

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07126

研究課題名(和文) てんかん発生機構の解明と予防薬の探索

研究課題名(英文) Mechanism of epilepsy pathogenesis and search for preventive drugs

研究代表者

田谷 真一郎 (Taya, Shinichiro)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・室長

研究者番号：60362232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんの発症機構は理解不足で良い診断・治療法も確立されてはいない。これまでに、我々はてんかん自然発症ラットの原因遺伝子としてDSCAML1を同定した。本研究では、ヒトのてんかん患者の遺伝子を解析し、ミスセンス変異を引き起こすSNPを複数同定したてんかん患者型DSCAML1は正常な細胞内局在をすることができず、機能欠損変異体であった。さらに、てんかん患者型DSCAML1ノックインマウスを作製すると、異常な脳波が検出できた。以上の結果から、DSCAML1の機能欠損は、てんかんの発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外で、てんかんの病態解明を目指している研究は他にも多々なされている。これまでに、てんかんをはじめとする精神・神経疾患の分野では遺伝学的・細胞生物学的な解析はなされてきた。しかし、本研究のようにてんかんに直接関連する分子に直接結合する分子群をプロテオームの手法を用いて同定し解析することはほとんどされてはいない。また、我が国に患者数が百万人以上いると言われるてんかんであるが、本研究によってその病態が理解され、さらに新たな診断法や治療法が開発されれば、大きく国民の生活の向上に貢献するであろうと信じている。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of epilepsy is poorly understood and good diagnostic and therapeutic methods have not yet been established. Previously, we identified DSCAML1 as a responsible gene in rats with spontaneous epilepsy. In the present study, we analyzed the DSCAML1 gene in human epilepsy patients and identified several SNPs that cause missense mutations. Furthermore, we generated patient-type DSCAML1 knock-in mice and detected abnormal brain waves. These results suggest that loss of function of DSCAML1 may be involved in the development of epilepsy.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん 神経回路網 抗てんかん薬

1. 研究開始当初の背景

高度な脳機能を司る複雑な神経回路網は、精巧な遺伝子プログラムの基に、様々な発生段階を経て創り上げられる。一方、神経回路網形成の過程で異常が生じると、てんかん、発達障害、自閉症などの様々な精神・神経疾患が惹起されると考えられている。すなわち、「正常な神経回路網形成の分子・遺伝子機構」を調べることが、直接的に精神・神経疾患の病態の理解につながり、ひいてはその診断や治療法の開発にも展開しうると考えられる。しかしながら、神経回路網形成の分子機構はその複雑さ故に未解明の部分が多い。また、それらの研究が、特定の精神・神経疾患の病態解明に大きく貢献しているという事例は、国内外を通じて少ない。とくに、我が国でも患者数が多いてんかんは、その発症機構の解明が進んでおらず、それ故に難治性のものも少なくない。

2. 研究の目的

てんかんは、人口の約 1%が罹患する精神疾患であり、遺伝要因と環境要因が複雑に関係するとされている。しかし、まだその分類法は不十分で、且つその発症・進展機構も理解不足で良い診断・治療法も確立されてはいない。てんかん発作の原因は、神経回路網形成異常に起因する神経細胞の過剰発火とされているが、その発症機構は不明な点が多い。イハラてんかんラット(IER)は、生後3ヶ月からてんかん症状を呈する原因不明のてんかん自然発症ラット突然変異体として報告されている。我々は、IERでは扁桃体・海馬・大脳皮質の神経細胞に異常が生じていることを見出した。さらに、連鎖解析からIERの原因遺伝子としてDSCAML1遺伝子の同定に成功した。IERではDSCAML1の発現が著しく低下しており、その結果、てんかん様の発作を惹起すると考えられる。しかし、これらの異常がどのようにして“てんかん原生の獲得”に繋がるのか不明である。本研究では、IERの神経回路網形成異常の行程を解明する。さらに、所属機関のバイオバンクに登録されているてんかん患者のゲノム解析から、DSCAML1上の複数のミスセンス変異を同定し、その変異を有するてんかん患者型DSCAML1変異マウスを作製し解析する。現有の治療薬はてんかん発作を抑制するものの、てんかんの発症自体を防ぐものではない。本研究では、IERとDSCAML1変異マウスを神経回路網異常型てんかんのモデルとして利用することによって、このタイプのてんかんに有効な薬剤をスクリーニングし、将来的な治療法の開発につなげていく。

