

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460493

研究課題名(和文) 新規単遺伝子変異マウスモデルを用いた内側型側頭葉てんかんの病態解析

研究課題名(英文) Investigation of pathogenesis of mesial temporal epilepsy using monogenic mouse model

研究代表者

浅井 真人 (Asai, Masato)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：70543536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんとは意識消失や意図しない体のけいれんする通常短時間の発作が繰り返しおこる病気である。脳内の発作焦点にある一部の神経細胞が突然異常放電することで発作はおこることが分かっているがこの異常放電の成立条件について何も知られていない。海馬を焦点とする側頭葉てんかんは成人で最多のてんかん原因である。我々はGirdin遺伝子を破壊して、電撃や薬剤等の誘発を全く加えず2年近い生涯必ず全般化発作をおこし続ける側頭葉てんかんマウスを開発し特許化した。同遺伝子が破壊されたヒトも必ず重度のてんかんをおこすことも発見した。この遺伝子の働きから異常放電成立条件を考察し普遍的なてんかんを説明する新モデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：Epilepsy is a chronic disorder characterized by recurrent seizures (by WHO's definition). The seizures are caused by sudden, usually brief, excessive electrical discharges in a group of neurons. However, the forming conditions of excessive electrical discharges are completely unknown. Mesial-temporal lobe epilepsy (MTLE), which is originated from hippocampus, is the most common form of adult epilepsy. We developed and patented monogenic MTLE mouse by ablating Girdin gene, which keeps exhibiting generalized tonic-clonic seizures and lower-level seizures for life (approximately two years) without any electrical- nor pharmacological induction. We also identified human patients in a consanguineous family with early onset epileptic seizures, caused by loss-of-function mutation in human Girdin gene (BRAIN 2016). By inferring forming conditions of excessive electrical discharges from the putative functions of Girdin protein, we proposed a new model to explain universal forms of epilepsy.

研究分野：神経内分泌

キーワード：側頭葉てんかん 海馬硬化 動物モデル ノックアウトマウス 全般化発作 感覚辺縁系過剰結合

1. 研究開始当初の背景

側頭葉てんかん(内側側頭葉てんかん)は、海馬を中心とする辺縁系に焦点があるてんかんで成人の難治性てんかんの大半を占める。側頭葉てんかんには精神運動発作(意識減損発作と自動症)と呼ばれる半覚醒状態でおこる発作のほか全般化発作(ひきつけ)がおこりしばしば再発する。側頭葉てんかんのうち特に重症のものは内服治療では根治せず侵襲の大きな脳外科手術が必要になる。てんかんの基本原理の理解そして疾患の根本的治療開発には世界的要請がある。

2. 研究の目的

当教室の持つ *Girdin* ノックアウトマウスの表現型(浸透率 100%のてんかん、吻側移動経路幅広化を伴う嗅球低形成、歯状回分散、海馬硬化)から我々は *Girdin* が難治性てんかんの代表である内側側頭葉てんかん(mesial-temporal lobe epilepsy; MTLE)の世界で初めて同定された原因遺伝子であり *Girdin* ノックアウトマウスが完全な MTLE のモデルマウスであることを予想する。ヒト MTLE 患者での *Girdin* 遺伝子変異探索をするとともに *Girdin* ノックアウトマウスが MTLE の発症悪化機構や治療標的を探索することが可能な系として確立しヒト MTLE の新規治療法を開拓することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) てんかん患者の *Girdin* 遺伝子変異探索
 - ① 理化学研究所との共同研究
 - ② ケンブリッジ大学との共同研究
- (2) *Girdin* 分子の *in vitro* の研究
 - リン酸化状態特異的抗体による活性化 *Girdin* 局在の研究
- (3) *Girdin* KO マウスを用いた研究
 - ① てんかんを長期ビデオ観察
 - ② マウスの脳波解析
 - ③ 海馬硬化組織の組織学的観察
 - ④ Cre/LoxP による責任 lineage 探索
 - ⑤ 急性スライス脳による電気生理実験
 - ⑥ 特許化と事業化

4. 研究成果

(1) てんかん患者の *Girdin* 遺伝子変異探索
 ① 理化学研究所との共同研究。
 2013 年から 2014 年にかけて理化学研究所・脳科学総合研究センター・神経遺伝研究チーム山川和弘シニアチームリーダーと鈴木俊光研究員との共同で、静岡てんかんセンターで得られた側頭葉てんかん(MTLE)患者 92 症例とてんかんを持たない日本人コントロール 313 症例のゲノム検体のゲノム解析を illumina 社の TruSeq Custom Amplicon (TSCA) v1.5 kit (FC-130-1001)を用いて行った。その結果、疾患特異的な変異一つを同定した。この変異は 313 人の日本人コントロールからは同定されなかった。しかしタンパク機能試験がまだ存在せず、

