

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 4 月 24 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659529

研究課題名（和文）新規モデル動物（キックイン）を用いててんかんの発症阻止に挑む

研究課題名（英文）Development of preventative measures against epilepsy using novel model animals (kick-in)

 研究代表者 廣瀬 伸一 (HIROSE SHINICHI)
 福岡大学・医学部・教授
 研究者番号：60248515

研究成果の概要（和文）：

Naチャンネル α 1サブユニット遺伝子(SCN1A)の微小欠失はDravet症候群の最重症型引き起こす。今回、SCN1Aの欠失を持つマウスを作出することに成功した。本マウスは激しいけいれんとてんかん性の脳波は放電が観察された。スライスパッチクランプ法と、ニューロンの初代培養を用いて、神経科学的な異常を同定している。現在このマウスを利用して、NKCC1阻害剤の効果を2観察中である。

研究成果の概要（英文）：

Dravet syndrome results from various mutations of SCN1A, the gene encoding α 1 subunit of Nav1.1 channel. Microdeletion of chromosome including SCN1A leads the most severe phenotype of Dravet syndrome. We have successfully genetically engineered mice bearing a heterozygous microdeletion of Scn1a, the mouse homologue of human SCN1A. The mice exhibited severe convulsions and epileptic discharges on Electro corticogram during 4 to 8 weeks of age. We are now examining effects of NKCC1 inhibitors on the development of the phenotypes whether the inhibitors can exert a prophylactic effect. Also, we are examining the neuro-electrophysiological characteristics of the mice using the slice patch clump method on brain. Primary culture of neurons of the mice are also has been implemented.

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：モデル動物 フロセミド てんかん

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、熱性けいれんを含めると国民の約2%が罹患する頻度が高い神経疾患であり、多くは小児期に発症する。しかしながら、その分子生物学的本態はほとんど分かっておらず、根本的な治療法の開発や創薬が行えていない。難治性のてんかん患者

は精神遅滞などの合併症を来す。

Dravet 症候群（乳児重症ミオクロニーてんかん）は精神遅滞を来す難治性てんかんの代表例で、申請者らは100種以上のナトリウムチャンネルの遺伝子異常を発見してきた。

すでに申請者らが作出した、ヒト夜間前

頭葉てんかんの遺伝子組み換えモデル動物を用いて発症前にNKCC1 (Na^+ , K^+ - 2Cl^- cotransporter) をループ利尿剤で阻害すると、てんかん発症が抑制される基礎研究結果を得た。(論文投稿中)

この折、キックインマウス作出法の開発に成功し、従来法に比べ容易にノックインマウスを作出できるようになった。

以上から新しい遺伝子改変動物を利用し、NKCC1 (Na^+ , K^+ - 2Cl^- cotransporter) の阻害が Dravet 症候群の発症を予防できるのではないかと思いついた。

2. 研究の目的

全体構想：申請者が続けてきた、てんかんの遺伝子研究を通じ、てんかんには発症の臨界期が存在し、その時期の分子病態に介入すれば、以降のてんかんの発症を完全に防止できる可能性を見出した。最近作出に成功した、精神遅滞を伴う難治性てんかん (Dravet 症候群) のモデル動物を用いて、その発症阻止を行う。成功すれば多くの患者・家族への福音となる。

目的：Dravet 症候群の遺伝子異常と症状を有する遺伝子改変モデルマウスを用いて、てんかん発症の臨界期前に、分子病態を阻止する薬剤 (Na^+ , K^+ - 2Cl^- cotransporter 阻害剤=ループ利尿剤) を投与し、神経科学的・神経薬理的に Dravet 症候群の発症阻止をする、根治治療法を開発する。

3. 研究の方法

最近申請者が作出した、Dravet 症候群の遺伝子異常を有し、ヒトと同じ症状を呈する、遺伝子改変動物 (Kick-in mouse) を利用し、てんかん発症の臨界期と思われる、離乳から8週齢の間にサイアザイド系薬剤による、「発症阻止」効果を、以下の実験で明らかにする。

