

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790866
 研究課題名（和文） E f h c 1 遺伝子改変マウスを用いた若年性ミオクロニーてんかん発症機序の解明
 研究課題名（英文） Understanding the pathology of juvenile myoclonic epilepsy (JME) using *Ehfc1*-deficient mouse
 研究代表者
 鈴木 俊光 (Suzuki Toshimitsu)
 独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・研究員
 研究者番号：20373318

研究成果の概要（和文）：

本研究では、てんかんモデルマウスとして *Ehfc1* 遺伝子改変マウスを用い、てんかん発症機序を解明することを目的とした。痙攣誘発剤の投与により、ヘテロおよびホモ変異マウスで痙攣感受性が有意に上昇している事、変異マウスで自然誘発性ミオクロヌスが頻出する事を見いだした。これらの結果は、myoclonin1 タンパクの減少または機能喪失が *EFHC1* 遺伝子変異によるてんかんの分子基盤である可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

We observed frequent spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility in mice with *Ehfc1* deficiency. These results suggest that reduction or loss of function of myoclonin1 may be the molecular basis for epilepsies caused by *EFHC1* mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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、E F H C 1、痙攣、若年性ミオクロヌステんかん、特発性てんかん、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

若年性ミオクロニーてんかん (JME) は、思春期 (8～20 歳) に発症し、ミオクロニー発作、強直間代発作などを特徴とする最も頻度の高い特発性てんかん (てんかん発作のみを症状とし、脳内病変を特定することが出来ない機能性てんかん) の一つである。原因となる遺伝子は、複数あることが予想されている。

申請者らは、以前、遺伝的連鎖解析、ポジショナルクローニングにより、候補領域の一つである第 6 番染色体短腕領域 6p12 から新規の原因遺伝子 *EFHC1* の同定に成功した。この遺伝子から家系内で連鎖を示す 5 種類のミスセンス変異をメキシコの JME 6 家系から発見した (Suzuki *et al.* Nat. Genet. 36, 842-849)。さらに、最近申請者らのグループは、新たな 4 種類の JME 疾患変異 (2 種類

のミスセンス変異、1つのナンセンス変異と1つのフレームシフト変異)を発見し報告した (Medina *et al.*, *Neurology*, 2007)。また、*EFHC1* の疾患変異は、複数のグループより報告が続いており、それらの変異は、JME、若年性欠伸てんかん、潜因性の側頭葉てんかん、さらに非分類型の特発性全般てんかんから見いだされた。このことより、*EFHC1* は JME 発症に関与しているだけでなく、特発性全般てんかんの痙攣誘発に広く関与している可能性もでてきている。現在までに同定されている特発性てんかん原因遺伝子のほとんどがイオンチャンネルをコードしているが、*EFHC1* はイオンチャンネルをコードしない機能未知のタンパク myoclonin1 をコードしている。Myoclonin1 タンパクには2種類のアイソフォームがある。一つは、DM10 と呼ばれる機能不明のドメインを3つ、更に EF-hand と呼ばれる、カルシウム結合タンパクでよく見られるカルシウムイオン (Ca^{2+}) 結合モチーフを1つ持つ、640 アミノ酸からなるタンパク (long フォーム) で、もう一つは、DM10 を1つだけ持ち 278 アミノ酸からなるタンパク (short フォーム) である。Myoclonin1 の機能については、細胞レベルにおいて、a) myoclonin1 をマウス海馬の初代培養神経細胞に強制発現させると、細胞死を誘導する効果が見られるが、疾患変異を導入した myoclonin1 (変異型) を強制発現させると、野生型で見られた細胞死の効果が有意に減少する、b) R-タイプ・カルシウムチャンネル (Cav2.3) が myoclonin1 に結合する、c) Cav2.3 を安定的に発現させた細胞株に myoclonin1 の野生型を強制発現させると Cav2.3 の電流を特異的に増加させるが、変異型を強制発現させると、野生型で見られるほどの電流増加を起こさない、などが分かっている (Suzuki *et al.*, 2004)。しかし、生体内におけるこの遺伝子のコードするタンパクの機能は解明されていない。Myoclonin1 がクラミドモナスの軸糸、マウス精子の鞭毛のような運動性を持つ繊毛で発現していると報告された (Ikeda *et al.*, 2005)。また、脳室表面における繊毛の運動性の低下が脳脊髄液の灌流不全をまねき、それにより Slit 蛋白質の濃度勾配が側脳室壁面にできなくなり、神経芽細胞の移動方向に影響を与えたとの報告があり (Sawamoto *et al.*, 2006)、これらの報告から、繊毛の運動性と細胞の移動の異常が JME の発症に関わっているのではないかと仮説 (King *et al.*, 2006) もでてきている。前述のように、てんかん家系を用いた研究において *EFHC1* の変異がてんかん発症に関与している事は示されているが、JME の発症機序は明らかとされていないなかった。

