

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18300137  
 研究課題名（和文） ヒトてんかんと同じ遺伝子異常を持つモデル動物の作出とその比較ゲノミクスの病態解析  
 研究課題名（英文） Establishment of animal model harboring a homologous mutation of human epilepsy and analysis of genomics”  
 研究代表者  
 上野 伸哉(UENO SHINYA)  
 弘前大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：00312158

## 研究成果の概要：

ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかん責任遺伝子（nACh receptor 遺伝子変異：S284L）を導入したラット（S284L-Tg）を作出し、脳波解析、行動解析、電気生理的機能解析の結果、Face validity（疾患とモデルの表現型の妥当性）、Construct validity（疾患とモデルのメカニズムの妥当性）、Predictive validity（疾患治療薬がモデルにも有効）の3点をクリアする世界初のてんかんモデルラットであることを示し報告した（J.Neurosci 28 (2008) 12465-12476）。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2007年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：脳・神経、てんかん、疾患モデル、遺伝子改変動物、イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

てんかん治療薬の開発やてんかんの電気生理学的、神経薬理学的さらに神経病理学的な基礎研究には従来からキンドリングラットやカイニン酸等によるけいれんモデル動物が使用されてきた。しかしながら、これらは"けいれん"のモデル動物であり必ずしも分子レベルでのヒト"てんかん"のモデルではなかった。同様に、自然発生のてんかんが多種の動物に見られるものの、分子生物学的にヒトのてんかんと同じ異常を持つモデル動物はまだ見つかっていない。このため、分子レベルでのてんかんの病態解明、創薬のための実験動物が強く望まれていた。

## 2. 研究の目的

(1) 遺伝性ヒトてんかん病態のなかで、特にニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に複数の変異が見つかっているヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかん(ADNFLE)に着目した。分子生物学・神経科学的な研究手法に耐えうる、ヒトてんかんの原因となる遺伝子異常をもつ遺伝子改変てんかんモデル動物の作出・系統確立を行う。  
 (2) 作出した遺伝子改変動物を用い、異なる遺伝子異常から、どのようにてんかんという共通の病態発症に至るかの機序解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変モデル動物作出・系統維持  
 正規性が検証された cDNA を中枢神経特異

性を有する PDGF プロモーターと共にベクターへ挿入し、SD 系ラットの受精卵へ注入する。作出した strain を維持し、てんかん発作の有無を指標に選別後、モデル動物の機能変異を検証する。

(2) タンパク機能解析と補正スクリーニング  
変異遺伝子と正常遺伝子を HEK293 細胞へ導入し形質膜上に発現したタンパクの機能解析をホールセルパッチ法を用いて検証する。 $\alpha 4\beta 2$  ニコチン受容体に対する選択的作動薬・阻害薬に対する反応性を感受性・開口速度・脱感作時間・イオン流入量を定量化して検討する。形質膜上への輸送・発現機構をも組織学的に検討する。

(3) 遺伝子改変モデル動物のスクリーニング  
S284L を始めとする 3 種類のトランスジェニックラットの生命予後、光顕レベルの組織学的検索などの基本的スクリーニングを施行する。

(4) 遺伝子改変モデル動物の行動解析  
以下の項目をルーチンとして行い、必要性に応じて実施計画を修正する。

記憶・学習 : Water maze test, Passive avoidance test

不安・抑うつ : Social interaction test, Learned helplessness test, Elevated plus test, Forced swim test

自発運動量 : Spontaneous locomotor activity (circadian rhythm), Open field test

(5) 神経伝達物質解析

In vivo microdialysis・biosensor を用い、acetylcholine, adenosine, aspartate, ATP, dopamine, GABA, glutamate, glycine, norepinephrine, serotonin の 10 種類の神経伝達物質・修飾物質の開口分泌制御機構の解析を行う。

(6) 神経伝達伝播解析

64 チャンネル細胞外刺激装置を有する細胞外電位 2 次元解析装置(optical-MED64)を用い、皮質・皮質 海馬・視床 皮質路の神経回路および周辺組織の興奮性伝播測定を施行する。

上記神経回路の興奮性伝播解析後に単一細胞レベルの入力・出力をスライスパッチクランプを用いて解析する。

(7) タンパク発現解析

既に作出に成功した S284L トランスジェニックラットで得られた、発現変動があった 80 種類のタンパクに加えて、前述の 4 - 2 ) で施行した、マイクロアレイ・real-time PCR で解析タンパクを追加選定し、脳各部位を Glovinsky の方法に従い、細胞質分画・形質膜分画・小胞分画・ER 分画で Western blot 法で発現タンパクの変動を解析する。

