

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03566

研究課題名(和文) 神経発達症におけるSCN2A欠損と環境要因の相互作用の解明

研究課題名(英文) SCN2A neurodevelopmental disorders and environments

研究代表者

山川 和弘 (Yamakawa, Kazuhiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：30241235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：SCN1A-GFPトランスジェニックマウスにおいてNav1.2の分布を検討することにより、大脳皮質においてはNav1.2は皮質-線条体、皮質-視床、および皮質-皮質投射細胞に発現し、一方、Nav1.1は錐体路投射細胞と皮質-皮質投射細胞の一部に発現し、両者は相互排他的であることなどを確認した(論文投稿中)。また、Scn2aホモfloxexマウスの内側前頭前皮質(mPFC)または腹側被蓋野(VTA)にCre発現アデノ随伴ウイルス(AAV-Cre)を注入して行動試験を行い、mPFCにおけるScn2aの欠損はPPIの低下を、VTAにおけるScn2aの欠損はPPIの上昇を示した。(論文投稿中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SCN2A遺伝子がコードする電位依存性ナトリウムチャンネル α 2サブユニット(Nav1.2)の複数の変異は自閉スペクトラム症、散発性知的障害、統合失調症など神経発達症の患者で報告されている。本研究では、Nav1.2の脳内における詳細な分布を明らかにするとともに、統合失調症関連脳部位特異的な欠損が行動障害にどのように寄与しているのかを詳細に解析することで、SCN2A変異を有する患者の疾患発症に關与する神経回路・発症メカニズムを検討した。これらの結果はSCN2A変異による神経発達症の発症機構解明、治療法開発に大きく役立つものである。

研究成果の概要(英文)：Investigation of Nav1.2 distribution on Scn1a-GFP transgenic mouse revealed that in neocortex Nav1.2 is expressed in cortico-striatal, cortico-thalamic and cortico-cortical projection neurons, while Nav1.1 is expressed in pyramidal tract projections. Conditional eliminations of Scn2a in mPFC (medial prefrontal cortex) and VTA (ventral tegmental area) regions revealed that the elimination in mPFC decreased PPI (prepulse inhibition) while that in VTA accelerates PPI. These results indicate that eliminations in these regions have opposite effects for schizophrenia-related social behaviors.

研究分野：神経発達症遺伝医学

キーワード：神経発達症 てんかん 電位依存性ナトリウムチャンネル SCN2A Nav1.2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

電位依存性ナトリウムチャンネルはナトリウムイオンを通す穴を形成する主要構成蛋白である α サブユニットと、その機能や細胞内移動を調節する β サブユニットからなるイオンチャンネルである。ヒトにおいては α サブユニットはNav1.1~1.9の9種類が、 β サブユニットは β 1~ β 4の4種類が知られている。 α サブユニットには主に骨格筋で発現するNav1.4や心筋のNav1.5などがあるが、中枢神経系で発現するものとしては主にNav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6の4種類が知られている。このうち、Nav1.1をコードする遺伝子*SCN1A*や、Nav1.2をコードする*SCN2A*の変異が神経発達症の患者さんで多く報告されている。現在までにこれら神経疾患の大規模な全ゲノム解析が複数行われ、これら疾患で新生機能喪失変異を示す多くの遺伝子が発症責任遺伝子候補として同定されてきているが、中でもこの*SCN2A*は自閉スペクトラム症で最も頻度高く新生機能喪失変異を示すことで知られている遺伝子である (Hoischen et al., *Nat Neurosci* 6:764-72, 2014; Johnson et al., *Nat Neurosci* 2:223-32, 2016など)。本研究の代表者である山川は今までに、*SCN1A*遺伝子について多くの患者変異同定・機能解析(Sugawara et al., *Neurology* 98: 6384-6389, 2001; Fujiwara et al., *Brain* 126:531-546, 2003; Morimoto et al., *Epilepsia*, 47:1732-1736, 2006; Nakayama et al., *Hum Mut* 31 :820-829, 2010, Takayama et al., *Epilepsia* 55: 528-538, 2014 など)や、マウスモデルにおけるてんかんや行動解析 (Ogiwara et al., *J Neurosci* 27: 5903-5914, 2007; Ito et al., *Neurobiol Dis* 49: 29-40, 2013; Ogiwara et al., *Hum Mol Genet* 22: 4784-4804, 2013など)の報告を行うとともに、*SCN2A*遺伝子についても、てんかん患者で世界初の*SCN2A*変異 (Sugawara et al., *PNAS* 98: 6384-6389, 2001)、てんかん脳症・知的障害・自閉症合併患者の新生ナンセンス変異 (Kamiya et al., *J Neurosci* 24:2690-2698, 2004自閉症で世界初)、野生型マウスにおけるNav1.2チャンネルタンパクの詳細な組織分布解析 (Yamagata et al., *Biochem Biophys Res Commun* 491:1070-1076, 2017) *Scn2a*-KOマウスの興奮性神経細胞依存的てんかん発作 (Ogiwara et al., *Commun Biol* 1:96, 2018) 記憶学習障害と記憶再生異常 (Middleton et al., *Nat Neurosci* 21:996-1003, 2018) 社会性行動異常とAMPA受容体機能亢進薬による改善 (Tatsukawa et al., *Mol Autism* 10:15, 2019)などを報告してきた。また、シナプスにおける神経伝達物質の放出に必須のタンパクMunc18-1をコードする*STXBPI*の変異も*SCN2A*変異によるものと類似の疾患を引き起こすが、山川は*Stxbp1*-KOマウスの顕著な攻撃性とAMPA受容体機能亢進薬による改善 (Miyamoto et al. *Hum Mol Genet* 26:4961-4974, 2017)、更には*STXBPI*と*SCN2A*に共通し線条体 (CPu) を介する全く新規なてんかん発症回路 (Miyamoto et al., *Nat Commun* 10:1917, 2019) を報告した。この報告は、これまでのてんかん発症メカニズムの理解にパラダイムシフトをもたらすものとなった(https://www.riken.jp/press/2019/20190516_1/)。大田原症候群などの重篤てんかんなどでみられる*SCN2A*の変異は新生ヘテロミスセンス変異であるのに対し、自閉スペクトラム症、散発性知的障害、統合失調症など神経発達症の患者さんでみられる*SCN2A*の変異は、新生ヘテロ分断変異である (Yamakawa K. *Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability*. San Diego: Academic Press,; p234-246, 2016 - review)。先に述べた論文 (Tatsukawa et al., *Mol Autism* 10:15, 2019) において山川は、まさしくこれら神経発達症のモデルとなる*Scn2a*ヘテロノックアウトマウス (*Scn2a*^{+/-}) の成体マウスにおいて、

