

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16671

研究課題名（和文）有棘赤血球舞蹈病に対するてんかん発作を生じる症状修飾因子の検討

研究課題名（英文）Modifying factors for epilepsy in chorea-acanthocytosis

研究代表者

崎元 仁志（SAKIMOTO, Hitoshi）

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・客員研究員

研究者番号：80813667

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：有棘赤血球舞蹈病（以下ChAc）は、有棘赤血球症と運動症状に加えててんかん発作は約40%に見られる。ヒトChAcの臨床表現型は多彩で個体差が大きく、症状修飾因子の存在が示唆されている。てんかん発作を呈するChAc変異を有するモデルマウスが同一家系に複数出現した。てんかん発作の症状修飾因子として遺伝子変異がde novoに生じたことが示唆され、マウスのてんかん表現型解析と分子遺伝学的手法によりHnrnpm遺伝子を同定した。同遺伝子変異を有するChAcモデルマウスは、同遺伝子を有さないChAcモデルマウスや野生型マウス、同遺伝子を有する野生型マウスと比較しててんかん発作を呈しやすい傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

症状修飾因子を分子遺伝学的に証明した報告は殆ど無い。症状修飾因子として遺伝子変異の同定に至った研究は極めて少なく、学術的独自性は高い。変異同定とともに分子的機能病態まで明らかにできれば、神経変性疾患に伴うてんかん発作や加齢に伴い合併する高齢てんかんの病因について新たな側面を提示できることになり、実臨床的にも意義深く創造性も高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：Chorea-acanthocytosis (ChAc) is a human, autosomal recessive neurodegenerative disorder. Clinically, ChAc is characterized by adult-onset chorea, acanthocytosis in erythrocytes, and epilepsy (40%). Humans with ChAc also exhibit a range of ages of onset and symptoms, even in the same family lineage. Similarly, the behavioral and pathological phenotypes of the model mice varied a good deal from individual to individual, indicating that differences between individuals. Several ChAc model mice with epilepsy appeared in the same family lineage. It is probable that genetic modifiers affect the epilepsy of the disease phenotypes. Occurrence of de novo mutations which is modifying factors for epilepsy was suggested, and genetic analysis identified the mutation of Hnrnpm. ChAc model mouse with Hnrnpm mutation tended to have epileptic seizures.

研究分野：分子生物学

キーワード：有棘赤血球舞蹈病 てんかん 症状修飾因子 モデルマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

有棘赤血球舞踏病 (chorea-acanthocytosis; ChAc) は稀な遺伝性神経変性疾患で、主に線条体神経変性と末梢血赤血球に有棘赤血球症をきたす。頻度は不明であるが、2009年時に全世界で200例ほどの症例が報告されている中で100例以上は日本国内からの症例であり本邦に比較的多い疾患である。ChAcは16~50歳頃に発症し、舞踏運動と有棘赤血球症のほか、多彩な精神神経症状 ChAc においててんかんは約40%の症例で認められ、家族性側頭葉てんかんと診断されていた家系症例も存在した。ヒト ChAc の臨床表現型は多彩で個体差が強く、症状修飾因子の存在が示唆されている。申請者の所属する研究室は世界に先駆けて ChAc の原因遺伝子 VPS13A を同定し遺伝子産物を chorein と命名し、遺伝子改変技術に基づき ChAc モデルマウスを作成した。129S/C57BL6 を背景遺伝子にもつハイブリッドマウスでは表現型に個体差が強く、背景遺伝子による症状修飾が示唆されていた。申請者らは、ChAc モデルマウスの背景遺伝子による症状修飾性を同定するため、10世代以上戻し交配を行うことにより FVB/Njcl、129S6、C57BL/6、DBA/2Jcl および BALB/cByJ を背景遺伝子にもつ ChAc モデルマウスを作成し、それぞれ表現型解析を行い、背景遺伝子による表現型の差異を見出した (Biochem Biophys Res Commun 472, 118-124, 2016)。ヒト ChAc の臨床表現型は多彩で個体差が大きく、ChAc マウスも同様に背景の strain によって表現型が異なることから、症状修飾因子の存在が示唆されている。当実験室が飼育していた ChAc モデルマウスにおいて、継代を重ねるうちにてんかん発作を起こしやすい ChAc 変異を有する個体が同一家系に複数出現するようになった。ChAc の遺伝子変異に加えて、てんかん発作を生じる症状修飾因子として遺伝子変異 が de novo に生じたことが考えられた。

### 2. 研究の目的

背景遺伝子統一した後の継代中に発生したてんかん発作であり、その世代以前には存在しなかったことから de novo による遺伝子変異と考えられる。表現型の有無も明確であり、分子遺伝学的手法により変異同定に至る可能性が高い。本研究はこの de novo 変異同定と、de novo 変異を生じた遺伝子産物機能解析とその相互作用タンパク質の解析を通して修飾因子としての分子病態の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### マウスの表現型解析

60~80週までの期間、ビデオ撮影を用いて週に2時間の観察時間を設け、てんかん家系マウスの行動を観察した。てんかん発作を確認した回数を記録し、各個体のてんかん発作の有無を評価した。また、てんかん発作が確認された ChAc モデルマウス (Epi+ Del/Del)、てんかん発作が確認されなかった ChAc モデルマウス (Epi- Del/Del)、野生型マウス (Wild/Wild) に対して脳波検査を行った。129S6 マウスのてんかん家系内の各個体についてテール等から遺伝子 DNA を抽出した。

#### 遺伝子解析

家系内で *Vps13a* 変異をホモ接合性に有するマウスについて、てんかん発作を生じ脳波異常が指摘された個体と、てんかん発作がなく脳波異常が指摘できない個体を同定した。てんかん発作を

生じたマウスと同一家系(A家系)においててんかんが観察された2個体、てんかんが観察されなかった1個体、別家系(B家系)の1個体、合計4個体からDNAを抽出した。次世代シーケンシングで配列を決定した。てんかんが観察された2個体が共通して保有し、観察されなかった2個体には存在しない変異を全て抽出し、IGVを用いて抽出された変異を手動ですべて評価し、サンガーシーケンスで確認を行った。

#### 表現型解析

てんかんを起こしたマウスの系統維持を行っていたため、*Vps13a* および候補遺伝子の両遺伝子につき、WTと変異型のアリルいずれかをそれぞれホモに保有するマウスの4群を作成。それらマウスを用い、加速度刺激による発作誘発でてんかん発作を誘発し、臨床発作と免疫組織学染色(ZNT3抗体)を用いて病理学的変化について観察した。病理学的変化に関しては、マウスを安楽死させたのちに半脳をホルマリンで浸漬固定を行い、O.C.T. Compoundに組織片を包埋した。これらの組織をZNT3抗体を用いて免疫組織染色を行った。行動観察はビデオ撮影による映像での確認を行い、てんかん発作が出現した個体の割合で統計解析を行った。解析はFisher正確検定を行い、3群以上の解析のため、Bonferroniの補正を行った。また、全般化した個体の割合に対してKruskal-Wallis検定を行った。

加速度刺激：しっぽを掴んで空中で把持した状態で、頭部が床から20cmの高さになるようにして、掴んでいる指を離す。発作を起こすまで最大20回施行する。

#### ヒト ChAc 症例における遺伝子解析

当教室が保有するヒト ChAc 症例 55 症例の DNA において候補となった de novo 変異に関して検索を行った。

### 4. 研究成果

#### マウスの表現型解析

129S6 の ChAc モデルマウスで今まで確認し得なかった表現型であるてんかん発作が出現するようになり、てんかん発作を有する ChAc モデルマウスは同一系統内に集積している傾向が確認された(図1)。それぞれのマウスに対して脳波検査

図1 モデルマウスの家系図

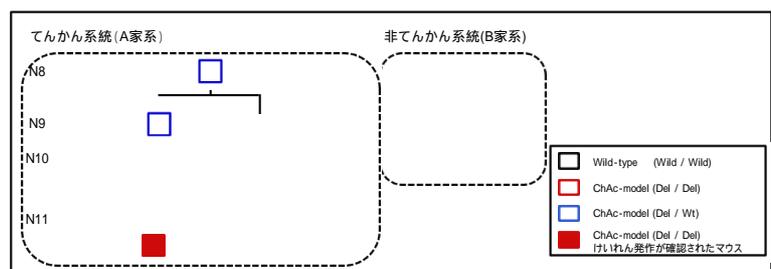
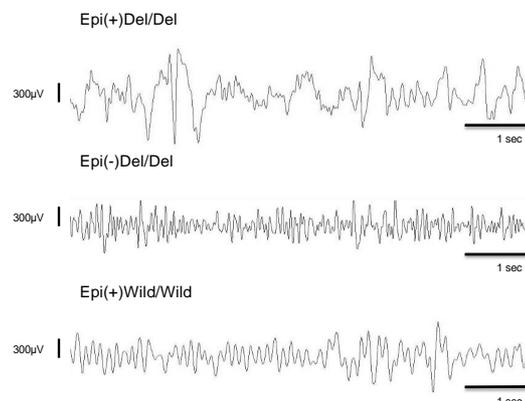


図2 脳波検査施行中の様子



図3 脳波検査



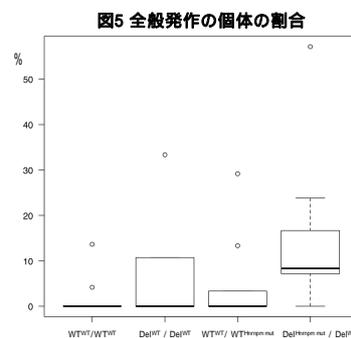
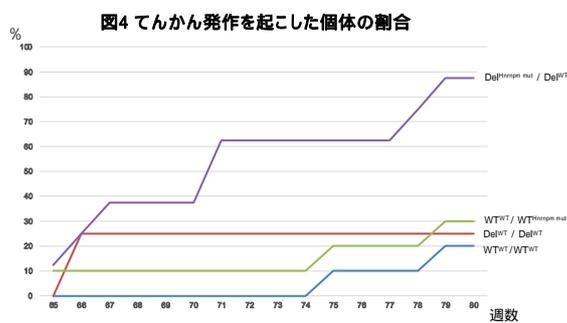
を施行し(図 2)、波形を比較したところ、てんかん発作を有する ChAc モデルマウスは全体的に高振幅の徐波傾向であった(図 3)。

