

# Dravet 症候群患者に認められたカルシウムチャネル機能異常を引き起こす CACNB4 遺伝子変異

大守 伊織<sup>a\*</sup>, 大内田 守<sup>b</sup>, 御牧 信義<sup>c</sup>, 西木 禎一<sup>a</sup>, 富澤 一仁<sup>a</sup>, 松井 秀樹<sup>a</sup>

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 <sup>a</sup>細胞生理学, <sup>b</sup>分子遺伝学, <sup>c</sup>倉敷成人病センター 小児科

キーワード: てんかん, Dravet 症候群, CACNB4 遺伝子, SCN1A 遺伝子

## A CACNB4 mutation showing altered Ca<sub>v</sub>2.1 function in a patient with Dravet syndrome

Iori Ohmori<sup>a\*</sup>, Mamoru Ouchida<sup>b</sup>, Nobuyoshi Mimaki<sup>c</sup>, Teiichi Nishiki<sup>a</sup>, Kazuhito Tomizawa<sup>a</sup>, Hideki Matsui<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departments of Physiology, <sup>b</sup>Molecular Genetics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, <sup>c</sup>Pediatrics, Kurashiki Medical Center

### 緒 言

Dravet 症候群（乳児重症ミオクロニーてんかん MIM# 607208）は1歳未満から発症する悪性てんかんである。全身痙攣や半身痙攣がしばしば発熱によって誘発され遷延しやすく、痙攣が30分以上持続するてんかん重積状態に陥ることも多い。2歳以降には無熱時にもミオクロニー発作や部分発作などの様々な発作型も出現する。発症時には正常であった精神運動発達は、徐々に遅れが目立つようになり、小脳失調症状も加わって歩行が不安定になる。てんかんや熱性けいれんの家族歴が高い以外、神経画像検査でも明らかな異常は

認められず、病因は長らく不明のままであった。

Dravet 症候群の患者において、電位依存性ナトリウムチャネル  $\alpha 1$  サブユニット (Na<sub>v</sub>1.1, MIM# 182389) をコードする SCN1A 遺伝子異常が2001年に初めて報告された。その後、我々を含む多施設で Dravet 症候群患者の遺伝子解析が行われ、患者の約80%が SCN1A 遺伝子変異を持つことが明らかになった<sup>1,2)</sup>。しかし、痙攣性疾患の家族歴が25~71%と高率であるにも拘らず SCN1A 遺伝子変異の90%は、新規突然変異であった<sup>3)</sup>。Dravet 症候群の患者は、SCN1A 遺伝子変異以外にもけいれん感受性遺伝子をもつ可能性が考えられる<sup>4)</sup>。

我々は、38例の SCN1A 遺伝子変異をもつ Dravet 症候群の患者を対象に、熱性けいれんや特発性てんかんの発症に関連する SCN1B 遺伝子, GABRG2 遺伝子, CACNB4 遺伝子解析を行った。その結果、新規の SCN1A 遺伝子変異と CACNB4 遺伝子変異をもつ1

平成21年9月受理

\*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7109 FAX: 086-235-7111

E-mail: iori@md.okayama-u.ac.jp

### プロフィール



大守 伊織  
略 歴

昭和41年10月1日生

平成3年3月 高知医科大学卒業

平成7年3月 岡山大学大学院医学研究科修了

平成7年4月 岡山大学医学部附属病院 小児神経科 医員

平成12年7月 社会福祉法人旭川療育センター児童院 小児科勤務

平成13年7月 岡山大学医学部附属病院 小児神経科 医員

平成15年11月 米国 Vanderbilt University, Division of Genetic Medicine Postdoctoral research fellow

平成16年12月 岡山大学医歯薬学総合研究科細胞生理学 研究員

平成17年4月 岡山大学医歯薬学総合研究科細胞生理学 助手

平成19年4月 岡山大学医歯薬学総合研究科細胞生理学 助教

現在に至る

症例を見出した。その *CACNB4* 遺伝子変異は熱性けいれんの既往がある父親から遺伝していた。

## 材料と方法

### 1. 対象

以前に *SCN1A* 遺伝子解析が行われ<sup>5)</sup>、変異を認めた38例の Dravet 症候群患者を対象にした。Dravet 症候群の診断は ILAE 診断基準に従った。200例の健常者をコントロールとして用いた。

### 2. 遺伝子解析

ゲノム DNA は末梢血から抽出し、*SCN1B* 遺伝子、*GABRG2* 遺伝子、*CACNB4* 遺伝子のすべてのコーディングエクソンを直接塩基配列決定法によって解析した。遺伝子解析方法は以前の我々の論文のとおりである<sup>2)</sup>。本研究は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を受けて実施された。書面による同意をすべての患者の両親およびコントロール健常者から得た。

### 3. 突然変異導入によるプラスミドの構築

pCMV Script-ヒト *SCN1A* (野生型) および pCD8-IRES-ヒト *SCN1B* (野生型) は Dr. Al George (Vanderbilt University, Nashville, TN) から贈与された。*SCN1A* cDNA を鋳型に *SCN1A*-NOT-S1 プライマー (5'-AAG CGG CCG CAT GGA GCA AAC AGT GCT TGT A-3') と *SCN1A*-R568X-AS1 (5'-TTG CGG CCG CTC ACC TTG GTG AAA ATA GGG A-3') を用いて R568X 変異の DNA 断片を PCR で増幅した。PCR 産物を T4 DNA polymerase と T4 polynucleotide kinase で処理し、*EcoRV* で切断された pBluescript KS に組み込んだ。cDNA の塩基配列を確認後、*NotI* サイトで pIRES-EYFP ベクター (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) に組み替えた。

pCIneo-CACNB4 (野生型ラット *CACNB4* cDNA) を鋳型に、*CACNB4*-R468Q-S4 プライマー (5'-AGG GCC CAG AAG AGT AGG AAC CG -3') と AS1 (5'-TCC CCC TGA ACC TGA AAC AT -3') を用いて R468Q 変異の DNA 断片を作成した。PCR 産物を T4 DNA polymerase と T4 polynucleotide kinase で処理し、*HincII* で処理した pKF18K2 に組み込んだ。cDNA の塩基配列を確認後、*ApaI* および *NotI* で切断し、pCIneo-野生型 *CACNB4* を R468Q 変異に入れ替えた。

### 4. 電位依存性ナトリウムチャネルの電気生理解析

ナトリウムチャネル $\alpha$ サブユニットは、 $\beta$ サブユニッ

トによる機能調節をうけているため、変異型プラスミドと $\beta$ サブユニットの *SCN1B*, *SCN2B* 発現ベクターをトランスフェクション試薬を用いてヒト腎細胞 HEK293 に共発現させた。全細胞記録によるパッチクランプ法を用いた電気生理学的特性の検討は、以前の我々の方法に準じた。

### 5. 電位依存性カルシウムチャネルの電気生理解析

カルシウムチャネル  $\alpha 1A$  サブユニット<sup>6)</sup>と pCIneo-CACNB4 (野生型と R468Q) は  $\alpha 2\delta$  サブユニット<sup>7)</sup>を定常発現している BHK 細胞に一過性トランスフェクションにより共発現させた。BHK 細胞からの電流計測は、ナトリウムチャネルと同様にパッチクランプ法を用いた全細胞記録により行った。アンプは EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) を使い、電気生理学的特性の検討は、若森らの方法に準じて行った<sup>7)</sup>。

全てのデータは mean  $\pm$  SEM で表示し、Student's *t*-test によって野生型と変異型を比較した。P < 0.05 を有意差と見なした。

## 結 果

### 1. *SCN1B* 遺伝子、*GABRG2* 遺伝子、*CACNB4* 遺伝子解析

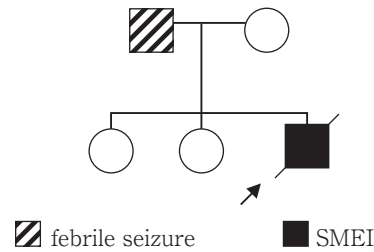
38例の *SCN1A* 遺伝子変異をもつ Dravet 症候群患者の中で、*SCN1B* 遺伝子と *GABRG2* 遺伝子に変異を持つ症例はなかったが、*CACNB4* 遺伝子変異を持つ症例を1例見出した。この発端者 A は *CACNB4* 遺伝子の R468Q ミスセンス変異と野生型をヘテロ接合にて持っていた (図 1 B)。この変異はカルシウムチャネル  $\beta$  サブユニットの C 末と  $\alpha 1$  サブユニットの C 末が結合する部位に存在していた (図 1 C)。この R468Q ミスセンス変異は、父親にも認められた。200例の健常者コントロール群に同変異は認められなかったため、遺伝子多型ではないと考えられた。発端者 A は *SCN1A* 遺伝子 R568X も検出されていたが、こちらは両親には認められなかった (図 1 D)。

