

平成 22 年 4 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18390316
 研究課題名（和文）ヒト認知機能を障害させる遺伝子異常を持つモデル動物の作出とその病態解析
 研究課題名（英文） Generation of epilepsy model animal bearing a genetic abnormality identified in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) of human
 研究代表者
 岡田 元宏 (MOTOHIRO OKADA)
 三重大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：10281916

研究成果の概要（和文）：ヒトてんかんの常染色体優性夜間前頭葉てんかん(ADNFLE)で見いだされた、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR) $\alpha 4$ サブユニットをコードする CHRNA4 遺伝子の S284L 変異に相同する、ラット Chrna4 変異遺伝子を導入した、遺伝子組換えラット (S284L-TG) を作出した。この S284L-TG はヒト ADNFLE 患者と同等のてんかん発作特性を獲得していた。S284L-TG の発作焦点領域における神経伝達機能変異として、GABAA 受容体機能を介した AMPA 型グルタミン酸興奮性伝達の亢進を検出した。この機能変異は、ADNFLE 発作獲得以前から認められていた。睡眠-覚醒リズムに伴う発作焦点領域の神経伝達機能の変化が、S284L 変異型 $\alpha 4$ nAChR 機能変異との相互作用によって、睡眠誘発性の ADNFLE 発作を発現する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mutations of genes encoding $\alpha 4$, $\alpha 2$ or $\alpha 2$ subunits (CHRNA4, CHRNA2, or CHRNB2, respectively) of neuronal nicotinic ACh receptor nAChR cause nocturnal frontal lobe epilepsy (NFLE) in human. NFLE-related seizures are seen exclusively during sleep and are characterized by three distinct seizure phenotypes: “paroxysmal arousals,” “paroxysmal dystonia,” and “episodic wandering.” We generated transgenic rat strains that harbor a missense mutation S284L, which had been identified in CHRNA4 in NFLE. The transgenic rats were free of biological abnormalities, such as dysmorphology in the CNS, and behavioral abnormalities. The transgenic rats showed epileptic seizure phenotypes during slow-wave sleep (SWS) similar to those in NFLE exhibiting three characteristic seizure phenotypes and thus fulfilled the diagnostic criteria of human NFLE. The rats exhibited two major abnormalities in neurotransmission: (1) enhanced AMPA/glutamatergic excitatory transmission in focus region and (2) abnormal glutamate release during SWS. The currently available genetically engineered animal models of epilepsy are limited to mice; thus, our transgenic rats offer another dimension to the epilepsy research field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,400,000	0	4,400,000
2007 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	15,300,000	3,270,000	18,570,000

研究分野：精神神経科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：てんかん、病態、トランスジェニックラット

1. 研究開始当初の背景

1995年にADNFLE家系からCHRNA4遺伝子変異(S280F)が同定され、これ以降、数多くの機能性神経精神疾患の病態に遺伝子変異が関与する可能性を示唆する研究結果が報告されてきていた。本邦でも、1999年にADNFLE日本人家系からCHRNA4のS284L変異の発見以降、多くのでんかん・熱性けいれんの責任遺伝子・感受性遺伝子が発見されてきた。特に、このS284L変異は、韓国・ポーランド・レバノンのADNFLE家系でも同様の変異が発見され、オーストラリアでは孤発性夜間前頭葉てんかん(NFLE)からも発見されるなど、ADNFLE/NFLEの責任遺伝子の中では最もメジャーな変異と考えられている。しかし、これら変異がADNFLEの病態にいかなる機序を介して関わるのかは明かにはされていなかった。

2. 研究の目的

過去15年間にわたる、特発性てんかん家系調査とゲノム解析から、“てんかん”及び“熱性けいれん”で構成される発作関連性疾患の責任遺伝子と感受性遺伝子と予想される、数多くの点変異を同定してきた。しかし、これらの候補遺伝子が、いかなる機序を介して発作関連性疾患の病態に関わるかは明らかにされていない。本研究計画では、本邦で同定された、常染色体優性夜間前頭葉てんかん(ADNFLE)家系で同定された、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ サブユニットをコードするCHRNA4遺伝子のS284L変異を標的とした、ADNFLE病態解析を試みた。ヒトS284L変異に相同する、ラットChrna4変異遺伝子を導入したトランスジェニックラット(S284L-TG)を作出し、このS284L-TGの行動学的解析、神経科学的解析、分子生物学的解析を行い、遺伝子変異と神経発達過程の相互作用の解析を実施した。

