

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10199

研究課題名(和文) EFHC1変異によるてんかん新規発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidating the pathology of epilepsy caused by EFHC1 mutations

研究代表者

鈴木 俊光 (Suzuki, Toshimitsu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：20373318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳室壁を覆う上衣細胞でCreを効率よく発現するrAAVを作製するために、どの血清型のrAAVが効率よく感染するのか、また効率良く感染する導入時期も併せて、発現の確認を行い同定した。胎生期内側基底核原基(MGE)由来のタンパクをiTRAQで標識し、定量的プロテオミクス解析を実施し、結果を得た。DREADDに関する検討については、痙攣感受性についての結果を蓄積しつつある。また、myoclonin1機能不全を誘導したマウスのけいれん感受性の評価を行い、まだ使用動物数が少ないために最終的な結果ではないが、痙攣閾値が低下する傾向を示す結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに同定されている特発性てんかん原因遺伝子のほとんどがイオンチャネルをコードしている。特発性全般てんかんの多くがチャネル病であるとするなか、申請者らは非イオンチャネルEFHC1遺伝子から若年性ミオクロニーてんかん患者に特異的な変異を発見した。本研究での成果は、新規てんかん発症機序の解明につなげる知見として貢献する。EFHC1遺伝子変異により引き起こされるてんかんの発症メカニズムを理解することは、若年性ミオクロニーてんかんばかりではなく、てんかん全体の発症メカニズムの理解にもつながると予想でき、今後、診断・治療法の開発および改良にも大きく寄与することが期待される世界的に重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：To select the serotype of Adeno-Associated Virus (AAV), which efficiently infect to ependymal cells lining the wall of ventricles in mouse brain, we injected several serotypes of AAV into the ventricles of brain at several stages of mouse age. We found one of serotype of AAV infected to ependymal cells with high efficiency. We performed quantitative proteomic analysis of iTRAQ labeling samples derived from medial ganglionic eminence (MGE) of Efhc1-deficient heterozygous and WT mice at embryonic stage. Regarding of the investigation using DREADD system, we are obtaining the results of susceptibility to drug-induced seizure in mice. We also performed drug-induced seizure susceptibility test on myoclonin1 dysfunction mice by interfering the interaction of myoclonin1 interact protein. Although the mouse number was not enough to get conclusion so far, we found the myoclonin1 dysfunction mice tended to increase in seizure susceptibility.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：てんかん EFHC1 若年性ミオクロニーてんかん マウスモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