変異症例数も 1 人に止まったためこの時点では疾患との因果関係を確定することができなかった。

② ケンブリッジ大学との共同研究。

2014 年から 2016 年にかけてイギリス Cambridge Institute of Medical Research, Department of Medical Genetics の Geoff Woods 教授と Michael S. Nahorski 研究員とイギリスで発見されたヒト *Girdin* 遺伝子(2p16.2)のホモ接合型 2313delT という変異をもつてんかん患者を複数含む血族結婚 1 家系を共同研究した。この家系ではホモ接合型である 3 人全員が出生早期発症のてんかん、滑脳症、脳梁欠損を示したが、ホモ接合型以外の核型では誰も発症しないことからこの遺伝子変異と疾患の因果関係と劣性遺伝形式が確定され、2016 年医学誌 BRAIN に掲載された(図 1)。

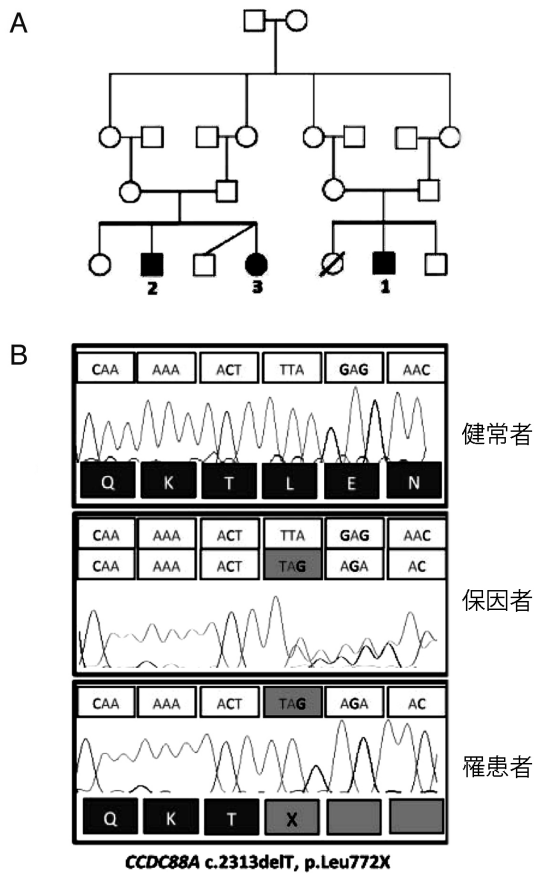


図 1 ヒト *Girdin* 遺伝子ホモ接合型喪失患者の同定。
 A. 血族結婚の家系図。黒塗りが患児、1 が発端者。
 B. ホモ接合型 2313delT がナンセンス変異を生じる。
 C. 頭部 MRI T1 強調画像。多小脳回、滑脳症を示す。
 D. 患児の特異な顔貌。狭い前額と小頭症が見られる。
 (Nahorski MS, Asai M 2016 Brain より抜粋)

(2) Girdin 分子の in vitro の研究

2011年から2015年にかけて大学院生の大森健治先生とGirdin特異的リン酸化状態特異的抗体による研究を行った。4つの想定リン酸化部位の部位特異的リン酸化状態特異的抗体とヒトGirdinのリン酸化部位変異体を作成し、EGF受容体と共に強制発現したHEK293FT細胞をEGFで刺激することにより抗体の検定を行った。この4つの抗体のうち1798位のチロシンリン酸化はEGF受容体の活性化に反応して数分でおこること、抗体は免疫染色にも使用可能であることが分かった。さらに1798位でリン酸化されたGirdinは、マウス海馬歯状回では苔状線維起始部と思われる部位に、培養神経細胞では先端突起細胞質内に小胞状に存在することを免疫染色で確認し、生理的にも1798位チロシンでGirdinのリン酸化状態が存在することを突き止め2015年速報誌BBRCに掲載された(図2)。

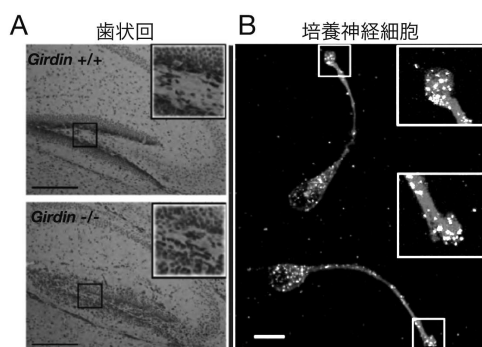


図2 Girdin1798位チロシンリン酸化(pY1798)の局在
pY1798-Girdinは細胞内キナーゼによる活性化体である。
A. pY1798特異抗体によるマウス脳の免疫染色で野生型(上)の歯状回苔状線維起始部にpY1798シグナルが見える。
B. pY1798特異抗体による培養神経細胞の免疫染色で先端突起に小胞状のpY1798シグナルが見える。
(Omori K, Asai M BBRC 2015より抜粋)