3. 研究の方法

1) 使用動物

弘前大学医学部附属動物実験施設内で自家繁殖した雄性S284L-TG及び同胞非組換え体(non-TG)を使用した。実験に供するまでは、それぞれラットエコンケージに1ケージ当たり5匹以下を収容して飼育した。固形飼料CRF-1(オリエンタル酵母株式会社)および上水道水(給水瓶)を自由摂取させた。馴化期間は5日間以上とした。本研究計画は、弘前大学動物実験委員会及び弘前大学組換えDNA実験安全委員会の承認を受けて、これら委員会の策定する指針に従い実験を行っ

た。

2) 脳波解析(発作焦点解析)

発作焦点解析には、1.8%イソフルレン麻酔下で、twisted bipolar stainless steel wire electrodesを、sensorimotor cortex(A=2.0 mm, L=4.0 mm, V=1.8 mm relative to bregma)、basolateral amygdala(A=2.8 mm, L=5.0 mm, V=7.5 mm)、ventrolateral thalamic nucleus(A=2.3 mm, L=1.8 mm, V=5.4 mm)に挿入した。

3) 睡眠覚醒リズムと神経伝達物質遊離解析

1.8%イソフルレン麻酔下で、I-typeマイクロダイアリースプローブをsensorimotor cortex(A=2.0 mm, L=4.0 mm, V=1.8 mm relative to bregma)に挿入した。同時にビス電極を前頭葉と後頭葉に挿入し、radiotelemetry unit(UniMec 1000TE-10202, Unimec, Tokyo, Japan)に接続した。脳波は、receiver unit(UniMec ITE1000R, Unimec)で受信し、NOTOCORD-hem system(Primetech, Tokyo, Japan)でアナログ信号をデジタル化し解析を行った(9-11)。麻酔覚醒後36時間後に、2 mMリン酸緩衝液とTris緩衝液でpH7.4に調整した、修正リンゲル液(MRS: 145.0 Na⁺, 2.7 K⁺, 1.2 Ca²⁺, 1.0 Mg²⁺, 154.4 Cl⁻)を1 μ L/minの流速で還流を開始した。還流液内のグルタミン酸とGABA濃度は、蛍光検出器を装着した高速液体クロマトグラフィで測定した。

4) 細胞外電位測定

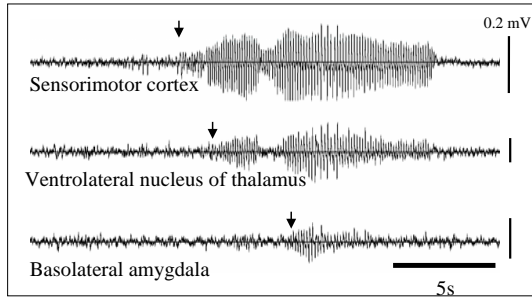
発作焦点領域(sensorimotor cortex)を含む、ラット皮質スライス(400 μ m)を、MED-probe(MED-P5155 probe: Alpha-MED Sciences, Tokyo, Japan)に装着し、30°Cに保温したpH7.4の人工脳脊髄液(126.0 NaCl, 2.5 KCl, 2.0 CaCl₂, 2.0 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄, 26.0 NaHCO₃, 20.0 glucose)を還流した。第V層を60 μ A x 0.1 msの電気刺激を行い、AMPA and NMDA関連性field EPSPs(fEPSPs)を測定した。

4. 研究成果

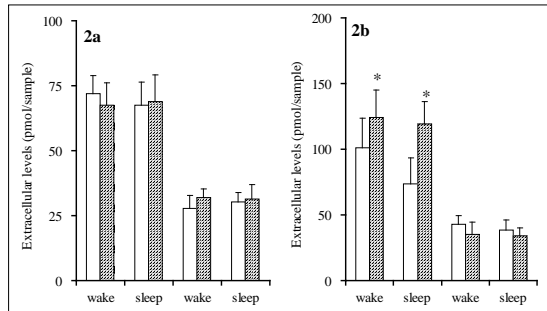
1) S284L-TGのてんかん発作特性

6週齢以降にsensorimotor cortexを焦点とする、interictal dischargeが観察されたが、これ以前はてんかん関連性の脳波的所見は得られなかった(Fig1)。8週齢以降にictal discharge、及びADNFLE/NFLEに特徴的な、paroxysmal arousals, paroxysmal dystonia, epileptic wanderingが観察された。Interictal及びictal dischargesは、徐波睡眠(SWS)期に発現していた。即ち、

