

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05354

研究課題名(和文)新規モデルラットを用いたウエスト症候群の発症機序の解明

研究課題名(英文) Study of the pathogenesis of west syndrome using a new model rat

研究代表者

大内田 守 (Ouchida, Mamoru)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80213635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは点突然変異誘発剤処理したラットから生まれた系統群の表現型解析研究を続けた結果、発達性およびてんかん性脳症に酷似した症状を示す疾患ラットを見出した。当疾患ラットはてんかん発作が4-6週齢の限られた期間にのみ出現するという特徴を持つ。当疾患ラットで見つかった原因遺伝子は、酸化還元反応により酸化ストレスを制御する働きを持つ遺伝子のミスセンス変異である。本研究の結果、ラットの発達過程において脳の局所領域で抗酸化機能の需要が特に高まる時期があり、当疾患ラットは抗酸化活性が低下しているため発生する酸化ストレスを適切に処理できず細胞の障害がおき、てんかん発作につながるのではないかと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスを制御する働きを持つ遺伝子の変異により、発達性およびてんかん性脳症に酷似した症状が自然に発症するという現象は世界初の発見であり、非常に革新的である。当疾患ラットの発症メカニズム解明は他に類を見ない研究であり、難病疾患モデル動物としても研究発展が見込まれ、国内外への大きな波及効果が期待される。当該モデル動物を用いた発達性およびてんかん性脳症の治療法開発は、難治てんかんのみならず他の酸化ストレス関連疾患の治療技術開発にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：On the study of mutant rats established by ENU mutagenesis, we found a lineage of diseased rats with developmental and epileptic encephalopathy-like epilepsy. Epileptic seizures occurred during a limited period of 4 to 6 weeks of age. The brain lesions were recovered spontaneously. The causative gene found in the rats is a missense mutation of a gene that regulates oxidative stress by redox reaction. Our results suggested that there may be a critical period when the oxidative stress becomes particularly high in the local region of the brain during the developmental process of the brain. Mutant rats may have reduced ability to properly suppress the oxidative stress due to its low function of antioxidant activity, resulting in damage of the brain.

研究分野：分子生物学

キーワード：発達性およびてんかん性脳症 疾患モデルラット 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでウエスト症候群、ドラベ症候群等の難治性てんかんの原因遺伝子の変異を見出し、その変異型遺伝子の機能解析、疾患モデルラットの作成・病態解析、治療法の開発を行っている。ウエスト症候群は乳児期早期から発症する難治性てんかん、指定難病のひとつである。生後3ヵ月～1歳未満に好発し、精神運動発達の退行、シリーズ形成性てんかん性スパズム、脳波上ヒプスアリズミアを三主徴とする。予後は極めて不良で、重度精神遅滞・四肢麻痺等を合併することが多い。てんかん発作は難治に経過し、脳の発達に伴って病型が変化することから発達性およびてんかん性脳症と呼ばれる。

近年、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析により、ウエスト症候群の原因遺伝子として *ARX*, *STXBP1*, *CDKL5*, *SPTAN1* 等が一部の症例で報告された。それに伴い世界各国のてんかん研究施設でモデル動物作製が試みられているが、遺伝子改変マウス・ラットではウエスト症候群の症状が出ない、もしくは、胎生致死であり、現在のところ、研究者の努力は実を結んでいない。発達性およびてんかん性脳症の病態は未だ解明されておらず、抗てんかん薬による治療効果は限定的である。病態の解明および新規治療法の開発のためにはヒトの症状、特に難治化の原因となる年齢依存性の変容を示すモデル動物の確立が欠かせない。

そこで申請者らは、ラットを突然変異誘発剤処理してランダム変異を入れ、生まれた系列の表現型を解析する研究を開始した。その結果、5週齢から疾走発作とスパズム様発作が出現し、7週齢以降には発作が消失する、発達性およびてんかん性脳症に似た症状を引き起こすラットを発見した。