### 遺伝子解析

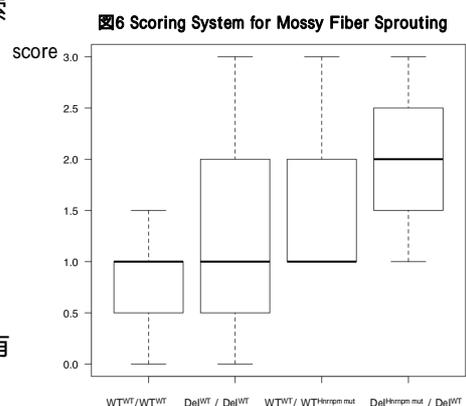
intron、UTR、Synonymous の変異を除外したところ、計 189 箇所の変異が確認され、それぞれ IGV を用いて目視的に確認を行った。*Hnrnpm* (chr17\_33649903)が候補遺伝子として挙がり、サンガーシーケンスで *Hnrnpm* 遺伝子のミスセンス変異(NM\_001109913.1; c.1549C>T)に絞り込んだ。

### 表現型解析

遺伝子解析で得られた結果を元に *Hnrnpm* 遺伝子変異を有する ChAc モデルマウス( $Del^{Hnrnpm\ mut}/Del^{WT}$ ; N=9)、*Hnrnpm* 遺伝子変異を有さない ChAc モデルマウス( $Del^{WT}/Del^{WT}$ ; N=8)、*Hnrnpm* 遺伝子変異を有する野生型マウス( $WT^{X\ mut}/WT^{WT}$ ; N=10)、*Hnrnpm* 遺伝子変異を有さない野生型マウス( $WT^{WT}/WT^{WT}$ ; N=11)を戻し交配で作成し、それぞれ加速度刺激によるてんかんの誘発実験を行った。二つの遺伝子変異をもつマウスはてんかん発作を起こしやすくなる傾向にあった ( $Del^{Hnrnpm\ mut}/Del^{WT}$  vs  $Del^{WT}/Del^{WT}$ : p=0.09,  $Del^{Hnrnpm\ mut}/Del^{WT}$  vs  $WT^{X\ mut}/WT^{WT}$ : p=0.019,  $Del^{Hnrnpm\ mut}/Del^{WT}$  vs  $WT^{WT}/WT^{WT}$ : p=0.0054) (図 4)。しかし Bonferroni の補正を行ったところ  $Del^{Hnrnpm\ mut}/Del^{WT}$  vs  $WT^{WT}/WT^{WT}$  以外は有意差が確認できなかった。また、Kruskal-Wallis 検定でも同様に有意差は確認されなかった(図 5)。



ZNT3 抗体を用いて免疫組織染色を行った。顆粒細胞軸索 (mossy fiber, 苔状線維) の歯状回内層への異常な萌芽がてんかん患者の海馬領域でより多く確認されるという報告があり (THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 404:537-553 (1999))、作成した 4 群のマウス脳を用いて、海馬 CA3 領域の観察し、同文献にある criteria に基づいたスコアリングを行った。他の 3 群と比較して criteria score が高い傾向にあったが、P=0.053 であり有意な差ではなかった(図 6)。



### ヒト ChAc 症例における遺伝子解析

申請者の所属する研究室は本邦における ChAc の遺伝子変異解析を含む分子的診断解析を担っており、ChAc 患者の遺伝子 DNA が集積している (Mov. Disord., 22: 1669-1670, 2007, Acta Neuropathol., 119: 271-273, 2009, Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet., 156: 620-631, 2011 Epilepsia, 57: 549-556, 2016)。当教室が保有するヒト ChAc 症例 DNA において *HNRNPM* 遺伝子変異に関して検索したところ、55 症例のうち 2 症例において同遺伝子の non

synonymus 変異が確認された。そのうち 1 症例はてんかん発作を認め、もう 1 症例はてんかん発作の既往は認めなかった。

今回の研究では有意な差は見られなかったが、*Hnrnpm* 変異を有する ChAc モデルマウスにおいて、てんかん発作が出現しやすい傾向にあると考えられた。個体数を増やした上で確認を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 崎元仁志
2. 発表標題 神経変性疾患モデルマウスでのんかん発作に対する症状修飾因子の解析
3. 学会等名 日本生物学的精神医学会
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
---------	---------