S284L-TG は、ヒト ADNFLE/NFLE 同様に、前頭葉を焦点とする睡眠中に有意に発現する ADNFLE 類似の自発性てんかん発作を獲得していた。



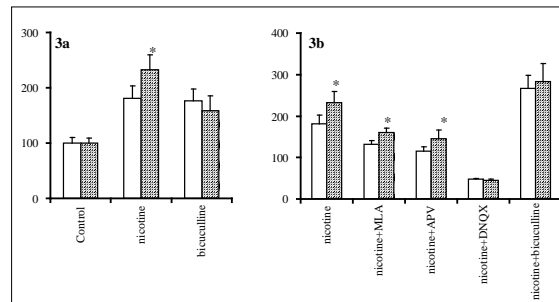
2) 睡眠覚醒リズムと神経伝達物質遊離解析 てんかん関連性の脳波所見が得られなかった 4 週齢ラットでは、non-TG 及び S284L-TG の発作焦点領域のグルタミン酸・GABA の遊離変化における有意な差は認められず、睡眠覚醒リズムに伴うグルタミン酸・GABA の遊離変化も認められなかった (Fig.2a)。自発性 ADNFLE 発作を獲得した、8 週齢の non-TG ラットでは、覚醒時のグルタミン酸遊離は睡眠時と比較して有意 ($P < 0.05$) に高かった (Fig.2b)。GABA 遊離の変化は認められなかった。一方、ADNFLE/NFLE 発作獲得後の 8 週齢 S284L-TG では、覚醒-睡眠に伴うグルタミン酸及び GABA 遊離変化は認められなかった (Fig.2b)。8 週齢の non-TG と S284L-TG 間の比較では、覚醒時及び睡眠時のグルタミン酸遊離は S284L-TG で有意 ($P < 0.05$) に高く、その差は睡眠期で顕著であった (Fig.2b)。GABA 遊離の差はなかった。



3) 細胞外電位測定

4 週齢ラットの発作焦点領域 sensorimotor cortex 第 V 層の電気刺激により検出された、fEPEP の電位を測定した。Non-TG と S284L-TG 間で fEPEP の差は検出されなかったが (Fig.3a)、10 μ M ニコチン還元環境下では、S284L-TG でニコチン誘発性 fEPSP 増強が non-TG よりも有意 ($P < 0.05$) に大きかった (Fig.3a)。この S284L-TG におけるニコチン誘発性 fEPSP は、 $\alpha 7$ nAChR と NMDA 受容体を介したのではなく、AMPA 受容体及び GABA_A 受容体感受性増強であった

(Fig.3b)。



S284L-TG の ADNFLE 症状は、ヒト ADNFLE 発作と同等のものであった 9)。その特徴として、以下の 3 点が上げられる。

1) 思春期以降に発症 (6 週齢に interictal discharge が発現し、8 週齢以降に ictal discharge が発現)

2) S284L-TG のてんかん発作は、主要ヒト ADNFLE 発作に類似した、paroxysmal arousals, paroxysmal dystonia, epileptic wandering の 3 種類の発作で構成されていた。

3) S284L-TG の ADNFLE 発作は、ヒト ADNFLE 発作同様に、睡眠(徐波睡眠期)誘発性であった。

以上の結果は、S284L-TG は、ヒト ADNFLE と相同する分子背景を有し、かつててんかん症状も類似した、ADNFLE の理想的遺伝子改変モデル動物である事が確認された 9)。

ADNFLE/NFLE の病態解明を目的に、脳波的に変異が確認できなかった、4 週齢と ADNFLE 発作獲得後の 8 週齢で、睡眠-覚醒に伴う、グルタミン酸・GABA 遊離の変化を検討した。4 週齢では、non-TG と S284L-TG で明らかな、神経伝達物質遊離の変異は確認されなかった。ADNFLE 発作獲得後の 8 週齢では、覚醒時では、S284L-TG のグルタミン酸遊離が non-TG よりも高かった。睡眠誘発性のグルタミン酸遊離低下が non-TG では観察されたが、この睡眠誘発性グルタミン酸遊離低下は S284L-Tg では確認できなかった。逆に、睡眠による GABA 遊離の変化は、non-TG・S284L-TG とともに認められなかった。即ち、8 週齢の S284L-TG の発作焦点領域では、覚醒時でも相対的グルタミン酸系伝達機能が亢進しており、睡眠時はこの相対的グルタミン酸系伝達機能亢進が更に増強される可能性が示唆された。本研究結果は、ADNFLE の睡眠誘発性発作の機序を明らかにしたものと考えられる 3; 9; 14)。