(1) スライスパッチクランプ法を用いて、イオンチャネル電気生理学上での効果を判定する。

(2) ニューロンの初代培養を用いて、単離ニューロンレベルでの効果を判定する。

(3) ビデオ同時記録装置を用いて、症候と脳波の解析を行い、個体レベルでの効果を判定する。

(4) 種々なループ利尿剤を(1)～(3)で応用し、最適薬剤、投与量を確定する。

4. 研究成果

ヒトDravet症候群の多くは、ニューロンNaチャネル α 1サブユニット遺伝子(SCN1A)のヘテロのナンセンス変異やミスセンスなど点変異により引き起こされる。一部の患者ではSCN1A遺伝子の微小欠失が原因となり、その場合一般的にDravet症候群の最重症型をとる。今回、我々は、本研究にこの最重度のDravet症候群の表現型を有するマウスを作出して、NKCC1 (Na^+ , K^+ - 2Cl^- cotransporter) 阻害剤のけいれん発症の抑制効果をみることにした。このため、C57BL/6バックグラウンドのマウスに我々が独自に開発してキックイン法の一部を利用し、SCN1Aの欠失を持つマウスを作出することに成功した。本マウスを、24時間ビデオ脳波計を用いて観察したところ、離乳後の4週齢から8週齢の間に激しいけいれんと脳皮質波でてんかん性の放電が観察された(論文準備中)現在このマウスを利用して、NKCC1 (Na^+ , K^+ - 2Cl^- cotransporter) 阻害剤=ループ利尿剤(フロセミド、ブメタニド、トラセミド、エタクリン酸)の効果を24時間ビデオ脳波計を用い、一度に8頭ずつ観察中である。フロセミドの効果の機序を明らかにするために、脳の冠状スライス

用いて、新皮質神経細胞のGABA受容体の reversal potential (EGABA) を測定している。またニューロンの初代培養を用いて、単離ニューロンレベルでのシナプス可塑性の異常を同定している。

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 16 件)

- 1). Kawai C, Minatogawa Y, Akiyoshi H, Hirose S, Suehiro T, Tone S. A Novel Mutation of Human Liver Alanine:Glyoxylate Aminotransferase Causes Primary Hyperoxaluria Type 1:Immunohistochemical Quantification and Subcellular Distribution. *Acta Histochem. cytochem.* (査読有) 2012;45((2)):121-9. doi:10.1267/ahc.11042
- 2). Shi X, Wang J, Kurahashi H, Ishii A, Higurashi N, Kaneko S, Hirose S. On the likelihood of SCN1A microdeletions or duplications in Dravet syndrome with missense mutation. *Brain Dev* (査読有) 2012 ; 34(8) : 617-9
- 3). Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, Kubota M, Amemiya K, Takanashi JL, Hirose S, Mizuguchi M. Mutation of the SCN1A gene in acute encephalopathy. *Epilepsia* (査読有) 2012: 53(3):558-64 doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03402.x
- 4). Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N and Kurotaki N. Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *J Hum Genet* (査読有) 2012: 57(5):338-41 doi:10.1038/jhg.2012.23
- 5). Higurashi N, Shi X, Yasumoto S, Oguni H, Sakauchi M, Itomi K, Miyamoto A, Shiraishi H, Kato T, Makita Y, Hirose S. PCDH19 Mutation in Japanese Females with Epilepsy. *Epilepsy Res* (査読有) 2012 : 99:28-37 DOI:10.1016/j.epilepsyres.2011.10.014
- 6). Shi X, Yasumoto S, Kurahashi K, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. Clinical spectrum of SCN2A mutations. *Brain Dev* (査読有) 2012:34 (7) : 541-5. doi:10.1016/j.braindev.2011.09.016
- 7). Yamakawa Y, Nakazawa T, Ishida A, Saito N, Komatsu M, Matsubara T, Obinata K, Hirose S, Okumura A, Shimizu T. A boy with a severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Brain Dev* (査読有) 2012;34(2):107-12. doi:10.1016/j.braindev.2011.05.003
- 8). Kobayashi Y, Akasaka N, Ohashi T, Saitoh S, Tomonoh Y, Hirose S, Tohyama J. Early-onset absence epilepsy at eight months of age. *Epileptic Disord* (査読有) 2011;13(4):417-21.
- 9). Hwang SK, Makita Y, Kurahashi H, Cho YW, Hirose S. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: a genotypic comparative study of Japanese and Korean families carrying the CHRNA4 Ser284Leu mutation. *J Hum Genet* (査読有) 2011; 56(8):609-12. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03002.x
- 10). Sakauchi M, Oguni H, Kato I, Osawa M, Hirose S, Kaneko S, Takahashi Y, Takayama R, Fujiwara T. Retrospective multiinstitutional study of the prevalence of early death in Dravet syndrome. *Epilepsia* (査読有) 2011;52(6):1144-9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03053.x
- 11). Sakauchi M, Oguni H, Kato I, Osawa M, Hirose S, Kaneko S, Takahashi Y, Takayama R, Fujiwara T. Mortality in Dravet syndrome: search for risk factors in Japanese patients. *Epilepsia* (査読有) 2011;52 Suppl 2:50-4. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03002.x
- 12). Tomonoh Y, Yasumoto S, Ihara Y, Fujita T, Nakamura N, Ninomiya S, Kodama R, Ideguchi H, Inoue T, Mitsudome A, Hirose S. Diagnosing nocturnal frontal lobe epilepsy: A case study of two children. *Seizure* (査読有) 2011;20(7):583-5. doi:10.1016/j.seizure.2011.03.004
- 13). Wang W, Takashima S, Segawa Y, Itoh M, Shi X, Hwang SK, Nabeshima K, Takeshita M, Hirose S. The Developmental Changes of Na(v)1.1 and Na(v)1.2 Expression in the Human Hippocampus and Temporal Lobe. *Brain Res* (査読有) 2011, 1389(5):61-70. doi:10.1016/j.brainres.2011.02.083

