

## 熱性けいれん、熱性けいれんプラス、及び乳児重症 ミオクロニーてんかんの遺伝子解析と遺伝子診断の設定

Genetic analysis study of febrile seizure, generalized epilepsy with  
febrile seizure plus, and severe myoclonic epilepsy in infancy to  
establish genetic diagnosis of the convulsive disorders.

兼子 直<sup>1)</sup>, 岡田 元宏<sup>1)</sup>, 朱 剛<sup>1)</sup>, 金井 数明<sup>1,2)</sup>, 福間 五龍<sup>3)</sup>  
廣瀬 伸一<sup>3)</sup>, 小島 俊男<sup>4)</sup>, 伊藤 正利<sup>5)</sup>, 小国 弘量<sup>6)</sup>  
The Epilepsy Genetics Study Group, Japan

要旨：熱性けいれん(FS),全般てんかん熱性けいれんプラス(GEFS+),乳児重症ミオクロニーてんかん(SMEI)はそれぞれ発熱と関連して発症するけいれん性疾患であるが,臨床症状・重症度・予後・薬剤に対する反応性などが著しく異なる。これらの疾患に対する遺伝子診断法を確立するために,今回以下の研究を行った;A)熱性けいれんに対する5cM単位でのゲノムワイド連鎖解析,B)SMEI及び辺縁型SMEI(SMEB)にたいするナトリウムチャネル遺伝子変異解析,C)GEFS+/SMEI/SMEBにおけるSCN1Aミスセンス変異に関する遺伝子型-表現型相関に関するメタ解析,D)上記疾患の候補遺伝子に対するゲノムワイド包括的変異解析。結果として,SMEI/SMEB患者に高頻度(44.8%)にSCN1A変異を認め,その頻度はSMEB群(25.9%)よりもSMEI群(61.3%)に多く, truncation変異はSMEI群にのみ認められた。上記の結果はSMEBはSMEIと遺伝学的に同一の疾患である事を示唆した。SCN1Aのミスセンス変異はGEFS+/SMEI/SMEBのいずれの表現型も取りえたが,SMEI/SMEBを生じる変異は遺伝子中のボア形成領域に高頻度に認められ,またボア形成領域のミスセンス変異はより臨床症状が重篤である傾向を示した。また研究Dでは上記疾患患者より新規遺伝子Xにおける病的意義の疑われる変異を認めた。GEFS+やSMEIで原因となる遺伝子変異が不明であるものが未だ多数にのぼり,今後とも新規責任遺伝子の探求が必要と考えられる。今後より多くの症例を集め,これまで既知の責任遺伝子の変異の種類や局在,それぞれ遺伝子変異の質的意義(機能解析など)などを解析して遺伝子型-表現型相関をより一層明らかにしていく一方で,新たな責任遺伝子とその機能を明らかにしていくことにより,FS/GEFS+/SMEIのより精度の高い遺伝子診断の設定が可能となると考えられる。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2004;16:91-100

**Key Words** : febrile seizure, generalized epilepsy with febrile seizures plus, severe myoclonic epilepsy in infancy, ion channel, genetic diagnosis

<sup>1)</sup> 弘前大学神経精神科, <sup>2)</sup> 千葉大学神経内科, <sup>3)</sup> 福岡大学小児科, <sup>4)</sup> 理研ゲノム科学総合研究センター, ゲノム機能解析研究チーム, <sup>5)</sup> 滋賀県立小児保健医療センター, <sup>6)</sup> 東京女子医科大学小児科  
Sunao Kaneko<sup>1)</sup>, Motohiro Okada<sup>1)</sup>, Gang Zhu<sup>1)</sup>, Kazuaki Kanai<sup>2)</sup>, Goryu Fukuma<sup>3)</sup>, Sin-ichi Hirose<sup>3)</sup>,  
Toshio Kojima<sup>4)</sup>, Masatoshi Ito<sup>5)</sup>, Hirokazu Oguni<sup>6)</sup>, The Epilepsy Genetic Study Group, Japan.  
<sup>1)</sup> Department of Neuropsychiatry, Hirosaki University school of Medicine, Aomori, Japan; <sup>2)</sup> Department  
of Neurology, Chiba University School of Medicine; <sup>3)</sup> Department of Pediatrics, Fukuoka University;  
<sup>4)</sup> Human Genome Research Group, RIKEN Genomic Sciences Center; <sup>5)</sup> Department of Pediatrics, Shiga  
Medical Center for Children; <sup>6)</sup> Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University