S284L-TG は $\alpha 4$ サブユニットを含むニコチン性受容体機能の変異が、その病態の中核になると考えられるが、 $\alpha 4$ nAChR は前頭葉

では、グルタミン酸神経よりも GABA 系神経への興奮性効果が有意と考えられており、マイクロダイアリースの結果だけでは、十分な病態解明が出来たとは言い難い。このため、ADNFLE 発作発現前でマイクロダイアリースの変化も検出できなかった、4 週齢の神経伝達機能の評価を行った。生理環境下では、S284L-TG の神経伝達機能変化は検出できなかったが、nAChR 機能亢進環境下では、グルタミン酸系伝達系の亢進が顕著であった。このニコチン誘発性グルタミン酸系伝達亢進は、 $\alpha 7$ AChR と NMDA 受容体非感受性であり、AMPA 受容体及び GABAA 受容体感受性であった。以上の結果は、S284L-TG の $\alpha 4$ nAChR 機能変異は、ラット前頭葉の GABAA 受容体機能を介した AMPA 受容体機能を増強する可能性を示唆する。

本研究結果は、CHRNA4 遺伝子の S284L 変異による、ADNFLE 病態に $\alpha 4$ nAChR 機能変異だけではなく、生理的な神経伝達機構の成熟過程が関与している可能性を示唆した。S284L 変異型 $\alpha 4$ nAChR 機能変異は、GABAA 受容体を介した AMPA 受容体型興奮性機能増強をもたらしているが、この発作焦点領域の機能変異は、ADNFLE 発作獲得前から認められていた。睡眠覚醒リズムに伴う発作焦点領域のグルタミン酸遊離機構の成熟が、S284L 変異型 $\alpha 4$ サブユニットにより阻害され、睡眠中のグルタミン酸系興奮性神経伝達機構の相対的増強が顕著となり、睡眠誘発性 ADNFLE 発作が発現する可能性が示唆された。

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 78 件)

- ① Yamamura, S., Hamaguchi, T., Ohoyama, K., Sugiura, Y., Suzuki, D., Kanehara, S., Nakagawa, M., Motomura, E., Matsumoto, T., Tani, H., Shiroyama, T., Okada, M., 2009a. Topiramate and zonisamide prevent paradoxical intoxication induced by carbamazepine and phenytoin. *Epilepsy Res* 84, 172-186. (査読有り)
- ② Yamamura, S., Ohoyama, K., Hamaguchi, T., Kashimoto, K., Nakagawa, M., Kanehara, S., Suzuki, D., Matsumoto, T., Motomura, E., Shiroyama, T., Okada, M., 2009b. Effects of quetiapine on monoamine, GABA, and glutamate release in rat prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 206, 243-258. (査読有り)
- ③ Yamamura, S., Ohoyama, K., Hamaguchi, T., Nakagawa, M., Suzuki, D., Matsumoto, T., Motomura, E., Tani, H., Shiroyama, T., Okada, M., 2009c. Effects of zotepine on extracellular

levels of monoamine, GABA and glutamate in rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* 157, 656-665. (査読有り)

- ④ Yamamura, S., Ohoyama, K., Nagase, H., Okada, M., 2009d. Zonisamide enhances delta receptor-associated neurotransmitter release in striato-pallidal pathway. *Neuropharmacology* 57, 322-331. (査読有り)
- ⑤ Yamamura, S., Saito, H., Suzuki, N., Kashimoto, S., Hamaguchi, T., Ohoyama, K., Suzuki, D., Kanehara, S., Nakagawa, M., Shiroyama, T., Okada, M., 2009e. Effects of zonisamide on neurotransmitter release associated with inositol triphosphate receptors. *Neurosci Lett* 454, 91-96. (査読有り)
- ⑥ 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., 2008. Rats harboring S284L Chrna4 mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype. *J Neurosci* 28, 12465-12476. (査読有り)
- ⑦ Hu, D.L., Zhu, G., Mori, F., Omoe, K., Okada, M., Wakabayashi, K., Kaneko, S., Shinagawa, K., Nakane, A., 2007. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. *Cell Microbiol* 9, 2267-2277. (査読有り)
- ⑧ Yoshida, S., Okada, M., Zhu, G., Kaneko, S., 2007. Carbamazepine prevents breakdown of neurotransmitter release induced by hyperactivation of ryanodine receptor. *Neuropharmacology* 52, 1538-1546. (査読有り)
- ⑨ Zhu, G., Okada, M., Yoshida, S., Mori, F., Hirose, S., Wakabayashi, K., Kaneko, S., 2006a. Involvement of Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing system in interleukin-1beta-associated adenosine release. *Eur J Pharmacol* 532, 246-252. (査読有り)
- ⑩ Zhu, G., Okada, M., Yoshida, S., Mori, F., Ueno, S., Wakabayashi, K., Kaneko, S., 2006b. Effects of interleukin-1beta on hippocampal glutamate and GABA releases associated with Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing systems. *Epilepsy Res* 71, 107-116. (査読有り)

