

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791014

研究課題名（和文） てんかん修飾因子の探索

研究課題名（英文） Survey of the genetic modifier for Dravet syndrome

研究代表者

山形 哲司 (YAMAGATA TETSUSHI)

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：00338766

研究成果の概要（和文）：

乳児重症ミオクロニーてんかんのモデルマウスにおいて、異なる遺伝的背景を持つマウス系統では、突然死などの重篤度が変化したことから、修飾遺伝子の存在が予想されていた。本研究では、日本産野生マウスを起源とする MSM/Ms 系統を用いて戻し交配を行い、各世代の生存率を指標として修飾遺伝子を探索した。得られた結果は、MSM 系統の常染色体上には、突然死に対する抵抗性遺伝子が存在し、X 染色体のセントロメア側 50cM に高感受性遺伝子が存在することを示した。

研究成果の概要（英文）：

As a model mouse for Dravet syndrome, the Nav1.1 deficient mouse (C57BL/6J background) that introduced R1407X mutation in the *Scn1a* gene has been investigated in our laboratory (Ogiwara *et al.*, J Neurosci 27:5903-5914, 2007. Heterozygous mice (*Scn1a*^{+/-}) exhibit spontaneous seizures, and approximately 60% of them survive to adulthood. Interestingly, this survivability of heterozygous mice depended on mouse strain. The strain dependency of latency of sudden death indicates that genetic background carries dominant modifier alleles at one or more loci that determine the severity of the epilepsy phenotype. In this study, to identify modifier genes, we performed genetic mapping of the sudden death phenotype using backcrossing to MSM/Ms strain. The results show 2 types of modifier genes involve in mortality induced by epilepsy. 1st modifier gene that is highly sensitive to the sudden death is located on chromosome X. Because backcrossing with MSM/Ms mice increased survival rate in each generation, we estimated that the autosomes of MSM/Ms strain have 2nd modifier gene(s) to resist symptoms of epilepsy also.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、修飾遺伝子、モデルマウス、Scn1a

1. 研究開始当初の背景

全般てんかん熱性けいれんプラス (GEFS+) と乳児重症ミオクロニーてんかんは、乳児期に発症するてんかんである。GEFS+ は、乳児期の熱性けいれん、幼児期の無熱性全般てんかんを特徴とし、比較的予後が良好である。一方、SMEI は乳児期の熱性けいれんを最初の発作とするが、発症後、難治の強直間代発作とミオクロニー発作へ進行するとともに重度の精神発達障害を起こす。多くの研究グループが、多数の電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 1$ 型サブユニット (SCN1A) 遺伝子の突然変異を GEFS+ と SMEI の患者に見いだしているが、突然変異チャネル分子の機能解析まで行っているのは申請者の所属する研究チームを含む少数グループのみであった。

申請者の所属する研究チームでは、189 例の SMEI 患者の SCN1A 遺伝子について変異解析を行い、104 例 (55%) で SCN1A 遺伝子の突然変異を見出していた (Sugawara *et al.* 2002; Fujiwara *et al.* 2003)。さらに、ヒト疾患のモデルとなるように SMEI 患者と同じナンセンス変異を SCN1A 遺伝子に導入した遺伝子改変マウスを作製した (Ogiwara *et al.* 2007)。このモデルマウスの表現型は、米国ワシントン大学の Catterall 博士の研究グループが報告した SCN1A 欠損マウス (Yu *et al.*, 2006) と酷似しており、生後 14 日より散発的にてんかん発作を起こした。変異型 Scn1a 遺伝子をホモで持つ個体は、生後 20 日前後に全て死亡したが、ヘテロ接合体の生後 90 日間の生

存率は、遺伝的背景により大きく異なっていた。すなわち、C57BL6/J 系統の遺伝的背景をもつ個体群の生存率は、約 60% だったのに対して 129/SvJ 系統の遺伝的背景をもつ個体群では死亡例が観察されなかった。この結果は、てんかん発作を発症する原因は、Scn1a 遺伝子の機能欠損であることを明確に示すと共にマウス系統間の遺伝的多型が、てんかん発作に対する耐性、又は感受性に影響していること強く示唆していた。また、SMEI 患者の家系においても同じ遺伝子変異を持つ患者が、異なる重篤度・症状を示す例が複数報告されており (Fujiwara *et al.* 2003; Gennaro *et al.* 2003; Nabbout *et al.* 2003)、SMEI の発症に関して修飾遺伝子の影響が小さくないことを推測させた。

