

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790707
 研究課題名 (和文) エピジェネティクス制御からみた小児性てんかんの病態解明
 研究課題名 (英文) The epigenetic regulation in infantile epilepsy
 研究代表者
 平澤 孝枝 (HIRASAWA TAKAE)
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部 ・助教
 研究者番号：10402083

研究成果の概要：

小児性てんかん患者が遺伝子変異ではなく発現調節異常によるものと想定し、研究をスタートさせた。てんかんと関係がある神経栄養因子や、DNA メチル化調節試薬による標的分子発現変化を検討した。DNA の遺伝子調節を検討するため、DNA メチル化結合蛋白質のノックアウトマウスにおける標的分子の発現変化を確認した。本研究ではてんかんの症状に神経栄養因子が関わっている点、また DNA メチル化結合蛋白と標的分子の発現変化はてんかんと新たな関連性も示唆した。今後クロマチン免疫沈降法等でさらに詳細なデータを収集する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	0	0	0
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：てんかん・エピジェネティクス・遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、熱性けいれん罹患率は約8%であるなど有病率の高い神経疾患である。その病態の概要は古くから神経回路の過剰興奮や過剰同期と理解されてきた。近年てんかん病態の新たな理解として、家族性特発性てんかん患者において、イオンチャネルの遺伝子異常（遺伝子変異）の存在が明らかになり、これまで生理現象だけで論じられていたてんかん研究に新たな考え方が導入された。しかしながら、少数の家族性患者以外に遺伝子変異は見つかっておらず、様々なイオンチャネル遺伝子の異常が画一的な臨床像を呈す

る理由や、興奮性・抑制性の両方の神経細胞に存在するイオンチャネル遺伝子異常がどのようにアンバランスに至らしめるかについてなど、不明な点がまだ少なくない。申請者はこれまでの研究結果から家族性ではない多くの小児性てんかん患者において遺伝子変異ではなくその発現異常によっててんかんを起こしていると想定し、遺伝子の発現がエピジェネティックに調節を受けており、その異常によって興奮性、抑制性の統合異常が起こるといった新しい概念から研究をスタートさせた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、てんかんを含めた様々神経活動に関与するイオンチャンネル蛋白やシナプス蛋白の遺伝子発現が、DNA のメチル化やクロマチンヒストンの修飾を含むエピジェネティクス機構によって調節されていることを明らかにし、その異常をてんかんモデルマウスで証明し、てんかんの新しい病態モデルを提唱することを目的とする。具体的には、1) 神経回路形成関連蛋白質の脳組織内発現の確認とそのエピジェネティクス調節の証明、2) てんかんモデルマウスにおける神経回路形成関連蛋白遺伝子のエピジェネティクス調節異常の証明という二つの研究目的により行なった。

3. 研究の方法

(1) マウス胎生 15 日齢のマウス大脳皮質を摘出、酵素処理にて単離し、神経細胞をラミン/ポリエチレンイミンコートしたガラスディッシュに低密度培養を行なった。その後、各培養日数において 4%パラホルムアルデヒドにて固定、免疫染色を行なって KCC2 の発現変化を蛍光顕微鏡にて観察した。
(2) マウス胎生 12 日齢の妊娠マウスにバルプロ酸 (VPA) を 600mg/kg 腹腔内投与して自閉症モデルマウスを作製した。生後 30 日齢のマウス大脳皮質より蛋白を抽出し、ウェスタンブロット法にて KCC2 の発現をコントロール群と比較した。また、胎生 15 日齢マウス大脳皮質初代培養細胞を作製し、培養液に VPA1mM、神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) を添加し免疫染色を行なった。
(3) 小児性神経疾患一つである、レット症候群モデルマウスの MeCP2 ノックアウトマウスの大脳皮質サンプルを用い、ウェスタンブロット法にて KCC2 の発現量を検討した。

4. 研究成果

(1) 神経細胞における抑制性関連因子の発現について

神経細胞の抑制性の発達は細胞内の Cl⁻イオンの濃度に依存する事が分かっているが、その調節を行なっているのが K⁺/Cl⁻-co-transporter であり、KCC2 は特に脳に特異的に発現している事が報告されている。まず、この KCC2 が抑制性の能力の指標の一つとしてその発現時期や部位を検討した。その結果、図 1 に示すように、KCC2 は培養日数の経過に伴って発現量が増加していた。

