

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年7月9日 (09.07.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/084472 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/073164
- (22) 国際出願日: 2008年12月19日 (19.12.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2007-340147  
2007年12月28日 (28.12.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 公立大学法人横浜市立大学 (PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸 2 2 番 2 号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松本 直通 (MATSUMOTO, Naomichi) [JP/JP]; 〒2360004 神奈川県横

浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 才津 浩智 (SAITSU, Hiro-tomo) [JP/JP]; 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP).

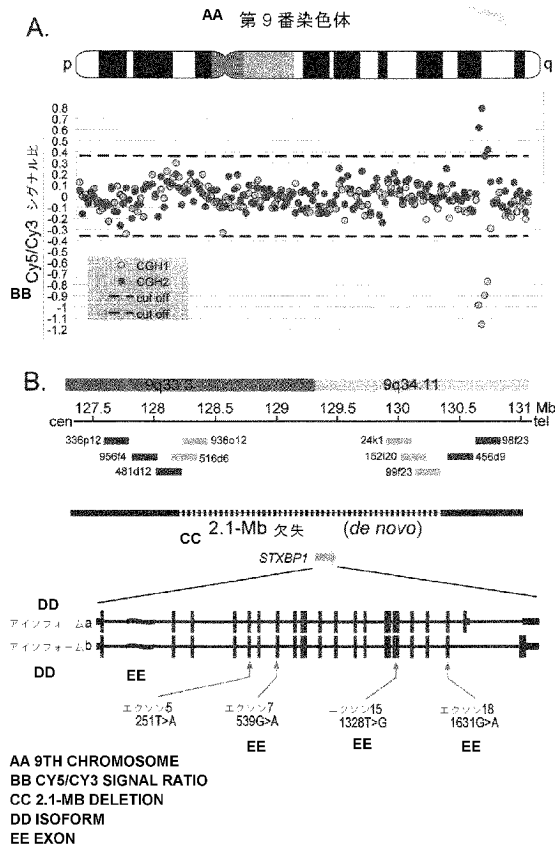
- (74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 SK飯田橋ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING INTRACTABLE EPILEPSY DEVELOPED IN NEONATAL PERIOD AND INFANCY

(54) 発明の名称: 新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a novel method for detecting intractable epilepsy developed in the neonatal period and infancy. The method of the invention is performed for a sample separated from the living body and uses whether or not syntaxin-binding protein 1 (STXPB1) gene is deleted and/or whether or not a gene encoding abnormal STXPB1 is present as an index. According to the invention, definitive diagnosis of the disease can be performed and individualization and optimization of therapy including gene therapy is expected. Association of STXPB1 gene with the disease is first reported by the invention.

(57) 要約: 新生児期～乳児期に発症する難治性てんかんを検出する新規な方法が開示されている。本発明の方法は、生体から分離した試料に対して行なう方法であって、シタキシン結合タンパク質1 (STXPB1) 遺伝子が欠失しているか否か及び/又は異常型STXPB1をコードする遺伝子が存在するか否かを指標とする。本発明によれば、該疾患の確定診断が可能となり、遺伝子治療を含めた治療の個別化・至適化が期待される。該疾患へのSTXPB1遺伝子の関与は本発明が初めて報告するものである。

WO 2009/084472 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

## 明 細 書

## 新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法

## 技術分野

[0001] 本発明は、新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法に関する。

## 背景技術

[0002] 新生児～乳児期発症の難治性てんかんには、早期ミオクロニー脳症 (early myoclonic encephalopathy: EME)、大田原症候群 (early infantile epileptic encephalopathy with suppression burst: EIEE)、West症候群 (點頭てんかん) がある。早期ミオクロニー脳症や大田原症候群の多くは乳児期早期に発症し、てんかん発作に加えて重度の精神運動発達遅滞と、脳波上顕著なsuppression burstを認めるのが特徴である。West症候群はシリーズ形成性のスパズムと脳波上のヒプスアリスミアがよく知られている。脳形成異常、染色体異常、周産期低酸素性脳障害などが原因として知られているが、明らかな原因がない特発性のものがあり遺伝的な素因が存在する(非特許文献1)。

[0003] EIEEとEMEの多くはWest症候群に移行することから、これら3疾患には共通の遺伝背景が存在することが示唆されていた。今までに同定された疾患責任遺伝子としては、家系例の解析からX染色体上に位置する2つの遺伝子ARX (aristaless related homeobox), CDKL5 (cyclin-dependent kinase-like 5) が報告されている(非特許文献2、3)。孤発例においても、男児のEIEE(非特許文献4)およびWest症候群(非特許文献1、5)においてARX変異が、女児のWest症候群においてCDKL5変異(非特許文献6)が報告されている。しかしながら、同定された責任遺伝子変異で原因が説明できない症例が多く、これらの遺伝子のみに着目して新生児～乳児期発症の難治性てんかんの確定診断を行なうことはできない。他の遺伝子の関与が示唆されているものの、確定診断に有用な新たな責任遺伝子は報告されていない。

[0004] 非特許文献1: Kato, M. Epilepsy Res, 2006. 70 Suppl 1: p. S87-95.

非特許文献2: Stromme, P., et al. Nat Genet, 2002. 30(4): p. 441-5.

非特許文献3: Weaving, L.S., et al. Am J Hum Genet, 2004. 75(6): p. 1079-93.

非特許文献4:Kato, M., et al. Am J Hum Genet, 2007. 81(2): p. 361-366.

非特許文献5:Guerrini, R., et al. Neurology, 2007. 69(5): p. 427-433.

非特許文献6:Evans, J.C., et al. Eur J Hum Genet, 2005. 13(10): p. 1113-1120.