- 1) 新規環境下における過活動 (立ち上がり行動など含む)
- 2) 不安行動の亢進と恐怖除去障害 (野生型マウスにおいては電気ショックに関連付けた音を、後から電気ショックを加えずに繰り返し聞かせることにより音を聞かせることによるすみ行動

が無くなるが、*Scn2a*^{+/-}マウスにおいてはすくみ行動が継続する)

3) 自閉スペクトラム症や統合失調症などの患者で見られる内側前頭前野 (mPFC) の脳波異常に類似したmPFCにおけるガンマ波の増大、

などの異常を報告した。更にこの論文で山川は、少なくとも新規環境下における過活動は、大脳皮質や海馬、扁桃体などの興奮性神経細胞における*Scn2a*の半減が寄与していることや、実際にこの過活動がAMPA受容体機能亢進薬による興奮性神経伝達の増強により改善されることを報告した

(Tatsukawa et al., *Mol Autism* 10:15, 2019)。しかしながら*Scn2a*^{+/-}マウスにおいて、社会性記憶の異常は認められたが、明らかな社会性そのものの異常を見出すことは出来なかった。その後、他の複数のグループから*Scn2a*^{+/-}マウスの行動異常についての解析の報告が続いたが、それらにおいても*Scn2a*^{+/-}マウスの社会性行動異常は見られなかった。一方、近年の研究から、自閉スペクトラム症などの神経発達症の発症には遺伝要因と環境要因が複雑に絡み合い寄与していることが示唆されており、環境要因の有力な候補として胎生期における母親の感染症による免疫亢進などが報告されている (Smith et al., *J Neurosci* 27:10695-702, 2007; Malkova et al., *Brain Behav Immun* 26:607-616, 2012など)。SCN2A変異を有する患者やマウスモデルにおいても、これら環境要因との相関・相乗効果が予想された。以上のことは、SCN2Aの異常が実際に神経ネットワークレベルや生理学的レベルでどのように変化をもたらし、更にそのうちのどの部分が*Scn2a*^{+/-}マウスで既に確認できた神経発達症様のそれぞれの症状に寄与しているのか、更には、SCN2A変異という遺伝要因は胎生期における母親の免疫亢進などの環境要因と相関作用・相乗効果を有するのか、そうであるならばそのメカニズムは何かという問題が、神経発達症の発症機構を理解し、真に有効で副作用の少ない治療法の開発の為にも必要不可欠な、学術的な意義の非常に大きな「問い」であることを示す。

