

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20240042

研究課題名（和文） ラットてんかん発作における遺伝的素因の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the genetic factors in rat epileptic seizures

研究代表者 芹川 忠夫

(SERIKAWA TADAO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30025655

研究成果の概要（和文）：てんかんモデルラット NER とてんかん非発症の F344 ラットを用いて、強直間代発作に関与する 2 つの QTLs を標的にした複数のコンジュニック系統を作製した。NER と発作抵抗性の NER.F344 ダブルコンジュニック系統を用いた脳の網羅的な遺伝子発現解析により、遺伝子発現量が顕著に異なる機能未知の 1 個遺伝子と 6 個の既知遺伝子を発見した。このようにして、我々は NER における遺伝的素因の候補遺伝子を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：Using an epilepsy rat model NER and a non-epileptic rat strain F344, we generated several congenic lines for two seizure-related QTLs. Comprehensive gene expression analyses in the brains of NER and a seizure-resistant NER.F344 double congenic strain revealed that one unknown gene and other six known genes were differentially expressed. Thus, we succeeded to disclose possible candidates for genetic factors contributing to seizure susceptibility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
平成 21 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
平成 22 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
平成 23 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
総計	38,400,000	11,520,000	49,920,000

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：てんかん、ラット、疾患モデル、原因遺伝子、NER、コンジュニック系統、遺伝解析、BAC クローン

1. 研究開始当初の背景

てんかん患者は全人口の 1~2 % と推定されている。てんかんを原因によって分類すると、その約 8 割は原因不明な「特発性てんかん」と言われており、残りは、脳の外傷、腫瘍、脳形成異常、変性疾患などによる脳の器質的な病変に起因する「症候性てんかん」である。臨床では一部に外科的手術もなされるが、主には、てんかん発作を抑制する薬によ

る対症療法がなされている。多くの場合、抗てんかん薬を長期間服用し続けざるを得ないので、患者は副作用、妊娠・出産の不安、社会生活の制限など深刻な問題を抱えている。それゆえ、副作用のない優れた抗てんかん薬の開発および根治的な治療法の開発が強く求められている。この究極の目標を達成するには、臨床研究に加えて、遺伝と環境を厳格に統御できるラットを用いたてんかん

研究が必須である。強直間代発作 (GTC) を自然発症するてんかんモデルラット NER は、脳に器質的な病変がなく、未知の複数の遺伝子変異の関与が推定されている。よって、NER は、ラットにおける「特発性てんかん」として位置づけられる。また、「特発性てんかん」や頭痛に関与する遺伝子の一つとして、ナトリウムチャンネル遺伝子 *SCN1A* の変異が取り上げられており、熱性けいれんプラスの患者の *SCN1A* のチャンネルポア構造部位をコードしている領域にアミノ酸置換を伴う変異が見つけられている。我々は、これとほぼ同じ部位に同様のアミノ酸置換変異をもつラットを、ENU 誘発突然変異個体群の遺伝子スクリーニングから樹立している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NER における GTC に関与する複数の原因遺伝子を明らかにすること、および F344 に NER のてんかん感受性遺伝子と *Scn1a* 遺伝子変異を共に導入して、自発性の GTC が生じるかどうかを調べることから、ラットモデルにおけるてんかん発作の遺伝素因を明らかにし、ヒトのてんかんの予防と治療に新たな切り口を提示することにある。

3. 研究の方法

1) コンジュニックシステムの作製

NER/Kyo(以後 NER と略)と F344/NS1c(以後 F344 と略)に加えて、開発済みの NER 背景の 2 つのコンジュニックシステム (N. F-*Ner1*^{F/F}と N. F-*Ner3*^{F/F})、F344 背景の 2 つのコンジュニックシステム (F. N-*Ner1*^{V/V}と F. N-*Ner3*^{V/V})、およびそれぞれのダブルコンジュニックシステムを用いた。まず、*Ner3* 座位を狭めるため、N. F-*Ner1*^{F/F}, *Ner3*^{F/F} と NER との交配から得た F1 ラットを起点にして選抜兄妹交配を行った。次いで、*Ner1* 座位を狭めるために、*Ner3* 座位を F344 由来のホモ型に狭めたダブルコンジュニックと NER との交配から得た F1 ラットを起点にして選抜兄妹交配を行った。また、第 2 染色体の *Ner2* を標的にした、F. N-*Ner2* と N. F-*Ner2* を作製するために、F344 と NER との交配から得た F1 ラットを、それぞれの親系統に戻し交配を行い、以後、内交配に戻し交配を継続して行った。上記いずれの場合にも、NER と F344 間にサイズ差がある SSLP マーカーのタイピングにより、次世代の交配用ラットを選抜した。