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 従って、本発明の目的は、新生児～乳児期発症の難治性てんかんを診断できる新規な手段を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、新生児～乳児期発症の難治性てんかんの女児症例において第9番染色体上の微細欠失を同定した。次いで、該欠失領域中に存在するシンタキシン結合タンパク質1 (syntaxin binding protein 1; STXBP1)に着目して、新生児～乳児期発症の難治性てんかん患者58名において変異解析を行なった結果、4名の患者において健常者には認められないミスセンス変異を見出し、本願発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は、生体から分離した試料に対して行なう方法であって、STXBP1遺伝子が欠失しているか否か及び／又は異常型STXBP1をコードする遺伝子が存在するか否かを指標とする、新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法を提供する。

### 発明の効果

[0008] 本発明により、新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの確定診断が可能な該疾患の検出方法が提供された。本発明によれば、該疾患の確定診断が可能となり、遺伝子治療を含めた治療の個別化・至適化が期待される。該疾患へのSTXBP1遺伝子の関与は本発明が初めて報告するものである。該遺伝子はシナプス小胞の輸送・放出に関わることが既に明らかになっているが、てんかん全般においてもシナプス小胞の輸送・放出に関わる遺伝子の報告はない。本発明の開示により、新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの病態生理の解明が一気に進み、有効な管理・治療法の開発につながると考えられる。

### 図面の簡単な説明

[0009] [図1](A)患者1での全ゲノム解析用BACアレイCGHの結果を示す。CGH1は患者DNAをCy5蛍光色素で、対照健常人DNAをCy3蛍光色素でラベルしており、CGH2では蛍光色素を交換してラベルしている。Cy5とCy3の蛍光強度の比の $\text{Log}_2$ 値を縦軸に、9番染色体の短腕から長腕にかけての各BACクローンの位置を横軸に示す。患者1では長腕にCGH1でマイナスに、CGH2でプラスに値が大きくなる領域があり、染色体の欠失と考えられた。(B)プローブに用いたBACクローンの染色体上の位置と、患者2～5で認められた塩基置換の位置を示した図である。患者1における欠失領域は9q33.3-34.11にかけての約2.1Mbと同定された。また、この欠失領域にあるSTXBP1遺伝子の変異解析を新生児～乳児期発症の難治性てんかん患者58名で行い、4人の患者で塩基置換を認めた。

[図2]患者2～5で認められた塩基置換部位の配列解析データと、各生物種における該当領域のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。4つの塩基置換は機能ドメイン内でのアミノ酸置換を引き起こす。変異は多種間で高度に保存されたアミノ酸で起こっており、4つのうち3つの変異については両親に変異がない新生突然変異であることを確認している。

[図3]Neuroblastoma 2A細胞での正常および変異STXBP1蛋白の発現パターンを示す。コントロールのEGFP-C1(EGFPのみ)は細胞全体に存在しているのに対して、EGFPとSTXBP1(WT)とのキメラ蛋白は細胞核を除いた細胞質全体に存在している。一方、4種類の変異蛋白とEGFPのキメラ蛋白は、細胞質内で強く凝集しているのが観察された。サンプル間の比較のため、蛍光画像は露光時間を固定して取り込んだ。

### 発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明の新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法は、生体から分離した試料に対して行なう方法であり、STXBP1遺伝子が欠失しているか否か及び／又は異常型STXBP1をコードする遺伝子が存在するか否かを指標として、該生体が上記難治性てんかんを罹患しているか否か又は発症するおそれがあるか否かを判断する。下記実施例にある通り、該難治性てんかん患者の中には、STXBP1遺伝子を完

全に欠失している者又は異常型STXBP1をコードする変異STXBP1遺伝子を有する者が認められ、これらの遺伝子異常は健常者には認められない。従って、(1)STXBP1遺伝子が欠失しているか否か、(2)異常型STXBP1をコードする遺伝子が存在するか否か、の少なくともいずれかを調べることにより、上記難治性てんかんを検出することができる。

[0011] STXBP1は公知のタンパク質であり、シナプス小胞の輸送・放出に関与することが知られている。ヒトにおいては、配列番号65に示すSTXBP1遺伝子ゲノム配列から2種類のバリエントmRNAが生成される。これらのバリエントの配列はGenBankにアクセッション番号NM\_003165(バリエント1/アイソフォームa)、NM\_001032221(バリエント2/アイソフォームb)として登録されている。アイソフォームa及びbのアミノ酸配列を配列表の配列番号2及び4に、cDNA配列を配列番号1及び3にそれぞれ示す。なお、配列番号2と配列番号4とは、第1番～第575番アミノ酸の領域においてアミノ酸配列が同一であり、また、配列番号1と配列番号3とは、第1番～第1703番塩基の領域において塩基配列が同一である。配列番号45～64は、配列番号65に示す塩基配列から、STXBP1遺伝子の各エクソン及びその前後300bpのイントロンの領域を抜粋して示したものである。各配列中のエクソン、コード領域及びUTR領域の位置を下記表1に示す。表中、「301-452nt」という表記は、該当する配列番号中の第1番目の塩基から数えて301番目の塩基から452番目の塩基までの領域を表す。エクソン19はアイソフォームaの最終コーディングエクソンであり、アイソフォームbはエクソン19は飛ばしてエクソン20が最終コーディングエクソンとなる。

[0012] [表1]

	配列番号	エクソン	コード領域	UTR
Ex1	45	301-452nt	416-452nt	301-415nt
Ex2	46	301-350nt	301-350nt	
Ex3	47	301-382nt	301-382nt	
Ex4	48	301-377nt	301-377nt	
Ex5	49	301-379nt	301-379nt	
Ex6	50	301-404nt	301-404nt	
Ex7	51	301-449nt	301-449nt	
Ex8	52	301-385nt	301-385nt	
Ex9	53	301-431nt	301-431nt	
Ex10	54	301-408nt	301-408nt	
Ex11	55	301-361nt	301-361nt	
Ex12	56	301-366nt	301-366nt	
Ex13	57	301-381nt	301-381nt	
Ex14	58	301-439nt	301-439nt	
Ex15	59	301-410nt	301-410nt	
Ex16	60	301-402nt	301-402nt	
Ex17	61	301-386nt	301-386nt	
Ex18	62	301-455nt	301-455nt	
Ex19	63	301-426nt	301-410nt	411-426nt
Ex20	64	301-2242nt	301-383nt	384-2242nt