2. 研究の目的

本研究においては、神経発達症で多くの変異を示すSCN2A遺伝子がコードするNav1.2タンパクの詳細な脳内分布を明らかにするとともに、今までに既に同定できた*Scn2a*^{+/-}マウスにおける神経発達症様の行動異常・生理学的異常がどのようなメカニズムで生じているのかを明らかにすること、さらにはSCN2Aが自閉スペクトラム症で最も頻度高く新生機能喪失変異を示す遺伝子であることから当然想定されるが*Scn2a*全身半欠損マウスでは確認できない(再現されない)SCN2A半欠損の社会性行動異常への寄与を、責任脳領域候補のみで*Scn2a*ホモ欠損を有するマウスや、妊娠母親マウスもしくは出生直後の*Scn2a*^{+/-}マウスに免疫亢進を引き起こしたマウスについての解析によりあぶり出すこと、更にはその発症メカニズム(神経細胞種・神経回路)を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(3-1) SCN2A機能喪失変異により引き起こされる行動異常・生理学的異常の神経細胞種・回路の解明

山川は*Scn2a*^{+/-}マウスにおいて、新規環境下における過活動、不安行動の亢進と恐怖除去障害、mPFCにおけるガンマ波の増大などの異常を見出し報告した(Tatsukawa et al., *Mol Autism* 10:15, 2019)。本研究では、これらの発症に関わる神経回路を*Scn2a*局所ノックアウトマウスや、先に山川が報告した論文(Miyamoto et al., *Nat Commun* 10:1917, 2019)でも用いた逆行性レンチウイルス遺伝子導入システムNeuRet、薬理遺伝学的神経興奮/抑制システムDREADD、カルシウム透過型AMPA受容体抑制薬NASPM、AMPA受容体機能促進薬CX516、GABA受容体作動薬muscimolなどの薬剤の局所注入、脳スライスパッチ、局所フィールド記録やテロード電極などの複数電極を用いた細胞外記録法などの手法を駆使し、更には新たに光遺伝学的手法なども導入して明らかにしていく。具体的には、それぞれの異常をも

たらずと予想される floxed-*Scn2a* マウス (Ogiwara et al., *Commun Biol* 1:96, 2018 ; Tatsukawa et al., *Mol Autism* 10:15, 2019 ; Miyamoto et al., *Nat Commun* 10:1917, 2019) の脳部位 (mPFC、CPu、側坐核 (NAc)、視床下部、扁桃体など) に Cre リコンビナーゼを組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV-Cre) を打ち込み、責任領域候補を同定する。更に、上記手法により、責任神経細胞種、神経回路を明らかにする。特に、*Scn2a*^{+/−} マウスにおいて再現性良く安定して検出される恐怖除去障害については、扁桃体中心核から始まる神経回路が過剰な恐怖の抑制を担うことや (Ozawa et al., *Nat Neurosci* 20:90-97, 2017) NAc に投射するドーパミンが消去に重要であることなどが報告されており (Luo et al., *Nat Commun* 9, Article number: 2483, 2018) これらの神経核を中心とした解析を進める。

先に述べた様に、*SCN2A* は自閉スペクトラム症などの神経発達症で最も頻度高く新生機能喪失変異が見られる遺伝子であるにもかかわらず、*Scn2a*^{+/−} マウスでは他者への興味の喪失がはっきりと再現されない (Tatsukawa et al., *Mol Autism* 10:15, 2019) *Scn2a* 全身ホモノックアウトマウス (*Scn2a*^{−/−}) は出生後早期に死亡することから、まずは山川はホモ floxed-*Scn2a* マウスの限られた脳部位への AAV-Cre 注入による局所ホモノックアウトの手法により打開を目指す。近年、他者への興味の喪失などの自閉症様行動異常については腹側被蓋野 (Ventral tegmental area: VTA) (Krishnan et al., *Nature* 543:507-512, 2017) や NAc (Walsh et al., *Nature* 560:589-594, 2018) などが注目されている。まずは mPFC 局所 *Scn2a* ノックアウトマウス (*Scn2a*-mPFC-KO) を作成し、スリーチャンバーテスト、複数匹でのオープンフィールドテストなどにより社会性異常の検出を試みる。この *Scn2a*-mPFC-KO マウスで社会性の異常が確認されない場合は、*Scn2a*-NAc-KO, *Scn2a*-CPu-KO マウスを作成・解析する。CPu を介した神経回路の異常も発達障害に深く関わることが示唆されており (Fuccillo et al., *Front Neurosci* 10:27, 2016; Subramanian et al., *Autism Res* 10:1751-1775, 2017) また、Nav1.2 が CPu, NAc に発現していることは我々自身が見出している (Miyazaki et al., *Nat Commun* 5:5525, 2014 ; 未発表データ)。これらマウスでも行動異常が確認できない場合は、局所ホモノックアウトの対象脳領域を拡大する。