[学会発表] (計 17 件)

- ① 岸昭宏, 吉田淑子, 朱剛, 上野伸哉, 廣瀬伸一, 兼子直, 岡田元宏, ADNFLE 共存症病態の行動学的解析. 第 43 回日本てんかん学会・弘前(2009, 10, 22).

- ② 吉田淑子, 岡田元宏, 吉田秀一, 兼子直, プロテインキナーゼ C に対するトピラマートの効果の検討. 第43回日本てんかん学会・弘前(2009, 10, 22).
- ③ 山村哲史, 小西康信, 齊藤浩充, 兼子直, 鈴木昇, 岡田元宏, P型電位依存性カルシウムチャネルコンディショナルノックダウンマウスを用いたてんかん分子病態の解析. 第43回日本てんかん学会・弘前(2009, 10, 22).
- ④ ④ 朱剛, 岡田元宏, 吉田淑子, 上野伸哉, 森文秋, 岸昭宏, 若林孝一, 廣瀬伸一, 兼子直, S284L トランスジェニックラット自発性けいれん発現機序の解明. 第43回日本てんかん学会・弘前(2009, 10, 22).
- ⑤ 上野伸哉, 山田順子, 右田啓介, 富山誠彦, 吉田淑子, 岡田元宏, 森文秋, 若林孝一, 朱剛, 廣瀬伸一, 兼子直, ADNFLE モデルラットにおける GABA 伝達の障害機構. 第43回日本てんかん学会・弘前(2009, 10, 22).
- ⑥ 森文秋, 富山誠彦, 上野伸哉, 吉田淑子, 岡田元宏, 廣瀬伸一, 兼子直, 夜間前頭葉てんかんの変異遺伝子(S284L)導入ラット脳におけるニコチン性アセチルコリン受容体の発現. 第43回日本てんかん学会・弘前(2009, 10, 22).
- ⑦ 石井敦士, 福岡五龍, 上原明, 宮島祐, 蒔田芳男, 安元佐和, 井上貴仁, 岡田元宏, 兼子直, 廣瀬伸一, De novo KCNQ2 遺伝子変異が見出された良性新生児けいれんから中心一側頭部棘波を伴う小児良性てんかんへの移行症例. 第43回日本てんかん学会・弘前(2009, 10, 22).

[図書] (計9件)

- ① 岡田元宏, 兼子直, 2006a. Epilep patitmal / Zarontin. In: 青葉安里, 諸川由実代 (Eds.), こころの治療ハンドブック 第4版. 星和書店, pp. 166-167.
- ② 岡田元宏, 兼子直, 2006b. Excegran. In: 青葉安里, 諸川由実代 (Eds.), こころの治療ハンドブック 第4版. 星和書店, pp. 164-165.
- ③ 岡田元宏, 松本卓也, 樫本香苗, 2008. 【神経科学の進歩と神経疾患治療】最新のとんかん理論と新しい抗てんかん薬. 医薬ジャーナル 44, 710-714.
- ④ 八木和一, 高橋孝雄, 赤松直樹, 加藤天

美, 岡田元宏, 2007. 【てんかん診療の新たな展開】 てんかん診療の新たな展開. MEDICO 38, 379-380,389-398.

[その他]

ホームページ等

<http://www.epigene.org/>

“てんかん・熱性けいれん遺伝子解析グループ”

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 元宏 (MOTOHIRO OKADA)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10281916

(2) 研究分担者

兼子 直 (SUNAO KANEKO)
弘前大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40106852

若林 孝一 (KOICHI WAKABAYASHI)
弘前大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50240768

上野 伸哉 (SHINYA UNENO)
弘前大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00312158

福澤 雅志 (MASASHI FUKUZAWA)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号：10231557

谷井 久志 (HISASHI TANII)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40346200

兼松 隆 (TAKASHI KANEMATSU)
九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授
研究者番号：10264053

朱 剛 (GANG ZHU)
弘前大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80400133

鈴木 大 (DAI SUZUKI)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30378301

(3) 連携研究者

()
研究者番号：