

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2007~2008

課題番号:19790747

研究課題名(和文)ナトリウムチャン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 epilepsy associated with mutations of voltage-gated sodium channel gene

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

研究成果の概要:電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha$ 1サブユニット(SCN1A)遺伝子は、乳児重症ミオクロニーてんかん(あるいはDravet症候群)の責任遺伝子である。本研究は、抑制性インターニューロン特異的にSCN1A遺伝子を破壊し、この変異マウスにけいれん発作と突然死を認めた。以上の結果は、乳児重症ミオクロニーてんかんの発病機序がインターニューロンの機能不全とする申請者らの従来の仮説を支持した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
2007年度	1,700,000円	0円	1,700,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000円	480,000円	3,780,000円

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、ナトリウムチャンネル遺伝子、インターニューロン、脳・神経、神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha$ 1サブユニット(SCN1A)遺伝子は、乳児期に発症するてんかん、全般てんかん熱性けいれんプラスと乳児重症ミオクロニーてんかん(Dravet症候群)の原因遺伝子である。

申請者の所属する研究チームは189名のSMEI患者のSCN1A遺伝子配列解析を行い、104例(55%)に突然変異を認めた。申請者らは、さらに、変異ナトリウムチャンネルを強制発現させた細胞にホールセルパッチクランプ法

を適用し、変異チャンネルが電流をほとんど、あるいは全く流さないことを明らかにした。以上の研究はSCN1A遺伝子の突然変異による $\alpha$ 1ナトリウムチャンネル分子の機能不全がSMEI発病機序であることを示唆する。しかし、これら結果だけでSMEI病態を説明することは不可能で、病態モデル動物を使った組織、個体レベルの研究が必要とされていた。

それ故に、申請者は、乳児重症ミオクロニーてんかん患者に認められたナンセンス突然変異を持つSCN1A遺伝子変異ノックインマ

ウスを作製した。この変異マウスは、ホモ接合体、ヘテロ接合体ともに乳児期（離乳前）にけいれん発作を呈した。さらに、ホモ接合体マウスは生後 20 日までに死亡し、ヘテロ接合体マウスのおよそ半数が生後 3 月までに死亡した。

申請者は、 $\alpha 1$  ナトリウムチャネルの脳内局在を解析した。 $\alpha 1$  ナトリウムチャネルは、マウス乳児海馬では parvalbumin 陽性インターニューロンの細胞体に、マウス乳児大脳皮質では parvalbumin 陽性インターニューロンの軸索起始部に主に局在した。さらに、ヘテロ接合体 *SCN1A* 遺伝子変異ノックインマウス parvalbumin 陽性インターニューロンに電気生理学的な異常を認めた。

以上の結果から、申請者は、*SCN1A* 遺伝子突然変異による parvalbumin 陽性インターニューロンの機能不全がてんかん発病機序であると考えた。

## 2. 研究の目的

てんかん発病機序における parvalbumin 陽性インターニューロンの役割を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスの作製  
マウス ES 細胞 (E14) の *SCN1A* 遺伝子 exon 7 の上流と下流に lox P 配列と薬剤耐性遺伝子を相同組換えにより挿入した。次に、独立した 3 つの ES 細胞からキメラマウスを作製し、C57BL/6J マウスと交配した。得られた仔マウスを生殖細胞系列で Flpe を発現するトランスジェニックマウスと交配し、薬剤耐性遺伝子を取り除き、コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウス（ただし Flpe を有する）を得た。そして、得られたマウスを C57BL/6J マウスと交配して Flpe を取り除いた。次に、Flpe が取り除かれたヘテロ接合体コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウス同士を交配させ、ホモ接合体コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスを得た。

(2) インターニューロン特異的 *SCN1A* 遺伝子破壊マウスの作製  
ホモ接合体コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスと Parvalbumin 陽性インターニューロンを含む複数種のインターニューロンで Cre-recombinase を発現するトランスジェニックマウスと交配した。そして、得られたインターニューロン Cre;*SCN1A* (ヘテロ接合体

flox) マウスの表現型を観察した。  
Cre-recombinase の発現と *SCN1A* 遺伝子 exon 7 の欠失は、PCR 法で解析した。

## 4. 研究成果

*SCN1A* 遺伝子 exon 7 の上流と下流に lox P 配列を有するコンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスを作製した。ホモ接合体コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスは見た目正常で、ナトリウムチャネル  $\alpha 1$  の発現量にも異常は認められなかった。一方、コンディショナル *SCN1A* 遺伝子破壊マウスと生殖細胞系列で Cre-recombinase を発現するトランスジェニックマウスを交配させて得られたヘテロ接合体 *SCN1A* 遺伝子変異マウスは、けいれん発作を呈した。

