

氏名	中山 東城
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Dravet 症候群における <i>SCN1A</i> 遺伝子プロモーター領域の欠失
論文審査委員	主査 教授 土屋 滋 教授 松原 洋一 教授 谷内 一彦

論文内容要旨

電位依存型 Na チャネル α サブユニット 1 型遺伝子 (*SCN1A*) の変異は、Dravet 症候群に代表される、小児難治てんかんの主要な原因のひとつである。Dravet 症候群においては、これまでに 500 以上の変異と翻訳領域の欠失・重複が同定されており、その病因には *SCN1A* 遺伝子のハプロ不全が関与していることが示唆されている。近年、*SCN1A* 遺伝子 5' 上流領域には複数の非翻訳エクソンが存在すること、その一部の非翻訳エクソン上流がプロモーター活性を有することが報告されているが、これまでの報告は一部のエクソンの検討に留まっており、また疾患との関連性についても未解明であった。そこで本研究では、*SCN1A* 5' 上流の非翻訳エクソンとそのプロモーター領域について包括的な検討を行い、さらに疾患との関連性について検証を行った。

まず、*SCN1A* 遺伝子の 5' 末端構造を 5'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE) により解析し、ヒト・マウス共に複雑な 5' 非翻訳領域を有しており、複数の非翻訳エクソンのうち、頻回に発現する 2 か所の非翻訳エクソンが存在していることを明らかにした。ルシュフェラーゼレポーター解析にてこの主要な 2 つの非翻訳エクソン上流のゲノム配列を検討したところ、神経系の SH-SY5Y 細胞・非神経系の HEK 細胞のいずれの系においても、有意なプロモーター活性を示し、同領域に *SCN1A* のプロモーターが存在していることが示唆された。この 2 つの非翻訳エクソンに対するプローブを用いたノーザンブロット解析、Single cell RT-PCR 解析から、ヒトにおいてこの 2 つのプロモーター領域は脳の種々の領域で同時に活性化され、また大多数の小脳プルキンエ神経細胞で両エクソンとも発現していることが明らかとなった。

これらの結果より、このプロモーター領域のヘテロ欠失では、*SCN1A* のハプロ不全が引き起こされるのではないかと推測した。そこで、このプロモーター領域の疾患への関与を検討するため、翻訳領域のリシーケンスで変異の認められない 130 名の小児難治性てんかん患者に対し、5' 非翻訳エクソンとその上流のプロモーター領域に対するプローブを用いた、Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 解析を施行した。その結果、解析を行った 71 名の Dravet 症候群患者において、5' 非翻訳エクソンとその上流プロモーター領域を含んでいるが、翻訳領域は巻き込まれていない新規のヘテロ欠失を 2 名に同定した。いずれの症例においても、Fluorescence in situ

hybridization (FISH)、または Long-range PCR 解析により、その欠失の存在が再確認された。別の Dravet 症候群患者 4 名においては翻訳領域の欠失・重複が、また小児難治性てんかん患者 1 名においては翻訳領域の欠失が認められた。

本研究は、*SCN1A* 5'領域の非翻訳エクソンが欠失しているが、翻訳エクソン、すなわち *SCN1A* の open reading frame が完全に保存された *SCN1A* 5'末端欠失という、新規の *SCN1A* 変異を提唱した。患者で同定された欠失領域は、プロモーター活性を有する領域を含んでいることから、この欠失が *SCN1A* の転写活性を下げ、コードする Nav1.1 チャンネル蛋白の発現を低下させることにより、てんかん発作を引き起こすものと考えられた。本研究により、*SCN1A* 5' 非翻訳領域とプロモーター領域の欠失が、Dravet 症候群やその関連疾患において、新たな病因となることが明らかとなった。

審査結果の要旨

博士論文題名 Dravet 症候群における *SCN1A* 遺伝子プロモーター領域の欠失

所属専攻・分野名 医科学 専攻・ 小児病態学 分野

学籍番号 氏名 中山 東城

電位依存型 Na チャネル α サブユニット 1 型遺伝子 (*SCN1A*) の変異は、Dravet 症候群に代表される、小児難治てんかんの主要な原因のひとつである。Dravet 症候群においては、これまでに 500 以上の変異と翻訳領域の欠失・重複が同定されており、その病因には *SCN1A* 遺伝子のハプロ不全が関与していることが示唆されている。近年、*SCN1A* 遺伝子 5' 上流領域には複数の非翻訳エクソンが存在すること、その一部の非翻訳エクソン上流がプロモーター活性を有することが報告されているが、これまでの報告は一部のエクソンの検討に留まっており、また疾患との関連性についても未解明であった。そこで本研究では、*SCN1A* 5' 上流の非翻訳エクソンとそのプロモーター領域について包括的な検討を行い、さらに疾患との関連性について検証を行った。

本研究では、まず *SCN1A* 遺伝子の 5' 末端構造を 5'-Rapid amplification of cDNA ends (RACE) により解析し、ヒト・マウス共に複雑な 5' 非翻訳領域を有しており、複数の非翻訳エクソンのうち、頻回に発現する 2 か所の非翻訳エクソンが存在していることを明らかにした。ルシュフェラーゼレポーター解析にてこの主要な 2 つの非翻訳エクソン上流のゲノム配列を検討したところ、神経系の SH-SY5Y 細胞・非神経系の HEK 細胞のいずれの系においても、有意なプロモーター活性を示し、同領域に *SCN1A* のプロモーターが存在していることが示唆された。この 2 つの非翻訳エクソンに対するプローブを用いたノーザンブロット解析、Single cell RT-PCR 解析から、ヒトにおいてこの 2 つのプロモーター領域は脳の種々の領域で同時に活性化され、また大多数の小脳プルキンエ神経細胞で両エクソンとも発現していることが明らかとなった。

これらの結果より、このプロモーター領域のヘテロ欠失では、*SCN1A* のハプロ不全が引き起こされるのではないかと推測した。そこで、このプロモーター領域の疾患への関与を検討するため、翻訳領域のリシークエンスで変異の認められない 130 名の小児難治性てんかん患者に対し、5' 非翻訳エクソンとその上流のプロモーター領域に対するプローブを用いた、Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 解析を施行した。その結果、解析を行った 71 名の Dravet 症候群患者において、5' 非翻訳エクソンとその上流プロモーター領域を含んでいるが、翻訳領域は巻き込まれていない新規のヘテロ欠失を 2 名に同定した。いずれの症例においても、Fluorescence in situ hybridization (FISH)、または Long-range PCR 解析により、その欠失の存在が再確認された。別の Dravet 症候群患者 4 名においては翻訳領域の欠失・重複が、また小児難治性てんかん患者 1 名においては翻訳領域の欠失が認められた。

本研究は、*SCN1A* 5' 領域の非翻訳エクソンが欠失しているが、翻訳エクソン、すなわち *SCN1A* の open reading frame が完全に保存された *SCN1A* 5' 末端欠失という、新規の *SCN1A* 変異を提唱したものである。患者で同定された欠失領域は、プロモーター活性を有する領域を含んでいることから、この欠失が *SCN1A* の転写活性を下げ、コードする Nav1.1 チャネル蛋白の発現を低下させることにより、てんかん発作を引き起こすものと考えられた。本研究は、*SCN1A* 5' 非翻訳領域とプロモーター領域の欠失が、Dravet 症候群やその関連疾患において、新たな病因となることを明らかにし、それは、プロモーター領域の変異による新しい疾患概念の提唱へとつながる知見であり、独創性にあふれた研究である。十分に学位に値する論文と考える。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。