(参考文献)

Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, *et*

al. (2004) Mutations in *EFHC1* cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics*. 36:842-849.

Ikeda T, Ikeda K, Enomoto M, *et al.*, (2005) The mouse ortholog of *EFHC1* implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Letter*. 579:819-822.

Medina MT, Suzuki T, Alonso ME *et al.*, (2008) Novel Mutations in Myoclonin1/*EFHC1* in Sporadic and Familial Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Neurology*. *Neurology* 70:2137-44.

Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, *et al.*, (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 311:629-632.

King SM. (2006) Axonemal protofilament ribbons, DM10 domains and the link to juvenile myoclonic epilepsy. *Cell Motil Cytoskeleton*. 63:245-253.

2. 研究の目的

若年性ミオクロニーてんかん (JME) は、思春期に発症する最も頻度の高い特発性てんかんの一つである。申請者らは、原因遺伝子の一つとして新規の遺伝子 *EFHC1* の同定に成功した。*EFHC1* の疾患変異は、複数のグループより報告が続いており、それらの変異は、JME、若年性欠伸てんかん、潜因性の側頭葉てんかん、さらに非分類型の特発性全般てんかんから見いだされた。このことより、*EFHC1* は JME 発症に関与しているだけでなく、特発性全般てんかんの痙攣誘発に広く関与している可能性もでてきている。現在までに同定されている特発性てんかん原因遺伝子のほとんどがイオンチャンネルをコードしているが、*EFHC1* はイオンチャンネルでない機能未知のタンパクをコードしている。本研究では、*Efhc1* 遺伝子改変マウスを解析する事により、新たなてんかん発症機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス痙攣発作の解析

自然誘発性の痙攣発作が有るかどうかを脳波測定および筋電図測定を用い観察した。筋電図においてミオクロニー発作が検出された時の脳波を加算平均し、解析した。痙攣感受性を検討するために、痙攣誘発剤として使われている、ペンチレンテトラゾール (PTZ) を複数個体の野生型、ヘテロ、ホモマウスに投与し、ヘテロ接合体 (ヘテロ) またはホモ接合体 (ホモ) マウスの痙攣感受性が野生型マウスと比べ高くなっているのかどうかを検討した。痙攣感受性の評価は、痙攣誘発剤投与からミオクロニー発作、間代発作、全身性の強直・間代発作が観察されるまでのそれぞれの時間により行った。4-5ヶ月齢と9-12ヶ月齢の2グループで

検討した。

(2) 脳の構造異常の解析

申請者らの提示した、『*EFHC1*の疾患変異によって、細胞死誘導効果を失うことにより異常な神経細胞が残存し、易興奮性の神経ネットワークの形成に繋がりJMEが発症している』という仮説を検証するために、*Efhc1* 遺伝子改変マウスの脳の構造、神経細胞およびその他の細胞の配列、配置、数の異常がないか確認した。胎生期から出生4ヶ月齢程度までの幾つかのステージで、複数個体のマウスの脳切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色またはニッスル染色を行い、同腹の野生型、ヘテロ、ホモの切片間で構造および神経細胞の数に異常がないか確認した。抑制性の神経細胞の異常により、神経細胞の興奮-抑制のバランスが崩れ、ニューロンの過興奮が生じ、てんかん発症につながっている可能性が考えられたので、抑制性の神経細胞の脳内での分布に異常があるのか、免疫組織染色法により、抑制性の神経細胞のマーカー（バルブアルブミン、カルビンジン、GAD65/67、ソマトスタチン、カルレチニン）を用いて、同腹の野生型、ヘテロ、ホモマウスの脳切片間で差がないかを確認した。