3. 研究の方法

(1) イハラてんかんラット(IER)の神経回路網異常部位の同定

IERのどの領域の異常がてんかん発作に関与するのか不明である。そこで、てんかん発作を惹起する以前のIERのスライス脳に膜電位感受性色素で標識し、ライブイメージングで計測する。てんかん発作の原因となる神経回路候補を探索すると同時にてんかん原生の獲得に繋がっているのか検討する。

(2) てんかん患者型DSCAML1ノックイン(KI)マウスの作製と解析

てんかん患者のゲノムシーケンスを行い、6種のDSCAML1ミスセンス変異を同定した。そのうち、ヒトDSCAML1^{A2105T}は小胞体に蓄積してしまい、細胞膜に局在できない機能欠損であることを見出している。そこで、CRISPR-Cas9システムを用いてDSCAML1^{A2105T}KIマウスの作製を試みる。そして、DSCAML1^{A2105T}KIマウスがてんかん発作に対して脆弱性を示すか検討する。

(3) 抗てんかん薬のスクリーニング

小胞体蓄積型(変性)タンパク質に対し、ケミカル シャペロンがタンパク質を安定化することが報告されている。そこで、ケミカル シャペロンの DSCAML1^{A2105T} KI マウスに対する治療効果を検討する。

(4) 精神疾患患者型 DSCAML1 の機能解析

統合失調症、自閉症患者、発達障害患者の全ゲノム解析の公共データベースを用いて、DSCAML1 遺伝子の SNP 変異を検索し、解析する。

4. 研究成果

(1) イハラてんかんラット(IER)の神経回路網異常部位の同定

IER 脳のどの領域で異常が生じているのかを明らかにするために、興奮と抑制のシステムを制御する神経細胞を調べた。その結果、海馬、扁桃体、嗅内皮質などの領域で抑制性神経細胞の分布や形態に異常を見つけた。特に、嗅内皮質領域では抑制のシステムを制御する神経細胞の数が劇的に減少していた。

次に、IER の嗅内皮質領域のスライス脳に膜電位感受性色素で標識し、ライブイメージングによる計測を行った。その結果、IER の嗅内皮質領域で興奮性が亢進していることが明らかになった。嗅内皮質は海馬領域への貫通繊維を介した入力に必要な領域である。これまでに、我々は IER では、貫通繊維の過剰入力の結果と思われる海馬の歯状回領域の顆粒細胞の苔状線維発芽の現象を報告している。しかし、なぜ顆粒細胞の苔状線維が過剰に発芽しているのか不明であった。以上の結果は、IER では抑制性の神経細胞が減少している嗅内皮質領域が興奮状態にあり、その興奮が海馬の歯状回領域の顆粒細胞に伝わり、さらに全般化することで、てんかん発作の感受性が高まっていることが IER の“てんかん原生の獲得”に繋がっていると考えている(Hayase et al., 2020)。

(2) てんかん患者型 DSCAML1 ノックイン(KI)マウスの作製と解析

患者型 DSCAML1^{A2105T} 変異体を挿入したノックイン(KI)マウスを作製した。野生型マウス由来の DSCAML1 に比べて、DSCAML1^{A2105T} の発現蛋白質総量に変化は認められなかった。次に DSCAML1^{A2105T} 変異体の細胞内局在を検討した結果、細胞質に蓄積する局在異常が認められた。さらに、海馬の抑制性神経細胞の配置異常や大脳皮質の錐体細胞の樹状突起伸展異常が認められた。これらの表現型は、IER や DSCAML1 KO マウスと非常に似ていることから、個体レベルでも DSCAML1^{A2105T} 変異体は機能欠損型であると考えている。また、DSCAML1^{A2105T} KI マウスはヘテロ型(患者はヘテロ型)でもホモ型でも異常なスパイクが観察された。以上の結果から、患者型 DSCAML1 変異体マウスが、てんかん発作を惹起しやすい状態であることが示唆された(Hayase et al., 2020)。