申請者は、疾患の原因遺伝子と機能的に関連した遺伝子(群)を網羅的に明らかにして解析することは困難であるが、特定の表現型に注目すればモデル動物による交配実験と遺伝的多型マーカーを用いた連鎖解析により、修飾遺伝子の同定が可能であると考えた。てんかんモデルマウスと交配するマウス系統としては、高い頻度で遺伝子多型を持つ系統が好ましい。したがって、C57BL6/J との遺伝的距離が他の近交系マウスよりも遠い日本産亜種 *Mus musculus molossinus* に由来する近交系統である MSM/MS を選択した。

2. 研究の目的

多くの乳児重症ミオクロニーてんかん (SMEI) 患者では、電位依存性ナトリウムチャネル α サブユニット 1 型をコードする遺伝子 (SCN1A) に突然変異が見出される。しか

しながら、同一の *SCN1A* 変異を有する家系内における複数の患者の症状や重篤度が大きく異なることは、*SCN1A* 遺伝子の他にも機能的に関連した遺伝子が病態に影響することを示唆していた。そのような修飾遺伝子の同定は、てんかんの発症機序の理解と治療の標的になりうる点で有用である。本研究では、*SCN1A* 遺伝子を改変したてんかんモデルマウス (C57BL6/J 系統) を遺伝的背景の異なる日本産野生マウス系統 (MSM/Ms) と交配して解析し、てんかんの発症に影響する修飾遺伝子を探索した。

3. 研究の方法

乳児重症ミオクロニーてんかん患者でみられた *SCN1A* ナンセンス変異を C57BL6 系統に導入したてんかんマウスモデル (*Scn1a-KI*) に対して C57BL6 系統との遺伝的距離が遠く、異なる表現型を示す対立遺伝子が多い日本産野生マウス由来の MSM/Ms と X 染色体を MSM/Ms 由来の染色体で部分置換した C57BL6 系統 (B6-ChrXC^{MSM}, B6-ChrXT^{MSM}) を受容系統として交配した。遺伝的背景を置換した各世代の個体について、離乳後から生後 90 日までの生存率を集計した。生存率の有意差は、フィッシャーの正確確率検定によって検定した。また、生存期間の有意差については、スチューデントの t 検定を行った。

4. 研究成果

本研究では、てんかん発症における修飾遺伝子の影響をあきらかにする為に、上記の *Scn1a* 変異マウスを異なる遺伝的背景を持つ日本産野生マウス MSM/Ms♂ (以下 MSM) と戻し交配したところ、次のような結果が得られた。1) MSM の遺伝的背景が増加するにしたがって生存率は改善した。このことは、MSM の遺伝的背景に *Scn1a* 変異によるてんかん

の発症に対して抵抗性を持つ修飾遺伝子があることを示すと考えられた。2) しかしながら、F1 (遺伝的背景 B6J:MSM = 50%:50%) の場合だけ、雌のヘテロが有意に低い生存率を示した。F1 ヘテロ♀の生存率が B6J 系統のヘテロより有意に低いのに対し、F1 ヘテロ♂の生存率は B6J 系統のヘテロより高かったため、F1 ♀の個体において、てんかん原因遺伝子によって引き起される疾患が増悪したと推測した。F1 の雌雄における遺伝的な差は、性染色体だけ (エピジェネティックな効果を除いて) であるので、F1 ♀の高い死亡率を説明出来る仮定としては、MSM 由来の X 染色体にてんかん発症に高感受性となる対立遺伝子が存在することであると結論した。第 3 世代以降において親ヘテロマウスの雌雄を入れ替えた際には、生存率に対するエピジェネティックな効果は確認されなかった。MSM の X 染色体に存在する対立遺伝子を明らかにするために、B6J の特定の染色体だけを MSM に置換したコンソミック系統を導入して交配したところ、X 染色体のセントロメアから DXMit63 マーカーまでの領域に候補遺伝子が含まれることが示唆された。

本研究により MSM 系統を交配させることによって、SMEI モデルマウスである *Scn1a* 遺伝子の変異マウスに観察されるてんかんに関連した突然死に関係する 2 種類の修飾遺伝子の存在が示された。第 1 の修飾遺伝子は、突然死に対する感受性を高める遺伝子であり、X 染色体上のセントロメア側 50 cM の領域に位置すると考えられる。第 2 の修飾遺伝子は、突然死に抵抗性となる遺伝子で常染色体上に 1 つ以上存在し、第 1 の修飾遺伝子の表現型を相補すると考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

①山形哲司, X染色体には乳児重症ミオクロ
ニーてんかんの遺伝的修飾因子が存在する,
第44回日本てんかん学会(岡山, 2010年
10月14日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 哲司 (YAMAGATA TETSUSHI)
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: 00338766