若年性ミオクロニーてんかん (JME) は、思春期(8~20歳)に発症し、ミオクロニー発作、強直間代発作などを特徴とする最も頻度の高い特発性てんかん(てんかん発作のみを症状とし、脳内病変を特定することが出来ない機能性てんかん)の一つである。申請者らは、遺伝的連鎖解析、ポジショナルクローニングにより、第6番染色体短腕6p12から原因遺伝子の一つとして新規の遺伝子 *EFHC1* の同定に成功した(Suzuki *et al.*, *Nature Genetics*, 2004)。さらに、申請者を含む研究チームおよび複数のグループから、新たな JME 疾患変異の報告が続いている (Medina *et al.*, *Neurology*, 2008)。それらの疾患変異は、ヨーロッパ人の JME 家系、イタリア人の JME 家系、白人の若年性欠伸てんかん、潜因性の側頭葉てんかん、さらに非分類型の特発性全般てんかんから見つかっている(Ma *et al.*, 2006, Annesi *et al.*, 2006, Stogmann *et al.*, 2007)。このことより、*EFHC1* は JME 発症に関与しているだけでなく、特発性全般てんかんの痙攣誘発に広く関与している可能性もでてきている。現在までに同定されている特発性てんかん原因遺伝子のほとんどがイオンチャネルをコードしているが、*EFHC1* はイオンチャネルをコードしない機能未知のタンパク myoclonin1 をコードしている。Myoclonin1 には2種類のアイソフォームがある。一つは、DM10 と呼ばれる機能不明のドメインを3つ、更に EF-hand と呼ばれる、カルシウム結合蛋白でよく見られるカルシウムイオン (Ca²⁺) 結合モチーフを1つ持つ、640 アミノ酸からなる蛋白 (long フォーム) で、もう一つは、DM10 を1つだけ持ち 278 アミノ酸からなる蛋白 (short フォーム) である。Myoclonin1 はクラミドモナスの軸系、マウス精子の鞭毛のような運動性を持つ繊毛で発現していると報告され(Ikeda *et al.*, 2005)、申請者らも、このタンパクが胎生期には脳室内の脈絡叢の細胞で、出生後は気管や脳室の内壁を覆う細胞の繊毛で多く発現がみられる事を報告した (Suzuki *et al.*, *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2008)。2009年、申請者は、*Efhc1* 遺伝子改変マウスを作製・解析し、遺伝子改変マウスにおいて自然誘発的なミオクロニー発作が野生型と比べ7~8倍多く出現すること、このミオクロニー発作出現時に異常な活動電位が脳波に出現すること、痙攣誘発剤の一つペンチレンテトラゾール (PTZ) に対し高い感受性を示すことなど、てんかん患者と類似の症状を示すことを発見し、*Efhc1* の喪失がてんかんを引き起こすことを示唆する直接的な生物学的証拠として報告した(Suzuki *et al.*, *Human Molecular Genetics*, 2009, **科学研究費補助金 若手研究 (B)、平成20年度~21年度の研究成果**)。さらに、遺伝子改変マウスで脳室壁の上皮細胞繊毛の運動機能の低下により脳室の拡大が観察されるなどの異常症状を示すことも明らかにし、併せて報告した(Suzuki *et al.*, *Human Molecular Genetics*, 2009)。また、ベルギーのグループは、myoclonin1 が紡錘体に局在し、大脳皮質発達時の細胞分裂や神経細胞移動を調節し、これらの異常が JME を引き起こすと提案した(de Nijs *et al.*, 2009)。しかしながら申請者らの *Efhc1* 遺伝子改変マウスを用いた解析で、de Nijs らの使用した抗体が非特異的な染色像を示し、また前駆細胞、有糸分裂細胞および放射状グリア細胞のマーカーを用いた免疫組織染色で、変異マウスと野生型マウス間で違いが認められなかった Yamakawa and Suzuki, *Epilepsy Behav.* 2013, Suzuki *et al.*, 未発表データ)。これらの結果は、de Nijs らの細胞分裂および興奮性神経細胞移動の異常が JME の原因となるという仮説についてさらなる検討が必要である事を示しており、JME 発症メカニズムは明らかとされていない。

2. 研究の目的

若年性ミオクロニーてんかん (JME) は、思春期に発症する最も頻度の高い特発性てんかんの一つである。申請者らは、原因遺伝子の一つとして *EFHC1* 遺伝子の同定に成功し、これまでに *EFHC1* がコードするタンパク myoclonin1 が、胎生期には脳室内の脈絡叢で、出生後は気管支や脳室の内壁を覆う細胞の繊毛で多く発現がみられること、*Efhc1* 遺伝子改変マウスが、てんかんと類似の症状を示すことなどを発見し、報告している。最近、抑制性神経細胞のマーカーを用いた免疫染色を行った結果、抑制性神経細胞数の変化が *Efhc1* 遺伝子改変マウスの線条体で見出されている。本研究では、*EFHC1* の異常が引き起こすてんかん発症メカニズムの解明につなげる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

Efhc1 遺伝子改変マウスが、てんかんと類似の症状を示すことなどは以前報告したが(Suzuki *et al.*, *Human Molecular Genetics*, 2009)、*Efhc1* がコードする myoclonin1 タンパクの異常がどのようなメカニズムでてんかん症状を引き起こすのかは明らかとなっていない。本研究では、*Efhc1* 遺伝子改変マウスで観察される線条体における抑制性神経細胞数の変化がどのようなメカニズムで引き起こされているのか、てんかん症状を引き起こす原因となりうるのかを、免疫組織染色、定量的プロテオミクス解析で検討した。また、*Efhc1* 遺伝子がコードする myoclonin1 タンパクと我々が同定している複数の myoclonin1 に相互作用するタンパク(未発表データ)のうちの1つの結合タンパクと myoclonin1 との結合を阻害することで myoclonin1 機能不全を誘導したマウスについて、我々の既報(Suzuki *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 18:1099-109, 2009)の手技に従い、けいれん誘発剤のペンチレンテトラゾール (PTZ) に対する痙攣閾値を myoclonin1 結合阻害マウスと対照群間で比較検討した。

