

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08629

研究課題名(和文) ナトリウムポンプ 2サブユニット遺伝子の生体機能と片頭痛の病態

研究課題名(英文) Physiological role of Na-pump alpha2 subunit gene and pathophysiology of hemiplegic migraine

研究代表者

川上 潔 (Kawakami, Kiyoshi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10161283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1 家族性片麻痺性偏頭痛で同定されたATP1A2点突然変異E700Kを導入したマウスでは、CSDの拡散速度が大きく、電位低下からの回復に長い時間がかかった。CSD誘起の閾値は、メスマウスにおいて低かった。

2 生体内でニューロン及びアストロサイトのCa<sup>2+</sup>濃度変化を解析した。(1) CSD誘導後、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を示したアストロサイト数は、Atp1a2欠損マウスで有意に多かった。(2) 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化パターンは、Atp1a2欠損マウスにおいてアストロサイト細胞内領域間で同調性が低かった。3 炎症性マーカーとして知られるIba-1の発現が、Atp1a2欠損マウスで発現が亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらにより、ヒト患者で見つかる変異を導入したマウスが、CSDの属性に変化をきたしており、偏頭痛のモデルとして有効であることを明らかにできた。これらの結果により、Atp1a2欠損マウスのアストロサイトでの機能的な変化が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. The mice harbouring mutation of E700K of Atp1a2, which has been identified as causative mutation of familial hemiplegic migraine, showed fast spreading of CSD and slow recovery from the potential drop. The threshold of CSD induction was lower in the female mutant mice.

2. We analyzed the change of Ca<sup>2+</sup> concentration of neuron and astrocyte in vivo. (1) The number of astrocytes that showed the increment of Ca<sup>2+</sup> concentration was higher in the Atp1a2 deficient mice. (2) The synchrony of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration variation was significantly lower in the astrocytes of Atp1a2 deficient mice.

3. The expression of Iba-1, which is known as a marker of inflammation was augmented in the Atp1a2 deficient mice.

研究分野：病態医化学

キーワード：家族性偏頭痛 ナトリウムポンプ カルシウムイメージング 大脳皮質拡延性抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

片頭痛は我が国における有病率が 8.4%と多くの患者が存在し、就労年齢層の患者割合が高いことから社会経済的損失は甚大である。にもかかわらず、片頭痛の根本原因や発症機序については未解明の点が多く、有効な根本治療法も未だ見つかっていない。従って、片頭痛の病態機序を解明し、治療の標的分子を定め有効な根本治療法を開発することは、多くの患者の希望であり、社会経済的側面からもその要請は強い。

片頭痛は種々の誘発因子によって起こされ、頭痛に加えて、悪寒、光過敏、音過敏、匂い過敏など様々な症状を呈する。遺伝的な要因で発症する片頭痛は病態解明や治療法の標的が絞り易いので、本研究では、原因となる遺伝子変異が同定された家族性片麻痺性片頭痛の病態解明に焦点を当てる。家族性片麻痺性片頭痛には I 型から III 型が存在し、各々カルシウムチャンネル、ナトリウムポンプおよびナトリウムチャンネル遺伝子の変異が原因として同定されている。これら遺伝子がコードするタンパク質が担う  $\text{Na}^+$  および  $\text{Ca}^{2+}$  の輸送は神経興奮や神経伝達の基盤であり、遺伝子変異がもたらす神経興奮異常や神経伝達の異常が頭痛の発症機序に深くかかわることが強く示唆される。

ナトリウムポンプ サブユニット遺伝子は 4 種存在し、そのうち 3 つ ( 1、 2、 3 ) が中枢神経系で発現し、 2 はグリア細胞に特異的とされる。グリア細胞は神経伝達物質の再吸収や、ニューロンへの情報伝達を介して、神経興奮や神経伝達効率に影響を与えることが知られている。我々は、ナトリウムポンプ 2 サブユニット遺伝子欠損ヘテロマウスが、恐怖不安行動の亢進や明期における過食を示すこと、ホモマウスの扁桃体では神経の異常興奮が起きること、グルタミン酸の神経終末への再吸収が低下すること、呼吸リズム形成ニューロン群の一部が抑制性から興奮性へと変化することを以前報告した (Ikeda et al. 2003, 2004; Kawakami et al. 2005; Onimaru et al. 2007)。これらの観察は、2 サブユニット遺伝子が神経伝達の制御に深く関わっており、興奮や抑制の神経伝達における特性が、同マウス脳内で大きく変化していることを示す。

本研究では、*Atp1a2* 欠損マウスが片頭痛の発症と関連した種々の表現型を示すかどうかを明らかにし、病態機序の解明につなげるとともに、家族性片麻痺性片頭痛患者でみつかるとともに、点突然変異を導入したマウスを構築して、変異と表現型との関連を明確にした病態モデルマウスを確立することを目指す。家族性片麻痺性片頭痛患者でみつかるとともに、*ATP1A2* の変異は大部分が点突然変異である。変異の部位によって症状に違いが見られ、ナトリウムポンプタンパク質の機能異常も変異によって違いが見られる。本研究では典型的な 3 種類の変異 (R202Q、E700K、M731T) を導入する。R202Q は頭痛に加えて運動失調が、E700K では頭痛のみが、M731T は構音障害が見られる。一方、酵素学的には R202Q は E1P から E2 への変換速度が低下し、E700K はウアイン結合性や ATP アーゼの活性が大きく低下する。M731T は  $\text{K}^+$  に対する親和性が低下する。いずれの変異についてもイオンポンプ活性の低下が共通して観察されるが、ポンプ活性の低下に加え、ドミナントネガティブな効果が症状の違いを生み出す可能性も考えられる。

## 2. 研究の目的

*Atp1a2* 欠損マウスを示す片頭痛に関連する表現型とその機序の解明、および、家族性片麻痺性片頭痛患者で見つかる変異を導入した片頭痛モデルマウスの確立を行う。具体的な解析として次の点を明確にする。

片頭痛の前兆現象と考えられる大脳皮質拡張性抑制 (CSD) の特性を、*Atp1a2* 欠損マウスと野生型マウスとで比較する。

痛みの原因である血管作動性物質の発現を *Atp1a2* 欠損マウスと野生型マウスとで比較する。

神経伝達の効率を小脳または海馬のスライス標本を用いて、*Atp1a2* 欠損マウスと野生型マウスとで比較する。

脳内グリア細胞の属性を *Atp1a2* 欠損マウスと野生型マウスとで比較する。

家族性片麻痺性片頭痛の患者で同定された *ATP1A2* 点突然変異を導入したトランスジェニックマウスを構築し、家族性片頭痛の種々の病態を再現したモデルマウスとして確立する。

予備的な解析から以下の点が明らかとなっており、*Atp1a2* 欠損マウスでの片頭痛に関連した表現型の出現と神経機能の変化が示唆される。

CSD を誘発した場合に *Atp1a2* 欠損マウス (CKO, NKO) は、CSD 誘起に対する KCl 濃度の閾値が有意に低く、また興奮の伝播速度が有意に速いという結果が得られている。このことは、同欠損マウスが CSD を起こし易く、またその影響が脳全体に速く広がることを示唆しており、同マウスが家族性片麻痺性片頭痛の症状を起こし易い性質を有する事が考えられる。

神経細胞の変性の有無を検証するために、野生型と *Atp1a2* 欠損マウスとで Jade C 染色を行った。小脳虫部において、*Atp1a2* 欠損マウス特異的に変性細胞の存在が確認された。この知見は、家族性片麻痺性片頭痛の発症と小脳との新たな関係を示す可能性があり、神経伝達やグリア細胞の違いを小脳についても検証することの必要性を示す。

### 3. 研究の方法

片頭痛発症機序の解明のために、*Atp1a2* 欠損マウスを用いて家族性片麻痺性片頭痛の発症機序にかかわる重要なステップについて解析する。

大脳皮質拡張性抑制 (CSD) の性質の変化およびグルタミン酸作動性ニューロンの興奮性、GABA 作動性ニューロンの抑制性、カルシトニン関連遺伝子ペプチドやサブスタンス P など血管作動性物質および炎症の有無、脳内グリア細胞の増殖や分化等の属性の比較さらに、家族性片麻痺性片頭痛患者の遺伝子変異 (*ATP1A2* 点突然変異) を導入したトランスジェニックマウスを構築し、上記の解析を行い、片頭痛モデルマウスとしての有用性を確立する。

片頭痛は、a) CSD の発生によって引き起こされる前兆、b) 何らの刺激による頭蓋内硬膜周辺の三叉神経終末からの血管作動性物質の放出促進、c) 神経原性炎症の発生、d) 三叉神経核の活性化と、視床、大脳への刺激伝達、e) 痛みや光過敏の発生、の各段階を経ると考えられる。*Atp1a2* 欠損ヘテロマウスと野生型マウスとを比較し、片頭痛に関連したこれらの症状の有無を検証する。

#### (1) 大脳皮質拡張性抑制 (CSD) の性質の変化

ナトリウムポンプ 2 サブユニットは、脳内では主にグリア細胞に局在し、グルタミン酸輸送体との機能共役を通じて神経伝達物質の再吸収を担う (Illarionova NB et al. PLoS One 2014)。また、細胞内のカリウムイオンを排出する働きにより、細胞外のカリウムイオン濃度の維持に関与する (Larsen BR et al. Glia 2014)。従って興奮性神経の伝達効率や、CSD からの回復過程に影響を与えることが示唆される。そこで、以下の点を解析する。

(1)-1 CSD を脳表への KCl の投与により誘発し、CSD 誘導閾値、伝播速度や電位変化の大きさ、局所脳血流量を *Atp1a2* 欠損マウスと野生型とで比較する。

(1)-2 CSD 誘発時の脳の発火状況を c-Fos の抗体染色によって解析し、脳幹三叉神経核、視床、大脳など脳内の興奮異常の生じる場所を同定する。

(1)-3 グルタミン酸作動性ニューロンの興奮性、GABA 作動性ニューロンの抑制性を電気生理学的に解析する。

#### (2) 血管作動性物質および炎症の有無

片頭痛が生じる機構として、三叉神経近傍の血管からカルシトニン関連遺伝子ペプチドやサブスタンス P など血管作動性物質の放出が起きると考えられている (Goatsby PJ et al. Ann Neurol. 1990)。そこで、これらの物質の放出量を *Atp1a2* 欠損マウスと野生型とで比較する。

(2)-1 カルシトニン関連遺伝子ペプチドおよびサブスタンス P など血管作動性物質の放出の様相を三叉神経終末付近を中心に、組織染色やウエスタンブロットにて比較する。

(2)-2 神経原性炎症の有無を、インターロイキン 6 (IL-6) 等をマーカーとして検出する。

#### (3) 脳内グリア細胞の属性の比較

*Atp1a2* はグリア細胞に豊富に発現することから、*Atp1a2* 欠損マウスでのグリア細胞の増殖や分化に異常が生じ、その結果として神経伝達の異常が生じることが考えられる。グリア細胞の機能の解析として、Ca<sup>2+</sup>イメージングが有効である。そのためマウスを *Atp1a2* 欠損マウスおよびグリア細胞の Ca<sup>2+</sup>センサーマウスとの交配によって得る。

(3)-1 グリア細胞の増殖 / 分化の様相を Ki67 およびリン酸化ヒストンの抗体と GFAP 抗体染色で観察する。

(3)-2 生体内でのグリアの Ca<sup>2+</sup>センサーマウスと交配し、グリアの Ca<sup>2+</sup>動態の変化を観察する。

(4) ヒトで見つかる片頭痛患者の遺伝子変異 (*ATP1A2* 点突然変異) を導入したマウスの構築

家族性片麻痺性片頭痛 II 型の患者では 20 数種類の *ATP1A2* の点突然変異が同定されている (Pietrobon D, Neurotherapeutics. 2007)。変異の多くは細胞内ドメインに存在し、それらのうちのいくつかの変異については、酵素学的な機能欠損が報告されている。分子機能の欠損と患者の症状とがどのような機序で結びつくのかは現在のところ未解明である。この点を解明するためには、変異を導入したマウスモデルを用いた解析が必須である。そこで、同定された *ATP1A2* 点突然変異を導入したトランスジェニックマウスを構築し、病態モデルマウスとして確立する。

点突然変異の導入には、ノックインマウスの手法がしばしば使われる。本研究では、これを Tg マウスとして構築する計画である。点突然変異を有する酵素が機能欠損のみならず、何らかのドミナントネガティブな効果を有する場合には、変異アリルのコピー数を増加させることによって、その効果が増大し、より顕著な表現型を生ずることが考えられる。Tg マウスを作成する過程では、コピー数の異なるいくつかのラインが得られることが予測され、それらの間での表現型の比較を行うことで、発症機序解明の手がかりとできる。

(4)-1 代表的な 3 種類の点突然変異をマウス BAC クローンに導入し、複数のトランスジェニックマウスを作製する。

(4)-2 得られたマウスを熱性痙攣に対する感受性を指標にスクリーニングし、野生型と比べ有意に痙攣発作の生じる時間が短いラインを選択する。

(4)-3 *Atp1a2* 欠損マウスで解析した症状について、これらのラインを用いて比較解析する。

#### (5) *ATP1A2* 点突然変異導入マウスの片頭痛モデルマウスとしての有用性

上記で確立した *ATP1A2* 点突然変異を有するマウスのうち、熱性痙攣の感受性が高いラインおよび、変異アリルのコピー数が異なるラインを選択し、28 年度に *Atp1a2* 欠損マウスについて行った CSD の検討、興奮性及び抑制性神経伝達の違い、血管作動性物質の発現、およびグリア細胞の属性の変化を解析する。予備的な解析から熱性痙攣の感受性が高いライン 2 ラインが同定されている。

## 4. 研究成果

(1) ヒト家族性片麻痺性偏頭痛 2 型の患者で見つかった変異を有するマウスの構築と解析  
家族性片麻痺性偏頭痛で同定された 3 種類の *ATP1A2* 点突然変異 (R202Q, E700K, M731T) を導入したトランスジェニックマウスを構築した。熱性痙攣に対する感受性の高いラインが得られた。また、最高血圧が有意に上昇したライン、心拍数が有意に増加したラインも確立できた。このうち、E700Kを導入したマウスについて、CSDの属性を比較した。変異マウスでは、CSDの拡散速度が大きく電位低下からの回復に長い時間がかかった。CSD誘起の閾値は、メスマウスにおいて低い傾向があった。初回CSDによる局所脳血流の低下には有意差がなかったが、その後の一時的な血流量はオスマウスにおいて、増加していた。CSD後の神経興奮をc-Fos抗体染色で解析したところ、扁桃体において、変異導入トランスジェニックマウスにおけるc-Fos発現が有意に高かった。これらにより、ヒト患者で見つかる変異を導入したマウスが、CSDの属性に変化をきたしており、偏頭痛のモデルとして有効であることを明らかにできた。

(2) イメージングによるCSD誘導時の大脳皮質ニューロンとアストロサイトのCa<sup>2+</sup>動態の比較  
生体内でニューロン及びアストロサイトのCa<sup>2+</sup>濃度変化をGFPの蛍光で評価できるマウス (GLT-1) と *Atp1a2* 欠損マウスとを交配した。脳表面にKClを滴下することでCSDを誘導し、ニューロン及びアストロサイトのCa<sup>2+</sup>濃度変化を *Atp1a2* 欠損マウスと野生型で比較観察した。アストロサイトは標識色素 (Sulphorodamine101) を用いて同定し、ニューロンとアストロサイトを別々に評価した。(1) CSD誘導後、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を示したアストロサイト数は、*Atp1a2* 欠損マウスで有意に多かった。ニューロンでは、有意な差は観察されなかった。(2) 細胞間Ca<sup>2+</sup>濃度変化パターンは全ての細胞間 (ニューロン・ニューロン間、ニューロン・アストロサイト間、アストロサイト・アストロサイト間) で、有意な差は観察されなかった。(3) アストロサイト細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化パターンは、*Atp1a2* 欠損マウスにおいて、細胞内領域間で有意に同調性が低かった。これらの結果により、*Atp1a2* 欠損マウスのアストロサイトでの機能的な変化が示唆された。

(3) 血管作動性物質および炎症の有無

カルシトニン関連遺伝子ペプチドやサブスタンスPの発現について、*Atp1a2* 欠損マウスと野生

型マウスの有意差が検出されなかった。炎症性マーカーとして知られるIba-1の発現を抗体染色で比較したところ、*Atp1a2*欠損マウスでの発現が亢進していた。

#### (4) グリア細胞の属性変化について

グリア細胞の増殖/分化の様相をKi67およびリン酸化ヒストンの抗体とGFAP抗体染色で観察したが、*Atp1a2*欠損マウスと野生型マウスでの違いは検出されなかった。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ikeda, K., Kawakami, K., Okada, Y., Yokota, S., Koshiya, N., Oku, Y., Iizuka, M., Koizumi, H. and Onimaru, H. (2017) The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal cord: Integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. *J. Physiol. Sci.* 67, 45-62. 査読あり

Ikeda, K. Onimaru, H. and Kawakami, K. (2017) Knockout of sodium pump  $\alpha 3$  subunit gene (*Atp1a3*<sup>-/-</sup>) results in perinatal seizure and defective respiratory rhythm generation. *Brain Res.* 1666, 27-37. 査読あり

Unekawa, M. Ikeda, K., Tomita, Y., Kawakami, K. and Suzuki, N. (2018) Enhanced susceptibility to cortical spreading depression in two types of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha 2$  subunit-deficient mice as a model of familial hemiplegic migraine 2. *Cephalalgia*, 38, 1515-1524. 査読あり

Sugimoto, H., Ikeda, K. and Kawakami, K. (2018) *Atp1a3* deficient heterozygous mice show lower rank in the hierarchy and altered social behavior. *Genes Brain Behav.* 17, e12435. 査読あり

Sugimoto, H. and Kawakami, K. (2019) Low-cost protocol of footprint analysis and hanging box test for mice applied the chronic restraint stress. *J. Vis. Exp.* Jan 23; (143). doi: 10.3791/59027. 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

Ikeda, K., and Kawakami, K.  
Exploring the neural hyper-active regions in the Sodium pump disease model mice. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama, July 20-22, 2016.

Sugimoto, H., Kawakami, K.  
*Atp1  $\alpha 3$*  regulates the hierarchy formation through altered behavioral characteristics. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama, July 20-22, 2016.

Unekawa, M., Ikeda, K., Tomita, Y., Kawakami, K., Suzuki, N.  
Enhanced susceptibility to cortical spreading depression and different degree in two-types of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha 2$  subunit-deficient mice as a model of familial hemiplegic migraine 2.  
18<sup>th</sup> Congress of the International Headache Society, Vancouver, September 7-10, 2017.

Unekawa, M., Ikeda, K., Tomita, Y., Kawakami, K., Suzuki, N.  
Widespread c-Fos expression after cortical spreading depression; possible differences between two types of animal models of familial hemiplegic migraine 2.  
WCN2017: XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, September 16-21, 2017.

Kawakami, K., Unekawa, M., Ikeda, K., Tomita, Y., Suzuki, N.  
*Atp1a2*-deficient mice as a model of familial hemiplegic migraine.  
The 15<sup>th</sup> International Conference on Na, K-ATPase and Related Transport ATPases, Otsu, September 24-30, 2017.

畝川美悠紀、池田啓子、富田裕、川上潔、鈴木則宏  
Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha 2$  サブユニット遺伝子欠損マウスにおける皮質拡延性抑制に対する感受性と脳内 c-Fos 発現分布. 第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会、豊中、2017 年 11 月 3 日-4 日.

川上潔、畝川美悠紀、池田啓子、富田裕、鈴木則宏  
家族性片頭痛マウスモデルとしてのナトリウムポンプ  $\alpha 2$  サブユニット遺伝子欠損マウス. 第

40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会、神戸、2017 年 12 月 6 日-9 日

畝川美悠紀、池田啓子、富田裕、伊澤良兼、唐春花、正本和人、菅野巖、川上潔、鈴木則宏、中原仁

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 2 subunit 遺伝子欠損マウスにおける 中大脳動脈閉塞時の拡張性脱分極の発生と梗塞巣の形成

第 61 回日本脳循環代謝学会学術集会、盛岡、2018 年 10 月 19 日-20 日

唐春花、畝川美悠紀、柴田護、富田裕、伊澤良兼、池田啓子、川上潔、中原仁

Property of behavior after cortical spreading depression in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 2 subunit defective mice

第 61 回日本脳循環代謝学会学術集会、盛岡、2018 年 10 月 19 日-20 日

畝川美悠紀、池田啓子、富田裕、川上潔、鈴木則宏、中原仁

家族性片麻痺性片頭痛2型モデルとして使用したNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 2サブユニット欠損マウスにおける大脳皮質拡張性抑制感受性亢進作用。

第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28日-30日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ <http://www.jichi.ac.jp/biol/home.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：池田 啓子、杉本 大樹、畝川 美悠紀、鈴木 則宏

ローマ字氏名：Keiko Ikeda, Hiroki Sugimoto, Miyuki Uekawa, Norihiro Suzuki