## 序 文

乳児・小児期に発熱と関連して発症するいくつかのけいれん性疾患が知られている。

最も代表的なのが熱性けいれん (FS) であり、6歳以下の全小児の数%が罹患し (日本では7-8%前後といわれる)<sup>1)</sup>、また最も頻繁に見られるけいれん性疾患でもある。これらのうち約5%が後にてんかんを発症するとされ、てんかん患者における熱性けいれんの有病率は10%以上と高い<sup>2)</sup>。熱性けいれんの頻度は日本人で高く、しばしば家族歴を伴う。

一方、全般てんかん熱性けいれんプラス (GEFS+) は常染色体優性遺伝を示し、6歳を越えてなお生じる有熱時のけいれんとその後の高頻度の無熱性けいれんを特徴とする家族性てんかん症候群であって熱性けいれんの亜型と考えられている<sup>3)</sup>。

乳児重症ミオクロニーてんかん (SMEI) はまれな弧発性の疾患で、当初は有熱時の全般性けいれんをもって乳児期に発症する。その後ミオクローヌス、欠神発作、部分発作などを示すが、生後2年目ごろから精神運動発達が遅れる薬剤抵抗性の予後不良なてんかんである<sup>3)</sup>。

これら3つの疾患はそれぞれ予後が異なるてんかん類型であり、責任遺伝子が判明するとその分子病態の解明、新たな治療法の開発、遺伝子診断へとつながる可能性がある。とくに、これらの類型を早期に診断することは対策・予後を検討する上で重要である。

これまでの遺伝子解析の結果からGEFS+の責任遺伝子としてNa<sup>+</sup>チャネル (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN1B*) 及びGABA<sub>A</sub>受容体のサブユニットを構成する遺伝子 (*GABRG2*, *GABRD*) の変異が報告され<sup>4-8)</sup>、SMEIでも*SCN1A*, *GABRG2*の関与が指摘されている<sup>9, 10)</sup>。加えて、頻回の強直間代発作を伴う難治性小児てんかん (ICEGTC) でも*SCN1A*の変異が報告されている<sup>11)</sup>。

そこで、乳児・小児期に発熱と関連して発症するけいれん性疾患の遺伝子診断の設定を目的に、これらのてんかん類型と遺伝子異常

の関連解析を中心に今回は以下のような研究を行った。

- A. FSの責任遺伝子 (座) 解析
- B. SMEIのNa<sup>+</sup>チャネル遺伝子変異解析
- C. *SCN1A*ミスセンス変異における遺伝子型-表現型関連解析
- D. GEFS+/SMEIにおける候補遺伝子に対する網羅的遺伝子解析研究

## 対象と方法

### A. FSの責任遺伝子 (座) 解析

FS 96症例に対し5cM単位でゲノムワイドスキャンを行った。

### B. SMEIのNa<sup>+</sup>チャネル遺伝子変異解析

SMEIの診断基準を完全に満たすものをSMEI中核群 (SMEI) と定義し、このSMEI 31症例と、SMEIの診断基準の多くを満たすが一部の基準のみを満たさない (ミオクロニー発作ないし非定型欠神発作を呈さない) ものをSMEI辺縁群 (SMEB) と定義しこのSMEB 27症例をあわせた計58症例に対してNa<sup>+</sup>チャネル遺伝子 (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN1B*, *SCN2B*) の変異解析を直接シーケンス法で検討した<sup>12)</sup>。

### C. *SCN1A*ミスセンス変異における遺伝子型-表現型関連解析

B研究で認められたSMEIでの*SCN1A*ミスセンス変異10種及びこれまでにてんかん・熱性けいれん遺伝 (子) 研究グループから報告されているGEFS+での*SCN1A*ミスセンス変異2種を、国内外の他のグループから報告されているGEFS+/SMEIでの*SCN1A*ミスセンス変異56種と合わせ遺伝子型-表現型関連について解析を行った。SMEIに関してはその臨床症状も検討した<sup>13)</sup>。

### D. GEFS+/SMEIにおける網羅的遺伝子解析研究

GEFS+ 103症例、SMEIは上記58症例に加え27症例を対象とし、複数の候補遺伝子に対して網羅的に直接シーケンス法を施行し、

Tab.1 Summary of the results of genetic analyses and clinical features of patients