(1) *Efhc1* flox マウスに Cre リコンビナーゼを発現する rAAV を時間・領域を変えて導入し、

Efhc1 遺伝子改変マウスで観察される自然誘発性のミオクロニー発作や PTZ で誘発される痙攣感受性の上昇が再現されるか検討し、*Efhc1* とてんかん発作発症の因果関係を追及する。myoclonin1 機能不全を誘導したマウスについて PTZ で誘発される痙攣感受性の上昇が再現されるか検討し、myoclonin1 に相互作用するタンパクと myoclonin1 との結合を阻害することで myoclonin1 機能不全とてんかん発作発症の因果関係を検討した。

(2) *Efhc1* 遺伝子改変マウスの線条体で見出された抑制性神経細胞数の変化がどのようなメカニズムで引き起こされているのか、線条体と大脳皮質抑制性神経を特徴づける因子について、免疫組織染色や iTRAQ 標識法を用いた定量的プロテオミクス解析で検討した。

(3) FLEX switch を組み込んだ DREADD の rAAV と細胞種特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを用い、標的神経細胞の活性を DREADD の特異的アゴニストである clozapine-N-oxide (CNO) の投与で制御し、*Efhc1* 遺伝子改変マウスで観察される自然誘発性のミオクロニー発作、PTZ で誘発される痙攣感受性の上昇が改善するかどうかを検討した。

4. 研究成果

血清型の異なる複数の rAAV を用い、どの血清型の rAAV がマウスの脳室壁を覆う上皮細胞に効率よく感染するのかを検討した。Cre リコンビナーゼ配列を組み込んだコンストラクトおよび対照用蛍光タンパクを組み込んだコンストラクトを用いて、上皮細胞への感染効率の良好であった血清型の rAAV を同定した。さらに、上皮細胞に rAAV が効率よく感染する時期を検討するために、複数のマウスの週齢において rAAV を脳室内に導入し、免疫組織染色法により発現を確認し、最適な導入時期を見出した。上皮細胞への感染効率の良好であった血清型で Cre リコンビナーゼ配列を組み込んだ rAAV および対照用蛍光タンパクを組み込んだ rAAV を作製し、複数のマウスの脳室内に導入後、発現の確認を行った。また、*Efhc1* 遺伝子改変マウスの抑制性神経細胞数の変化がどのようなメカニズムで引き起こされているのか検討するために、胎生期内側基底核原基(MGE)のタンパクを iTRAQ で標識し、定量的プロテオミクス解析を行い、結果を得た。FLEX switch を組み込んだ DREADD に関する検討については、痙攣感受性について、結果を蓄積しつつある。myoclonin1 機能不全を誘導したマウスを作出し、得られたホモマウスと同腹の野生型マウスの脳組織を用い、目的タンパクの発現をウエスタンブロット解析および免疫組織染色法により検討し、目的の細胞において発現していることが確認できた。また、我々の既報(Suzuki et al., Hum. Mol. Genet., 18:1099-109, 2009)の手技に従い、けいれん誘発剤のペンチレンテトラゾール (PTZ) に対する痙攣閾値を myoclonin1 結合阻害マウスと対照群間で比較検討した。けいれん感受性の評価は、けいれん誘発剤投与からミオクロニー発作、間代発作、全身性の強直・間代発作が観察されるまでのそれぞれの時間を測定し、統計的に対照群と比較検討した。まだ使用動物数が少ないために最終的な結果ではないが、myoclonin1 機能不全マウスにおいて、けいれん誘発剤に対する痙攣閾値が低下する傾向を示す結果を得た。

<引用文献>

- Medina M.T., Suzuki T., Alonso M.E. et al., (2008) Novel mutations in myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. Neurology 70:2137-2144.
- Suzuki T., Miyamoto H., Nakahari T., et al., (2009) *Efhc1* deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. Hum. Mol. Genet. 18:1099-1109.
- Suzuki T., Inoue I., Yamagata T., et al. (2008) Sequential expression of *Efhc1*/myoclonin1 in choroid plexus and ependymal cell cilia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 367(1):226-233.
- Suzuki T., Delgado-Escueta A.V., Aguan K., et al. (2004) Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. Nature Genetics 36:842-849.
- Yamakawa K, Suzuki T. (2013) Re-evaluation of myoclonin1 immunosignals in neuron, mitotic spindle, and midbody--nonspecific? Epilepsy Behav. 28 Suppl 1:S61-2.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。