

平成23年3月31日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21791020

研究課題名(和文)

ナトリウムチャネル遺伝子変異によって引き起こされるてんかん発病機序の解明

研究課題名(英文) Molecular pathology of epilepsy associated with mutations of voltage-gated sodium channel gene

研究代表者

荻原 郁夫 (OGIWARA IKUO)

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： 30373286

研究成果の概要(和文)：電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 1$ サブユニット(*SCN1A*)遺伝子は、乳児重症ミオクロニーてんかん(あるいはDravet症候群)の責任遺伝子である。本研究は、抑制性神経細胞特異的、あるいは興奮性神経細胞特異的に*SCN1A*遺伝子を破壊した。抑制性神経細胞特異的*SCN1A*遺伝子マウスはけいれん発作を呈したが、興奮性神経細胞特異的*SCN1A*遺伝子マウスはけいれんを呈さなかった。以上の結果は、乳児重症ミオクロニーてんかんの発病機序が抑制性神経細胞の機能不全とする申請者らの従来の仮説を支持した。

研究成果の概要(英文)：Mutations in *SCN1A* gene encoding voltage-gated sodium channel $\alpha 1$, $Na_v1.1$, cause severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI, also known as Dravet syndrome). We here demonstrated that selective $Na_v1.1$ elimination in inhibitory neurons was sufficient to trigger epileptic seizures. In contrast, selective $Na_v1.1$ elimination in excitatory neurons did not result in epileptic seizures. The results indicate that altered functions of the inhibitory circuits predominantly contributed to epileptic seizures in mice, in good agreement with our hypothesis proposed previously.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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・小児科学

キーワード：てんかん、ナトリウムチャネル遺伝子、抑制性神経細胞、興奮性神経細胞、脳・神経、神経科学

1. 研究開始当初の背景

電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 1$ サブユニット(*SCN1A*)遺伝子は、乳児期に発症するてんかん、全般てんかん熱性けいれんプラ

スと乳児重症ミオクロニーてんかん(severe myoclonic epilepsy in infancy、あるいはDravet症候群)の原因遺伝子である。

申請者の所属する研究チームは 189 名の SMEI 患者の *SCN1A* 遺伝子配列解析を行い、104 例 (55%) に突然変異を認めた。申請者らは、さらに、変異ナトリウムチャンネルを強制発現させた細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、変異チャンネルが電流をほとんど、あるいは全く流さないことを明らかにした。以上の研究は *SCN1A* 遺伝子の突然変異による $\alpha 1$ ナトリウムチャンネル分子の機能不全が SMEI 発病機序であることを示唆する。しかし、これら結果だけで SMEI 病態を説明することは不可能で、病態モデル動物を使った組織、個体レベルの研究が必要とされていた。

それ故に、申請者は、乳児重症ミオクロニーてんかん患者に認められたナンセンス突然変異を持つ *SCN1A* 遺伝子変異ノックインマウスを作製した。この変異マウスは、ホモ接合体、ヘテロ接合体ともに乳児期 (離乳前) にけいれん発作を呈した。さらに、ホモ接合体マウスは生後 20 日までに死亡し、ヘテロ接合体マウスのおよそ半数が生後 3 月までに死亡した。

申請者は、さらに、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ サブユニットの脳内局在を解析した。電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ サブユニットは、マウス乳児海馬ではパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞の細胞体に、マウス乳児大脳皮質ではパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞の軸索起始部に主に局在した。さらに、ヘテロ接合体 *SCN1A* 遺伝子変異ノックインマウスパルブアルブミン陽性抑制性神経細胞に電気生理学的な異常を認めた。

最近、申請者は、抑制性神経細胞特異的 (ヘテロ接合体) *SCN1A* 遺伝子破壊マウスを作製した。抑制性神経細胞特異的 (ヘテロ接合体) *SCN1A* 遺伝子破壊マウスは、離乳期前後にけいれんを発現した。

以上の結果は、抑制性神経回路の機能不全が乳児重症ミオクロニーてんかんの発病機序であることを示唆した。

2. 研究の目的

てんかん発症機序における抑制性神経回路と興奮性神経回路の役割を検討した。

3. 研究の方法

ホモ接合体コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスを抑制性神経細胞特異的に Cre-recombinase を発現するマウスと交配し、得られた抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子

破壊 (ヘテロ接合体 flox) マウスの表現型を観察した。*SCN1A* 遺伝子破壊は、PCR 法で解析した。

さらに、抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ヘテロ接合体 flox) マウスをホモ接合体コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスと交配し、得られた抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ホモ接合体 flox) マウスの表現型を観察した。

ホモ接合体コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスを興奮性神経細胞特異的に Cre-recombinase を発現するマウスと交配し、得られた興奮性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ヘテロ接合体 flox) マウスの表現型を観察した。

次に、興奮性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ヘテロ接合体 flox) マウスをホモ接合体コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスと交配し、得られた興奮性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ホモ接合体 flox) マウスの表現型を観察した。

マウスを麻酔下でかん流固定後、脳を摘出した。凍結状態の脳から切片を作製し、切片を抗電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ サブユニット抗体と反応させた。そして、抗原抗体反応を可視化した。