No.	Diagnosis	Sex	Exon	Mutation	Age of onset	Myoclonic seizures	Atypical absence	Psychomotor retardation <sup>1)</sup>
1	core SMEI	F	3	V144fsX148	< 1year old	+	+	moderate
2	core SMEI	F	5	R222X	< 1year old	+	+	severe
3	core SMEI	F	4	W190R	< 1year old	-	+	moderate
4	core SMEI	M	9	E435X	< 1year old	+	-	mild
5	core SMEI	F	12	R701X	< 1year old	+	+	severe
6	core SMEI	F	12	R701X	< 1year old	+	-	moderate
7	core SMEI	F	15	M924I	< 1year old	+	+	moderate
8	core SMEI	F	15	R936C	< 1year old	+	-	moderate
9	core SMEI	F	15	W942X	< 1year old	-	+	moderate
10	core SMEI	F	17	L1165fsX1172	< 1year old	+	+	moderate
11	core SMEI	M	21	R1397X	< 1year old	+	-	moderate
12	core SMEI	F	25	M1549del	< 1year old	+	+	moderate
13	core SMEI	F	26-1	R1635X	< 1year old	+	-	moderate
14	core SMEI	F	26-1	F1682S	13 months old <sup>1)</sup>	+	-	severe
15	core SMEI	F	26-1	Y1684C	< 1year old	+	+	severe
16	core SMEI	M	26-2	Y1771C	< 1year old	-	+	mild
17	core SMEI	M	26-3	R1882X	< 1year old	-	-	moderate
18	core SMEI	M	26-3	R1882X	< 1year old	+	-	moderate
19	core SMEI	F	26-3	R1902X	< 1year old	+	-	mild
20	core SMEI	M	-	-	< 1year old	+	+	severe
21	core SMEI	M	-	-	< 1year old	+	-	moderate
22	core SMEI	M	-	-	< 1year old	+	-	moderate
23	core SMEI	F	-	-	< 1year old	+	+	severe
24	core SMEI	F	-	-	< 1year old	+	+	moderate
25	core SMEI	M	-	-	< 1year old	+	-	severe
26	core SMEI	F	-	-	< 1year old	+	+	severe
27	core SMEI	M	-	-	< 1year old	+	+	severe
28	core SMEI	F	-	-	< 1year old	+	-	moderate
29	core SMEI	F	-	-	< 1year old	-	+	severe
30	core SMEI	F	-	-	< 1year old	-	+	moderate
31	core SMEI	F	-	-	< 1year old	-	+	severe
32	SMEB	M	2	R101Q	< 1year old	-	-	moderate
33	SMEB	F	15	M924I	< 1year old	-	-	mild
34	SMEB	F	15	V934A	< 1year old	-	-	moderate
35	SMEB	M	15	R936C	< 1year old	-	-	severe
36	SMEB	F	15	R936H	< 1year old	-	-	severe
37	SMEB	F	21	L1345P	< 1year old	-	-	moderate
38	SMEB	F	26-2	F1756del	< 1year old	-	-	severe
39	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	moderate
40	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	moderate
41	SMEB	M	-	-	< 1year old	-	-	moderate
42	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	severe
43	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	mild
44	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	severe
45	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	moderate
46	SMEB	M	-	-	< 1year old	-	-	severe
47	SMEB	M	-	-	< 1year old	-	-	moderate
48	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	moderate
49	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	moderate
50	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	mild
51	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	severe
52	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	mild
53	SMEB	M	-	-	< 1year old	-	-	moderate
54	SMEB	F	-	-	< 1year old	-	-	moderate
55	SMEB	M	-	-	< 1year old	-	-	moderate
56	SMEB	M	-	-	< 1year old	-	-	moderate
57	SMEB	M	-	-	< 1year old	-	-	moderate
58	SMEB	M	-	-	< 1year old	-	-	moderate

SMEI: core severe myoclonic epilepsy in infancy and SMEB: borderline SMEI

<sup>1)</sup> See the detail in the text, <sup>2)</sup> Mild: IQ/DQ=60-80; moderate, 30-60; severe, less than 30.