### 2. 発端者 A の臨床所見

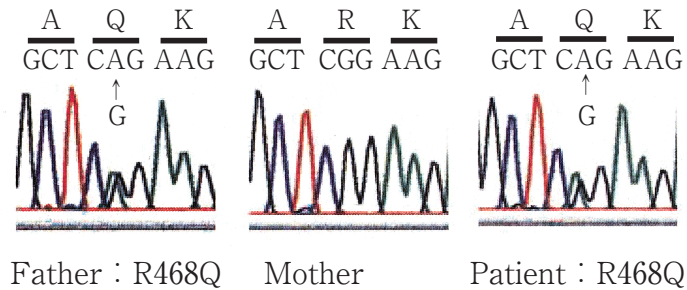
発端者 A は Dravet 症候群の 4 歳男児である。家系図は図 1 A に示した。家族歴については、父親に熱性けいれんの既往があった。

周産期には異常なく、乳児期早期発達に遅れはなかった。生後 3 ヶ月、熱性けいれんで発症し、1 週間後には無熱時の全身けいれん、生後 8 ヶ月にはミオクロ

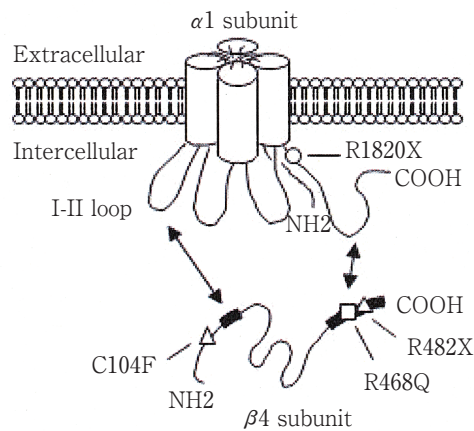
A Pedigree of the family



B Mutational analysis of the *CACNB4* gene



C



D Mutational analysis of the *SCN1A* gene

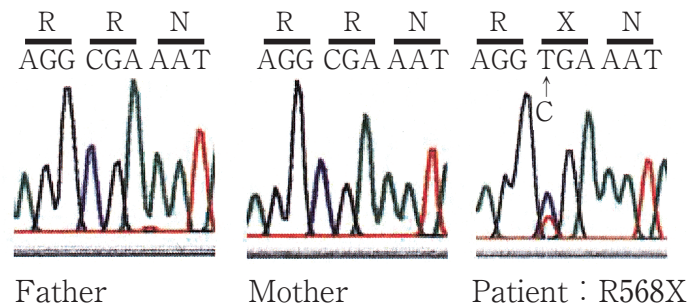


図1 (A) 発端者の家系図. (B) *CACNB4* 遺伝子 R468Q ミスセンス変異は父親と発端者に認められた. (C) 電位依存性カルシウムチャネル  $\beta 4$  サブユニットと  $\alpha 1$  サブユニットの相互作用部位を太線で示した. □; 発端者と父親に認められたミスセンス変異 △; これまでに報告されている変異 (D) *SCN1A* 遺伝子解析結果. 発端者のみに R568X 変異を認める.

ニー発作が認められた。てんかん発作はしばしば発熱によって誘発され、抗てんかん薬による治療に反応が乏しかった。脳波上、てんかん発射は検出されにくく、頭部 MRI では異常が認められなかった。徐々に発達の遅れが顕著になり、4歳時の発達指数（遠城寺式）は44であった。また、歩行が不安定になり、Dravet 症候群の診断基準を満たした。

4歳6ヵ月時、インフルエンザA罹患による40℃の発熱に伴って、けいれん重積状態に陥った。各種抗てんかん薬の静脈内投与が行われたが、一時的に発作が抑制されても断続的にけいれんを繰り返す状態が13時間持続した（図2A）。けいれん消失後、抗てんかん薬の静脈内投与は中止されたが、発症3日間で脳波の低電圧化が進行した（図2B）。発症4日目には自発呼吸の消失、角膜反射の消失が認められ、中枢性尿崩症を合併した。発症7日目に、脳波上は生理的な波形が消失し（図2C）、聴性脳幹反応でも反応が消失した。27日目に多臓器不全のため死亡した。