[0013] 本発明において、「正常型STXBP1」としては、野生型STXBP1である上記2種類のアイソフォームがあり、これらの他にも、該アイソフォームと同様の生理活性を示す天然の変異体が存在すればそれらも包含される。一方、「異常型STXBP1」とは、STXBP1の天然の変異体であって、STXBP1としての活性が変化又は消失したものをいう。そのような異常型STXBP1の例としては、後述する4種類のミスセンス変異を挙げることができ、これらのほかにも、例えば、短縮型の(truncated)STXBP1、活性に重要なアミノ酸に置換又は欠失を生じたSTXBP1、活性に重要な領域にアミノ酸の挿入が生じたSTXBP1等の天然の変異体が存在すればそれらも包含される。なお、本明細書及び特許請求の範囲において、単に「STXBP1」と言った場合には、文脈からそうではないことが明らかな場合を除き、正常型STXBP1と異常型STXBP1との両者を包含するものとする。

[0014] 異常型STXBP1の発現をもたらす変異としては、例えば、ミスセンス変異やナンセンス変異が挙げられるが、これらに限定されない。本発明で指標とし得るミスセンス変異の例としては、下記実施例で同定された以下(1)~(4)の変異が挙げられる。なお、変

異の位置は、野生型STXBP1の1つであるアイソフォームaの塩基配列及びアミノ酸配列、すなわち配列番号1及び2を基準として表したものであり、「aa84」とは配列番号2中の第84番アミノ酸、「251nt」とは配列番号1中の第251番塩基を表す。

- (1) aa84がバリンからアスパラギン酸になる変異(251ntがtからaに変異)
- (2) aa180がシステインからチロシンになる変異(539ntがgからaになる変異)
- (3) aa443がメチオニンからアルギニンになる変異(1328ntがtからgになる変異)
- (4) aa544がグリシンからアスパラギン酸になる変異(1631ntがgからaになる変異)

[0015] これらのうちの少なくともいずれか1つの変異が見つければ、該生体は新生児期～乳児期発症の難治性てんかんを罹患している又は発症するおそれがあると考えられるが、本発明で指標とし得る変異はこれらに限定されない。すなわち、下記実施例に記載される通り、これらのミスセンス変異は、野生型STXBP1の立体構造(Protein Data Bank ID, 1DN1)において、折りたたまれた構造の内部に位置するアミノ酸で生じているが、上記以外の部位であっても、同様に折りたたみ構造内部等の立体構造の維持に重要な位置のアミノ酸に置換が生じれば、活性が変化又は消失して異常型STXBP1となり得るため、本発明の検出方法において指標とし得る。野生型STXBP1遺伝子のコード領域の配列及びゲノム配列は、配列番号1及び3並びに配列番号65に示され、GenBankにも登録されている通り公知である。また、アミノ酸をコードするコドンも公知である。従って、このようなミスセンス変異を生じる塩基置換は、下記実施例で同定された塩基置換に限定されない。

[0016] 生体から分離した試料を用いて、(1)STXBP1遺伝子が欠失しているか否か、(2)異常型STXBP1をコードする遺伝子が存在するか否か、の少なくともいずれかを調べる方法としては、例えば、以下に記載するとおり、ゲノムDNA試料を解析する方法やmRNA試料を解析する方法が挙げられる。また、生体から分離したタンパク質試料について、STXBP1タンパク質が欠失しているか否かや、異常型STXBP1タンパク質が存在するか否かを調べることによっても、STXBP1遺伝子の欠失や異常型STXBP1をコードする遺伝子の存在を調べることができる。これらの方法のうち、本発明の方法としては、ゲノムDNA試料を用いてSTXBP1遺伝子の欠失や異常型STXBP1をコードする遺伝子の存在を調べる方法が好ましい。



[0017] ゲノムDNA試料を用いて実施する方法としては、例えば以下の(ア)~(エ)の方法を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0018] (ア) in situハイブリダイゼーション法

対象生体から細胞を採取し、染色体標本試料を調製する。STXBP1遺伝子領域と特異的にハイブリダイズするDNAを標識してプローブを作製し、該プローブを上記染色体標本とハイブリダイズさせる。プローブからのシグナルの有無を調べることにより、STXBP1遺伝子の欠失を検出することができる。DNAの標識は、特に限定されないが、通常、ラジオアイソトープ又は蛍光色素(Cy5、Cy3、FITC等)を用いて行なわれ、蛍光色素がより一般的に用いられている。蛍光標識プローブを用いる場合、この手法はFISH法と呼ばれる。STXBP1遺伝子領域と特異的にハイブリダイズするDNAプローブは、当業者であれば、配列表の配列番号65に示すSTXBP1遺伝子ゲノム配列を参照して容易に調製することができる。具体的には、例えば配列番号65中の所望の領域を増幅できるプライマーを調製し、正常なSTXBP1遺伝子を含むゲノムDNAを鋳型としてPCRを行なうことにより、プローブに用いるDNAを得ることができる。また、下記実施例に記載されるように、STXBP1遺伝子領域を含むBACクローン等のクローンを標識してプローブとして用いることもできる。ヒトゲノムDNAを含むBACクローン等のクローンは市販もされており、入手は容易である。プローブに用いるDNAは、STXBP1遺伝子のコード領域の全領域をカバーするものであってもよいし、コード領域の一部のみをカバーするものであってもよい。