病的意義のある遺伝子変異の検索を行った。

## 結果

### A. FSの責任遺伝子(座)解析

FSに関しては現在も解析中であり、最終の結果は得られていない。

### B. SMEIのNa<sup>+</sup>チャネル遺伝子変異解析

SMEI/SMEB 58症例に対してNa<sup>+</sup>チャネ

ル遺伝子(SCN1A, SCN2A, SCN1B, SCN2B)の変異解析を直接シーケンス法で検討した結果、SCN1Aの変異は26例に認められた(44.8%)。変異はSMEIでは31例中19例(61.3%)、SMEBでは27例中7例(25.9%)であった(Tab.1)。変異の内訳は全体でナンセンス10例、フレームシフト2例、インフレームデリション2例、ミスセンス12例であり、SMEIではナンセンス10例、フ

**Tab.2** Individuals with mutations of Na<sup>+</sup> channel  $\alpha 1$  subunit gene *SCN1A*

Mutations	SMEI (n=31)	SMEB (n=27)	p
Without mutations	12 (38.7%)	20 (74.1%)	
With mutations	19 (61.3%)	7 (25.9%)	<0.05*
Missense mutations <sup>b</sup>	7 (22.6%)	7 (25.9%)	
Truncation mutations	12 (38.7%)	0 (0%)	<0.01 <sup>c</sup>
Nonsense	10	0	
Frame-shift	2	0	

SMEI: core severe myoclonic epilepsy in infancy, SMEB: borderline cases of severe myoclonic epilepsy in infancy (see diagnostic criteria in Materials and Methods).

\*Continuity-adjusted  $\chi^2$  test. <sup>b</sup>Two deletion mutations, c.461\_3delAAT: M1549del and c.5266\_8delTTT: F1756del were included in SMEI and SMEB, respectively. Two missense mutations, c.2772G>C: M924I and c.2772G>A: M924I were found in both SMEI and SMEB. <sup>c</sup>Cochran-Mantel-Haenszel statistics.

レームシフト2例, インフレームデリーション1例, ミスセンス6例であり, SMEBではインフレームデリーション1例, ミスセンス6例であった。全体としてSMEIにおいて*SCN1A*変異が認められる頻度が高く ( $p < 0.05$ ), truncation変異はSMEIに有意に多かった ( $p < 0.01$ ) (Tab.2)。

2種のミスセンス変異はSMEIとSMEBの双方に認められた。

### C. *SCN1A* ミスセンス変異における 遺伝子型-表現型関連解析

*SCN1A*はS1からS6までの6回膜貫通領域からなる相同ドメイン領域を4回繰り返した構造をもち, このうちS4は電位センサー領域, S5からS6まではイオンが通過するポア形成領域を形成している。このためGEFS+ / SMEIでの*SCN1A*ミスセンス変異について遺伝子型-表現型関連について解析を行うにあたり, *SCN1A*をその機能からポア形成領域, ポア形成領域を除いた相同ドメイン領域, 相同ドメイン領域以外の領域の3つのグループに分け解析した。結果として, *SCN1A*を先のように3つの領域に分けた場合GEFS+とSMEIのミスセンス変異の分布は有意に異なり ( $p < 0.05$ ), SMEI群では*SCN1A*遺伝子中のポア形成領域に変異が集中していた

**Tab.3** Distribution patterns of missense mutations in GEFS+, SMEI, SMEB, and the total SMEI group

	GEFS+	SMEI	SMEB	SMEIBS
S1	0	2	0	2
S1-S2 linker	1	0	0	0
S2	1	2	1 <sup>†</sup>	3
S2-S3 linker	1	1	0	1
S3	1	1	0	1
S3-S4 linker	0	0	1	1
S4	3	2	0	2
S4-S5 linker	1 <sup>‡</sup>	2 <sup>‡</sup>	0	2
interdomain linker	1	1	1 <sup>†</sup>	2
N-terminal	0	3	1	4
C-terminal	1 <sup>‡</sup>	3	1	5 <sup>‡</sup>

Pale shadowed area shows the "voltage sensor" region in *SCN1A*  
Dark shadowed area shows the "pore" forming region in *SCN1A*

<sup>†</sup>: P1668A and M1852T are counted in both GEFS+ and SMEI, and T1709I both in both GEFS+ and SMEB

<sup>‡</sup>: F1692S is counted only in SMEI, because the father of the patient with F1692S showed only simple FS.

<sup>†</sup>: T808S/N1011S is counted both in S2 and in the interlinker domain.