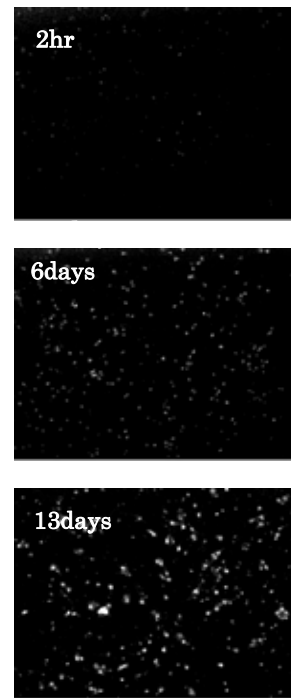


図 1 培養日数の経過に伴う KCC2 の発現の変化

更に、その発現部位を確認した結果、図 2 に示す様に細胞体、軸索、樹状突起に存在している事が分かった。

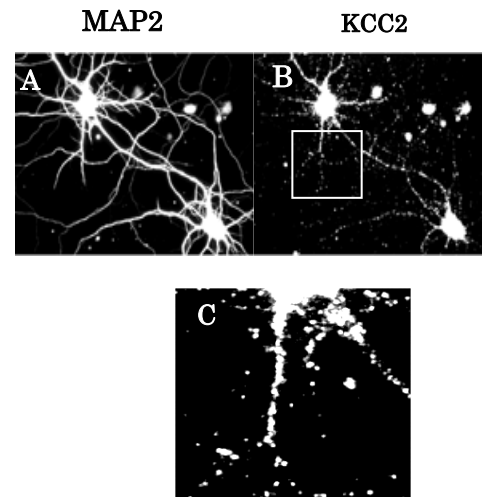


図 2 培養 13 日目における KCC2 の発現

- A 神経特異的のマーカである MAP2 の発現
- B KCC2 の発現
- C 白枠内を拡大したもの。粒状に発現している。

この事から KCC2 は神経細胞の成熟に伴って発現量を増やしていく事が示唆された。

(2) 神経細胞の活性化調節における KCC2 の発現調節について

神経細胞の成熟に伴って発現が変化しているという事は、神経細胞の活性に依存的であるという可能性が考えられる。そこで神経細胞の活性化を調節した場合の KCC2 の発現変化を確認した。今回注目したのはてんかんと関係がある神経栄養因子の一つである BDNF である。BDNF は神経の成熟に関与する栄養因子の一つであるが、同時にてんかん患者脳において有意に増加する事が報告されている。そこで、今回は培養液中に BDNF を添加し、その後 KCC2 の発現の変化を確認した。その結果、BDNF を加えた神経細胞の KCC2 の発現が減少した。またバルプロ酸を培養液に添加した場合は若干ではあるが KCC2 の発現の減少がみられた。(図 3)

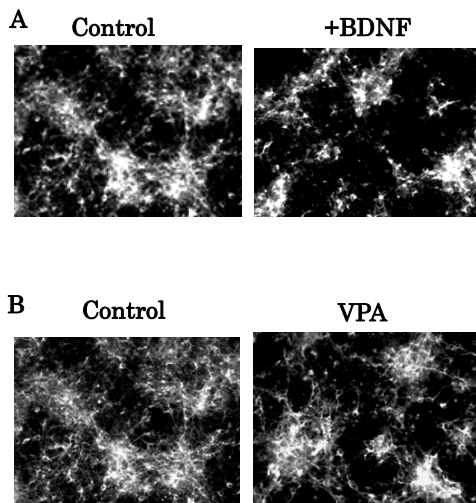


図 3 神経活動を調節した場合の KCC2 の発現

A 100ng/ml BDNF を添加した場合

B 1mM バルプロ酸を添加した場合

てんかんモデルにはよくカイニン酸の投与が使用されるが、本研究ではエピジェネティカルな DNA の遺伝子調節を検討するため、DNA メチル化結合蛋白質の一つである MeCP2 ノックアウトマウスとバルプロ酸 (VPA) 投与マウスを用い抑制性に関与する KCC2 の発現を確認した。

バルプロ酸 (VPA) は抗てんかん薬として有名であるが、その薬理作用は不明な所が多く、胎生期に用いると自閉症を発症する事が分かっている。現在バルプロ酸を胎児マウスに投与する事で自閉症のモデルマウスとして使用されている。自閉症にはてんかんと併