(3) Girdin KO マウスを使った成果

以降の成果は2016年4月現在進行中で未発表でもあるため概要を記すに留める。

① てんかんを長期ビデオ観察

Girdin KO マウスが2年近い生涯全般化発作を起こし続けることを発見した。発作間期にも側頭葉てんかん患者で見られる感覚辺縁系過剰結合を示す行動異常が見られた。

② マウスの脳波解析

Girdin KOは海馬直上電極に最強点をもつ高振幅高周波発作波を示すことを発見した。

③ 海馬硬化組織の組織学的観察

両側海馬硬化と歯状回分散は生後2週過ぎから明瞭になり、その後海馬全領域に波及することを発見した。

④ Cre/LoxPによる責任 lineage 探索

Nestin-CreとGirdin floxによるNestin-Creリニエージ特異的Girdin KOマウスはglobal KOと全く変わらないてんかん表現型を表すことを発見した。

⑤ 急性スライス脳による電気生理学実験
現在名古屋大学大学院医学系研究科メカノバイオロジーラボと共同で行っている。

⑥ 特許化と事業化

Girdin KO マウスは従来のモデルとは異なり、薬剤や電撃による誘発をすることなくすべてのホモ接合型が浸透率100%で側頭葉てんかん表現型(海馬起点のてんかん、海馬硬化、海馬外損傷が無い)を呈する。さらに適切な飼育条件のもとでは2年程度の長寿命をもち、また全個体が生涯、ほぼ毎日頻回に全般化発作を起こし続ける、個体によるてんかん頻度や海馬硬化程度のばらつきが無く均質であるという特徴があるため、新規薬剤や新規治療法を簡便に試すことができると考え特許化した。2015年6月26日国内で特許が査定された。2015年10月13日海外特許も出願している。

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13件)

1. Identification of Mefflin as a Potential Marker for Mesenchymal Stromal Cells.

Maeda K, Enomoto A, Hara A, Asai N, Kobayashi T, Horinouchi A, Maruyama S, Ishikawa Y, Nishiyama T, Kiyoi H, Kato T, Ando K, Weng L, Mii S, Asai M, Mizutani Y, Watanabe O, Hirooka Y, Goto H, Takahashi M. Sci Rep. 2016 Feb

29;6:22288. doi: 10.1038/srep22288. 査読有

2. CCDC88A mutations cause PEHO-like syndrome in humans and mouse.

Nahorski MS, Asai M, Wakeling E, Parker A, Asai N, Canham N, Holder SE, Chen YC, Dyer J, Brady AF, Takahashi M, Woods CG. Brain. 2016 Apr;139(Pt 4):1036-44. doi: 10.1093/brain/aww014. 査読有

3. Role for Daple in non-canonical Wnt signaling during gastric cancer invasion and metastasis.

Ara H, Takagishi M, Enomoto A, Asai M, Ushida K, Asai N, Shimoyama Y, Kaibuchi K, Kodera Y, Takahashi M. Cancer Sci. 2016 Feb;107(2):133-9. doi: 10.1111/cas.12848.

- 査読有
4. Maternal molecular hydrogen administration on lipopolysaccharide-induced mouse fetal brain injury. Nakano T, Kotani T, Mano Y, Tsuda H, Imai K, Ushida T, Li H, Miki R, Sumigama S, Sato Y, Iwase A, Hirakawa A, Asai M, Toyokuni S, Kikkawa F. *J Clin Biochem Nutr.* 2015 Nov;57(3):178-82. doi: 10.3164/jcbn.15-90. 査読有
 5. Potential involvement of kinesin-1 in the regulation of subcellular localization of Girdin. Muramatsu A, Enomoto A, Kato T, Weng L, Kuroda K, Asai N, Asai M, Mii S, Takahashi M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Aug 7;463(4):999-1005. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.049. 査読有
 6. Girdin is phosphorylated on tyrosine 1798 when associated with structures required for migration. Omori K, Asai M, Kuga D, Ushida K, Izuchi T, Mii S, Enomoto A, Asai N, Nagino M, Takahashi M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar 20;458(4):934-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.065. 査読有
 7. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. Nakai T, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Asai N, Enomoto A, Asai M, Yamada S, Saifullah AB, Sokabe M, Takahashi M, Yamada K. *J Neurosci.* 2014 Nov 5;34(45):14995-5008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2228-14.2014. 査読有
 8. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. Weng L, Enomoto A, Miyoshi H, Takahashi K, Asai N, Morone N, Jiang P, An J, Kato T, Kuroda K, Watanabe T, Asai M, Ishida-Takagishi M, Murakumo Y, Nakashima H, Kaibuchi K, Takahashi M. *EMBO J.* 2014 Sep 17;33(18):2098-112. doi: 10.15252/embj.201488289. 査読有
 9. TRIM27/MRTF-B-dependent integrin $\beta 1$ expression defines leading cells in cancer cell collectives. Kato T, Enomoto A, Watanabe T, Haga H, Ishida S, Kondo Y, Furukawa K, Urano T, Mii S, Weng L, Ishida-Takagishi M, Asai M, Asai N, Kaibuchi K, Murakumo Y, Takahashi M. *Cell Rep.* 2014 May 22;7(4):1156-67. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.068. 査読有
 10. Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in ovarian clear cell carcinoma cells. Niimi K, Murakumo Y, Watanabe N, Kato T, Mii S, Enomoto A, Asai M, Asai N, Yamamoto E, Kajiyama H, Shibata K, Kikkawa F, Takahashi M. *Cancer Sci.* 2014 May;105(5):545-52. doi: 10.1111/cas.12390. 査読有
 11. Detection of a soluble form of CD109 in serum of CD109 transgenic and tumor xenografted mice. Sakakura H, Murakumo Y, Mii S, Hagiwara S, Kato T, Asai M, Hoshino A, Yamamoto N, Sobue S, Ichihara M, Ueda M, Takahashi M. *PLoS One.* 2014 Jan 6;9(1):e83385. doi: 10.1371/journal.pone.0083385. 査読有
 12. The REV7 subunit of DNA polymerase ζ is essential for primordial germ cell maintenance in the mouse. Watanabe N, Mii S, Asai N, Asai M, Niimi K, Ushida K, Kato T, Enomoto A, Ishii H, Takahashi M, Murakumo Y. *J Biol Chem.* 2013 Apr 12;288(15):10459-71. doi: 10.1074/jbc.M112.421966. 査読有
 13. Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity. Asai M,

Ramachandrappa S, Joachim M, Shen Y,
Zhang R, Nuthalapati N, Ramanathan V,
Strochlic DE, Ferket P, Linhart K, Ho C,
Novoselova TV, Garg S, Ridderstråle M,
Marcus C, Hirschhorn JN, Keogh JM,
O'Rahilly S, Chan LF, Clark AJ, Farooqi IS,
Majzoub JA. Science. 2013 Jul
19;341(6143):275-8. doi:
10.1126/science.1233000. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 浅井真人 創薬を目的とした高品質の側頭葉てんかんマウスモデル 中部地区医療バイオ系シーズ発表会 2016年2月4日 吹上ホール 愛知県名古屋市
- ② 浅井真人 メラノコルチン2受容体付属タンパク(MRAP2)の機能喪失は哺乳類の肥満と関連する 日本小児内分泌学会 2015年10月8日 タワーホール 船堀 東京都江戸川区
- ③ 浅井真人 てんかんと関与も指摘されている遺伝子Xをノックアウトした内側側頭葉てんかんモデルマウス DSANJ 疾患別商談会 2015年8月28日 大阪産業創造館 大阪府大阪市中央区
- ④ 陸大輔、浅井真人 Unmasked identicalness between tuft cells and apoptotic absorptive cells 日本病理学会総会 2015年4月30日 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市
- ⑤ 浅井真人 Mrap2 遺伝子変異と肥満 日本神経内分泌学会 2014年10月31日 都道府県会館 東京都千代田区
- ⑥ 大森健治、浅井真人 Phosphorylation of Girdin in colon cancer 日本癌学会 2013年10月3日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市
- ⑦ 浅井真人 リン酸化 Girdin 特異的抗体の作成とマウス脳における組織学的検討 日本病理学会総会 2013年6月6日 ロイトン札幌、北海道札幌市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)
名称：ノックアウトマウス、内側側頭葉てんかんを抑制する物質のスクリーニング方法、及び内側側頭葉てんかんを抑制する手法の選択方法
発明者：浅井真人、高橋雅英、浅井直也、榎本篤、内山孝蔵
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：PCT/JP2015/78891

出願年月日：2015年10月13日
国内外の別： 国外

○取得状況 (計1件)
名称：ノックアウトマウス、内側側頭葉てんかんを抑制する物質のスクリーニング方法、及び内側側頭葉てんかんを抑制する手法の選択方法
発明者：浅井真人、高橋雅英、浅井直也、榎本篤、内山孝蔵
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特許 5765720 号
出願年月日：2014年10月14日
取得年月日：2015年6月26日
国内外の別： 国内

[その他]

ホームページ等
名古屋大学腫瘍病理学分野
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅井 真人 (ASAI, MASATO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：70543536

(2)研究分担者

榎本 篤 (ENOMOTO, ATSUSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20432255
浅井 直也 (ASAI, NAOYA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80273233

(3)連携研究者 なし