(3) 脳室内繊毛の運動性低下の検討

マウス *myoclonin1* が運動性を持つ繊毛において高発現しているとの報告(Ikeda et al., 2005)があるが、この報告の中では、精子の鞭毛および気管支の繊毛を持つ細胞での *Myoclonin1* の発現は確認されているが、脳内での *myoclonin1* の発現部位は検討されていないなかった。申請者らは、抗 *myoclonin1* 抗体を用いて、野生型マウスの脳における *myoclonin1* 発現部位の確認を行い、側脳室、第三脳室、中脳水道、および第四脳室周囲の上衣細胞の持つ繊毛において発現が見られることを確認済みである(Suzuki et al., 2008)。この抗体の染色特異性は、ノックアウトマウスの脳切片を用い、繊毛において染色が見られない事により確認されている。脳室周囲の繊毛において *myoclonin1* の発現が確認されたこと、さらに、遺伝子改変マウス(ホモ接合体)において脳室拡大が観察されたことから、遺伝子改変マウスにおける、脳室周囲の上衣細胞繊毛について検討した。繊毛の構造に異常があるかどうか調べるために、走査型電子顕微鏡で繊毛長さ、直径を観察した。また、繊毛の運動性について、高速ビデオを用い繊毛運動を撮影し、運動率を求めた。

4. 研究成果

Efhc1 遺伝子改変マウスを解析した結果、遺

伝子改変マウス(ヘテロおよびホモ接合体)において自然誘発的なミオクローヌス発作が野生型と比べ7~8倍多く出現することがわかった。このミオクローヌス発作出現時に異常な活動電位が加算平均した脳波に出現することが観察された。けいれん誘発剤であるペンチレンテトラゾールを投与し、けいれんを生じるまでの時間を測定したところ、4~5月齢、9~12月齢ともにヘテロ接合体およびホモ接合体マウスで、野生型に比べてけいれんを生じるまでの時間が大きく短縮され、この結果は、これら遺伝子改変マウス(ヘテロおよびホモ接合体)で、痙攣感受性が高くなっている事を示唆した。*Efhc1* 遺伝子改変マウスがてんかん患者と類似の症状を示したことから、*Efhc1* の欠損がてんかんを引き起こすことを示唆する直接的な生物学的証拠として報告した(Suzuki et al., Hum. Mol. Genet., 2009)。さらに、遺伝子改変マウス(ホモ接合体)において脳室拡大が観察され、その原因が、脳室壁の上衣細胞繊毛の運動機能の低下による、脳脊髄液の灌流不全によるものであることも明らかにし、併せて報告した(Suzuki et al., Hum. Mol. Genet., 2009)。これらの成果は、*EFHC1* 遺伝子異常が確かにてんかんの発症につながることを確認するとともに、*myoclonin1* タンパクが上衣細胞繊毛運動機能に関与していることを示唆するものとなった。*EFHC1* 遺伝子変異により引き起こされるてんかんの発症機構を理解することは、若年性ミオクローヌスてんかんばかりではなく、てんかん全体の発症メカニズムの理解にもつながると予想され、今回の成果と *Efhc1* 遺伝子改変モデルマウスは、今後、治療法の開発・改良にも大きく寄与することが期待される。

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1件)

- ① Toshimitsu Suzuki, Hiroyuki Miyamoto, Takashi Nakahari, Ikuyo Inoue, Takahiro Suemoto, Bin Jiang, Yuki Hirota, Shigeyoshi Itoharu, Takaomi C. Saïdo, Tadaharu Tsumoto, Kazunobu Sawamoto, Takao K. Hensch, Antonio V. Delgado-Escueta and Kazuhiro Yamakawa, *Efhc1* deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility, Human Molecular Genetics, 18, 1099-1109, 2009, 査読: 有

[学会発表] (計3件)

- ① 鈴木俊光, Mice lacking epilepsy gene, *Efhc1*, cause spontaneous myoclonus, annual meeting of the Society for Neuroscience, 2009年11月15日,

Washington, DC, USA

- ② 鈴木俊光, *Efhc1* 変異マウスで頻出する自然誘発ミオクロームス, 日本てんかん学会, 2009年10月18日, 東京
- ③ 鈴木俊光, *Efhc1* 欠損マウスにおける痙攣閾値の低下, 日本神経科学会, 2009年7月09日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊光 (Suzuki Toshimitsu)

独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・研究員

研究者番号 : 20373318