F344 の遺伝的背景で *Ner1* 座位と *Ner3* 座位を共に NER 由来とした *Scn1a* ミュータントラットを作製するため、F344-*Scn1a*^{Kyo811/Kyo811} ラットと F. N-*Ner1*^{V/V}, *Ner3*^{V/V} の F2 ラットから選抜兄妹交配を行った。

2) コンジュニックシステムの評価

新たに作製した NER 背景のコンジュニックシステムについて、自発性のてんかん様発作の発症有無、発症時期、発症頻度、および発作型を調べた。NER の自発性 GTC は、ケージ交換後の 1 時間以内に起こりやすいので、個別飼育で約半年間、週に 1 度のケージ交換条件で観察した。さらに、自家開発した赤外線振動感知式自動行動録画装置により、昼夜の行動観察を実施した。また、NER は透明な飼育ケージから非透明の異なる環境に暴露すると GTC が誘発されやすいので、24 週齢以降において、この環境変化刺激を与えて発作が誘発されるか否かを調べた。

F344 背景の NER コンジュニックシステムについては、GABA 拮抗薬である中枢系けいれん誘発剤ペンチレンテトラゾール (PTZ) を静脈内に投与して、けいれん感受性の比較試験を行った。

F. N-*Ner1*^{V/V}, *Ner3*^{V/V}, *Scn1a*^{Kyo811/Kyo811} 変異ラットについては、自発行動の観察、PTZ の静脈内投与におけるけいれん感受性試験、および、湯浴刺激によるけいれん感受性試験を実施した。

PTZ 試験においては、12~18 週齢のラットを 3 用量群 (13.0, 16.9, 22.0 mg/kg of body weight) に別けて、尾静脈投与後の行動を観察した。温浴試験においては、5 週齢時に、45°C の恒温槽にラットを入れて最長 5 分間の行動を観察した。発作が生じたラットは、直ちに恒温槽から出して、行動を継続観察した。

3) NER のゲノム BAC クローンの整備

NER の GTC の発症に関与する遺伝子座位として、*Ner1* (第 1 染色体上)、*Ner2* (放り上げ刺激による解析にて検出、第 3 染色体上)、*Ner3* (第 5 染色体上)、および *Ner4* (*Ner1* と *Ner3* に相互作用をもつ遺伝子座、第 14 染色体上) が挙げられる。これらの標的領域を解析するため、NER のゲノム BAC ライブラリーの整備においては、ゲノム 10 倍量、平均インサート 150kb を目標にした。

4) NER における発作時脳内 Fos 発現の解析

Fos 蛋白マッピング法により、NER のてんかん発作に関わる脳内興奮部位を検索した。30 分間の行動観察中に GTC を発症した NER を 2 時間後に深麻酔下で脳を摘出した。行動観察中に GTC を発症しなかった NER を対照動物として、同様に脳を摘出した。Fos-like 免疫染色は ABC 法により行い、陽性細胞核数を数えた。

5) 網羅的遺伝子発現解析

GTC 発症系の NER とその抑制系のダブルコンジュニックシステムを用いて、全遺伝子 DNA チップによる脳各部位の遺伝子発現の解析を行い、*Ner1* と *Ner3* 座位の遺伝子について脳

の遺伝子発現を比較した。評価部位は、NERで顕著な神経興奮が認められた扁桃核、海馬、後頭葉皮質の3部位とし、サンプリングの時期は、6週齢時と18週齢時とした。得られた脳組織よりRNAを抽出し、SurePrintG3 Rat GE 8x60K マイクロアレイ (アジレント社) を用いて遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

1) コンジェニック系統の作製とてんかん感受性の評価

我々は、(F344 x NER)F1 x NERの戻し交雑子のGTC発症時期を指標にしたQTL解析により、第1染色体上の*Ner1*座位と第5染色体上の*Ner3*座位が強く関与していることを明らかにして、NER系統を背景にして、*Ner1*座位あるいは*Ner3*座位のそれぞれ1ヶ所を、GTCを発症しないF344由来に置き換えたコンジェニック系統、および両者を共に置き換えたダブルコンジェニック系統を作製維持してきた。これらのラットの行動を約半年間観察したところ、*Ner1*座位あるいは*Ner3*座位の1ヶ所のみを置き換えたコンジェニック系統ではGTCを抑制しなかったが、ダブルコンジェニック系統においてはGTCの発症時期ならびに発症頻度を有意に抑制されることが判った。そこで、*Ner3*座位を狭めるために、N.F-*Ner1*^{F/F}、*Ner3*^{F/F}に加えて、NER背景の以下の3つのダブルコンジェニック系統を作製した。

A: N.F-*Ner1*(1-6)*, *Ner3*(10)

B: N.F-*Ner1*(1-6), *Ner3*(10-11.5)

C: N.F-*Ner1*(1-6), *Ner3*(12-14)

[*SSLPマーカー名、F344ホモ型]

個別飼育で、週に1度のケージ交換後1時間の自発行動を観察した結果、ダブルコンジェニック系統AとBにおいては24週齢までGTCは観察されなかったが、ダブルコンジェニック系統CではNERと同程度にGTCが観察された。

次いで、*Ner3*座位を狭めるために、NER背景の以下のダブルコンジェニック系統を作製して、同様に継続観察したところ、ダブルコンジェニック系統DとFは発作感受性型、EとGは発作抑制型であると判別することができた。

D: N.F-*Ner1*(1-3), *Ner3*(10)

E: N.F-*Ner1*(4-6), *Ner3*(10)

F: N.F-*Ner1*(5), *Ner3*(10)

G: N.F-*Ner1*(6), *Ner3*(10)

一方、F344背景のコンジェニックラットは自発性のGTCを発症しなかったため、雄ラットを用いてPTZの尾静脈内投与によるけいれん誘発に関する感受性試験を行った。その結果、F344背景のコンジェニック系統であるF.N-*Ner1*^{V/V}は、F344と同様に抵抗性であった

が、F.N-*Ner3*^{V/V}とF.N-*Ner1*^{V/V}、*Ner3*^{V/V}はNERと同様の感受性を示した。

マイクロサテライトマーカーの解析から、抑制系のダブルコンジェニック系統G、すなわち、N.F-*Ner1*(6), *Ner3*(10)の*Ner1*座位は約15Mbであり、*Ner3*座位は約14Mbであると推定された。

2) NERのゲノムBACクローンの整備

NERのGTC発症感受性に関与する遺伝子のゲノム変異を明らかにするために、NERのゲノム5倍分に値する129,024のBACクローンを作製した。使用したベクターはpIndigoBAC-5、大腸菌ホストはDH10Bであり、インサート平均長は136Kbであった。

3) NERにおける発作時脳内Fos発現の解析

GTCの発症に伴い、大脳皮質および扁桃核を中心とする大脳辺縁系において、神経興奮反応が認められた。一方、脳幹・延髄など下位脳では、有意な変化は見られなかった。

4) 網羅的遺伝子発現解析

*Ner1*座位においては、NERの遺伝子発現量が2倍以下の遺伝子が3遺伝子(*NID1*, *NID2*, *NID3*)、逆に、2倍以上の遺伝子が2遺伝子見出された(*NIU1*, *NIU2*)。 *Ner3*座位においては、NERの遺伝子発現量が2倍以下の1遺伝子(*N3D1*)と2倍以上の1遺伝子(*N3U1*)が見出された。*N3D1*遺伝子はNERの脳内で遺伝子発現量は非常に低く、そのタンパク質レベルでは検出できなかった。そのエクソン部分には変異はなかったが、イントロン内に内在性レトロウイルスの挿入変異が見出された。野生型の*N3D1*遺伝子産物は、てんかん発作を抑制するように働き、これを欠損しているNERにおいてGTCが発症しやすくなっている可能性があるとして推定した。そこで、GTC抵抗性系統のダブルコンジェニックラットの*N3D1*遺伝子をノックアウトするとGTC感受性のラットとなるか否かを調べる予定である。

5) 熱性けいれんモデルラットに対するNER由来の*Ner1*と*Ner3*座位の影響

*Ner1*と*Ner3*座位が熱性けいれんモデルラットのけいれん発症に影響を与えるか否かを調べるために、F344-*Scn1a*^{Kyo811/Kyo811}遺伝子変異ラットと作製したF344-*Ner1*^{V/V}、*Ner3*^{V/V}、*Scn1a*^{Kyo811/Kyo811}ラットを比較検査した。両ラットは、共に自発性のGTCは生じなかったが、後者では、稀に、前肢のものがきに続き上下に体を硬直させてビクつかせる異常行動が観察された。湯浴検査において、F344-*Ner1*^{V/V}、*Ner3*^{V/V}、*Scn1a*^{Kyo811/Kyo811}ラットは、けいれん発作の発症までの時間が有意に短く、けいれん終了後の顔面けいれんが顕著であった。けい

れん時の直腸温とけいれんの持続時間には有意差はなかった。F344-*Ner1^{VN}*, *Ner3^{VN}*, *Scn1a^{Kyo811/Kyo811}* ラットの PTZ 誘発けいれん試験では、13.0 mg/kgBW 群のすべてのラットがけいれんを発症して、その半数が死亡した。16.9 と 22.0 mg/kgBW の投与群では、すべてのラットがけいれんを発症して死亡した。このようにして、NER 由来の *Ner1* と *Ner3* 座位は、*Scn1a* ミュータントのけいれん感受性を高める傾向があると推定された。

本研究によって、NER におけるてんかん感受性に関する複数の候補遺伝子を発見することに成功した。今後、これらの遺伝子の機能と相互作用を解明することが求められる。実験用モデルラットの研究から、ヒトのてんかん発症基盤が明らかにされ、新たな治療法や予防法が開発されることを期待する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Ohno Y, Shimizu S, Harada Y, Morishita M, Ishihara S, Kumafuji K, Sasa M, Serikawa T.
Regional expression of Fos-like immunoreactivity following seizures in Noda epileptic rat (NER).
Epilepsy Res. 87 (1):70-76, 2009
<http://dx.doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.07.012>
- ② Ohno Y, Ishihara S, Mashimo T, Sofue N, Shimizu S, Imaoku T, Tsurumi T, Sasa M, Serikawa T.
Scn1a missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures.
Neurobiol Dis. 41(2):261-269, 2010
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.09.013>
- ③ Ohno Y, Sofue N, Ishihara S, Mashimo T, Sasa M, Serikawa T.
Scn1a missense mutation impairs GABAA receptor-mediated synaptic transmission in the rat hippocampus.
Biochem Biophys Res Commun. 400(1):117-122, 2010
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.021>
- ④ Mashimo T, Ohmori I, Ouchida M, Ohno Y, Tsurumi T, Miki T, Wakamori M, Ishihara S, Yoshida T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Sasa M, Mori Y, Serikawa T.

A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Nav1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats.
J Neurosci. 30(16): 5744-5753, 2010
doi: 10.1523/JNEUROSCI.3360-09.2010

- ⑤ Ishimaru Y, Chiba S, Serikawa T, Sasa M, Inaba H, Tamura Y, Ishimoto T, Takasaki H, Sakamoto K, Yamaguchi K.
Effects of levetiracetam on hippocampal kindling in Noda epileptic rats.
Brain Res. 1309: 104-109, 2010
<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.056>
- ⑥ Hayashi K, Ueshima S, Ouchida M, Mashimo T, Nishiki T, Sendo T, Serikawa T, Matsui H, Ohmori I.
Therapy for hyperthermia-induced seizures in *Scn1a* mutant rats.
Epilepsia. 52(5):1010-1017, 2011
DOI: 10.1111/j.1528-1167.2011.03046.x

[学会発表] (計 11 件)

- ① 奥村貴裕、寺田 亮、石原 静、北宅良祐、富田知里、徳留健太郎、田中智也、笹 征史、芹川忠夫、大野行弘。強直-間代性発作モデル Noda epileptic rat (NER) における SV2A および SNARE 関連タンパクの発現解析, 第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 平成 23 年 10 月 27-29 日, 東京
- ② 長尾侑紀、原田悠耶、奥田 葵、藤本 恵、向井崇浩、小野朝香、阪上嘉久、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘。Noda epileptic rat (NER) における扁桃核アストロサイト Kir4.1 チャンネルの発現低下, 第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 平成 23 年 10 月 27-29 日, 東京
- ③ 長尾侑紀、原田悠耶、奥田 葵、藤本 恵、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘。てんかんモデル Noda epileptic rat (NER) におけるアストロサイト内向き整流性カリウムチャンネル Kir4.1 の発現解析, 第 119 回日本薬理学会近畿部会, 平成 23 年 7 月 8 日, 名古屋
- ④ 長尾侑紀、原田悠耶、奥田 葵、藤本 恵、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘。全般性強直-間代発作モデル Noda epileptic rat におけるアストロサイト Kir4.1 チャンネルの病態解析, 第 7 回日本てんかん学会近畿地方会 平成 23 年 7 月 23 日, 京都

- ⑤ Harada Y, Shimizu S, Ishihara S, Kumafuji K, Serikawa T, Sasa M, Ohno Y. Immunohistochemical studies in Noda epileptic rat (NER): Exploring the seizure foci by brain mapping of c-Fos protein expression. The XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat. November 30 - December 3, 2010, Kyoto
- ⑥ Ohno Y, Ishihara S, Sofue N, Mashimo T, Sasa M, Serikawa T. Pharmacological analysis of the hyperthermia-induced seizure-susceptible (Hiss) rats, a novel rat model of febrile seizure. The XVIIIth International Workshop on Genetic Systems in the Rat. November 30 - December 3, 2010, Kyoto
- ⑦ 原田悠耶、清水佐紀、石原 静、芹川忠夫、熊藤健太、笹 征史、大野行弘. 自発性てんかんモデル NER (Noda epileptic rat) における脳内 Fos 発現解析, 第 57 回日本実験動物学会, 平成 22 年 5 月 12-14 日, 京都
- ⑧ 原田悠耶、清水佐紀、森下真帆、石原 静、熊藤健太、芹川忠夫、笹 征史、大野行弘. Noda Epileptic Rat (NER) における発作時脳内 Fos 発現の解析, 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会・第 1 回アジア CINP 会議合同年会, 平成 21 年 11 月, 京都
- ⑨ 真下知土、大守伊織、大内田守、大野行弘、鶴見東志子、三木崇史、若森 実、森 泰生、芹川忠夫. 熱刺激誘発けいれん感受性ラットの開発: 新たな熱性けいれんモデルとして, Neuro2009 (第 32 回日本神経科学大会), 平成 21 年 9 月 16 日, 名古屋
- ⑩ 中西 聡、熊藤健太、山崎賢一、Birger Voigt、庫本高志、芹川忠夫. てんかん感受性遺伝子を同定するための NER コンジュニック系の作製, 第 56 回日本実験動物学会, 平成 21 年 5 月 14-16 日, さいたま
- ⑪ 真下知土、芹川忠夫. チャネル病のモデル動物: 電位依存性 Na⁺チャネル Nav1.1 変異ラット, 第 295 回 CBI 学会研究講演会, 平成 21 年 4 月 3 日, 東京

〔図書〕 (計 3 件)

- ① 小畑裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通 (編集)、生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール、〈series モデル動物利用マニュアル〉平成 23 年 2 月 25 日, (株) エル・アイ・シー
- ② 小畑裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通 (編集)、疾患モデルの作製と利用ー脳・神経疾患〈series モデル動物利用マニュアル〉平成 23 年 11 月 22 日, 株式会社エル・アイ・シー
- ③ 芹川忠夫, 論文ができてしまう! 疾患モデルマウス表現型解析指南, 脳・神経系 (中枢系) てんかん p65-69, 平成 23 年 12 月 28 日, 株式会社 中山書店

〔その他〕

ホームページ等

http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/serikawas%20Lab/03_Publications.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芹川 忠夫 (SERIKAWA TADAO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30025655

(2) 研究分担者

庫本 高志 (KURAMOTO TAKASHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 20311409

(3) 研究分担者

真下 知土 (MASHIMO TOMOJI)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号: 80397554

(4) 研究分担者

大野 行弘 (OHNO YUKIHIRO)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 00432534