発する事が多く、その頻度は通常のとてんかんの発生頻度の倍以上となっている。筆者等は、このような神経疾患が引き起こすてんかんも、KCC2 を始めとした分子の発現に影響があると考え、自閉症モデルマウスにおいても検討した。その結果、バルプロ酸投与のマウスにおいて KCC2 の発現の低下が認められた。(図 4)

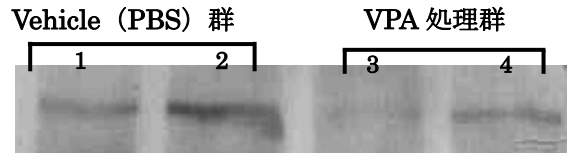


図 4 自閉症モデルマウスにおける KCC2 の発現

lane 1,2 コントロール (Vehicle) 群

lane 3,4 VPA 投与群

マウス大脳皮質よりウェスタンブロット法にて確認した。

(3) MeCP2 ノックアウトマウスにおける KCC2 の発現変化について

MeCP2 は DNA メチル化結合蛋白質の一つであるが、小児性神経疾患のレット症候群の責任遺伝子である。その症状は、幼児期から小児期にかけて発症する自閉症とてんかんが上げられる。この MeCP2 が標的とする遺伝子に BDNF が上げられる。これまでに、このレット症候群が引き起こすてんかんのメカニズムについては不明であった。著者は、レット患者やノックアウトマウスの BDNF 量が高い事に着目し、またこれまでの研究結果から BDNF により KCC2 の発現が抑制される事からレット症候群のとてんかんのメカニズムについて検討を行なった。

その結果、MeCP2 ノックアウトマウスの KCC2 の発現は減少している事が分かった。

(図 5)

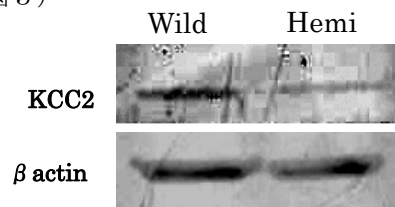


図 5 MeCP2 ノックアウトマウス大脳皮質における KCC2 の発現

今後標的遺伝子のメチル化やヒストン蛋白の修飾などを検討する事が必要となった。本研

究では抑制性の性質の獲得には神経活動の活性化が重要である事が示唆された。特にてんかんの症状に BDNF が関わっているという事、また VPA や MeCP2 等の DNA メチル化調節蛋白と発現の調節は自閉症とてんかんの新たな関連性も示唆している。特に VPA は分化や細胞成熟、増殖に作用する事が近年報告されている事から未熟な神経細胞への効果が考えられ、非常に興味深い結果となった。今後 ChIP (クロマチン免疫沈降) 法等でさらに詳細なデータとしてまとめる予定である。

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 5 件)

- ① Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Hagiwara Y, Shogi M, Maeda S. Transthyretin accelerates vascular Abeta deposition in a mouse model of alzheimer's disease. *Brain Pathol* 19(1): 48-57, 2009 (査読あり)
- ② Natori T, Kodaira F, Hirasawa T, Gao YY, Nagai K. Augmentation of polysialic acid by valproic acid in early postnatal mouse hippocampus and primary cultured hippocampal neurons. *J Biosci Bioengineering* 105(29): 164-167, 2008 (査読あり)
- ③ 平澤孝枝 高坂新一. ミクログリア可視化トランスジェニックマウスの作製. *BRAIN AND NERVE* 59(7): 763-772, 2007 (査読なし)
- ④ Uchino S, Wada H, Honda S, Nakamura Y, Ondo Y, Uchiyama T, Tsutsumi M, Suzuki E, Hirasawa T, Kohsaka S. Direct interaction of PDZ domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 AMPA receptor *J Neurochem* 97(4) 1203-14 2006 (査読あり)
- ⑤ 平澤孝枝 久保田健夫. 知的発達障害と

エピジェネティクスの分子遺伝学. 神経研究の進歩 50(5), 770-779, 2006 (査読なし)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Takae Hirasawa, Hidenori Tabata, Kazunori Nakajima, Takeo Kubota, Shigeo Uchino, Shinichi Kohsaka NMDA receptors participate in neuronal migration in the early stage of mouse cortical development. 第 49 回 日本神経化学学会 9.13 名古屋 2006

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平澤 孝枝 (HIRASAWA TAKAE)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 10402083

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし