

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 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：2011～2012
 課題番号：23791202
 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 neurodevelopmental disorders associated with mutations of voltage-gated sodium channel gene
 研究代表者
 萩原 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 $\alpha 2$ をコードする *SCN2A* 遺伝子は、乳児期発症で重度精神発達障害を伴うてんかんの責任遺伝子の一つである。本研究は、コンディショナル *SCN2A* 遺伝子マウスを作製し、解析した。前脳神経細胞特異的 *SCN2A* 遺伝子破壊は、脳内電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 2$ 発現量を3分の2に減少させ、周産期致死を引き起こした。けいれんは誘発しなかった。以上の結果は、前脳に発現する電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 2$ が生存に必須な分子であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Mutations of *SCN2A* gene encoding voltage-gated sodium channel $\alpha 2$, Nav1.2, have been associated with neurodevelopmental disorders. We here demonstrate that mice with selective *SCN2A* deletion in forebrain neurons died within postnatal day 2 and developed no apparent behavioral seizures. The results indicate that $\text{Na}_v1.2$ in forebrain neurons is essential to survival.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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：精神発達障害、てんかん、ナトリウムチャネル遺伝子、興奮性神経細胞、脳・神経、神経科学

1. 研究開始当初の背景

乳幼児期発症で精神発達障害を伴う治療抵抗性てんかんは、治療開発が強く求められている。近年、電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ をコードする *SCN1A*、*SCN2A*、*SCN1B* 遺伝子の変異が相次いで報告され、遺伝子変異情報に基づく発症機序解明による治療開発が期待されている。

最初の *SCN2A* 遺伝子変異は、菅原らによって報告された。菅原らは、全般性熱性けいれんプラスの家系にミスセンス変異を見出した。続いて、Berkovic らは、家族性良性乳

児新生児けいれんの家系に *SCN2A* 遺伝子のミスセンス変異を認めた。全般性熱性けいれんプラスや家族性良性乳児新生児けいれんは発作予後良好なてんかんで、*SCN2A* 遺伝子変異は家族性であった。

SCN2A 遺伝子変異は、精神発達障害を伴った難治てんかん症例にも認められている。神谷らは、孤発性難治局在性てんかん症例に de novo *SCN2A* 遺伝子変異を認めた。続いて、申請者らは、難治性點頭てんかん (West 症候群) で精神運動発達遅滞を併発した症例と非典型新生児てんかん性脳症症例、それぞれに

de novo *SCN2A* 遺伝子変異を認めた。これら de novo *SCN2A* 遺伝子変異は、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ の電気生理学特性を著しく変化させた。他方、上述の家族性良性乳児新生けいれんの *SCN2A* 遺伝子ミスセンス変異は、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 機能に微細な影響しか与えなかった。これら電気生理学的解析結果は、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ の劇的な機能変化が難治てんかん発症機序であることを示唆する。また、Shi らは、難治てんかんと重度精神発達障害を特徴とする Dravet 症候群（乳児重症ミオクロニーてんかん）症例に de novo *SCN2A* 遺伝子ミスセンス変異を報告している。

2. 研究の目的

本研究は、*SCN2A* 遺伝子変異がてんかんや精神発達遅滞を引き起こす発症機序解明を目的とし、病態モデルマウスを使った実験を計画した。

2000年、Planells-Cases らは、*SCN2A* 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。*SCN2A* 遺伝子ノックアウトマウスは、生後2日以内に全例が低酸素脳症で死亡した。*SCN2A* 遺伝子ノックアウトマウスにけいれんは、認められていない。申請者は、コンディショナル遺伝子破壊マウス作製技術を利用することで、週産期致死性を回避できると考えた。本研究は、前脳神経細胞特異的 *SCN2A* 遺伝子破壊マウスを作出し、これら変異マウスがてんかん病態マウスとして有用か検討した。

3. 研究の方法

- (1) Floxed *SCN2A* 遺伝子変異マウスを作製した。この floxed *SCN2A* 遺伝子変異マウスは、*SCN2A* 遺伝子 exon 2 の上流と下流に loxP 配列が挿入されており、Cre-recombinase の活性で exon 2 を欠失する。Floxed *SCN2A* 遺伝子変異マウスの脳内電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 発現は、ウエスタンプロット法で解析した。
- (2) Floxed *SCN2A* 遺伝子アリルが Cre-recombinase の活性でノックアウト *SCN2A* 遺伝子アリルに組み換えられることを確認するため、floxed *SCN2A* 遺伝子変異マウスを生殖細胞系列で Cre-recombinase を発現する EIIa-Cre マウスと交配した。exon 2 欠失の検出には、PCR 法を利用した。また、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 発現をウエスタンプロット法で解析した。
- (3) 前脳神経細胞特異的 *SCN2A* 遺伝子破壊を行うため、floxed *SCN2A* 遺伝子破壊マウス

と Cre マウスを交配させた。そして、得られた *SCN2A* 遺伝子ノックアウトマウスの表現型を観察した。また、floxed *SCN2A* 遺伝子アリルの exon 2 欠失を PCR 法で解析した。また、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 発現をウエスタンプロット法で解析した。さらに、免疫組織染色法で、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 脳内発現分布を解析した。

4. 研究成果

ホモ接合体 floxed *SCN2A* 遺伝子変異マウス (*Scn2a*^{flox/flox}) は、正常に出生した。生育や繁殖も正常であった。脳内電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 発現も正常であった。

次に、Floxed *SCN2A* 遺伝子変異マウスを EIIa-Cre マウスと交配し、全身性 *SCN2A* 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。全身性ホモ接合体 *SCN2A* 遺伝子ノックアウトマウスは、既報の *SCN2A* 遺伝子ノックアウトマウスと同様に、生後2日以内に全例が死亡した。PCR 法は、Cre-loxP を介した組み換えによる exon2 欠失を確認した。そして、ウエスタンプロット法は、exon2 欠失による電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 発現抑制を認めた。以上の結果は、floxed *SCN2A* 遺伝子変異マウスが Cre-loxP を介した *SCN2A* 遺伝子破壊に利用できることを示した。

そして、前脳神経細胞特異的 *SCN2A* 遺伝子破壊マウス (*Scn2a*^{flox/flox}; Cre) を作製した。前脳神経細胞特異的 *SCN2A* 遺伝子破壊マウスは、全身性 *SCN2A* 遺伝子ノックアウトマウスと同様に、全例が生後2日以内に死亡した(表)。けいれんは、認められなかった。半定量的ウエスタンプロット法は、前脳神経細胞特異的 *SCN2A* 遺伝子破壊マウスの電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 脳内発現量が、コントロールのおよそ3分の2に減少していることを見出した。そして、免疫組織染色法は、前脳の電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ 発現低下を認めた。本成果は、前脳に発現する電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ が生存に必須であることを示唆する。

表、*Scn2a*^{flox/flox}; Cre マウスの生存個体数

| | 遺伝子型 | | | |
|----------|-----------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------------|
| | <i>Scn2a</i> ^{flox/flox} | <i>Scn2a</i> ^{flox/+} | <i>Scn2a</i> ^{flox/flox} ; Cre | <i>Scn2a</i> ^{flox/+} ; Cre |
| 生後 0.5 日 | 8 | 9 | 8 | 9 |
| 生後 2.5 日 | 8 | 9 | 0 | 9 |

Scn2a^{flox/flox} マウスと *Scn2a*^{flox/+}; Cre マウスを交配し、産仔数をカウントした。

本研究は、*SCN2A* 遺伝子異常とけいれんとの関連を明らかにできなかったが、電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ が前脳神経細胞で発現する、生存に必須な分子であることを示唆した。今後、片 *SCN2A* アレルのみをコンディショナルに破壊したマウスを作製し、け

いれん誘発に対する感受性をテストする。

最近、*SCN2A* 遺伝子変異が自閉症や知的障害の疾患関連遺伝子との報告がなされた。本研究で作成したコンディショナル *SCN2A* 遺伝子マウスは、精神発達障害の発症基盤解明にも有用であると期待している。

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 5 件)

- ① *Ito S, *Ogiwara I, (*共筆頭著者) Yamada K, Miyamoto H, Hensch TK, Osawa M, Yamakawa K. Mouse with Nav1.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment. *Neurobiology of Disease*, 49: 29-40, 2013. 査読有
- ② *Ogiwara I, *Nakayama T, (*共筆頭著者) Yamagata T, Ohtani H, Mazaki M, Tsuchiya S, Inoue Y, Yamakawa K. A homozygous mutation of voltage-gated sodium channel β_1 gene *SCN1B* in a patient with Dravet syndrome. *Epilepsia*, 53(12): e200-203, 2012. 査読有
- ③ *Cao D, *Ohtani H, (*共筆頭著者) Ogiwara I, Ohtani S, Takahashi Y, Yamakawa K, Inoue Y. Efficacy of stiripentol in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia*, 53(7): 1140-1145, 2012. 査読有
- ④ Sugiura Y, Ogiwara I, Hoshi A, Yamakawa K, Ugawa Y. Different degrees of loss of function between GEFS+ and SMEI Na_v1.1 missense mutants at the same residue induced by rescuable folding defects. *Epilepsia*, 53(6): e111-e114, 2012. 査読有
- ⑤ Ogiwara I, Mazaki E, Inoue I, Yamakawa K. Analysis of pharmacological effects of 2-deoxy glucose in Scn1a mutant mice. *Annual Report of the Japan Epilepsy Research Foundation*. 22: 25-30, 2011. 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ogiwara I, Miyamoto H, Mazaki E, Tamamaki N, Hensch TK, Yamakawa K. Selective deletion of the *Scn1a* gene encoding voltage-gated sodium channel $\alpha 1$ in parvalbumin positive cells in mice triggers epileptic seizures. 第

46 回日本てんかん学会、平成 24 年 10 月 11 日、東京都千代田区

- ② 堀米ゆみ, 榛葉俊一, 飯塚真喜一, 荻原郁夫, 高橋幸利. 高濃度酸素持続吸入による発作時突然死の予防 - Dravet 症候群マウスモデルを用いた検討. 第 46 回日本てんかん学会、平成 24 年 10 月 11 日、東京都千代田区
- ③ Horigome Y, Iizuka M, Ogiwara I, Shinba T, Takahashi Y. Central and obstructive apnea and cardiac arrhythmia during seizures all play roles in sudden death in a Dravet syndrome mouse model. 10th European congress on epileptology. 平成 24 年 10 月 3 日、英国 London 市
- ④ Ogiwara I, Miyamoto H, Mazaki E, Tamamaki N, Hensch TK, Yamakawa K. Deletion of a voltage-gated sodium channel $\alpha 1$, Nav1.1, in parvalbumin-positive interneurons confers epileptic seizures in mice. 第 35 回日本神経科学大会、平成 24 年 9 月 21 日、愛知県名古屋市
- ⑤ 荻原郁夫, 中山東城, 山川和弘. 電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha 2$ (*Scn2a*) 遺伝子変異マウスに認められたけいれん感受性の亢進. 第 54 回日本小児神経学会総会、平成 24 年 5 月 18 日、北海道札幌市
- ⑥ Nakayama T, Ogiwara I, 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. 2012 American epilepsy society's annual meeting. 平成 23 年 12 月 3 日、米国 Baltimore 市
- ⑦ Ogiwara I, Ito S, Yamada K, Yamakawa K. Nav1.1-haploinsufficient mice, a model for Dravet syndrome, exhibit learning impairment and autistic-like behaviors. *Neuroscience 2011*、平成 23 年 11 月 13 日、米国 Washington 特別区
- ⑧ 山形哲司, 真崎恵美, 荻原郁夫, 井上有史, 山川和弘. てんかん患者に見出された電位依存性ナトリウムチャンネル $\beta 2$ (*SCN2B*) 遺伝子のミスセンス. 変異第 45 回日本てんかん学会、平成 23 年 10 月 6 日、新潟県新潟市
- ⑨ 荻原郁夫, 伊藤進, 山田一之, 山川和弘. Dravet 症候群モデルマウスに認められた学習障害ならびに自閉症様行動. 第 45 回日本てんかん学会、平成 23 年 10 月 7 日、新潟県新潟市
- ⑩ Ogiwara I, Mazaki E, Itohara S,

Yamakawa K. *Scn1a*-GFP BAC transgenic mouse lines showed predominant Nav1.1 expression in parvalbumin-positive interneurons in neocortex and hippocampus. 第34回日本神経科学大会、平成23年9月16日、神奈川県横浜市

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/r-world/research/results/2012/120927/index.html>

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

研究者番号：30373286

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし