

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

◆ 記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		KANJI		KANJI		KANJI	
①研究代表者氏名		兼子 直		②所属研究機関・部局・職		弘前大学・医学部・教授	
③研究課題名	和文	てんかんの分子病態の解析：受容体・イオンチャネルの遺伝子多型に基づく個別化治療の開発					
	英文	Analysis of molecular biology of epilepsy: Development of personalized medicine for epilepsy based upon genetic polymorphisms.					
④研究経費		平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	平成20年度	総合計
18年度以降は内約額 金額単位：千円		32,000	17,800	15,800	13,600	13,000	92,200
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
兼子 直	弘前大学・医学部・教授	神経化学・てんかん学		本研究の総括、倫理的側面の管理、薬剤の効果判定、遺伝子診断・個別化治療設定			
佐藤 敬	弘前大学・医学部・教授	分子生物学・神経化学		変異遺伝子発現・機能解析、遺伝子改変モデル動物遺伝子解析			
和田 一丸	弘前大学・医学部・教授	てんかん学		てんかん診断・DNAゲノム管理			
岡田 元宏	弘前大学・医学部附属病院・講師	神経科学・てんかん学		神経科学研究の総括、遺伝子改変モデル動物機能解析			
古郡 規雄	弘前大学・医学部・講師	臨床薬理学		CYP多型・チャネル多型と薬物応答に関連する解析			
清水 俊夫	弘前大学・理工学部・教授	生物物理学		バイオインフォマティクス的てんかんの遺伝子多型データベースの構築			
辻 省次	東京大学・医学部附属病院・教授	神経内科学・分子遺伝学		分子生物学研究の指導、ゲノムワイドスクリーンによるてんかんの異常遺伝子同定			
桑野 良三	新潟大学・脳研究所・助教授	分子神経生物学		てんかんの遺伝子異常同定（ゲノムワイドスクリーン）			
小島 俊男	理化学研究所・ゲノム情報比較解析研究チーム・チームリーダー	分子遺伝学		網羅的伝達物質受容体・イオンチャネル遺伝子解析			
廣瀬 伸一	福岡大学・医学部・教授	分子遺伝学		分子生物学研究の総括、変異遺伝子同定と機能解析、トランスジェニックラットの作成			
山川 和弘	理化学研究所・神経遺伝研究チーム・チームリーダー	分子遺伝学		てんかんの遺伝子異常同定			
荒木 喜美	熊本大学・発生医学研究センター・助教授	発生工学		可変ノックアウトの作成			
若林 孝一	弘前大学・医学部・教授	神経病理学		遺伝子改変モデル動物の組織・病理学的検討			
上野 伸哉	弘前大学・医学部・教授	神経生理学		受容体・イオンチャネル機能解析			
福澤 雅志	弘前大学・農学生命科学部・助教授	分子生物学・細胞生物学		変異遺伝子クローニング			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
てんかんの分子病態を明らかにし、てんかんの遺伝子診断と個々の遺伝子変異と多型に基づいた薬力学的・薬物動態学的個別化治療の開発への基本的資料の提案が本研究の目的である。							
この目的達成のため、下記研究計画を実施した。							
A. てんかん分子病態の解析：薬力学的個別化治療開発を目的とした、受容体・イオンチャネルの遺伝子を網羅的に解析し、てんかんの責任遺伝子・感受性遺伝子を同定する。対象疾患はJuvenile myoclonic epilepsy (JME)・Childhood absence epilepsy (CAE)・juvenile absence epilepsy, epilepsy with myoclonic absences・benign familial neonatal convulsion (BFNC)・benign neonatal convulsion (BNC)・febrile seizure (FS) とした。							
B. 薬物動態学的特性の解析：抗てんかん薬の代謝を規定するCYP・トランスポーターの遺伝子多形を背景とした代謝能力シミュレーション化を目的とした解析。未だ解明されていない抗てんかん薬の作用機序の解析。							
C. バイオインフォマティクスを活用した個別化治療の開発：							
1) 変異蛋白機能解析法の開発 (in vitro, ex vivo, in vivo手法の合理的解析アルゴリズムの構築)							
2) 機能解析データをデータベース化した、個別化治療設定の薬力学・薬物動態学的支援手段システムの構築							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1. てんかんの分子病態の解明