### 3. 電位依存性ナトリウムチャネルの電気生理特性

全細胞記録では、R568X 変異からは背景電流異常のナトリウム電流は認められなかった。

### 4. 電位依存性カルシウムチャネルの電気生理特性

図3AはBHK細胞に野生型CACNB4またはR468Q変異を発現させたCa<sub>v</sub>2.1チャネルに対して、-40mVから50mVまで30msec脱分極刺激を行った時の代表的なBa<sup>2+</sup>電流を示したものである。電流-電圧連関では、0mVから40mVの間で、変異チャネルが野生型に比し有意にBa<sup>2+</sup>電流が増大していた（ $P < 0.05$ ）（図3B）。ピーク電圧（ $P < 0.01$ ）、細胞キャパシタンス（ $P < 0.05$ ）、電流密度（ $P < 0.05$ ）も変異型が野生型よりも有意に高値であった（図3C）。

Ca<sub>v</sub>2.1チャネルの活性化、不活性化における電気生理特性を検討したが、野生型、変異型間に有意差はなかった（図4Aおよび4B）。また、不活性化の時定数についても有意差は認められなかった（図4C）。

## 考 察

Dravet 症候群の小児期における死亡率は15~18%である。原因としては、けいれん重積、溺水、事故、重症感染症、突然死などが報告されている。Dravet 症候群は症例ごとに臨床症状の重症度に差異が認められるが、薬物抵抗性のけいれん重積の後に脳死に至った本症例は最重症型と考えられる。

SCN1A 遺伝子変異をもつてんかん症候群が、自然寛解する良性から致死的な難治性までの広いスペクトラムの表現型を示す原因はいまだに解明されていない。いくつかの臨床研究および変異チャネルの電気生理学的解析から Dravet 症候群の臨床症状を重篤化させる修飾因子の存在が示唆されている。まず第一に、Dravet 症候群では、約50%に良性てんかんや熱性けいれんの家族歴がある<sup>4)</sup>。Dravet 症候群で検出される SCN1A 遺伝子変異の90%が新規突然変異であること<sup>3)</sup>を考慮すると、SCN1A 遺伝子変異以外にけいれん感受性遺伝子を親から受け継いでいる可能性がある。第二に、SCN1A 遺伝子変異に関連するてんかん症候群の変異チャネル蛋白の電気生理学的特性をパッチクランプ法で解析すると機能獲得型と機能喪失型の両者が認められ<sup>8-11)</sup>、臨床症状との相関性が不明確である。そして第三に、Scn1a 遺伝子のノックアウトマウスでのてんかんの重症度は系統の遺伝的背景の影響を大きく受けることが示されている<sup>12,13)</sup>。これらの報告は、SCN1A 遺伝子変異以外の修飾因子によっててんかんの症状が変化する可能性を示唆するものである。

そこで、我々は Dravet 症候群の臨床症状に影響を与える可能性のあるけいれん感受性遺伝子のスクリーニングを行うことにした。けいれん感受性遺伝子としては、SCN1B、SCN2A、CACNB4、CACNA1A、CACNA1H、CLCN2、GABRG2、GABRA1、GABRD、GABRB3などが含まれる<sup>14)</sup>。これらの遺伝子群のスクリーニングの過程で、SCN1B、GABRG2、CACNB4 遺伝子の解析が終了した時点で、1例において CACNB4 遺伝子変異を検出した。

電位依存性カルシウムチャネル（VDCC）は、ポアを形成するα1サブユニットとそれを修飾するβ、α2δおよびγサブユニットで構成され、神経細胞の脱分極刺激により開口してカルシウムを流入させる。CACNB4 遺伝子がコードするCa<sub>v</sub>β4サブユニットは主にCa<sub>v</sub>2.1（P/Q type）カルシウムチャネルと相互作用を持つ<sup>15)</sup>。CACNB4 遺伝子およびCa<sub>v</sub>2.1をコードするCACNA1A 遺伝子ともに、全般てんかんと小脳失調を示す患者においてその変異が検出されている。いくつかの変異はCa<sub>v</sub>2.1のC末<sup>16)</sup>あるいはβ4サブユニットのC末<sup>17)</sup>に存在しており（図1C）、α1サブユニットとβ4サブユニットのC末間の結合作用も報告されている<sup>18)</sup>。症例Aで検出されたR468Q-CACNB4変異は、同様にβ4サブユニットのC末に位置していた。

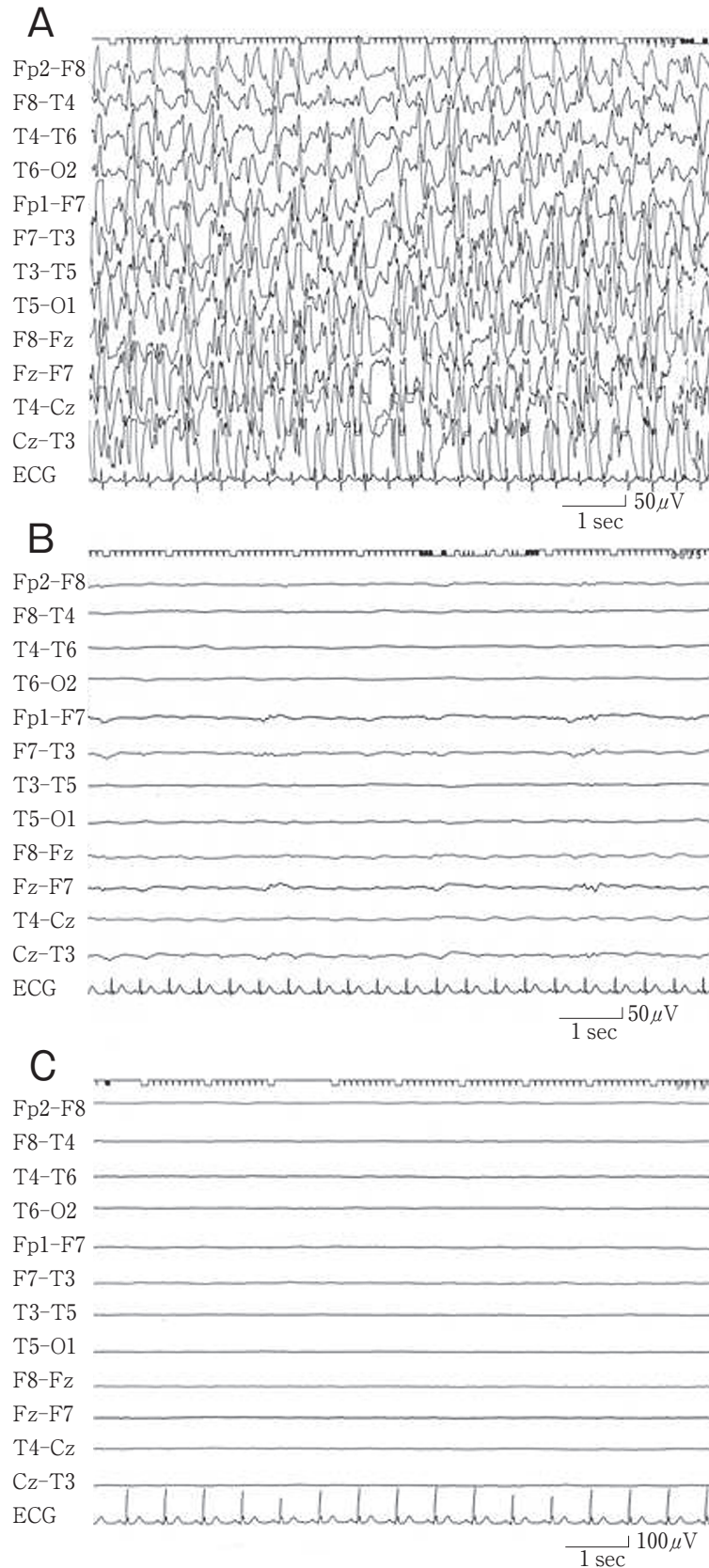


図2 発端者の脳波の経過。(A) けいれん発症13時間後の脳波。断続的にけいれんが認められていた。この後麻酔薬によって発作は抑制された。(B) 麻酔薬を中止後、広汎性低電圧化が認められた。(C) 第7病日には脳波上、生理的な活動が消失した。

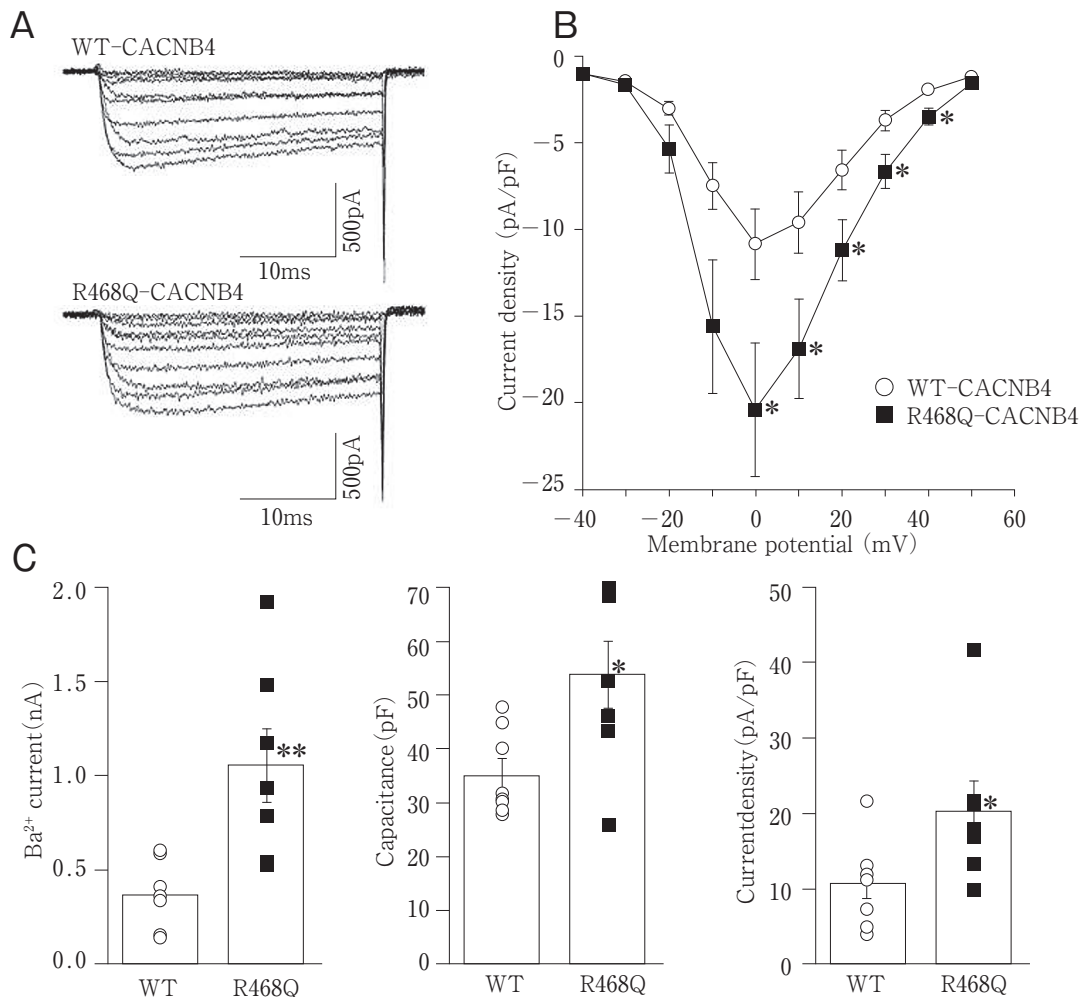


図3 BHK細胞に野生型-CACNB4またはR468Q-CACNB4発現させた時のCa<sub>v</sub>2.1電流の比較。(A)典型的な全細胞Ba<sup>2+</sup>電流。-40mVから+50mVまで10-mVずつ増加させて30ミリ秒間脱分極刺激を与えた時のBa<sup>2+</sup>電流を測定した。(B)Ca<sub>v</sub>2.1の電流-電圧曲線。○:WT-CACNB4(n=8),■:R468Q-CACNB4(n=7)。0mVから+40mV間において,R468Q-CACNB4は野生型よりも有意に電流密度が高かった(P<0.05)。(C)膜電位0mVの時のピーク電流(左),細胞キャパシタンス(中央),電流密度(右)。\*P<0.05 and \*\*P<0.01 versus WT-CACNB4。

R468Q-CACNB4の電気生理学的特性をパッチクランプ法を用いて解析すると,野生型と比較して電流密度が増加していた。我々は,一次的にSCN1A遺伝子変異によって発症したDravet症候群の表現型に加え,CACNB4遺伝子変異が症状を重篤化させたのではないかと推測している。では,どのようにしてCa<sub>v</sub>2.1チャネル異常がDravet症候群の症状を悪化させたのであろうか?SCN1A遺伝子がコードするNa<sub>v</sub>1.1チャネルは抑制系ニューロンに主に発現しており,Scn1a遺伝子ノックアウトマウスマウスのけいれんは抑制系ニューロンの機能不全で引き起こされていると考えられている<sup>12)</sup>。発端者Aで認められたR568X-SCN1A遺伝子変異はチャネルとしての機能がなく,類似の機構

があると思われる。一方,Ca<sub>v</sub>2.1チャネルはシナプス前膜に多く発現している<sup>19)</sup>。シナプス終末に脱分極刺激が到達すると,Ca<sub>v</sub>2.1チャネルが開く。カルシウムイオンの流入によって細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し,シナプス小胞から神経伝達物質が放出される。抑制系ニューロンの機能が低下している状況下では,一度けいれんが発症すると,R468Q-CACNB4変異により興奮系ニューロンから神経伝達物質がより多く放出される可能性がある。過剰なカルシウムイオンの流入は神経細胞死につながったのかもしれない。