研究期間中 (2009 年 3 月 1 日まで) に 32 匹のインターニューロン特異的ヘテロ接合体 *SCN1A* 遺伝子破壊マウスが得られた。内 31 匹が生後 17 日から 30 日までに死亡した。死亡マウス中 3 匹は通常のメンテナンス作業中にけいれん発作を呈し、1 匹は発作中に死亡した。インターニューロン特異的ヘテロ接合体 *SCN1A* 遺伝子破壊マウス死亡率は、申請者が以前作製したヘテロ接合体 *SCN1A* 遺伝子変異ノックインマウスの死亡率が 3 割程度であったことと比較すると、非常に高率であった。

以上の結果は、インターニューロンの機能不全が乳児重症ミオクロニーてんかんの発病機構とする申請者らの仮説を支持した。

## 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 2 件)

- ① Osaka, H., Ogiwara, I., Mazaki, E., Okamura, N., Yamashita, S., Iai, M., Yamada, M., Kurosawa, K., Iwamoto, H., Yasui-Furukori, N., Kaneko, S., Fujiwara, T., Inoue, Y., Yamakawa, K. Patients with a sodium channel alpha 1 gene mutation show wide phenotypic variation. *Epilepsy Research* 75(1): 46-51, 2007. 査読有り
- ② Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Takeuchi, T., Itohara, S., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T. K., Yamakawa, K. Nav1.1 localizes

to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *Journal of Neuroscience* 27(22): 5903-14, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

- ①第 30 回日本神経科学大会サテライトシンポジウム、平成 19 年 9 月、横浜  
Epileptic seizures in mice carrying a premature stop codon in the voltage-gated sodium channel alpha 1 gene: a model for human severe myoclonic epilepsy in infancy  
Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Takeuchi, T., Itohara, S., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T. K., Yamakawa, K.
- ②日本人類遺伝学会第 52 回大会、平成 19 年 9 月、東京  
てんかんと電位依存性ナトリウムチャンネル遺伝子変異  
荻原郁夫、真崎恵美、井上育代、森本昌史、小坂仁、萩野谷和裕、井上有史、藤原建樹、山川和弘
- ③第 30 回日本神経科学大会、平成 19 年 9 月、横浜  
Nav1.1 predominantly localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in Nav1.1-deficient mice  
荻原郁夫、宮本浩行、森田規之、アタポアナフィセ、真崎恵美、井上育代、柳川右千夫、小幡邦彦、ヘンシュ K. 貴雄、古市貞一、山川和弘
- ④第 41 回日本てんかん学会、平成 19 年 11 月、福岡  
乳児重症ミオクロニーてんかんモデルマウスにおける大脳皮質抑制性神経細胞の異常  
荻原郁夫、森田規之、アタポアナフィセ、宮本浩行、井上育代、真崎恵美、柳川右千夫、小幡邦彦、ヘンシュ貴雄、古市貞一、山川和弘
- ⑤Neuroscience 2007、平成 19 年 11 月、San Diego  
Nav1.1 predominantly localizes to axons in the developing mouse brain  
Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Itohara, S., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T.K., Yamakawa, K.
- ⑥第 50 回日本小児神経学会総会、平成 20 年 5 月、東京  
電位依存性ナトリウムチャンネル  $\alpha 1$  (*SCN1A*) 遺伝子変異とてんかん  
荻原郁夫、山川和弘
- ⑦第 31 回日本神経科学大会、平成 20 年 7 月、東京  
Voltage-gated Na<sup>+</sup> channel  $\alpha 1$  gene is transcribed from two widely separated promoters  
荻原郁夫、伊藤公一、真崎恵美、金田誠、山川和弘
- ⑧日本人類遺伝学会第 53 回大会、平成 20 年 9 月、横浜  
難治性乳幼児てんかんに認められた電位依存性ナトリウムチャンネル  $\alpha 2$  遺伝子変異電位  
荻原郁夫、伊藤公一、小坂仁、真崎恵美、井上育代、四家達彦、藤原建樹、井上有史、金田誠、山川和弘
- ⑨第 42 回日本てんかん学会、平成 20 年 10 月、東京  
電位依存性ナトリウムチャンネル  $\alpha 2$  遺伝子変異を認めた點頭てんかん 1 症例  
荻原郁夫、伊藤公一、真崎恵美、井上育代、四家達彦、藤原建樹、井上有史、金田誠、山川和弘
- ⑩Neuroscience 2008、平成 20 年 11 月、Washington, D.C.  
Mutation analysis of the voltage-gated sodium channel alpha II gene in patients with early childhood intractable epilepsies  
Ogiwara, I., Ito, K., Osaka, H., Mazaki, E., Inoue, I., Fujiwara, T., Inoue, Y., Kaneda, M., Yamakawa, K.

[その他]

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2007/070530/detail.html>

<http://www.rikenresearch.riken.jp/japan>

/research/294/

## 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