- 14). Ishii A, Zhang B, Kaneko S, Hirose S. Positive association between benign familial infantile convulsions and LGI4. Brain Dev (査読有) 2010; 32:538-43. doi:10.1016/j.braindev.2009.09.006
- 15). Ottman R, Hirose S., Jain S, Lerche H, Lopes-Cendes I, Noebels JL, Serratosa J, Zara F, Scheffer IE. Genetic testing in the epilepsies—Report of the ILAE Genetics Commission Epilepsia (査読有) 2011 ; 51(4) : 655-670 doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02429.x
- 16). Segawa Y, Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Hirose S., Takeshita M, Iwasaki H. IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. Pediatr Nephrol (査読有) 2010;25(6):1091-9. doi 10.1007/s00467-009-1439-8 doi:10.1016/j.eplepsyres.2008.12.003

[学会発表] (計 10 件)

1. Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of AHC in Japanese patients/Ishii A,Hirose S./symposium ATP1A3 in disease from gene mutations to new treatments(招待講演)/Brussels,Belgium-2012.12/10-12/11
2. Genetic analysis of Alternating Childhood /Ishii A,saito Y,Sasaki M,Hirose S./10th European Congress of Epileptology/London ,UK/2012.9/30
3. Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choleoathetosis syndrom,and benign convulsions with mild gastroenteritis/Ishii A,Yasumoto S,Ihara Y, Inoue T,Fujita T,Nakamura N,Ohfu M, Lee WT,Kaneko S, Hirose S./2012Korea Epilepsy congress /Incheon,Korea/2012.6/8
4. Genetics of benign neonatal seizures/Hirose S./12th international child Neurology Congress of Child Nuerology(招待講演)/Brisbane,Australia/2012.5/27-2012.6/1
5. Neutral Hyperexcitability and the Effects of KCNQ Channel Openers on Pentylene-tetrazole Induced Seizures on Mice in BFNS/Tomonoh Y,Saito R,Araki K,Deshimaru M,Takano Y,Hirose S./ 12th international child Neurology Congress of Child Nuerology/ Brisbane,Australia,2012.5/27-2012.6/1

6. The development of the DNA chip which aimed at the clinical application in epilepsy./Sugawara T,Yoshida S, Wda K, Hirose S., Iwasa H,Kaneko S./29th International Epilepsy Congress./Rome/2011.8/28-9/1
7. Steroid pulse therapy as an effective treatment for refractory epilepsy in children with glutamate receptor (GLUR) antibodies./Yasumoto S, Ihara Y, Fujita T, Tomonoh Y, Ninomiya S, Nakamura N, Ideguchi H, Inoue T, Takahashi Y, Hirose S./29th International Epilepsy Congress/Rome/2011.8/28-9/1
8. Autosomal Dominant nocturnal frontal Lobe Epilepsy:A Genotypic Comparative Study of Japanese and Korean Families Carrying the CHRNA4 Ser284LeuMutation/Su-Kyeong Hwang,Makita Y,Kurahashi H, Yong-Won Cho, Hirose S./KES 韓国てんかん学会/韓国/2011.6/24
9. Guideline for genetic diagnosis for epilepsy/Hirose s./KES 韓国てんかん学会(招待講演)/韓国/2011.6/24
10. Update for genetics of epilepsy Basic Science Session/Hirose S./KES 韓国てんかん学会(招待講演)/韓国/2011.6/24

[図書] (計 1 件)

1. Jesper's Basic Mechanisms of the Epilepsies/Steinlein andOK, Kaneko S, HiroseS./Nicotinic acetylcholine receptor mutations/2012/1-15p

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 特願

番号：
取得年月日
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/epilepsy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 伸一 (HIROSE SHINICHI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：60248515

(2) 研究分担者

該当者無し

(3) 連携研究者

高野行夫 (TAKANO YUKIO)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：50113246

斎藤亮 (SAITO RYO)
福岡大学・薬学部・講師
研究者番号：80122696

桂林秀太郎 (KATSURABAYASHI SHUTARO)
福岡大学・薬学部：助教
研究者番号：50435145