[0019] (イ) サザンハイブリダイゼーション法

対象生体から得たゲノムDNA試料を任意の制限酵素で切断後、アガロースゲル等で電気泳動し、メンブレンにDNAを転写する。このメンブレン上で、STXBP1遺伝子領域と特異的にハイブリダイズするDNAを標識して調製したDNAプローブをハイブリダイズさせる。検出されるバンドの有無を調べることにより、STXBP1遺伝子の欠失を検出することができる。また、例えば点変異のような変異であっても、制限酵素部位に変化を生じる変異である場合には、検出されるバンドのサイズが変化するため、該方法で検出し得る。プローブの標識は、特に限定されないが、通常、ラジオアイソトープやジゴキシンゲン等のハプテンを用いて行なわれる。ここでプローブとして用いるDNA

の調製方法等は(ア)における説明と同様である。

[0020] (ウ) ヘテロ二本鎖の検出による遺伝子変異スクリーニング

de novoで生じる点変異等の突然変異は通常ヘテロ接合体の形で見られるため、ゲノムDNA試料を熱変性後に再会合させることにより、正常型DNAと変異DNAとがハイブリダイズしたヘテロ二本鎖が生じる。ヘテロ二本鎖は、(1)非変性ポリアクリルアミドゲル中で異なる移動度を示す、(2)ミスマッチ部分の塩基は化学物質や酵素による切断を受けやすい、(3)変性の際に異なる変性温度を示す、といった特性を有する。これらの特性を利用してヘテロ二本鎖を検出する方法がこの分野において公知であり、変異の検査方法として実用化もされている。具体的には、例えば、変性高速液体クロマトグラフィー(dHPLC)を用いてヘテロ二本鎖を検出する方法や、下記実施例に具体的に記載されるHigh Resolution Melt法が知られている。High Resolution Melt法とは、二本鎖DNAに高密度で結合する蛍光色素(SYTO(登録商標)9, LC Green(登録商標), EvaGreen(商標)等)を用いて、二本鎖DNAの融解(熱変性)の過程を蛍光強度の変化としてとらえ、ヘテロ二本鎖を検出する方法である。すなわち、二本鎖DNAに高密度で結合する蛍光色素を用いて二本鎖DNAを染色すると、該二本鎖DNAを融解(熱変性)させたとき、二本鎖が解離した部位から蛍光色素が脱落するため、二本鎖DNAからの蛍光シグナルの量が減少する。従って、そのような蛍光色素を用いることで、二本鎖DNAの熱変性の過程を蛍光強度の変化として視覚的にとらえることができる。温度-蛍光のデータを高密度で取得し解析することで、ヘテロ二本鎖の検出を迅速に高感度で行うことができる。本発明においても、正常型STXBP1を発現できないポリヌクレオチドが存在するか否かを調べる手法として、これらの公知の方法を用いることができる。ヘテロ二本鎖を検出するこれらの方法は、点変異を検出する方法として特に好ましい方法である。本発明においてHigh Resolution Melt法を用いる場合には、使用するプライマーは、当業者であれば配列番号45~64又は配列番号65に示す塩基配列を参照して容易に調製可能であり、例えば下記実施例で用いられている配列番号5~44に示される塩基配列から成るプライマーを好ましく用いることができる。

[0021] (エ) 塩基配列解析

遺伝子変異を詳細に調べるためには、塩基配列の解析を行なうことが望ましい。対象生体ゲノムDNA上のSTXBP1遺伝子の塩基配列を決定し、これを野生型STXBP1遺伝子配列と比較することにより、変異を詳細に同定できる。決定した塩基配列は、例えばSeqScape（登録商標）等の公知のソフトウェアを用いて解析することにより、変異の検出やプロファイリングを容易に行うことができる。

[0022] 上記した(ア)～(エ)の方法は、適宜組み合わせで行なうことができる。例えば、まず(ア)及び／又は(イ)により、ゲノムDNA試料中にSTXBP1遺伝子領域が存在するかどうかを調べる。存在する場合には(エ)を行なってSTXBP1遺伝子領域中の変異の有無を調べる。(ウ)により塩基配列を決定すべき領域を絞り込んで(エ)を行なうとより効率的に検査が可能である。

[0023] また、mRNA試料を用いて本発明を実施する方法としては、例えば以下に述べる方法が挙げられるが、これらに限定されない。STXBP1のmRNAの有無は、例えば、配列番号1又は3に示す塩基配列を基に作製したプローブやプライマーを用いてノーザンハイブリダイゼーション法やRT-PCR法を行なうことで容易に調べることができる。STXBP1のmRNAが検出されない場合にはSTXBP1遺伝子が欠失していると判断され、難治性てんかんが検出されたと判断できる。また、mRNA試料から逆転写反応により得たcDNAの塩基配列を上記(エ)に述べたように解析することで、変異を詳細に同定することができる。STXBP1のcDNAに対して上記(ウ)の方法を行なっても差し支えないが、STXBP1のcDNAは、配列番号1及び3に示す通り2kbp以下と比較的短いため、上記(ウ)の方法を行なって塩基配列を決定する領域を絞り込む必要性は低い。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR自体は周知の常法であり、当業者であれば配列番号1又は3に示す塩基配列をもとに容易にプローブやプライマーを作製することができる。

## 実施例

[0024] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。

[0025] 1. 新生児期～乳児期発症の難治性てんかんに合併する染色体異常のスクリーニング

全ゲノム解析用の4200個のBACクローンを搭載したアレイを用いたCGH(comparati

ve genomic hybridization)法により、乳児期に難治性てんかんを発症した女兒患者(患者1)について染色体異常の解析を行なった。患者又は健常者から得た末梢血白血球よりゲノムDNAを採取し、(1)患者DNAをCy5標識し健常者DNAをCy3標識(CGH1)、(2)患者DNAをCy3標識し健常者DNAをCy5標識(CGH2)の2通りでプローブを調製した。これらのプローブを用いて本願発明者らの研究室で作成した4200BACアレイCGHを行い、GenePix4000B(AXON社製)でスキャン後、GenePixPro6.0(AXON社製)で数値化を行い、常法により解析を行なった。その結果、図1Aに示す通り、該患者1において第9番染色体の9q33.3-q34.11の領域にかけて微細欠失があることが判明した。