1-1) 責任遺伝子解析の主な結果

- ・国際共同研究で JME の解析を行い、責任遺伝子として EFHC1 を同定し報告した (Nat Genet, 2004)。また EFHC1 の新たな変異および SNPs など多数の良性 variant を発見した (Ann Neurol 投稿準備中)。
- ・全般発作を示す 125 症例 (JME・CAE・juvenile absence epilepsy, epilepsy with myoclonic absences) を用いて遺伝子探索を行い、T type Ca²⁺チャネルをコードする遺伝子における、日本人特有の新たな変異を見いだした (Ann Neurol, in contribution)。
- ・家族性けいれん (BFNC) で発見された KCNQ2 遺伝子の変異を、孤発性 BNC 症例でも発見した (de novo KCNQ2)。(投稿準備中)
- ・BFNC 家系で新たな KCNQ3 遺伝子の変異を見いだした。(投稿準備中)
- ・JME、GEFS+、SMEI、BFNC・BNC・NFLE患者および正常対照群 192 例を対象に、あるK⁺チャネルを網羅的に解析し、3 種類の新たな変異と多数の新たなSNPsを見いだした。現在これらの機能変異を解析している。(結果の一部は投稿準備中)
- ・SMEI、GEFS+症例で SCN1A および SCN2A の変異を見だし、電気生理学的機能解析を施行した。機能変異と臨床類型における相関性はなく、この異なる両疾患の病態に、チャネル上のアミノ酸変異部位が関連する可能性を指摘した (Neurology 2004; Epilepsia 2004, etc)。
- ・ヒト側頭葉てんかんに類似した AP3M2 遺伝子欠損マウスの解析結果を基に、日本人てんかん患者 192 症例で AP3M2 遺伝子における変異を解析し、新たな 16 個の SNPs を発見し NCBI dbSNP database に登録した (投稿準備中)。
- ・50 万 SNPs をマーカーとした、日本人正常対照群 150 例と日本人てんかん患者 73 例のケースコントロールスタディーを実施し進行中である。この過程で従来の PCR を用いた解析手法では明らかに出来なかった、微小遺伝子欠損の解析手法を確立し報告した (BBRC, 2006)。現在症例数の拡充に努め、より精度の高いデータ取得に努めている。

2. 薬理学的性の解析

2-1) 治療に用いられる抗てんかん薬の作用機序解析

- ・全般発作 (Valproate:VPA)、部分発作 (carbamazepine:CBZ、zonisamide:ZNS と近く認可される新薬 topiramate) の治療に使用される抗てんかん薬 (AED) の作用機序をイオンチャネル、GABA、glutamate への作用を中心に解析し、薬剤選択への根拠を検討しつつある (結果は 2004, 2005, 2006 年の多数の論文にて公表した)。これまでのまとめは次頁へ。

2-2) 遺伝子診断法と遺伝子多型に基づく個別化治療の開発

- ・AED 代謝に関わる CYP の主要分子種 (CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP2D6 など) の既知のすべてのアリル頻度、遺伝子型 (poor, rapid, intermediate, ultrarapid metabolizer) 頻度を 423 人の正常日本人で決定した。Transporter 遺伝子 (MDR1) 多型は 317 症例で解析し、日本人には存在しない多型が判明した (投稿準備中)。

3. バイオインフォマティクスを活用した個別化治療の開発

3-1) 変異遺伝子の機能解析

- ・遺伝子改変動物：本研究グループが発見した ADNFLE 及び孤発性 NFLE の責任遺伝子 (CHRNA4 遺伝子の S284L 変異) を組み込んだ遺伝子改変ラット (S284L トランズジェニックラット) を作出した。各種スクリーニングに加え、行動学的・電気生理学的・神経科学的・分子生物学的解析を行った結果、ヒト ADNFLE の診断基準を満たし、臨床的な抗てんかん薬感受性も S284L 変異遺伝子を有するヒト ADNFLE と同等であることから、ヒトてんかんと同等の分子生物学的背景を有するてんかんモデル動物の作出に成功した (結果の詳細は記載しない、Nature Medicine in 2nd revision)。
- ・既知の CHRNA4 の 5 種の変異の内、S284L に加えて、V287L と V287M を組み込んだラットを作成し、S280F と insL は作成中である。我々が同定した BFNC の責任遺伝子 KCNQ2 (W309R) のノックインマウスも作出した。近く、これらの動物で電気生理学的・行動学的解析を行い、ヒトてんかんの診断基準を満たした場合、病態解析を開始する。
- ・作出した AP3M2 遺伝子欠損マウスは自発性のけいれん発作 (側頭葉てんかん) を起こし、GABA 細胞内輸送動態の変異と temporoammonic pathway の異常亢進が、てんかん病態に関与することを明らかとした (J Cell Biol, 2004)。
- ・その他、多数見いだされた新たな遺伝子変異による機能変化を解析した (各遺伝子異常を報告した論文に記載)。

