

## 論文の内容の要旨

論文題目 急性脳症における疾患感受性遺伝子の探索と機能解析

氏名 柴田 明子

### 【背景】

急性脳症は、主に小児期に感染症に続発して急性発症する意識障害を主徴とする症候群である。病理学的には急激で広範囲な脳浮腫による機能障害である。症候としては、意識障害を特徴とし、けいれんをしばしば伴う。生来健康だった児に重度の神経学的後遺症を残すこともあるが、特異的な治療法は未だ確立されていない。

急性脳症の病態機序として、代謝異常、興奮毒性、サイトカインストームの3つが推定されている。急性脳症は臨床病理的特徴に基づき症候群分類されており、代謝異常を主な病態とする病型として古典的 **Reye** 症候群、サイトカインストームを主な病態とする病型として急性壊死性脳症 (ANE)、興奮毒性が主病態の病型としてけいれん重積型急性脳症(AESD)、難治頻回部分発作重積型急性脳症 (AERRPS/FIRES)、その他の病態が推測される病型として可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳炎・脳症(MERS) がある。

急性脳症の発症数が世界的にみて東アジアで多いことから、発症に何らかの遺伝要因が関与すると考えられている。また、急性脳症の環境要因として、アセチルサリチル酸やテオフィリンなどの薬剤や感染症がある。急性脳症は発症に遺伝要因と環境要因がともに影響する複雑な疾患である。一方、主にヨーロッパ人に発症する常染色体優性急性壊死性脳症 (ADANE) という原因遺伝子が同定されている急性脳症もある。

本研究では、急性脳症の病態機序の解明を目指し、疾患感受性遺伝子の探索を行った。孤発性の急性脳症に関する疾患感受性遺伝子の探索を行い、ADANE について原因遺伝子 *RANBP2* の機能解析を行った。

### 【研究1：急性脳症における *CPT2* 熱不安定性多型の関連解析】

<序文>急性脳症は各症候群によって、予後や先行感染の病原体は多様である。予後不良の重症な症候群として AESD、ANE などがあり、予後良好な軽症な症候群として MERS がある。また、MERS や ANE ではインフルエンザ性が多いのに対し、AESD はヒトヘルペスウイルス 6 型または 7 型によるものが多い。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 2 (*CPT2*) はミトコンドリア内膜に存在し、長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化に関わる酵素である。高温で酵素活性が低下する、*CPT2* 遺伝子の熱不安定性多型 rs2229291 と重症急性脳症との関連が報告されている。今回我々は、軽症な症候群 MERS も含む、より大きな急性脳症コホートについて、rs2229291 の患者対照関連解析を行った。

<方法>症例は AESD 239 例、MERS 40 例、ANE 47 例、AERRPS/FIRES 18 例を含む日本人急性脳症症例 416 例である。対照として本教室の先行教室で解析した健常日本人 100 人

の rs2229291 の遺伝子型情報を用いた。CPT2 エクソン 4 について Sanger 法で配列決定を行い、Cochran-Armitage 傾向検定 加法モデルを用いて患者対照関連解析を行った。インフルエンザや予後についても検討した。

<結果>rs2229291 は、MERS、AESD、および急性脳症全体と有意な関連を示した。残りの症候群では対照群との有意差は認められなかった。予後やインフルエンザウイルスと熱不安定性多型との有意な関連は認められなかった。

<考察>CPT2 熱不安定性多型は軽症から重症の幅広い重症度の急性脳症症候群の共通した遺伝的リスク因子であると考えられる。発熱時のミトコンドリア代謝障害が急性脳症の様々な症候群に共通する根底となる疾患発症機序であることを示唆している。この多型のマイナーアレル頻度が東アジア人で高いことは注目すべき点と言える。このことにより、東アジアで急性脳症の発症率が高いことが部分的には説明されるかもしれない。治療的観点からは、本研究は L-カルニチン、ビタミン B1 などの代謝レスキュー療法の急性脳症治療への導入を推奨する根拠の一端を提供するものと考えられる。

#### 【研究 2：けいれん重積型急性脳症における SCN1A, KCNQ2 レアバリエント関連解析】

<序文>AESD は、臨床的には二相性の経過を示すけいれん発作と頭部 MRI 上の皮質下病変が特徴の症候群である。AESD の主病態として、けいれん重積により上昇したグルタミン酸の興奮毒性が推定されている。電位依存型ナトリウムチャンネル $\alpha$ サブユニット 1 をコードする SCN1A のバリエントは、熱性けいれん、熱性けいれんを伴う全般性てんかんプラス、および Dravet 症候群などの発熱誘発性けいれん発作を呈する症候群において同定されている。電位依存性カリウムチャンネルをコードする KCNQ2 のバリエントは、良性家族性新生児発作および大田原症候群で同定されている。本研究では、AESD における SCN1A と KCNQ2 遺伝子のレアバリエント関連解析を行った。

<方法>症例は日本人 AESD 症例 175 例である。対照として日本人 3554 人の全ゲノムシーケンシングデータを含むデータベースを用いた。症例のうち 175 人に対して SCN1A、111 人について KCNQ2 の解析を行った。2 遺伝子の全エクソンを Sanger 法で配列決定した。非同義レアバリエント（サンプル MAF < 0.005）を対象とし、5 つのインシリコ解析のうち 4 つで有害と判定されたバリエントを有害レアバリエントとした。レアバリエント関連解析として、分散成分検定(SKAT)と負荷検定(WSS)を用いた。