[0026] 次いで、この微細欠失の領域をより詳細に調べるため、白血球染色体標本を用いたin situハイブリダイゼーション法を行なった。患者1及びその両親から末梢血白血球を採取して染色体標本を作製し、9q33.3-q34.11の領域に位置する複数のBACクローンを標識して調製したプローブを該標本にハイブリダイズさせて蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、BACクローン516d6、936o12、24k1、152i20、及び99f23をプローブとした場合には、2本ある相同染色体のうち一方においてシグナルが検出されず、微細欠失は約2.1Mbの領域であることが判明した(図1B)。両親の染色体ではこの微細欠失は認められなかった。すなわち、該患者で認められた染色体微細欠失はde novo変異(新生突然変異)であり、難治性てんかんの原因となっている可能性が強く示唆された。

## [0027] 2. STXBP1遺伝子の変異解析

上記欠失領域には脳で発現している遺伝子が複数あったが、そのうち、シンタキシン結合タンパク質1(syntaxin binding protein 1; STXBP1、別名Munc18-1、GeneBankアクセッション番号NM\_003165(バリエント1)、NM\_001032221(バリエント2))を候補遺伝子として、新生児～乳児期発症の難治性てんかん患者58名で以下のとおり変異解析を行った。

[0028] 患者から得た末梢血白血球よりゲノムDNAを採取した。ゲノムDNAは、Genomiphi version 2 (GE healthcare)を用いて全ゲノム増幅させ、この増幅DNAを用いて変異解析を行なった。STXBP1遺伝子(エクソン1-20)のコーディングエクソンおよびエクソン

イントロン境界における変異解析はHigh resolution melt法を用いて行った。これは、蛍光色素二本鎖DNAに結合する蛍光色素を用いてPCR産物の融解(熱変性)の過程を蛍光強度の変化としてとらえ、温度-蛍光のデータを高密度で取得し解析することで、ヘテロ二本鎖の検出を迅速に高感度で行う方法である。リアルタイムPCRおよび引き続いてのHigh resolution melt解析はRoterGene-6000 (Corbett Life Science)を用いて12- $\mu$ lの反応系で行った。エクソン2から20までは、1 $\times$ ExTaq buffer, 0.2 mM each dNTP, 0.2  $\mu$ M each primer, 1  $\mu$ l DMSO, 1  $\mu$ l LCGreen Plus (Idaho Technology), 0.25 U Ex TaqHS polymerase (TAKARA)の組成で反応を行った。反応条件は、95°C1分の熱変性後、95°C10秒、アニーリング20秒、伸長20秒のサイクルとした。エクソン1に関しては、1 $\times$ GC buffer II, 0.4 mM each dNTP, 0.2  $\mu$ M each primer, 1  $\mu$ l LCGreen Plus (Idaho Technology), 0.5 U LA Taq polymerase (TAKARA)の組成で反応を行った。反応条件は、95°C1分の熱変性後、95°C10秒、62°C30秒の2ステップのサイクルとした。サイクル数はリアルタイムPCRをモニターして適宜決定した。プライマーの塩基配列と反応温度を表2に示す。表2中に記載される各エクソン増幅用プライマーの上段がセンスプライマー、下段がアンチセンスプライマーである。また、各エクソン番号の下に記載した数字は、各エクソン及びその前後300bpのイントロンの配列を記載した配列番号を示している。

[0029] [表2]

エクソン	増幅サイズ (bp)	プライマー配列 (5' - 3')	配列 番号	アニーリン グ (°C)	伸長 (°C)
Ex1 (45)	229	CAGTCCGCGGTCAGTCG	5	62(2ステップ)	
		CTCCTCGGGAGCCGCAGTC	6		
Ex2 (46)	242	GCCTAAGGTGGGAAATGACC	7	56	68
		CCCTCATTCCTGCCTACAAC	8		
Ex3 (47)	196	CGGTAAGCTGAGCGAGAATC	9	56	68
		CCACAGAGAGAAGGCTCCAG	10		
Ex4 (48)	244	TGCAACA GTCTGAAGGTAGCC	11	56	68
		CAGTCTGTGCCACATAAATCC	12		
Ex5 (49)	234	ACAGGTC CCATTTGGCTCTA	13	56	68
		TTCCCTC TTGACCTGCCTTA	14		
Ex6 (50)	290	TGTGCAGCTGTTAAATGAACC	15	56	68
		CCGTGCA TTTGGCAATTCAG	16		
Ex7 (51)	272	CACTGCCAGGGTCAGAGAAT	17	56	68
		CTCCTCACTGGGGGACAC	18		
Ex8 (52)	245	GCACTGCTGGCTTCTCTTT	19	56	68
		AAGCTGTCTCTGGGACTGTCA	20		
Ex9 (53)	290	GCACTCAGAGTTGCTTCC	21	56	68
		GCTCATGTGCAGAGCCGTAT	22		
Ex10 (54)	241	AGCTGAA GAGGGTTTCGATGA	23	60	72
		TGAACGCATCATCAATAGCAG	24		
Ex11 (55)	236	TCAACACATACCTCAAAGGAAA	25	56	69
		AGGCAGCTTCCCTGCTCTTA	26		
Ex12 (56)	237	TAGCCTTGCAAAGCCTCCTA	27	56	68
		TCGTGAATTTCCATGAATCAA	28		
Ex13 (57)	238	CCATGAT TAGTCCCTTGGTCA	29	56	68
		GCTTCCCGTCTCTATTTCC	30		
Ex14 (58)	244	TCTCCACACTGTCACCAGA	31	56	68
		CTCAGTTTCCC CAAGACAGG	32		
Ex15 (59)	242	CTGTCCCATTGGGTGCAT	33	60	72
		TGTCAGTCAGAGCAGAAGCAG	34		
Ex16 (60)	247	TCCAGAGAGTAGCAGAGGTCA	35	60	72
		GAAAGCATCCAGGCTGACAAG	36		
Ex17 (61)	245	TGGCTTTGCCAAGTGACAT	37	56	68
		AGCTGACATCCAACCAAGAGC	38		
Ex18 (62)	272	TGCCGTGAGTGAGATAAAC	39	60	72
		AA GCGTGGAATGGAGTTGAG	40		
Ex19 (63)	245	GCCTAAGTTGGCATGTTTCT	41	56	68
		GAAAGCCCTTCAGAGTGGAA	42		
Ex20 (64)	237	GCAAGAAAGGAAGTGTGGA	43	56	68
		GCAACAGACGC AAAGGA ACT	44		