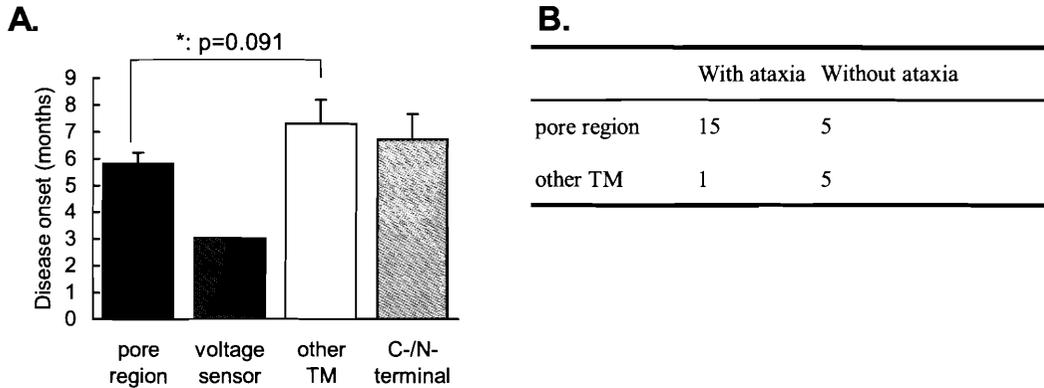
<sup>‡</sup>: R931C, M934I, and R946C are counted both in SMEI and SMEB.

(Tab.3)。ポア形成領域に関しては, SMEI内ではポア形成領域に変異を有するものは失調症状を伴う頻度が有意に高く ( $p < 0.05$ ), また発症年齢も早期である傾向を示し ( $p < 0.10$ ), 臨床症状がより重篤であることが示された (Fig.1)。

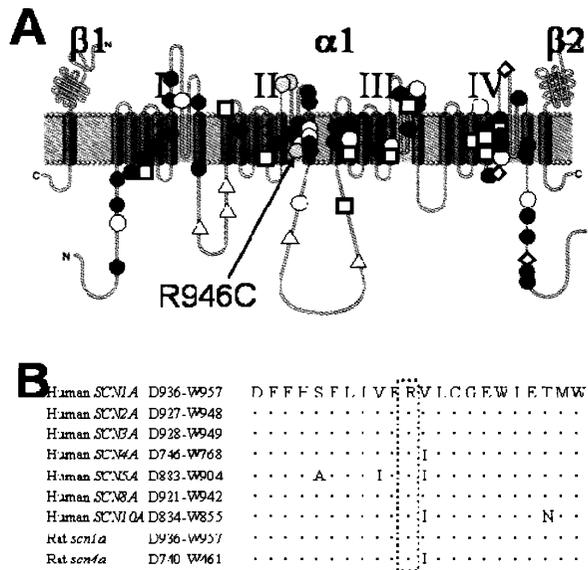
またSMEIをきたすミスセンス変異の質的意義を検討していく中で, 今回の研究で見出されたR946C変異が, イオン選択性の異常を呈することが既に報告されているラット *scn4a*のR750C変異と相同であることが判明した (Fig.2)。

### D. GEFS+ / SMEIにおける網羅的遺伝子解析研究

GEFS+ 103症例, SMEIは上記58症例に加え27症例を対象とし, 複数の候補遺伝子に対して網羅的に直接シーケンス法を施行し, 病的意義のある遺伝子変異の検索を行った結果, 遺伝子多型では無く, 病的意義が推測される遺伝子変異 (*gene X*)を発見した。現在GEFS+, SMEIにどのように関連しているかその機能を検討中である。



**Fig.1** Result of clinical data analysis. (A) Mean disease onset in the total SMEI group classified by mutation location. Pore region; mutations present in that region (S5, S6, or S5-S6 linker). Voltage sensor; mutations present in the voltage sensor region (S4). Insulating region; mutations in internal homologous regions other than the pore and voltage sensor regions. C-/N-terminal; mutations in the C- or N-terminal. \* $p=0.091$ . (B) The number of subjects with/without ataxia in the total SMEI group divided according to the mutation location. With ataxia; number of SMEI patients with ataxia. Without ataxia; number of SMEI patients without ataxia. \*  $p=0.018$



**Fig.2** (A) Distribution of reported missense mutations in *SCN1A*. Solid-circle: missense mutation identified in SMEI patients; open-circle: mutation identified in SMEB, meshed-circle: mutation identified both in SMEI and SMEB; open-square: mutation identified in GEFS+; open-diamond: mutation identified both in an GEFS+ and SMEI/SMEB patients; open-triangle: mutation identified in patients with idiopathic generalized epilepsy. R946C is indicated by the arrow. (B) evolutionary conservation of arginine residue 946 (R946) and amino acid alignment near it. R946 and surrounding amino acid alignment are highly conserved among *SCN1A*, *SCN4A*, and *scn4a*. R946 in *SCN1A* is comparable to R756 in *SCN4A* and R750 in *scn4a* (enclosed by the dotted box).