3-2) 解析の高速化

Bioinformatics を用いてゲノムの受容体・チャネル遺伝子情報を利用し、効率のかつ高速に受容体・チャネル機能を行うためのシステムを開発中であるが、全ゲノムの中の小さな変化の同定を可能とする方法を開発した。これは通常の karyotype 解析を行い、次いで DNA microarray 解析と PCR で染色体の欠損部位を正確に決め、欠損部位に存在する遺伝子が同定可能であることを証明した (BBRC, 2006)。

3-3) 臨床効果判定に関わる成果

当初、AED 投与に対する臨床反応の解析は予期的に行う予定であったが、研究期間内に集まる症例数は十分ではないとの予測のもと、2006 年 3 月の大阪でのグループ会議で現在 VPA で治療中の全般発作、CBZ で治療中の部分発作の患者 (non-responder は ZNS) も対象とするとの合意を得、新たなプロトコルの設定と症例記録用紙を作成し、サンプリングを開始した。

VPA には新たに臨床使用される製剤が加わり、2 種類の製剤が存在する (セレニカ R、デパケン R) ことなるため、健常成人を対象にクロスオーバー法により両剤の体内薬物動態と生物学的同等性の比較検討を行い、生物学的同等性に差異はないが、最高血中濃度到達時間に約 5 時間の差異が存在することを明らかにした (Prima Medica, 2005)。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1 ヒト前頭葉てんかん(ADNFLE/NFLE) 責任遺伝子を組み込んだ遺伝子改変ラットの作出と機能解析

家族性及び孤発性前頭葉てんかん(ADNFLE/NFLE)の責任遺伝子であるCHRNA4のS284L変異を組み込んだ遺伝子改変ラット(S284L-TG)を作出し、それがヒトADNFLE/NFLEの診断基準を満たす、てんかんでは世界初のてんかんモデル動物を獲得した。これまでのモデル動物は電撃けいれん・薬物誘発性けいれんを指標にしたけいれんモデルであり、てんかんモデルではなかった。S284L-TGの獲得により、このラットの脳を用いることで分子病態の解析が可能となるだけでなく、その解析結果は新たな治療法の開発に寄与しうる。現在S284L-TGは実用化試験を終了し、実用化に向けた市場調査を開始する。加えて、ADNFLEの家系調査では、家系内に自閉症、統合失調症を併発する変異と併発しない変異があり、CHRNA4の既知の7種類のADNFLE/NFLE変異の中で、認知機能障害を有する2種類の変異を含めた計5種類のモデル動物の作出を完了することになる。これらの変異を導入した遺伝子改変動物の行動解析と神経伝達機能変異を解析することで、てんかんだけではなく認知機能障害の病態解析をも可能となる。加えて、このセットがヒト前頭葉障害を解析する上で最初の認知障害モデル動物ともなる可能性がある(Nature Medicine, in revision)。

2 Genotypingを用いたgenomic breakpointの決定法の開発

従来法では検出が不可能であった、微少遺伝子欠損の同定を可能とする方法を開発した。これは通常のkaryotype解析を行い、次いでDNA microarray解析による欠損遺伝子スクリーニングの後、ダイレクトシーケンシングによる欠損部位を検出する方法である。既に、フィッシャー法による欠損部位が明らかな症例を用い、欠損領域に存在する遺伝子が同定可能であることを証明し報告した(BBRC, 2006)。現在、この手法を用いて非定型欠損発作を示すSmith-Magenis syndromeの症例で(17p11.2の腕内欠失)欠失部位に存在する遺伝子群を同定中である。今後、これまで解析してきたサンプルの再調査をも施行し、微少遺伝子欠損の解析を進める予定である。

3 てんかんの遺伝子解析における人種差の重要性の確認

日本人とヒスパニックにおいて全般発作(IGE)の遺伝子を探索し、あるイオンチャネルをコードする遺伝子に変異を見いだしたが、これらの変異もアミノ酸置換も日本人にのみ見いだされ、ヒスパニックには無かった(Ann Neurol, in contribution)。このことはカスタムメイドのDNAチップを作成する際には日本人特有の遺伝子変異、SNPsを選択し、搭載する必要性を示す。