当該疾患ラットは突然変異誘発剤を投与する手法で作製されているため、てんかん発作を起こす個体を野生型との戻し交配を何度も繰り返して(無関係の変異遺伝子を排除した後)、次世代シーケンス解析により、原因が1遺伝子のミスセンス変異であることをつきとめた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、本疾患ラットを用いて脳の発達に伴い変容する難治性てんかんの分子病態を解明すること、我々が見出した遺伝子がヒトのウエスト症候群・レノックス・ガストー症候群発症に関わっているか検証することである。

3. 研究の方法

(1) 長時間ビデオ行動観察

生後3週齢から9週齢までのヘテロラット(n=9)、ホモラット(n=6)をホームケージ内の自由行動下で毎週24時間のビデオ観察を行った。

(2) ビデオ脳波解析

生後4週齢で全身麻酔下にて両側の前頭部及び後頭部に慢性ネジ電極を埋込み、リファレンスは小脳領域に埋め込んだ。1週間後から脳波計Neurofax EEG-1200 (Nihon Koden, Japan)を用いて、ビデオ脳波モニタリングを行った。

(3) 変異蛋白の機能解析

本疾患ラットで見つかった変異型遺伝子と正常型遺伝子の cDNA を作成後、発現ベクターを作製した。遺伝子導入試薬を用いてヒト胎児腎細胞 HEK293 に発現ベクターを導入し、48 時間後に細胞から蛋白抽出液を調整した。抗 FLAG M2 affinity agarose beads(A2220; Sigma)を用いて発現した蛋白を精製した。精製蛋白の濃度を BCA Protein Assay kit (Pierce)を用いて測定し FLAG 抗体 (F3165; Sigma)を用いたウエスタンブロットで蛋白量を確認した。当該タンパク質の活性測定キットを用いて活性測定を行った。

(4) 各臓器における当該遺伝子の発現解析

生後1ヶ月と4ヶ月の疾患ラットと WT ラットから脳、心臓、腎臓、肝臓を摘出し、蛋白を抽出後、当該蛋白に対する抗体と GAPDH 抗体 (#2118; CST) でウエスタンブロットを行なった。

(5) 病理組織解析

ラット脳を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、組織切片を作成し HE(ヘマトキシリン・エオジン)染色、KB 染色(Klüver-Barrera 染色)、Bodian 染色にて病理組織解析を行った。

(6) 免疫組織解析

ラット脳を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、組織切片を作成した。脱パラフィン処理後、8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)抗体、および、4-Hydroxynonenal (4-HNE)抗体、Ki67 抗体、NeuN 抗体(ab177486; abcam)、Olig2 抗体 (ab109186; abcam)、GFAP 抗体 (ab7260; abcam)、Iba1 抗体(ab178847; abcam)を用いて脳組織の免疫染色を行った。

(7) アポトーシス解析

WT とホモラットの新生児より作成した線維芽細胞の初代培養細胞を 0.3mM 過酸化水素で3時間処理した後、In Situ Cell Death Detection Kit (Sigma)にてアポトーシス解析を行った。

(8) 電子顕微鏡解析

脳組織を固定後、電子顕微鏡用切片を作成し透過型電子顕微鏡 (日立 H-7100S)にて組織・細胞内器官の形態変化を観察した。

(9) 遺伝子変異解析

当大学医学部小児神経科との共同研究で小児難治性てんかんの患者および両親・健康人の血液を採取し、DNA を抽出した。当該遺伝子の各エキソンを挟み込むプライマーを作成し、ABI3100 蛍光シーケンサーにより当該遺伝子の変異検索を行った。

4. 研究成果

(1) 長時間ビデオ行動観察

生後3週齢から9週齢までのヘテロラット、および、ホモラットを用いて、毎週24時間のビデオ観察を行った。てんかん発作は4週齢から6週齢まで観察されたが、5週齢がもっとも頻発した(図1)。6週齢以降は発作が減少し、7週齢以降は発作が捕捉されなかった。1匹が発作をおこすと別個体のてんかん発作が誘発される傾向があった。また、発作は明期で入眠中に発症することが多かった。