<結果>症例群では、6 つの SCN1A 非同義レアバリエント、3 つ（のべ 4 つ）の KCNQ2 非同義レアバリエントが同定された。レアバリエント関連解析の結果、SCN1A は AESD と有意に関連しており、有害バリエントのみを対象とするとより有意な関連性を示した。KCNQ2 に関しては、症例群で非同義レアバリエントは多い傾向にはあったが、有意な関連性は認めなかった。

<考察>SCN1A レアバリエントと AESD との間に関連性があることを統計学的に初めて示した。SCN1A は AESD の疾患感受性遺伝子であることが明らかとなった。SCN1A とは対

照的に、*KCNQ2* と AESD との有意な関連性は認められなかった。生後早期には、GABA は神経興奮性に働き、*KCNQ2* チャネルは抑制系において中心的な役割を果たすが、AESD が好発する乳児期後期には抑制系において GABA が主体となり *KCNQ2* が果たす役割は相対的に小さくなるためかもしれない。今後の研究では GABA 作動系のこれらの発達的变化を考慮に入れる必要がある。

### 【研究 3：常染色体優性急性壊死性脳症の原因遺伝子 *RANBP2* の機能解析】

<序文>ADANE は、家族性・再発性に ANE 症状を示す疾患だが、予後や病巣に関して孤発性急性壊死性脳症と異なる特徴を有する。報告は主にヨーロッパ人で、日本人での発症はない。原因遺伝子として *RANBP2* が同定され、今までに *RANBP2* のロイシンリッチドメイン(LD)内に 4 変異が同定されている。*RANBP2* の LD は cytochrome *c* oxidase copper chaperone (COX11)の hexokinase 1(HK1)に対する阻害作用を抑制すること、*RANBP2* ヘテロノックアウトマウスの中樞神経系では HK1 と ATP が低下することが報告されている。我々は、ADANE の変異 *RANBP2* では LD を介した COX11 との結合性が低下し、その結果 HK1 の活性低下、ATP 産生低下が起き、発熱・炎症という酸化ストレス下でエネルギー代謝不全が起き、ADANE 発症へつながるといふ仮説を立てた。本研究では、ADANE の *RANBP2* 変異が COX11 との相互作用に影響を及ぼすか検討した。また、患者と対照のリンパ芽球を用いて細胞内 ATP 濃度の比較も行った。

<方法>患者と健常コントロールの cDNA から *RANBP2* バリエント c.1754 C>T, p.Thr585Met を含む変異型および野生型 pGEX-*RANBP2* ベクターを作成した。大腸菌に GST-*RANBP2* 融合タンパク質を発現させ、COX11 とのブルダウンアッセイを行い、Western Blotting によりタンパク質量を比較した。患者と日本人健常対照 10 人のリンパ芽球を用いて細胞内 ATP 濃度の比較を行った。

<結果>COX11/GST-*RANBP2* 比は変異型では野生型と比べて低下していた。独立した 3 サンプルで同様の結果が確認され、変異型では COX11 との結合が有意に低下していた。野生型と変異型で細胞内 ATP 濃度に明らかな差は認めなかった。

<考察>本研究では *RANBP2* の LD の機能異常により解糖系での COX11 との結合性が低下していることを確認した。

リンパ芽球においては野生型と変異型で ATP 濃度に明らかな差が認められなかった。平常時には野生型と変異型でのエネルギー代謝に明らかな差がない可能性や、神経系細胞以外では差が出ない可能性が考えられた。今後の研究として、酸化ストレス環境下での比較や ADANE の *RANBP2* バリエントを導入したモデル神経細胞における ATP や HK1 の検討も必要である。

### 【総括】

急性脳症の疾患感受性遺伝子として、メンデル遺伝性疾患の原因遺伝子、レアバリエント

からコモンバリエントに渡って、また機能としてはエネルギー代謝関連、神経興奮関連と多様な機能の遺伝子が急性脳症の疾患感受性遺伝子となっていることを明らかとした。複雑な疾患である急性脳症の発症には複数遺伝子のコモンまたはレアなバリエントが寄与しており、”common disease, multiple common and rare variants”仮説を裏付けた。急性脳症はエネルギー代謝不全、サイトカインストーム、興奮毒性という 3 病態が連関して発症に関与すると考えられており、それぞれの寄与の度合いにより多様な表現型の症候群を含有する症候群と考えられる。また、逆に臨床病理学的に同一の病態し同一の症候群と診断されても、患者により発症に寄与している疾患感受性遺伝子は多様である。急性脳症は多様な疾患感受性遺伝子が関与し、多様な病態をとりうる **heterogenous** な症候群である。

今後の研究では、より網羅的な疾患感受性遺伝子の同定や機能解析により急性脳症の遺伝的構造を明らかとし、病態機序のさらなる解明がなされることが考えられる。将来的には網羅的な遺伝学的スクリーニング検査により、急性脳症の高リスク群を早期発見し、発症予防や発症時の早期診断・治療が可能となることが期待される。また、疾患感受性遺伝子の分子生物学的機能を足掛かりとした早期診断のためのバイオマーカーの同定、個々の患者のもつ遺伝因子からイオンチャネル受容体拮抗薬や代謝補助治療などそれぞれの患者に適した治療を施すプレシジョン・メディシンなど多様な場面で臨床現場に活かされると考えられる。