## 考 察

研究A.のFSについては遺伝子座位、遺伝子については現在も解析中であり、結果は別に報告する予定である。

研究B.ではSMEIの診断基準の全てを満たすSMEI中核群において高率にSCN1A変異を認め、SMEIの診断基準の一部を満たさないだけで臨床像は類似するSMEI辺縁群というべき一群でもSCN1A変異が認められることを確認した。これは他のグループからの報告とも合致するものであり<sup>11, 14)</sup>、SMEIとSMEBは遺伝子に同一の症候群と考えられた。また、truncation変異はSMEI中核群に有意に多かったことは、truncation変異がloss of functionを呈し多くの場合重篤な機能異常を伴うことを考えると、"ナトリウムチャンネルにより重篤な機能障害が生じると、より多彩で重篤な臨床症状を呈する"という仮説を提示するものであった。

一方で、当研究においてもSMEI/SMEB双方でSCN1Aのミスセンス変異が見出され、他グループの報告と合致していた<sup>11, 14)</sup>。当初SMEIでSCN1Aの変異が報告された際、そのほとんどはtruncation変異であったが、その後SMEIにおけるSCN1A変異の報告が続き、その中でSCN1Aのミスセンス変異の報告も相次ぎ、中には1家系内にGEFS+とSMEIの両者が存在するような家系まで報告されている<sup>11)</sup>。

Gain of functionを示すSCN1Aのミスセンス変異がGEFS+で報告され、SMEIでもSCN1Aのtruncation変異とミスセンス変異の双方が報告されたことはSMEI/GEFS+の分子病態に大きな謎を投げかけることとなった。Truncation変異はloss of functionをきたすとされるため、SCN1Aではgain of functionでもloss of functionでもてんかんが生じるということ、さらには同じようなミスセンス変異でSMEIとGEFS+という重篤度・予後・治療反応性などが著しく異なる臨床病型をとりうるということが示されることとなった<sup>15)</sup>。換言すると、SCN1Aは神経系全体に幅広く存在

する分子種で興奮系にも抑制系にも豊富に存在するので、これまでの興奮系・抑制系のバランス破綻仮説ではこれらの分子病態は全く説明できないということになる。

このため、"同じようなミスセンス変異でSMEIとGEFS+という重篤度・予後・治療反応性などが著しく異なる臨床病型をとりうる"という疑問に対し、国内外のグループから報告されているGEFS+/SMEIでのSCN1Aミスセンス変異につき遺伝子型-表現型関連について解析を行った。これはまたSCN1A変異の遺伝子型-発現型相関をより明らかにすることにより、将来のてんかんの遺伝子診断へ向けた一歩となるものである。

結果としてSMEIでのSCN1Aミスセンス変異は、遺伝子内のポア形成領域に有意に多く存在し、臨床症状でもポア形成領域のミスセンス変異はSMEIにおいて失調症状の随伴と有意に相関し、発症時期も早期である傾向を示した。

ポア形成領域は遺伝子内でイオンが通過する穴(ポア)を形成するだけでなく、チャンネルのキネティクスやイオン選択性などに重要な役割を果たし、チャンネル遺伝子の"vital part"を形成している<sup>16, 17)</sup>。このため、ポア形成部位のミスセンス変異は他の部位の変異に比べより強いチャンネル機能異常を引き起こすことが推定される。このため、SMEIでSCN1Aのポア形成領域に有意に変異が多く見出されるということは、"より重篤なチャンネル機能異常はより多彩で重篤な臨床症状を呈する"という研究Bで示された仮説を支持するものと考えられる。

SMEI/SMEBの双方の患者で認められたR946C変異がラット*scn4a*のR750C変異と相同であることが判明したが<sup>13)</sup>、この*scn4a* R750C変異は、培養細胞を用いた発現系による機能解析結果では通常のナトリウムチャンネルには無いK<sup>+</sup>に対する透過性や、NH<sub>3</sub><sup>+</sup>イオンに対する透過性が通常の数倍になるなどの異常を呈する<sup>17)</sup>。これは、ポア領域のミスセンス変異が他の部位に比べて"より重篤な機能異常"を呈するという仮説を支持し、この