[0030] High resolution melt解析でヘテロ二本鎖と判定したサンプルに関しては、ExoSAP-

IT (GE healthcare)でPCR産物を精製後、BigDye Terminator chemistry version 3 (Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行った。反応物はSephadex G-50 (GE healthcare) とMultiscreen-96 (Millipore)を用いてゲル濾過にて精製し、ABI Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems)でシーケンスを得た。得られたシーケンスは、SeqScape version 2.1.1 software (Applied Biosystems)を用いて変異の有無について解析を行った。変異が認められたサンプルに関しては、全ゲノム増幅させないゲノムDNAを鋳型とした変異解析を再度行い、ゲノムDNA上での変異を確認した。

[0031] その結果、4名の患者でミスセンス変異を認めた：患者2が251T>A, アミノ酸V84D変異, 患者3が539G>A, アミノ酸C180Y変異, 患者4が1328T>G, アミノ酸M443R変異, 患者5が1631G>A, アミノ酸G544D変異 (図1B, 2)。これらの変異は対照の健常者250名に認められず、3つの変異については両親のゲノムDNAには見られないde novo変異であることを確認した。1例(患者5)については、父親が既に死亡していたため、母親のみ同変異がないことを確認した。変異はすべて、多種間で高度に保存されたアミノ酸で起こっていた (図2A)。また、Protein Data Bank ID, 1DN1に登録のSTXBP1の3次元立体構造を参照すると、上記変異により置換されるアミノ酸は、構造的に折りたたまれたタンパク質の内部に位置していた。これらのことから、上記した置換がタンパク質の安定性を著しく低下させることが予想された。変異が見つかった患者1ないし5の臨床情報を表3に示す。

[0032] [表3]

患者番号	1	2	3	4	5
性別	女性	男性	男性	女性	男性
変異	STXBP1遺伝子 欠失	251T>A, V84D	539G>A, C180Y	1328T>G, M443R	1631G>A, G544D
	de novo	de novo	de novo	de novo	不明
発症時期	1.5ヶ月	2ヶ月	2ヶ月	1.5ヶ月	
脳波パターン (初診時)	suppression- burst	suppression- burst	suppression- burst	suppression- burst	suppression- burst
West症候群への移行	あり	あり	あり	あり	あり

[0033] 3. 生細胞における変異STXBP1タンパク質の局在

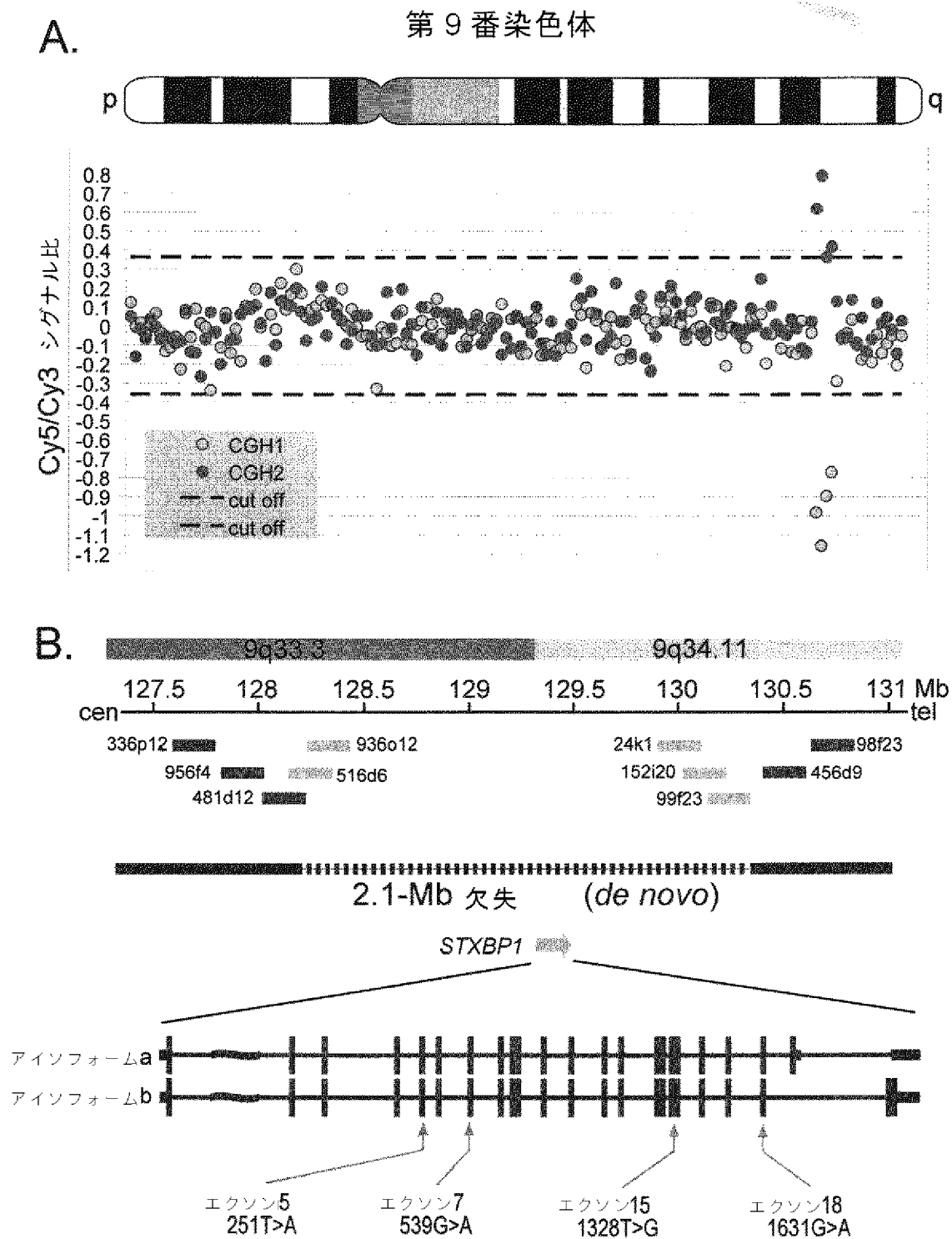
次に我々は、患者で見られたSTXBP1変異の生物学的意義について、マウス神経芽細胞腫であるNeuroblastoma 2A細胞に対する一過性発現系を用いて検討を行った。STXBP1は可溶性蛋白であり、そのアミノ酸配列中に局在シグナルを有していない(Schutz, D., et al., A dual function for Munc-18 in exocytosis of PC12 cells. Eur J Neurosci, 2005. 21(9): p. 2419-32.)。蛍光蛋白であるEGFP蛋白とSTXBP1のキメラ蛋白を作成し、GFPの蛍光をもとに細胞内局在を検討したところ、予想通り核と細胞膜を除く細胞内への分布が認められた(図3)。興味深いことに、患者で認められた4種類の変異についてそれぞれ変異蛋白を作成したところ、一部の細胞で細胞質内での変異蛋白の凝集が認められた(図3)。このことから、新生児～乳児期発症の難治性てんかん患者で認められた変異は蛋白の安定性を低下させ、結果として凝集を引き起こすことが強く示唆された。