#### 4. 研究成果

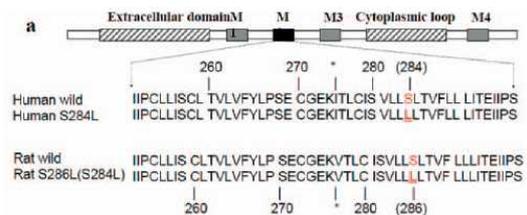
(1) モデル動物作出

ヒト夜間前頭葉てんかん (ADNLF) の原因遺

伝子はニコチン性 Ch チャンネルをコードしており、 $\alpha 4$  及び  $\beta 2$  サブユニットに数種類の変異が人より見つかっている。 $\alpha 4$  および  $\beta 2$  サブユニットにヒトと同じ変異を持つ遺伝子改変動物、S284L-TG の 1 系統および 4 系統の  $\beta 2$  変異導入ラットを作出した。S284L-TG および  $\beta 2$  変異の 2 系統において、脳波記録およびビデオによる行動観察同時記録により自発性痙攣発作が確認された。また 1 年以上の長期飼育が可能であり、繁殖性にも特に異常は見られなかった。また、幼若期から、老齢期の動物の組織学検索においては奇形など著明な解剖学的異常は見られなかった。これらのヒトと同じ変異を導入した遺伝子改変動物は、発現量、組織学的検索、長期飼育、繁殖性には異常なく、自発痙攣発作の行動および脳波上での痙攣発作が見られることより、てんかんのモデル動物として機能解析に値すると考えられた。異なる変異から、同様なてんかん病態にいたる細胞内情報伝達系異常の解析に役立つモデル動物としての応用が、今後可能とした。

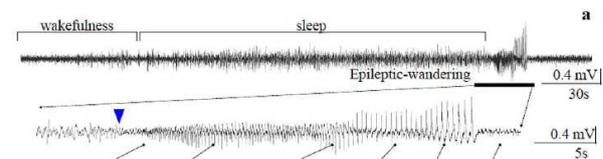
(2) 遺伝子改変動物モデル機能解析

S284L-TG モデルの Construct validity  
この遺伝子改変ラットは  $\alpha 4$  にヒトと同じ変異導入した ADNFLE モデル動物である (S284L-TG)。ADNFLE 変異部位を下図に示す。



S284L-TG モデルの Face validity

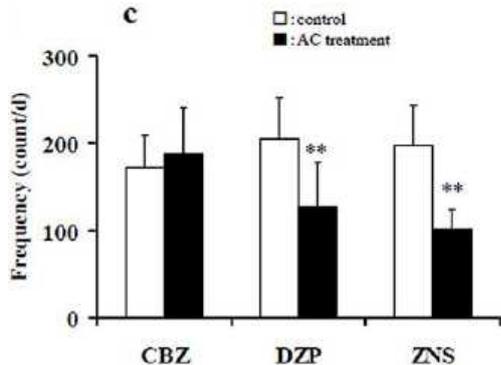
脳波およびビデオの同時解析により、ヒトに観察される痙攣発作 (“paroxysmal arousals,” “paroxysmal dystonia,” “episodic wandering”) と同様な発作波形および行動を呈した。しかも、その発作は、ヒトの場合と同様、睡眠脳波出現時に発生し(下図に睡眠時けいれん発作脳波を示す)、また発作焦点は大脳皮質運動野から起きており、ヒトの病態と同一であった。つまり、S284L-TG の性質はヒト ADNLF の診断基準を満たすものであった。



S284L-TG の Predictive validity

S284L-TG の脳波上の痙攣発作波に対する抗痙攣薬の効果は、ジアゼパム、ゾニサミドは

抑制効果を持つが、カルバマゼピンは抑制効果を持たなかった。この性質もヒトADNFLEの場合と同様であった。(CBZ:カルバマゼピン、DZP:ジアゼパム、ZNS:ゾニサミドをそれぞれ2週間投与による発作間欠期異常脳波数の変化を下图に示す)



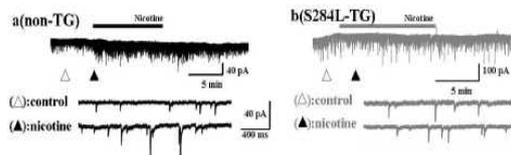
以上のことより S284L-TG はてんかんモデルラットとして 疾患とモデルのメカニズムの妥当性、疾患とモデルの表現型の妥当性 疾患治療薬がモデルにも有効であること、の3点をクリアする世界初のモデル動物である(雑誌論文)

#### S284L-TG の病態解析

このモデル動物が示す細胞レベルでの機能異常を明らかとした。

i)覚醒から睡眠に以降する際、脳内での興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、正常動物においては、減少する。ところが S284L-TG においては、この際の減少がみられない。

ii)その機構として、抑制性神経伝達物質である GABA の伝達機構の減弱が起きていることを電気生理学的に証明した。この抑制系 GABA 系の減弱により、相対的に興奮系の増強がおこり、痙攣発作をひきおこしていると考えられる。下图に S284L-TG におけるニコチン誘導性の GABA 応答の減弱例を示す。