4. 研究成果

抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ヘテロ接合体 flox) マウスは、極めて稀な例外を除く、ほぼ全例が生後一ヶ月までに死亡した。この抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ヘテロ接合体 flox) マウスの死亡率は、ヘテロ接合体 *SCN1A* 遺伝子ノックアウトマウスの死亡率 (生後一月でおよそ 30%) よりはるかに高かった。また、脳波記録を行った 5 匹中 4 匹の抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ヘテロ接合体 flox) マウスにけいれん発作を認め、4 匹ともけいれん発作で死亡した。

抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ホモ接合体 flox) マウスは、全例が生後 11 から 13 日の間に死亡した。この抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ホモ接合体 flox) マウスの死亡時期は、通常 *SCN1A* 遺伝子ノックアウトマウスの死亡時期 (生後 14-20 日) よりはるかに早かった。抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ホモ接合体 flox) マウスを詳細に観察したところ、死亡する前日までは見た目正常であるのに対し、死亡当日は、無活動と、断続的なミオクロニー様発作が認められた。免疫組織学的解析は、抑制性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ホモ接合体 flox) マウスの海馬で、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ サブユニットの発現低下を認めた。

興奮性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊マウスは、ホモ接合体でも、けいれん発作などの見た目

の異常は認められなかった。免疫組織学的解析は、興奮性神経細胞特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊 (ホモ接合体 flox) マウスの海馬と大脳で、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ サブユニットの発現低下を認めた。

以上の結果は、抑制性神経回路の異常がてんかん発症機序であるのに対し、興奮性神経回路の異常はてんかん発症に関与しないことを示唆するとともに、乳児重症ミオクロニーてんかんの発症機序が抑制性神経細胞の機能不全とする申請者らの従来の仮説を支持する。

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 2 件)

① Nakayama T, Ogiwara I (共筆頭著者), Ito K, Kaneda M, Mazaki E, Osaka H, Ohtani H, Inoue Y, Fujiwara T, Uematsu M, Haginoya K, Tsuchiya S, Yamakawa K. Deletions of *SCN1A* 5' genomic region with promoter activity in Dravet syndrome. *Human Mutation* 31(7):820-9, 2010. 査読有り

② Ogiwara I, Ito K, Sawaishi Y, Osaka H, Mazaki E, Inoue I, Montal M, Hashikawa T, Shike T, Fujiwara T, Inoue Y, Kaneda M, Yamakawa K. De novo mutations of voltage-gated sodium channel αII gene *SCN2A* in intractable epilepsies. *Neurology* 73(13): 1046-53, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

① Neuroscience 2010、平成 22 年 11 月 14 日、米国 San Diego 市
Scn1a-GFP BAC transgenic mouse lines showed predominant expression of Nav1.1 in parvalbumin-positive interneurons
Ogiwara I, Tokonami N, Mazaki E, Inoue I, Yamakawa K.

② 日本人類遺伝学会第 55 回大会、平成 22 年 10 月 30 日、埼玉県大宮市
電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 遺伝子とてんかん
荻原郁夫、中山東城、真崎恵美、井上育代、伊藤公一、金田誠、宮本浩行、Takao K. Hensch、沢石由記夫、小坂仁、藤原建樹、井上有史、山川和弘

③ 第 44 回日本てんかん学会、平成 22 年 10 月 14 日、岡山県岡山市

難治てんかんに認められた *de novo* 電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ (*SCN2A*) 遺伝子変異

荻原郁夫、真崎恵美、井上育代、伊藤公一、金田誠、沢石由記夫、小坂仁、藤原建樹、井上有史、山川和弘

④ Neuro 2010、平成 22 年 9 月 2 日、兵庫県神戸市
Scn1a mice exhibit hyperactivity, autism-like behavioral deficits and learning impairments
Ogiwara I, Ito S, Yamada K, Yamakawa K.

⑤ 2010 Gordon Conference on Mechanisms of Epilepsy and Neuronal Synchronization、平成 22 年 8 月 11 日、米国 Waterville 市
Analysis of *SCN1A* expression using BAC transgenic mice
Ogiwara I, Tokonami N, Mazaki E, Yamakawa K.

⑥ 第 52 回日本小児神経学会総会、平成 22 年 5 月 21 日、福岡県福岡市
電位依存性ナトリウムチャンネル $\beta 1$ (*SCN1B*) 遺伝子にホモ接合型変異を認めた Dravet 症候群 1 例
荻原郁夫、中山東城、芳村勝城、藤原建樹、井上有史、山川和弘

⑦ Neuroscience 2009、平成 21 年 10 月 18 日、米国 Chicago 市
Analysis of alternative promoters of voltage-gated Na^+ channel αI gene
Ogiwara I, Ito K, Mazaki E, Kaneda M, Yamakawa K.

⑧ 日本人類遺伝学会第 54 回大会、平成 21 年 9 月 24 日、東京都港区
マウス小脳プルキンエ細胞における電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 1$ 遺伝子の発現解析
荻原郁夫、伊藤公一、真崎恵美、金田誠、山川和弘

⑨ 第 32 回日本神経科学大会、平成 21 年 9 月 18 日、愛知県名古屋市
Analysis of voltage-gated sodium channel $\alpha 1$ expression using BAC transgenic mice
Ogiwara I, Mazaki E, Itohara S, Yamakawa K.

⑩ 第 51 回日本小児神経学会総会、平成 21 年 5 月 29 日、鳥取県米子市
難治性乳幼児てんかんに認められた *de novo* 電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 遺伝子変異

荻原郁夫、沢石由記夫、小坂仁、藤原建
樹、井上有史、山川和弘

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻原 郁夫 (OGIWARA IKUO)
独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チ
ーム・研究員
30373286

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者