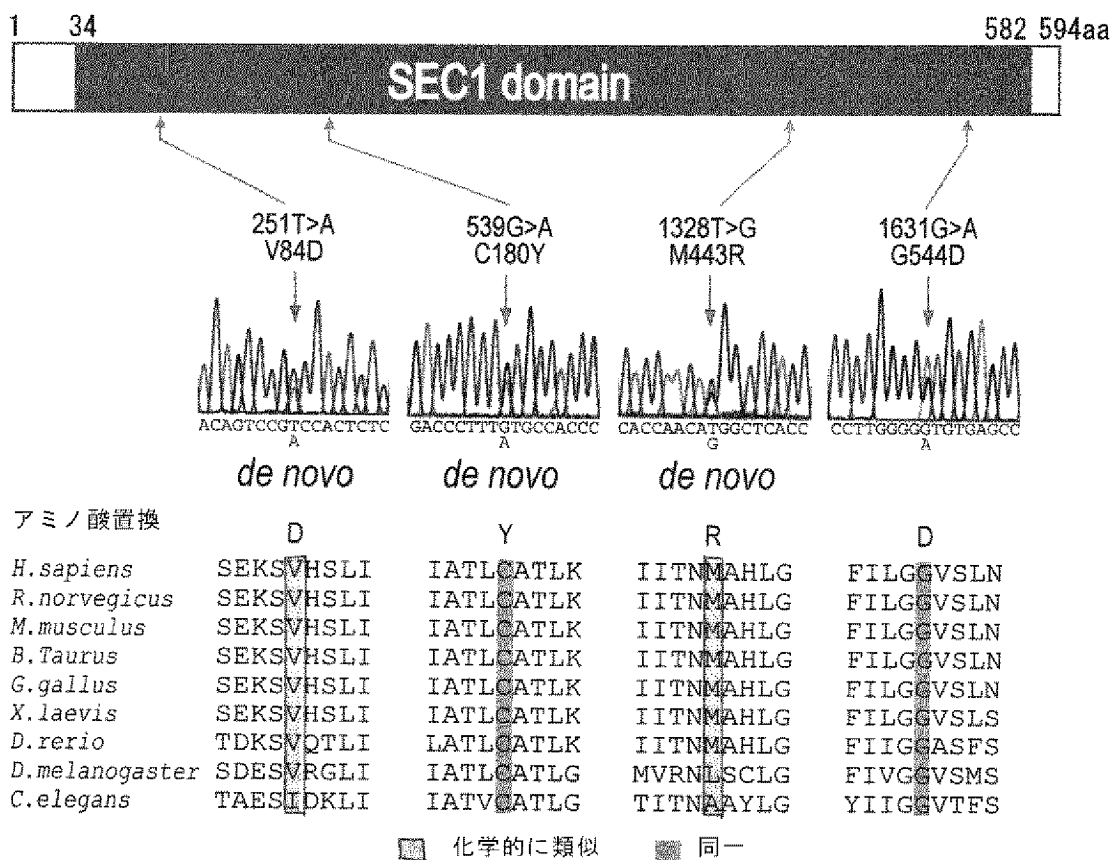
## 請求の範囲

- [1] 生体から分離した試料に対して行なう方法であつて、STXBP1遺伝子が欠失しているか否か及び／又は異常型STXBP1をコードする遺伝子が存在するか否かを指標とする、新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法。
- [2] 正常型STXBP1は配列表の配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列から成る請求項1記載の方法。
- [3] 前記試料がゲノムDNAである請求項1又は2記載の方法。
- [4] 前記異常型STXBP1をコードする遺伝子は、ミスセンス変異を有するSTXBP1遺伝子である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] 前記ミスセンス変異は少なくとも以下のいずれか一つである請求項4記載の方法。
- (1) 野生型STXBP1中のaa84のバリンがアスパラギン酸になる変異、
  - (2) 野生型STXBP1中のaa180のシステインがチロシンになる変異、
  - (3) 野生型STXBP1中のaa443のメチオニンがアルギニンになる変異、
  - (4) 野生型STXBP1中のaa544のグリシンがアスパラギン酸になる変異。

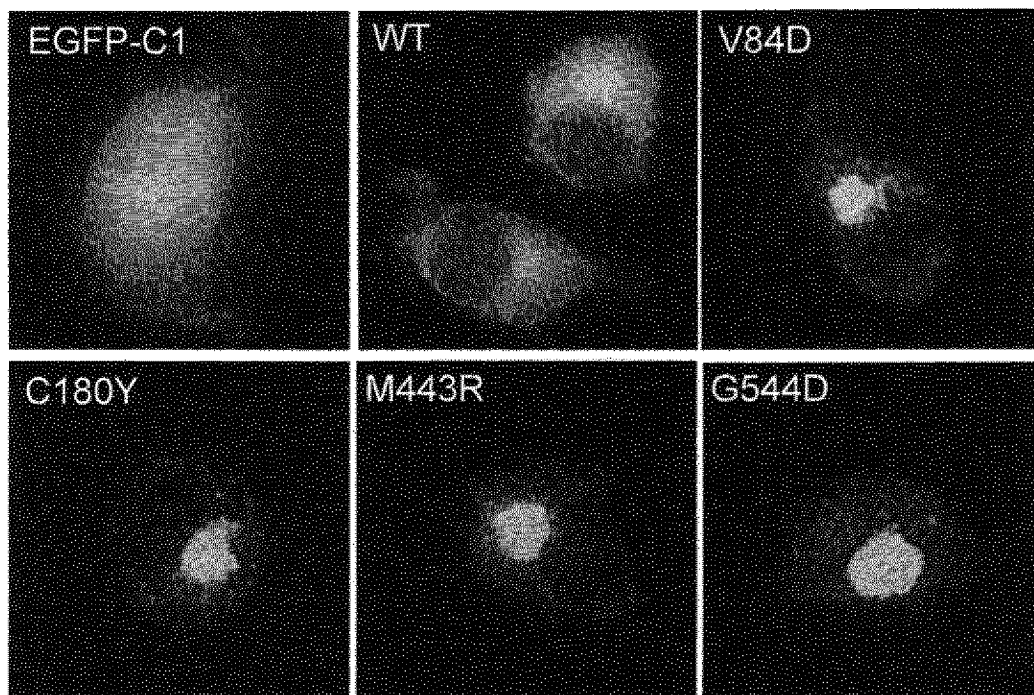
[図1]



[図2]



[図3]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2008/073164

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q1/68, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Hiroto Saito et al., De novo mutations in the gene encoding STXB1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy, Nature Genetics, 2008.06, Vol.40, No.6, 782-788, full text	1-5
P, Y	Stefan H. Gerber et al., Conformational Switch of Syntaxin-1 Controls Synaptic Vesicle Fusion, Science, 2008.09.12, Vol.321, 1507-1510, full text	1-5
A	WO 2006/133508 A1 (BIO-NOMICS LTD.), 21 December, 2006 (21.12.06), & EP 001904630 A & JP 2008-546376 A	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 March, 2009 (13.03.09)	Date of mailing of the international search report 24 March, 2009 (24.03.09)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/073164

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-325500 A (Hirosaki University), 07 December, 2006 (07.12.06), Claim 36; Par. Nos. [0002], [0038] (Family: none)	1-5
A	JP 2005-192411 A (Japan Science and Technology Agency), 21 July, 2005 (21.07.05), Claims 7, 10; Par. Nos. [0009], [0035] (Family: none)	1-5
A	JP 2004-329153 A (Japan Science and Technology Agency), 25 November, 2004 (25.11.04), Claims 9, 12; Par. Nos. [0042] to [0044] (Family: none)	1-5
A	Ru Yang et al., Autoimmunity to Munc-18 in Rasmussen's Encephalitis, Neuron, 2000, Vol.28, 375-383, Summary, Discussion	1-5
A	Yukitoshi TAKAHASHI et al., "Rasmussen Noen to Ko Shinkei Kotai", Neurological Medicine, 2003, 59(1), 38-44, page 40, right column	1-5

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CA(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Hiroto Saito et al., De novo mutations in the gene encoding STXB1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy, Nature Genetics, 2008.06, Vol.40, No.6, 782-788, 全文参照	1-5
P, Y	Stefan H. Gerber et al., Conformational Switch of Syntaxin-1 Controls Synaptic Vesicle Fusion, Science, 2008.09.12, Vol.321, 1507-1510, 全文参照	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13.03.2009	国際調査報告の発送日 24.03.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 長井 啓子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 4 5 0 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2006/133508 A1 (BIO-NOMICS LIMITED) 2006.12.21, & EP 001904630 A & JP 2008-546376 A	1-5
A	JP 2006-325500 A (国立大学法人弘前大学) 2006.12.07, 【請求項36】、【0002】、【0038】参照 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 2005-192411 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2005.07.21, 【請求項7】、【請求項10】、【0009】、【0035】参照 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 2004-329153 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2004.11.25, 【請求項9】、【請求項12】、【0042】～【0044】参照 (ファミリーなし)	1-5
A	Ru Yang et al., Autoimmunity to Munc-18 in Rasmussen' s Encephalitis, Neuron, 2000, Vol.28, 375-383, Summary, Discussion 参照	1-5
A	高橋幸利ら, Rasmussen 脳炎と抗神経抗体, 神経内科, 2003, 59(1), 38-44, 第40頁右欄参照	1-5