#### てんかん原性の病態機構

S284L-TG において、けいれん発作発症機構に、そのメカニズムの関与を明らかとした。しかしながら、遺伝子変異がいかんして、てんかん原性を引き起こすかに関してはまだ明確な機構は明らかとなっていない。そこで、痙攣発作発症以前より、細胞レベルの機能異常を探索した。その結果、やはり -ii)とは異なる GABA 系の異常が既に発現していることを見いだした。遺伝子異常からてんかん病

態にいたる機構解明に、S284L-TG の痙攣発作発症以前の情報伝達機構のゆがみを標的として解析を行うことにより病態機構の解明および治療につなげることが可能と考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Araki, K., Takeda, N., Yoshiki, A., Obata, Y., Nakagata, N., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Yamamura, K. Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain. *Mamm Genome* 20, 14-20. (2009) 査読有り

Zhu G., Okada M., Yoshida S., Ueno S., Mori F., Takahara T., Saito R., Miura Y., Kishi A., Tomiyama M., Sato A., Kojima T., Fukuma G., Wakabayashi K., Hase K., Ohno H., Kijima H., Takano Y., Mitsudome A., Kaneko S. & Hirose S. Rats Harboring S284L ChRNA4 Mutation Show Attenuation of Synaptic and Extrasynaptic GABAergic Transmission and Exhibit the Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy Phenotyp. *J. Neurosci* 28, 12465-12476, (2008), 査読有り

Yamada Y., Wang HY., Fukuzawa M., Barton GJ., Williams JG. A new family of transcription factors. *Development* 135 3093-3101. (2008) 査読有り

Khirug S., Yamada J., Afzalov R., Voipio J., Khiroug L., Kaila K. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J. Neurosci* 28, 4635-4639. (2008) 査読有り

Yamada J., Furukawa T., Ueno S., Yamamoto S. & Fukuda A. (2007). Molecular Basis for the GABA<sub>A</sub> Receptor-Mediated Tonic Inhibition in Rat Somatosensory Cortex. *Cereb Cortex* 17, 1782-1787. (2007) 査読有り

Yamamoto S., Yamada J., Ueno S., Kubota H., Furukawa T., Yamamoto S. & Fukuda A. (2007). Insertion of  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors at Neocortical Layer V GABAergic Synapses Is Induced by a Benzodiazepine, Midazolam.

Cereb Cortex 17, 653-660. (2007) 査読有り

Honda K., Koguchi M., Koga K., Nakajima K., Kobayashi F., Migita K., Ogata S., Hirabara Y., Takano Y. Contribution of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C in the spinal cord to the development of mechanical allodynia in diabetic mice. Biol. Pharm. Bull. 30 930-933 (2007) 査読有り

Yoshida S, Okada M., Zhu G, Kaneko S. Carbamazepine prevents breakdown of neurotransmitter release induced by hyperactivation of ryanodine receptor. Neuropharmacology 52 1538-1546 (2007) 査読有り

Gang Zhu, G., Okada, M., Yoshida, S., Mori, F., Ueno, S. et al. Effects of interleukin-1beta on hippocampal glutamate and GABA releases associated with Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> releasing systems. Epilepsy Res 71 107-116 (2006) 査読有り

〔学会発表〕(計 6件)

上野伸哉 ADFLE モデルラットにおける GABA 伝達機構の障害 第 82 回日本薬理学会年会 2009 年 3 月 18 日 パシフィコ横浜

右田啓介 神経因性疼痛モデルマウスの大脳皮質 II/III 層錐体細胞におけるシナプス応答 第 82 回日本薬理学会年会 2009 年 3 月 17 日 パシフィコ横浜

Yamada J., PRIP-1 is involved in GABA receptor-mediated tonic inhibition in basolateral. SFN2008 2008.11.16 ワシントン DC(米国)

Yamada J., GABAergic depolarization of the axon initial segment is caused by NKCC1 in cortical principal neurons. Neuroscience2008 2008.07.10 東京国際フォーラム

Araki, K et al., Establishment of embryonic stem cell lines derived from MSM/Ms strain originated from Mus musculus molossinus. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Jointly sponsored by the International Society of Developmental Biologists) 2008.5.28 徳島

Tomiyama M, Arai A, Kimura T, Watanabe M,

Kawarabayashi T, Shoji M. Enhanced GABA release in the medial globus pallidus of a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. XVII WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders Jun 16-20, 2007 Amsterdam.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

該当無し

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 伸哉 (UENO SHINYA)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00312158

(2) 研究分担者

荒木 喜美 (ARAKI KIMI)

熊本大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号: 90211705

岡田 元宏 (OKAMOTO MOTOHIRO)

三重大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 10281916

平成 18 年度のみ

富山 誠彦 (TOMIYAMA MASAHIKO)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 40311542

福澤 雅志 (FUKUZAWA MASASHI)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号: 10231557

右田 啓介 (MIGITA KEISUKE)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 10352262

平成 19 年以降

山田 順子 (YAMADA JUNKO)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30334965

平成 20 年度以降

森山 朋子 (MORIYAMA TOMOKO)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 90400134

平成 18 年度のみ

(3) 連携研究者

研究協力者

兼子 直 (KANEKO SUNAO)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40106852