(3) 抗てんかん薬のスクリーニング

培養細胞に DSCAML1^{A2105T} 変異体を発現させると細胞内(小胞体やゴルジ体)に蓄積する。我々は、その蓄積はケミカル シャペロンによって部分的に改善されることを見出している。次に、成体の DSCAML1^{A2105T} KI マウスにケミカル シャペロン(4PBA)を引水投与し、解析を行った。その結果、野生型レベルまでは回復できないが、有意に神経突起伸長作用が認められた。さらに、4PBA の引水投与が DSCAML1^{A2105T} KI マウスで見られる異常なスパイクを改善することに成功した。以上の結果から、ケミカル シャペロンの 4PBA が DSCAML1^{A2105T} 変異体の局在を正常化することで、神経細胞異常、脳波異常を改善できることを示唆した。

(4) 精神疾患患者型 DSCAML1 の機能解析

既存の統合失調症、自閉症、発達障害等の患者データベースを用いて、複数の SNP を DSCAML1 遺伝子上に見出した。次に、各疾患型 DSCAML1 の発現プラスミドを作製し、特に構造予想ソフトでダメージが高い変異型に着目して解析を進めた。その結果、一部の疾患型 DSCAML1 が機能欠損型であることを見出した。以上の結果から DSCAML1 のミスセンス変異は、てんかんのみならず神経疾患発症に関与することが示唆された (Ogata et al., 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyashita S, Owa T, Seto Y, Yamashita M, Aida S, Sone M, Ichijo K, Nishioka T, Kaibuchi K, Kawaguchi Y, Taya S, Hoshino M	4. 巻 -
2. 論文標題 Cyclin D1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e105712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020105712	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Zheng T, Ghasemi D, Okonechnikov K, Korshunov A, Sill M, Maass K, Benites Goncalves da Silva P, Ryzhova M, Gojo J, Stichel D, Arabzade A, Kupf R, Benzel J, Taya S, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cross-species genomics reveals oncogenic dependencies in ZFTA/C11orf95 fusion-positive supratentorial ependymomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Discov.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.CD-20-0963	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Ogata S, Hashizume K, Hayase Y, Kanno Y, Hori K, Balan S, Yoshikawa T, Takahashi H, Taya S, Hoshino M	4. 巻 26(3)
2. 論文標題 Potential involvement of DSCAML1 mutations in neurodevelopmental disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 136-151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12831	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Hayase Y, Amano S, Hashizume K, Tominaga T, Miyamoto H, Kanno Y, Ueno-Inoue Y, Inoue T, Yamada M, Ogata S, Balan S, Hayashi K, Miura Y, Tokudome K, Ohno Y, Nishijo T, et al.	4. 巻 206
2. 論文標題 Down syndrome cell adhesion molecule like-1 (DSCAML1) links the GABA system and seizure susceptibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-020-01082-6	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Arimura N, Okada M, Taya S, Dewa KI, Tsuzuki A, Uetake H, Miyashita S, Hashizume K, Shimaoka K, Egusa S, Nishioka T, Yanagawa Y, Yamakawa K, Inoue Y, Inoue T, Kaibuchi K, Hoshino M	4. 巻 6
2. 論文標題 DSCAM Regulates Delamination of neurons in the developing midbrain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Adv.	6. 最初と最後の頁 eaba1693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba1693	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamashita M, Owa T, Shiraiishi R, Adachi T, Ichijo K, Taya S, Miyashita S, Hoshino M	4. 巻 25(12)
2. 論文標題 The role of SCFSkp2 and SCF -TrCP1/2 in the cerebellar granule cell precursors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 796-810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12813	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Arimura N, Dewa KI, Okada M, Yanagawa Y, Taya S, Hoshino M	4. 巻 24(1)
2. 論文標題 Comprehensive and cell-type-based characterization of the dorsal midbrain during development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 41-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12656	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Owa T, Taya S*, Miyashita S, Yamashita M, Adachi T, Yamada K, Yokoyama M, Aida S, Nishioka T, Inoue YU, Goitsuka R, Nakamura T, Inoue T, Kaibuchi K, Hoshino M	4. 巻 38
2. 論文標題 Meis1 coordinates cerebellar granule cell development by regulating Pax6 transcription, BMP signaling and Atoh1degradation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1277-1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1545-17.2017	査読の有無 有
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------