イオン選択性異常という機序がR946C変異のSMEI・SMEB発症の病態生理に関わっている可能性がある。イオン選択性の異常は、神経筋チャネルパチーでは機序の1つとして想定はされているがその実在は証明されてこなかったものであり、この発見はてんかんの分子病態学だけでなくチャネルパチー全体の理解を深めるものである。

ただ、"より重篤なチャネル機能の障害"が最終的にいかなる機序を持ってSMEI/SMEB（あるいはGEFS+）の発症にいたるのか、ということに関しては未だ不明である。今回の研究Cの解析では変異の遺伝子内の局在のみを検討し、そのアミノ酸置換等は検討できなかった。これは主にアミノ酸置換の質を検討するに十分な症例数が不足していたためである。またtruncation変異はC末端に多い事なども指摘されており<sup>18)</sup>、変異の遺伝子内局在やアミノ酸置換の質の影響などについては今後の更なる検討が必要である。

一方で、今回の研究BではSMEI群でのSCN1A変異の有病率は44.8%であり、残余の50%強の患者ではNa<sup>+</sup>チャネル遺伝子の変異は認められなかった。また当研究とは別にてんかん・熱性けいれん遺伝子研究グループがGEFS+で行った遺伝子解析でも、Na<sup>+</sup>チャネル遺伝子変異が認められたのは全体の約10%程度であった。これらの事実は、GEFS+・SMEIともに未知の原因遺伝子が存在することを示唆する。

そのため、更なる責任遺伝子を求め研究Dを行った。SMEI群におけるGABRG2遺伝子変異およびSMEI・GEFS+の発症者に変異が認められた遺伝子 (*gene X*) の変異に関する報告は、現在その機能を解析中であり、別の機会に行う予定である。

今後より多くの症例を集め、これまで既知の責任遺伝子の変異の種類や局在、それぞれの遺伝子変異の質的意義（機能解析など）などを解析し、遺伝子型-表現型相関をより一層明らかにしていく一方で、新たな責任遺伝子とその機能を明らかにしていくことにより、GEFS+とSMEIのより精度の高い遺伝

子診断の設定が可能となる。てんかんの責任（感受性）遺伝子解析を進め遺伝子診断を可能にしていく上での究極の目的の1つは、てんかんの遺伝子解析によって正確な予後予測や最適な使用薬剤選択を行い、また異なる臨床病型を取り得る場合には早期からの介入によってより重篤な臨床病型を回避することができるような個別化医療の開発である。SCN1A変異に関しては同一の変異によってGEFS+とSMEIの双方の発症者が存在する家系も報告されており、これは他の遺伝子の関与あるいは遺伝子変異を有していたとしても、何らかの治療的介入により、重篤な臨床病型を回避できる可能性を示唆するものと考えられる。今後FSの責任遺伝子が判明し、GEFS+・SMEIの病態が明確になるとFS・GEFS+・SMEIの遺伝子診断とその臨床的応用が可能になるものと考えられる。

#### 文 献

- 1) 兼子 直. てんかん教室, 改訂2版. 新興医学出版, 東京, 2003.
- 2) A Hamati-Haddad, B Abou-Khalil. Epilepsy diagnosis and localization in patients with antecedent childhood febrile convulsions. *Neurol* 1998; **50**, 917-922
- 3) Kaneko S, Okada M, Iwasa H, et al. Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neurosci Res*. 2002; **44**, 11-30
- 4) Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, et al. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet*. 2000; **24**, 343-5
- 5) Sugawara T, Tsurubuchi Tsurubuchi, Agarwala KL, et al. A missense mutation of the Na<sup>+</sup> channel alpha II subunit gene Na (v) 1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; **98**, 6384-9
- 6) Wallace RH, Wang DW, Singh R, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet*. 1998; **19**, 366-70