本研究はDravet症候群が多因子によって症状が重篤化している可能性を示した。しかしながら,異所性細胞に強制発現させたチャネル解析の結果をそのまま

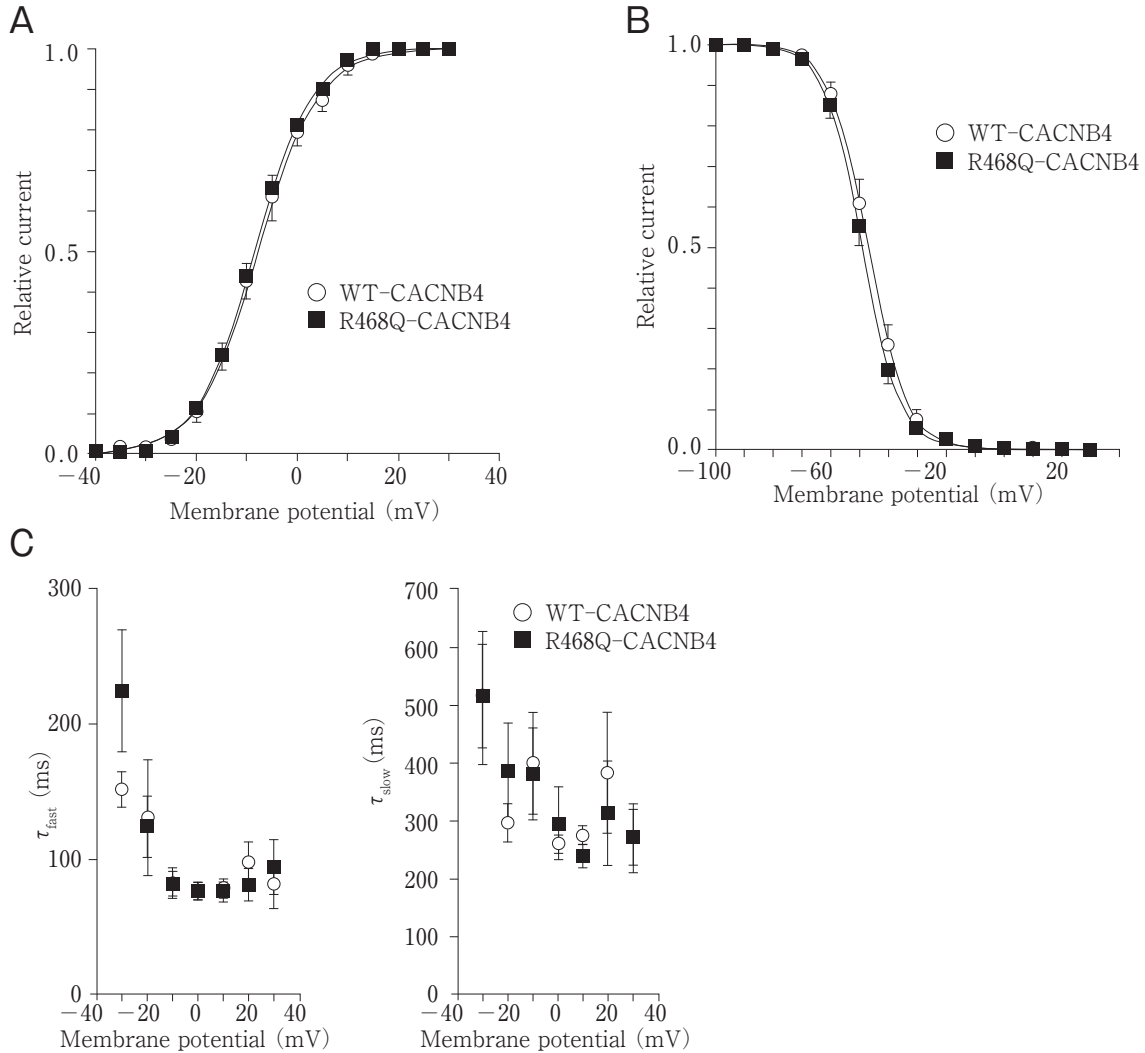


図4 (A) 電位依存性活性化曲線.  $-100\text{mV}$  の保持電位より,  $-40$  から  $+30\text{mV}$  まで膜電位を変化させた. WT-CACNB4 ( $n = 7$ ):  $V_{1/2} = -7.90 \pm 1.12\text{mV}$ , slope factor =  $5.67 \pm 0.19$ . R468Q-CACNB4 ( $n = 8$ ):  $V_{1/2} = -8.55 \pm 0.49\text{mV}$ , slope factor =  $5.55 \pm 0.14$  (B) 電位依存性不活性化曲線.  $-100\text{mV}$  の保持電位より, 2 秒間  $-100$  から  $+30\text{mV}$  まで脱分極させたのち 20 ミリ秒間テストパルスを加え,  $\text{Ba}^{2+}$  電流を測定した. WT-CACNB4 ( $n = 6$ ):  $V_{1/2} = -47.05 \pm 1.79\text{mV}$ , slope factor =  $-6.33 \pm 0.16$ . R468Q-CACNB4 ( $n = 6$ ):  $V_{1/2} = -48.80 \pm 1.29\text{mV}$ , slope factor =  $-6.23 \pm 0.18$  (C) 不活性化時定数.  $-30\text{mV}$  から  $30\text{mV}$  までの  $\tau_{fast}$  (左) と  $\tau_{slow}$  (右) を示した.

神経細胞や脳の機能的変化に単純に一般化することはできない. 今後は遺伝子改変動物を用いて,  $\text{Na}_v1.1$  チャンネルと  $\text{Ca}_v2.1$  チャンネルの相互作用を詳細に検討する必要がある.

## 文 献

- 1) Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P: De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* (2001) 68, 1327-1332.
- 2) Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, Oka E, Shimizu K:

Significant correlation of the SCN1A mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 295, 17-23.

- 3) Harkin LA, McMahon JM, Iona X, Dibbens L, Pelekanos JT, Zuberi SM, Sadleir LG, Andermann E, Gill D, Farrell K, Connolly M, Stanley T, et al.: The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* (2007) 130, 843-852.
- 4) Benlounis A, Nabbout R, Feingold J, Parmeggiani A, Guerrini R, Kaminska A, Dulac O: Genetic predisposition to severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* (2001) 42, 204-209.
- 5) Hattori J, Ouchida M, Ono J, Miyake S, Maniwa S,

- Mimaki N, Ohtsuka Y, Ohmori I : A Screening test for the prediction of Dravet syndrome before one year of age. *Epilepsia* (2008) 49, 626–633.
- 6) Niidome T, Teramoto T, Murata Y, Tanaka I, Seto T, Sawada K, Mori Y, Katayama K. Stable expression of the neuronal BI (class A) calcium channel in baby hamster kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1994) 203, 1821–1827.