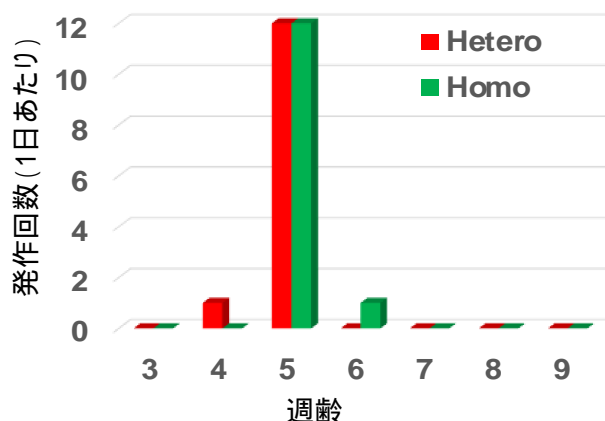


図1. 長時間ビデオ行動観察結果

(2) ビデオ脳波解析

そこで生後5週齢に集中して変異ラットのビデオ脳波解析を行った。いくつかの自然発症てんかん発作が記録された。

(3) 変異蛋白の機能解析

疾患ラットで見つかった変異型遺伝子と正常型遺伝子のcDNAから発現させた蛋白を精製し、当該蛋白活性を測定するキットを用いて活性測定を行ったところ、変異型は正常型に比べて活性が50-30%程度へ低下していた。ドミナントネガティブ効果は確認されなかった。

(4) 各臓器における当該遺伝子の発現解析

生後1ヶ月と4ヶ月の疾患ラットとWTラットから脳、心臓、腎臓、肝臓を摘出し、蛋白を抽出後、当該蛋白に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行なったところ、疾患ラットにおける当該蛋白の発現はWTラットと比べて大きな変動は見られなかった。

(5) 病理組織解析

次にラット脳の組織切片を作成後、HE染色にて病理組織解析を行った。5週齢ヘテロ、および、ホモラットの脳の一部において、組織異常を認めた。同様に生後3週齢から11週齢までのラット脳の病理組織解析を行った。その結果、3週齢以降の脳の一部において組織異常が認められたが、9週齢以降で病変はほぼ解消していた。

(6) 免疫組織解析

DNA 酸化損傷マーカーである 8-OHdG を認識する抗体、および、脂質酸化損傷マーカーである 4-HNE を認識する抗体で、5 週齢の WT、ヘテロ、ホモラットの脳の DNA と脂肪の酸化損傷を調べた。ヘテロ、ホモの脳が 8-OHdG 抗体、4-HNE 抗体で強く染まっており、ヘテロとホモの脳は酸化ストレスによる損傷を受けていることが示された。

(7) アポトーシス解析

WT とホモラットの線維芽細胞(初代培養細胞)を用いてアポトーシスを解析した。過酸化水素処理後に細胞を解析すると、ホモラットの細胞はアポトーシスを起こしやすいことが示された。ホモラットの細胞は未処理の状態でもアポトーシスを起こしやすい傾向が見られた。

(8) 電子顕微鏡解析

5 週齢変異ラットの脳組織の電子顕微鏡用切片を作成後、電子顕微鏡にて組織・細胞内器官の形態変化を観察した。その結果、ヘテロ、ホモラットでは脳の一部で細胞の形態異常が確認された。

(9) 免疫組織解析

NeuN 抗体、Olig2 抗体、GFAP 抗体、Iba1 抗体を用いて、5 週齢変異ラットの脳組織のウエスタンブロットと免疫染色解析を行い、各細胞の変動を解析した。その結果、ヘテロ、ホモラットでは脳の一部で細胞群の数的異常が観察された。その変化はホモラットで顕著であった。次に、発作を起こさない時期である 9 週齢の野生型、および、ヘテロ、ホモラットの脳組織を用いて同様の免疫染色解析を行った。その結果、9 週齢のヘテロ、ホモラットでは細胞群の数的異常が解消傾向にあることが明らかになった。

(10) ヒト患者における遺伝子変異解析

ウエスト症候群およびレノックス・ガスター症候群患者に当該遺伝子の変異を持つ人が存在するかを調べるために、ヒト患者 DNA の遺伝子変異解析を行った。これまでのところ、アミノ酸置換を伴う DNA 変異は検出されなかったが、イントロンに 5 個の SNP を見出した。

当疾患ラットはてんかん発作が 4-6 週齢の限られた期間にのみ出現するという特徴を持つ。当疾患ラットで見つかった原因遺伝子は、酸化還元反応により酸化ストレスを制御する働きを持つ遺伝子のミスセンス変異である。ラットの発達過程において、脳の局所領域で抗酸化機能の需要が特に高まる時期があり、当疾患ラットは抗酸化活性が低下しているため発生する酸化ストレスを適切に処理できず細胞の障害がおき、てんかん発作につながるのではないかと推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大内田 守, 真下 知二, 大守 伊織	4. 巻 30
2. 論文標題 年齢依存性てんかん性脳症の分子病態解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 公益財団法人 てんかん治療研究振興財団 研究年報	6. 最初と最後の頁 37-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大守伊織、真下知士、大内田守、山下享子、豊國伸哉
2. 発表標題 新規Txn1遺伝子ミスセンス変異による多臓器障害
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会 第18回日本NO学会 合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iori OHMORI, Tomoji MASHIMO, Mamoru OUCHIDA, Kyoko YAMASHITA, Shinya TOYOKUNI
2. 発表標題 A Txn1 missense mutation damages multiple organs.
3. 学会等名 第41回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤(内藤)有香, 真下知士, 大内田守, 豊國 伸哉, 大守伊織
2. 発表標題 Txn1における新規ミスセンス変異がひきおこす多臓器障害の解析
3. 学会等名 平成30年度文部科学省 新学術領域研究 先端モデル動物プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大守伊織, 真下知士, 大内田守, 加藤(内藤)有香, 豊國伸哉
2. 発表標題 年齢依存性てんかん脳症を示すTxn1遺伝子変異ラットの病態解析
3. 学会等名 平成30年度文部科学省 新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大守伊織, 真下知士, 大内田守, 山下享子, 豊國伸哉
2. 発表標題 遺伝子変異ラットの表現型解析
3. 学会等名 平成29年度文部科学省 新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内田 守, 真下 知二, 大守 伊織
2. 発表標題 年齢依存性てんかん性脳症の分子病態解析
3. 学会等名 公益財団法人 てんかん治療研究振興財団第30回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大守伊織
2. 発表標題 Txn1遺伝子ミスセンス変異ラットにおける脳-腎-心関連解析
3. 学会等名 第12回ラットリソースリサーチ研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iori Ohmori, Tomoji Mashimo, Mamoru Ouchida, Shinya Toyokuni
2. 発表標題 A novel model rat of chronic kidney disease generated by ENU mutagenesis
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大守伊織, 真下知士, 大内田守, 内藤有香, 今井宏彦, 豊國伸哉
2. 発表標題 Txn1遺伝子変異ラットのでんかんの表現型
3. 学会等名 日本てんかん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大守伊織, 大内田守, 豊國伸哉, 真下知士
2. 発表標題 チオレドキシシン機能低下は年齢依存のかつ臓器特異的細胞障害を惹起する
3. 学会等名 2019年度文部科学省 新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 遺伝子改変非ヒトモデル動物	発明者 大守伊織、大内田守、真下知二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/045008	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 遺伝子改変非ヒトモデル動物	発明者 大守伊織、真下知士、大内田守	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-238612	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 抗てんかん薬	発明者 大内田 守、大守 伊織	権利者 大守 伊織
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6587299号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	大守 伊織 (OHMORI Iori) (20403488)	岡山大学・教育学研究科・教授 (15301)	
研究協力者	真下 知二 (MASHIMO Tomoji)		
研究協力者	豊國 伸哉 (TOYOKUNI Shinya)		