そのため、抗てんかん薬代謝に関わるCYPの主要分子種(CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP2D6など)の既知のすべてのアリル頻度、遺伝子型(poor, rapid, intermediate, ultrarapid metabolizer)頻度を423人の正常日本人で決定した。Transporterの遺伝子(MDR1)多型は317症例で解析し、日本人には存在しない多型が判明した。加えて、Affimetrix社製DNAチップ(500K)を用いて日本人正常対照群150例、日本人てんかん患者73例で50万SNPsの解析を行った。これらの資料は日本人SNPsのデータベース化に役立つ。

4 EFHC1の発見とその分子病態の意味すること

JMEは最も頻度の高い全般発作であるが、このJMEにおいて新たにEF-hand motifをコードする遺伝子EFHC1の変異(ヘテロで3種、ホモで1種)を見いだした(Nat Genet, 2004)。当初、日本人患者ではこの遺伝子の変異は見いだされなかったが、我々の家系でもこの遺伝子の新たな変異が見いだされ、人種を越えてJMEの責任遺伝子であることが確認された(投稿中準備中)。

この遺伝子発見の意義は単にJMEの重要な責任遺伝子を見いだしたことだけでなく、その分子病態の新たな理解にある。つまり、EFHC1に変異があるとapoptosisにより本来は胎児期に細胞死を起こすべき細胞が生き残り(Cav2.3の拮抗薬SBX-482でEFHC1変異による効果を少なくすることが出来る、EFHC1のN-terminusとCav2.3が結合していることも確認)発達段階でてんかんが発現するという理解である。EFHC1はCav2.3を通して細胞内へのCa²⁺の流入を強め、Ca²⁺のホメオスタシスを不安定にする細胞の(プログラムされた)細胞死を起こすが、変異によりEFHC1の機能が一部傷害された結果、中枢神経内にこのような興奮を起こす細胞が密に残り、興奮性のサーキットが発達段階で構築されるのではないかと、中枢神経系の発達とてんかん源性の関連に置いて「新たなてんかんの分子病態の理解」を提案したことにある。

Effects of antiepileptic drugs on ion channels

AED	Na ⁺ channel blockade	T-type Ca ²⁺ channel blockade	Non-T-type Ca ²⁺ channel blockade	GABA-minosis	Anti-glutamate	monoamine release
Phenytoin	+++		+	+		
Phenobarbital	++		+	++	++	
Carbamazepine	+++		+	+	+	+++
Valproic acid	++	+	+	++	+	+++
Ethosuximide		+++				
Benzodiazepines	+		+	+++		
Zonisamide	+	++	+		++	+++
Lamotrigine	+++				+	
Oxcarbazepine	+++		+		+	
Tiagabine				+++		
Gabapentin			++	++		
Felbamate	+		+	+	++	
Topiramate	++		+	++	++	+++

表・抗てんかん薬の作用機序

抗てんかん薬の作用機序を、てんかん責任遺伝子が同定されたイオンチャネルに絞りまとめた物である。赤は本研究計画で明らかになった部分を示している。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