- 7) Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, et al. First genetic evidence of GABA (A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet.* 2001; **28**, 46-8
- 8) Dibbens LM, Feng HJ, Richard MC, et al. *GABRD* encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABA<sub>A</sub> receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet.* 2004; **13**, 1315-9
- 9) Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, et al. De novo mutations in the sodium-channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet.* 2001; **68**, 1327-32
- 10) Harkin LA, Bowser DN, Dibbens LM, et al. Truncation of the GABA (A) -receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet.* 2002; **70**, 530-6
- 11) Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, et al. Mutations of sodium channel alpha subunit type 1 (*SCN1A*) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 2003; **126**, 531-46.
- 12) Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, et al. Mutations of neuronal voltage-gated Na<sup>+</sup> channel  $\alpha 1$  subunit gene *SCN1A* in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia* 2004; **45**, 140-148.
- 13) Kanai K, Hirose S, Oguni H, et al. Effect of localization of missense mutations in *SCN1A* on epilepsy phenotype severity. *Neurology* 2004; **63**, 329-334.
- 14) Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, et al. Significant correlation of the *SCN1A* mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; **295**, 17-23.
- 15) Noebels JL. Exploring new gene discoveries in idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 2003; **44** Suppl 2, 16-21
- 16) Chen Z, Alcayaga C, Suarez-Isla BA, et al. A "minimal" sodium channel construct consisting of ligated S5-P-S6 segments forms a toxin-activatable Ionophore. *J Biol Chem.* 2002; **277**, 24653-8.
- 17) Yamagishi T, Li RA, Hsu K, Marban E, Tomaselli GF. Molecular architecture of the voltage-dependent Na channel: functional evidence for alpha helices in the pore. *J Gen Physiol.* 2001; **118**, 171-82.
- 18) Wallace RH, Hodgson BL, Grinton BE, et al. Sodium channel  $\alpha 1$ -subunit mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy and infantile spasms. *Neurology* 2003; **61**, 765-769.

## Summary

### **Genetic analysis study of febrile seizure, generalized epilepsy with febrile seizure plus, and severe myoclonic epilepsy in infancy to establish genetic diagnosis of the convulsive disorders.**

Sunao Kaneko, Motohiro Okada, Gang Zhu, Kazuaki Kanai, Goryu Fukuma, Sin-ichi Hirose, Toshio Kojima, Masatoshi Ito, Hirokazu Oguni, and The Epilepsy Genetic Study Group, Japan.

**Purpose and Method:** Febrile seizure (FS), generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+), and severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) are all known as convulsive disorders associated with fevers in infancy and childhood, but are distinct from each other in terms of its clinical symptoms, severity, prognosis, and responses to antiepileptic drugs. To establish the genetic diagnosis for these fever-associated convulsive disorders, we studied A) the linkage study with 5cM genome-wide scan for 96 patients with febrile seizure, B) the mutation analysis of sodium channels in the 58 patients with SMEI and borderline SMEI (SMEB), C) the meta-analysis of the genotype-phenotype relationship in the patients with GEFS+/SMEI/SMEB with *SCN1A* missense mutations, and D) comprehensive genome-wide mutation screening for candidate genes for convulsive disorders. **Results:** *SCN1A* mutations were identified in 26 (44.8%) of 58 individuals, and were more frequent in SMEI group (61.3%) than in SMEB group (25.9%). Mutations resulting in a molecular truncation were found only in SMEI group. Mutations in SMEI/SMEB occurred more frequently in the "pore" region of *SCN1A* than did those with GEFS+. These SMEI mutations in the "pore" regions were more strongly associated than mutations in other regions with the presence of ataxia and tendency to early onset of the disease. The possibility of participation of ion selectivity dysfunction of the channel in the pathogenesis of SMEI was suggested by a mutation in the pore region (R946C) identified in a SMEI patient. We found the mutations of new responsible *gene X* in the patients with GEFS+/SMEI. **Conclusions:** Our results confirm that SMEB is a part of the SMEI spectrum. We found a significant phenotype-genotype relationship in GEFS+ and SMEI with *SCN1A* missense mutations, i.e., mutations in the pore region resulting in more severe sodium channel dysfunctions might be involved in the pathogenesis of SMEI, and this may produce the difference between GEFS+ and SMEI. Several mechanisms including abnormal ion selectivity may also be involved in the "more severe sodium channel dysfunctions". The relatively low prevalence of sodium channels mutations in the patients with FS/GEFS+/SMEI suggests that other responsible or modifying genes will be involved in the pathogenesis of FS/GEFS+/SMEI, and our discovery of mutations of the gene X will be one of crucial keys for the establishment of genetic diagnosis of epilepsy.

**Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found.2004;16:91-100**