  - 7) Wakamori M, Yamazaki K, Matsunodaira H, Teramoto T, Tanaka I, Niidome T, Sawada K, Nishizawa Y, Sekiguchi N, Mori E, Mori Y, Imoto K : Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel. *J Biol Chem* (1998) 273, 34857–34867.
  - 8) Spanpanato J, Escayg A, Meisler MH, Goldin AL : Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *J Neurosci* (2001) 21, 7481–7490.
  - 9) Lossin C, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George AL Jr : Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* (2002) 34, 877–884.
  - 10) Rhodes TH, Lossin C, Vanoye CG, Wang DW, George AL Jr : Noninactivating voltage-gated sodium channels in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101, 11147–11152.
  - 11) Ohmori I, Kahlig KM, Rhodes TH, Wang DW, George AL Jr : Nonfunctional SCN1A is common in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia* (2006) 47, 1636–1642.
  - 12) Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA : Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* (2006) 9, 1142–1149.
  - 13) Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, Takeuchi T, Itohara S, Yanagawa Y, Obata K, Furuichi T, Hensch TK, et al. : Na(v)1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons : a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci* (2007) 27, 5903–5914.
  - 14) Ashcroft FM : From molecule to malady. *Nature* (2006) 440, 440–447.
  - 15) Dolphin AC : Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* (2003) 35, 599–620.
  - 16) Jouvenceau A, Eunson LH, Spauschus A, Ramesh V, Zuberi SM, Kullmann DM, Hanna MG : Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet* (2001) 358, 801–807.
  - 17) Escayg A, De Waard M, Lee DD, Bichet D, Wolf P, Mayer T, Johnston J, Baloh R, Sander T, Meisler MH : Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* (2000) 66, 1531–1539.
  - 18) Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP : Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha1-subunit. *Nature* (1994) 368, 67–70.
  - 19) Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA : Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci* (1995) 15, 6403–6418.