(3-2) 行動異常における遺伝要因 (*SCN2A* 遺伝子変異) と環境要因 (免疫負荷) との相関・相乗効果の解明

げっ歯類や哺乳類の実験動物において神経発達症・統合失調症様行動異常を誘導するための免疫亢進を引き起こす手法の一つとして、妊娠中の母親への poly(I:C) 2 本鎖 RNA の投与が行われている (Smith et al., *J Neurosci* 27:10695-702, 2007; Malkova et al., *Brain Behav Immun* 26:607-616, 2012 など)。しかしながら、この手法での仔獣における行動異常には大きなばらつきがあり、それを避けるために仔獣に対して生後すぐ (生後 2 日) からの poly(I:C) の連続投与も用いられている (Ibi et al. *Neurosci Res* 64:297-305, 2009; Nawa et al. *Methods Mol Biol* 829:445-451, 2012 など)。本研究では、*Scn2a*^{+/−} マウス仔獣に対して poly(I:C) を投与し、それらマウスにおいてスリーチャンバーテスト、複数匹でのオープンフィールドテストなどにより社会性の異常を評価し、*Scn2a* の半減と poly(I:C) による免疫亢進の間での相乗効果の有無を明らかにする。相乗効果が確認された場合には、仔獣への poly(I:C) 投与に対する実際の神経発達症・統合失調症のモデルとしての妥当性への批判も考慮し、妊娠中の母親への poly(I:C) 投与でも確かに同じ効果が得られるのかも確認する。更には、あぶり出された *Scn2a*^{+/−} マウスの社会性行動異常の責任脳領域、神経細胞種、神経回路を上述の手法により明らかにする。

4 . 研究成果

自閉スペクトラム症、散発性知的障害、統合失調症など神経発達症の患者で多くの変異が報告されている *SCN2A* 遺伝子がコードする電位依存性ナトリウムチャンネル 2 サブユニット Nav1.2 の脳内における詳細な分布を明らかにするとともに、統合失調症関連脳部位特異的な欠損が行動障害に

どのように寄与しているのかを詳細に解析することで、SCN2A 変異を有する患者の疾患発症に關与する神経回路・発症メカニズムの一部を明らかにした。具体的には、SCN1A-GFP トランスジェニックマウスにおいて Nav1.2 の分布を検討することにより、大脳皮質においては Nav1.2 は皮質-線条体、皮質-視床、および皮質-皮質投射細胞に発現し、一方、Nav1.1 は錐体路投射細胞と皮質-皮質投射細胞の一部に発現し、両者は相互排他的であることなどを確認した(論文投稿中)。また、Scn2a ホモ floxed マウスの内側前頭前皮質(mPFC)または腹側被蓋野(VTA)に Cre 発現アデノ随伴ウイルス(AAV-Cre)を注入して行動試験を行い、mPFC における Scn2a の欠損は PPI の低下を、VTA における Scn2a の欠損は PPI の上昇を示した。(論文投稿中)。これらの結果は SCN2A 変異による神経発達症の発症機構解明、治療法開発に大きく役立つものである。

1. Yamagata T, Ogiwara I, Tatsukawa T, Otsuka Y, Mazaki E, Inoue I, Tokonami N, Hibi Y, Itohara S, Yamakawa K*. (2023) Scn1a-GFP transgenic mouse revealed Nav1.1 expression in neocortical pyramidal tract projection neurons. *BioRxiv*. MS ID#: BIORXIV/2021/437794. (ELife - in revision)
2. Suzuki T, *, Hattori S, Mizukami M, Nakajima R, Hibi Y, Kato S, Matsuzaki M, Miyakawa T, Yamakawa Y. Impaired medial prefrontal cortex-nucleus accumbens excitatory transmissions by selective Nav1.2 deficiency display a reduction in prepulse inhibition of acoustic startle response (論文投稿中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuhiro YAMAKAWA
2. 発表標題 Molecular genetics of epilepsy and autism: Model studies for SCN1A, SCN2A, STXBP1
3. 学会等名 Xiangya International Pediatric Neurology Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山川和弘
2. 発表標題 てんかん・自閉症の発症機序：SCN1A, SCN2A, STXBP1
3. 学会等名 脳の医学生物学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山川和弘
2. 発表標題 てんかんと発達障害の分子遺伝学
3. 学会等名 茨城てんかん懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山川和弘
2. 発表標題 てんかんと自閉症の本態を探る
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------