【論文】

1. Yamauchi T, Kaneko S, Yagi K, Sase S. Treatment of partial seizures with gabapentin. *Psychiat Clin Neurosciences*, 2006 in press.
2. Kojima T, Mukai W, Fuma D, Ueda Y, Okada M, Sakai Y, and Kaneko S. Determination of genomic breakpoints in an epileptic patient using genotyping array. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(3): 792-796.
3. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Mori F, Hirose S, Wakabayashi K, and Kaneko S. Involvement of Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing system in interleukin-1 β -associated adenosine release. *Eur J Pharm* 2006; 532: 246-252.
4. Yasui-Furukori N, Uno T, Kaneko S, and Tateishi T. Author's reply: Hydroxylation of lansoprazole in poor metabolizers -of CYP2C19. *Brit J Clin Pharmacol* 2006; 61(3): 361-362.
5. Yasui-Furukori N, and Kaneko S. Digitalis intoxication induced by paroxetine co-administration. *Lancet* 2006; 367: 788.
6. Yasui-Furukori N, Saito M, Nakagami T, Kaneda A, Tateishi T, and Kaneko S. Association between multi-drug resistance(*MDR1*) gene polymorphisms and therapeutic response to bromperidol in schizophrenic patients: A preliminary study. *Prog Neuro-Psychopharm & Biol Psychiat* 2006; 30: 286-291.
7. Wakabayashi K, Mori F, Hasegawa M, Kusumi T, Yoshimura I, Takahashi H, Kaneko S. Co-localization of β -peptide and phosphorylated tau in astrocytes in a patient with corticobasal degeneration. *Neuropathology* 2006; 26: 66-71..
8. Okada M, Yoshida S, Zhu G, Hirose S, and Kaneko S. Biphasic action of topiramate on monoamine exocytosis associated with both soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors and Ca²⁺ induced Ca²⁺-releasing system. *Neuroscience* 2005; 134: 233-246.
9. Mori F, Okada M, Tomiyama M, Kaneko S, and Wakabayashi K. Effects of ryanodine receptor activation on neurotransmitter release and neuronal cell death following kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 2005; 65(1-2): 59-70.
10. Yoshida S, Okada M, Zhu G, and Kaneko S. Effects of zonisamide on neurotransmitter exocytosis associated with ryanodine receptors. *Epilepsy Res* 2005; 67(3): 153-62.
11. Huang CW, Ueno S, Okada M, and Kaneko S. Zonisamide at clinically relevant concentrations inhibits field EPSP but not presynaptic fiber volley in rat frontal cortex. *Epilepsy Res* 2005; 67: 51-60.
12. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Mori F, Hirose S, Wakabayashi K, Kaneko S. Involvement of Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing system in interleukin-1 β -associated adenosine release. *Eur J Pharmacol* 2005; 532: 246-252.
13. Yabe H, Sutoh T, Matsuoka T, Asai R, Hiruma T, Sato Y, Iwasa H, and Kaneko S. Transient gamma-band response is dissociated from sensory memory as reflected by MMN. *Neurosci Lett* 2005; 380(1-2): 80-82.
14. Yabe H, Matsuoka T, Sato Y, Hiruma T, Sutoh T, Koyama S, Gunji A, Kakigi R and Kaneko S. Time may be compressed in sound representation as replicated in sensory memory. *Neuroreport* 2005; 16(2): 95-98.
15. Hirose S, Mitsudome A, Okada M, and Kaneko. Genetics of idiopathic epilepsies. *Epilepsia* 2005; 46(1): 38-43.
16. Oguni H, Hayashi K, Osawa M, Awaya Y, Fukuyama Y, Fukuma G, Hirose S, Mitsudome A, and Kaneko S. Severe myoclonic epilepsy in infants -clinical analysis and relation to SCN1A, mutations. *Adv Neurol* 2005; 95: 103-117.
17. Okada M, Zhu G, Yoshida S, Hirose S, and Kaneko S. Chapter 6: mechanisms of calcium-associated exocytosis of striatal dopamine and DOPA release, studied by in vivo microdialysis.(Eds by Misu Y & Goshima Y), pp.89-99, Taylor & Francis; New York; 2005.
18. Yabe H, Asai R, Hiruma T, Sutoh T, Koyama S, Kakigi R, Tervaniemi M, and Kaneko S. Sound perception affected by nonlinear variation of accuracy in memory trace. *Neuroreport* 2004; 15(18): 2813-2817.
19. Taima K, Takanashi S, Okumura K, Imaizumi T, Kumagai M, Ishikawa A, Yoshida H, Satoh K, Fujita T: Double-stranded RNA stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in BEAS-2B bronchial epithelial cells. *Exp Lung Res* 31(3): 361-375, 2005.
20. Imaizumi T, Kumagai M, Taima K, Fujita T, Yoshida H, Satoh K: Involvement of RIG-I in IFN- γ /STAT1 signaling pathway in BEAS-2B cells. *Eur Resp J* 25(6): 1077-1083, 2005.
21. Imaizumi T, Mori F, Hatakeyama M, Yamashita K, Ishikawa A, Taima K, Yoshida H, Wakabayashi K, Satoh K: Double-stranded RNA induces the synthesis of retinoic acid-inducible gene-I in vascular endothelial cells. *Endothelium* 12(3): 133-137, 2005.
22. Imaizumi T, Yamashita K, Taima K, Ishikawa A, Yoshida H, Satoh K: Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands on the expression of retinoic acid-inducible gene-I in endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 78(1-4): 46-54, 2005.
23. Nakatsu F, Okada M, Mori F, Kaneko S et al: Defective function of GABA-containing synaptic vesicles in mice lacking the AP-3B clathrin adaptor. *J Cell Biol* 167(2): 293-302.

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

- ⑭ Suzuki T, Yamakawa K, Kaneko S, et al. Mutation in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. Nature Genet 2004; 36/8: 842-849.
- ⑮ Okada M, Zhu G, Yoshida S, Hirose S, and Kaneko S. Protein kinase associated with gating and closing transmission mechanisms in temporoammonic pathway. Neuropharmacology 2004; 47(4): 485-504.
26. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, Miyajima T, Yasumoto S, Ohfu M, Inoue T, Watanavhai A, Kira R, Matuo M, Munakata H, Sofue F, Zhang B, Kaneko S. Mitsudome A, and Hirose S. Mutations of neuronal voltage-gated Na⁺ channel $\alpha 1$ subunit gene SCN1A in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI(SMEB).Epilepsia 2004; 45(2): 140-148.
27. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Hirose S, and Kaneko S. Both 3, 4-dihydroxyphenylalanine and dopamine releases are regulated by Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing system in rat striatum. Neurosci Lett 2004; 362(3): 244-248.
28. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Hirose S, and Kaneko S. Pharmacological discrimination of protein kinase associated exocytosis mechanisms between dopamine and 3,4-dihydroxyphenylalanine in rat striatum using in vivo microdialysis. Neurosci Lett 2004; 363(2): 120-124.
29. Zhu G, Okada M, Uchiyama D, Ohkubo T, Yoshida S, and Kaneko S. Hyperactivity of endoplasmic reticulum associated exocytosis mechanism contributes to acute phenylclidine intoxication. J Pharm Sci 2004; 95:214-227.
30. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Hirose S and Kaneko S. Determination of exocytosis mechanisms of DOPA in rat striatum using in vivo microdialysis. Neurosci Lett 2004; 367: 241-245.
- ⑰ Kanai K, Hirose S, Oguni H, Fukuma G, Shirasaka Y, Miyajima T, Wada K, Iwasa H, Yasumoto S, Matsuo M, Ito M, Mitsudome A, and Kaneko S. Effect of localization of missense mutations in SCN1A on epilepsy phenotype severity. Neurology 2004; 63(2): 329-334.
32. Suzuki T, Delgado-Escueta VA, Aguan K, Shi J, Hara Y, Nishida M, Numata T, Takeuchi T, Bai D, Inoue Y, Osawa M, Kaneko S, Oguni H, Mori Y, and Yamakawa K. Identification of the gene responsible for juvenile myoclonic epilepsy. Epilepsia 2005; 46(Suppl 3): 15-16.
33. Kanai K, Hirose S, Oguni H, Fukuma G, Shirasaka Y, Miyajima T, Kuwabara S, Wada K, Iwasa H, Yasumoto S, Ito M, Hattori T, Mitsudome A, and Kaneko S. Localisation of missense mutations in SCN1A affects epilepsy phenotype severity. Neurology Asia 2005; 9 (Suppl 1): 144.
34. Ishii A, Fukuma G, Yasukochi M, Uehara A, Miyajima T, Hamachi A, Yonetani M, Kaneko S, Mitsudome A, and Hirose S. Mutations of KCNQ2 and KCNQ3 identified in benign neonatal convulsions cause channel dysfunction despite proper expression on the cell membrane. Neurology Asia 2005; 9 (Suppl 1): 146.
35. Kanaumi T, Fukuma G, Ueno S, Ishii A, Haga Y, Hamachi A, Yonetani M, Itoh M, Takashima S, Kaneko S, Mitsudome A, and Hirose S. Possible pathogenesis of severe myoclonic epilepsy in infancy: A novel nonsense mutation of GABRG2 leading to aggregation of GABA receptors in neurons. Neurology Asia 2005; 9 (Suppl 1): 151.
36. Okada M, Yoshida S, Zhu G, Ueno S, and Kaneko S. Down-regulation of CICR gene expression by carbamazepine, via stimulation of CICR associated monoamine exocytosis. J Pharmacol Sci 2005; 97 (Suppl 1): 78P.
37. Huang CW, Ueno S, Okada M, and Kaneko S. Zonisamido at clinically relevant concentrations inhibits evoked EPSP but not presynaptic fiber volley in rat frontal cortex. J Pharmacol Sci 2005; 97 (Suppl 1): 268P.
38. Zhu G, Okada M, Mori F, Nakatsu F, Yoshida S, Wakabayashi K, Ohno H, and Kaneko S. Age-Dependent impairment of GABA ergic transmission in $\mu 3B$ knockout mice. Epilepsia 2005; 46(Suppl 2): 2.
39. Ishii Ai, Fukuma G, Uehara A, Miyajima T, Makita Y, Hamachi A, Yasukochi M, Inoue T, Okada M, Kaneko S, Mitsudome A, and Hirose S. A novel de novo KCNQ2 mutation in a sporadic case of benign neomatal convulsions. Epilepsia 2005; 46(Suppl 2): 3-4.
40. Okada M, Zhu Gang, Yoshida S, Mori F, Wakabayashi K, and Kaneko S. Effects of carbamazepine on mechanism of Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing system-associated exocytosis. Epilepsia 2005; 46(Suppl 2): 15-16.
41. Nakatsu F, Okada M, Mori F, Kumazawa N, Iwasa H, Zhu G, Kasagi Y, Kamiya H, Harada A, Nishimura K, Takeuchi A, Miyazaki T, Watanabe M, Yasa D, Manabe T, Wakabayashi K, Kaneko S, Saito T, and Ohno H. Epileptic seizure in mice deficient in $\mu 3B$ subunit of AP-3B complex. Epilepsia 2005; 46(Suppl 2): 67-68.
42. Zhu G, Okada M, Nakatsu F, Mori F, Yoshida S, Wakabayashi K, Ohno H, and Kaneko S. Impairment of monoaminergic transmission in $\mu 3B$ knockout mice. Epilepsia 2005; 46(Suppl 3): 11-12.
43. Wada K, Iwasa H, Okada M, Kawata Y, Murakami T, Kamata A, Zhu G, Onasai T, Kato T, and Kaneko S. Marital status of patients with epilepsy with special reference to the influence of epileptic seizures on the patient's married life. Epilepsia 2004; 45(Suppl.8): 33-36.
44. Hirano Takayuki, Fujioka Kuniko, Okada Motohiro, Iwasa Hiroto, and Kaneko Sunao. Physical and psychomotor development in the offspring born to mothers with epilepsy. Epilepsia 2004; 45(Suppl.8): 53-57.
45. Iwasa H Nakatsu F, Kasagi Y, Okada M, Ohno H, and Kaneko S. The possible contribution of adaptor protein complex Wada K, Mitsudome A, Kaneko S, Montal M, Nagata K, Hirose S, and Yamakawa K. Epilepsia 2004; 45(Suppl.8): 58-59.

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

46. Hirose S, Fukuma G, Iwata H, Matsushima N, Sugiyama H, Ito M, Kaneko S, and Mitsudome A. Electrophysiologic in the basic mechanisms of epilepsy: Experimental studies of seizure susceptibility in $\mu 3b$ gene knockout mice. *Epilepsia* 2004; 45(Suppl.8): 58.
47. Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala LK, Ito M, Fukuma G, Mazaki-Miyazaki E, Nagafuji H, Noda M, Imoto K, characterization of neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) harboring a mutant (Ser284Leu) of nAChR $\alpha 4$ subunit (CHRNA4) found in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE). *Epilepsia* 2004; 45(Suppl.8): 60
48. Ito M, Nagafuji H, Fukuma G, Hirose S, Sugawara T, Mazaki E, Yamakawa K, Shirasaka Y, Okuno T, Miyajima T, Mitsudome A, Wada K, and Kaneko S. Autosomal dominant epilepsy with febrile seizure plus. *Epilepsia* 2004; 45(Suppl.8): 61.
49. Kawata Y, Okada M, Murakami T, Zhu G, Yoshida S, Kamata A, and Kaneko S. Effects of valproate on basal monoamine releases in rat hippocampus. *Epilepsia* 2004; 45(Suppl.8): 68.
50. 兼子直. てんかんの生物学的背景-病態解明から個別化治療の開発.精神医学対話, 松下正明, 神庭重信編. 弘文堂, 2006, 印刷中.
- 51.和田一丸, 兼子直. (疾患を有する妊婦・授乳婦への薬物治療) てんかん患者. 薬事 2006; 48(2): 47-50.
52. 古郡規雄. 向精神病薬と高プロラクチン血症. *CLINIC magazine* 2006; 33(1): 33(1).
53. 兼子直, 金井数明, 岡田元宏, 桑原聡, 廣瀬伸一.てんかん -責任遺伝子解明の進展とその後の課題-. 実験医学 2005; 23(5): 776-781.
54. 岡田元宏, 朱剛, 上野伸哉, 吉田淑子, 福間五龍, 廣瀬伸一, 兼子直.ヒトてんかんと同じ遺伝子異常をもつ組換え動物の作出.精神薬療研究年報 2005; 37: 160-164.
55. 岩佐博人, 兼子直. てんかんにおける認知障害とその分子基盤-遺伝子異常との関連を含めて-.分子精神医学 2005; 5(3): 284-290.
56. 古郡規雄, 近藤毅, 兼子直. 徐放性バルプロ酸ナトリウム製剤(セレニカ®錠200mg, デパケン®錠R200)の体内薬物動態と生物学的同等性の比較検討. *Pharma Medica* 2005; 23(12): 71-75.
57. 兼子直.てんかんの分子病態.「脳の世紀」推進会議(伊藤正男, 晝馬輝夫, 河西春郎, 山口陽子, 兼子直, 酒井邦嘉)編, 脳を知る・創る・守る・育む, pp.100-129, (株)クパプロ, 東京; 2005.
58. 兼子直, 金井数明, 福間五龍, 岡田元宏, 桑原聡, 廣瀬伸一.てんかんの分子遺伝学研究のUp to date. *ゲノム医学*; 5(3): *ゲノム医学*.
59. 岩佐博人, 兼子直. てんかんの薬物療法における新たな視点-オーダーメイド治療の可能性と課題-. 神経進歩 2005; 49(5):745-756.
60. 兼子直, 和田一丸. メンデル型遺伝を示すてんかん症候群 -チャンネル病を中心に-. *精神科治療学* 2005; 20(Suppl): 364-366
61. 兼子直. てんかん病態解明への挑戦. *International Epilepsy News* 2004; 149: 33-34.
62. 兼子直. チャネロパチー. *分子精神医学* 2004; 4(2:)162-163.
63. 兼子直, 金井数明. てんかんの遺伝子診断の可能性. *精神神経学雑誌* 2004; 106(5): 660-670.

学会発表

- Zhukovskaya N, Fukuzawa M, Araki T, Yamada Y, and Williams J. Regulation for Dictyostelium prestalk-specific gene expression by a bZIP and a MYB transcription factor. International Dictyostelium Conference 2005, August 13-18, 2005, Autrans, France.
 - Inoue Y, Kanai K, Mizuta S, Okada M, Kaneko S and Shimizu T. Comprehensive Detection of TM Protein Genes which might be associated with Febrile. The 16-th International Conference on Genome Informatics (GIW2005), Yokohama.
 - Arai M, Fukushi T, Satake M, and Shimizu T. Domain Architecture of Transmembrane Proteins: Focusing on Single-Spanning Proteins First. The 9th Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB2005), Boston.
 - Mizuta S, Munakata H, Aimaiti A, Oya I, Oosawa K, and Shimizu T. Seeking Genome Rearrangements in Prokaryotic Genomes via Tandem Repeats. The 9th Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB2005), Boston.
 - Mori F, Nishie M, Piao YS, Kito K, Kamitani T, Takahashi H, Wakabayashi K: Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. The Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, 2004.10.23-27, San Diego, USA.
 - Ueno S., Yamada J., Yamamoto S., Furukawa T. & Fukuda A. Expression and function of P2X receptors in rat supraoptic nucleus. 4th Forum of European Neuroscience 2004.7.10-14 Lisbon, :Portugal,2004
 - Yamamoto S, Yamada J, Ueno S, Fukuda A. Midazolam facilitate presynaptic GABA release via alpha7 nicotinic Ach receptors in layer V neocortical pyramidal neurons 4th Forum of European Neuroscience 2004.7. 10-14 Lisbon, :Portugal,2004
 - Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Shi J, Hara Y, Nishida M, Numata T, Takeuchi T, Bai D., Inoue Y, Osawa M, Kaneko S, Oguni H, Mori Y, Yamakawa K (2004) 若年性ミオクロニーてんかん(JME)責任遺伝子の同定 第38回日本てんかん学会、静岡、9月
- 兼子直. てんかんの分子遺伝学. 第13回日本精神・行動遺伝学会. 福岡, 2005.10.1.(特別講演)
- 兼子直. 精神科領域における個別化治療の可能性. 第48回日本神経化学大会. 福岡, 2005.9.30.(ランチョンセミナー)
- 井上泰仁, 金井数明, 水田智史, 岡田元宏, 兼子直, 清水俊夫. てんかん関連膜貫通タンパク質遺伝子の網羅的検出. 第43回日本生物物理学会年会、2005年11月23-25日、札幌 (教育講演)