

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08534

研究課題名(和文)疾患原因遺伝子変異から探る細胞膜興奮性制御の統合的生理機構の解明

研究課題名(英文) Exploration of the integrated physiological mechanism of membrane excitability regulation through analyses of disease-causing gene mutations

研究代表者

秋田 天平 (Akita, Tenpei)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00522202

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)：本研究で我々は、発達性てんかん性脳症(DEE)をはじめとする、種々の重度難治性てんかん疾患の原因遺伝子変異について、変異による疾患発症機序を詳細に検討し、また新規原因遺伝子変異の探索も行った。まず、以前我々が報告した電位依存性カリウムチャンネルKCNB1(Kv2.1)のDEEを引き起こす変異について、患者と同じ変異を導入した遺伝子改変マウスの作成に成功し、そのマウスの大脳皮質錐体神経で、正常とは異なる連続発火パターンが明らかになった。また、新たに4種類の原因遺伝子変異を、患者の遺伝子解析と変異の機能解析により同定して報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

かつて原因不明とされていた、乳幼児・小児期発症の治療抵抗性てんかんを伴う重度の神経発達障害は、その多くが遺伝子変異によると考えられ、近年の次世代シーケンサーの普及を通じて挙げられた候補に対して機能解析を集中的に行うことにより、実際に数多くの原因遺伝子変異が同定されるに至り、本研究もその一端に貢献した。一方、それらに対する的確な治療法の開発には未だ隔たりがあり、変異によるてんかん発症機序の詳細を解明する必要がある。本研究では患者と同じ変異を導入した遺伝子改変マウスを作成し、そのマウスの神経活動を調べることにより発症機序を解明しつつあり、今後の治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to elucidate the pathogenic mechanism of severe and intractable epileptic disorders caused by gene mutations, including developmental and epileptic encephalopathies (DEE), and to search for novel causative mutations. First, we succeeded in generating genetically engineered mice with the same DEE-causing mutation we reported earlier in the gene encoding the voltage-gated potassium channel KCNB1 (Kv2.1), and found that pyramidal neurons in the cerebral cortex of these mice indeed exhibited a repetitive firing pattern different from normal. Furthermore, through genetic analyses of the patients and functional analyses of the mutations, we identified and reported four novel causative gene mutations.

研究分野：病態生理学、神経生理学、細胞生理学

キーワード：発達性てんかん性脳症 難治性てんかん 疾患原因遺伝子変異 電位依存性カリウムチャンネル 遺伝子改変マウス 大脳皮質 錐体神経 神経発火活動

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサー（NGS）の出現による遺伝子解析速度の急速な向上により、ヒト一人の全遺伝情報が短期間に高精度で解読できるようになったことで、以前は原因不明とされていた難治性疾患の原因遺伝子変異が次々に明らかになりつつあった。本研究代表者（秋田）と連携研究者の1人（福田）は、NGSを用いた難治性疾患研究で著名な他の連携研究者ら（才津・松本）のグループと共同で、以前より特に発達障害を伴う重度の難治性てんかん患者の遺伝子解析で判明した原因遺伝子変異の機能解析を進め、その成果を次々と発表してきた。NGSの世界的な普及により、このような疾患研究分野は年々競争が激化していたが、その反面、報告の多くは遺伝子産物である蛋白質の機能が変異により単に有意に変化したことを大雑把に示すに止まり、具体的な疾患発症機序を明らかにするには至っていないことが殆どであった。ひいては、先行して一流誌に掲載された変異蛋白質の機能解析の報告が、後に誤りであることが判明する例も後を絶たず、本研究代表者もそのような例を指摘してきた。本研究代表者は丁寧な電気生理学的機能解析の豊富な経験を活かし、例えばてんかん患者で見つかった原因遺伝子 *KCNBI* の変異が神経連続発火活動をむしろ抑制することを見出したように（文献①）、常識を覆す知見を数々報告してきた。慎重に解析を進めることは、それにより得られる知見が実際の患者の治療方針を大きく左右しうることからも、至極当然なことではあるはずが、必ずしも徹底されていない状況があった。加えて、1つの遺伝子変異は1細胞内においても複数の異なる影響を与える可能性があり、さらに複数の組織に亘って広く影響が及びうることからも、様々な視点から継続的に解析を進める必要があった。また、遺伝子解析速度の向上は、患者のみならずその家族の遺伝子解析も容易にしたことで、遺伝学的なロジックのみで原因遺伝子変異を特定できる例が増えていた。そのようにして見出された変異の中には、一見既存の知識では細胞膜興奮性の制御と直感的には結び付け難いものもあり、その場合は一層多角的に注意深く機能解析を行う必要があった。

2. 研究の目的

本研究は、第一線の遺伝学者である連携研究者ら（才津・松本）のグループにより同定された種々の重度難治性てんかん疾患の原因遺伝子変異について、変異による疾患発症機序をより詳細に検討し、各正常遺伝子産物による細胞膜興奮性制御の生理機構とその意義を一層明確にするるとともに、それらの機構間の共通性や相補性の有無について検討することにより、多数の要素の相互作用を介してバランスが保たれている細胞膜興奮性制御の統合的生理機構をより具体的に明確にすることを目的とした。本研究目的の達成は、各変異や障害の種類に応じた細胞膜興奮性制御のための治療方針を立てる上での基盤的知識を提供することが期待された。

3. 研究の方法

本研究初期では、変異を導入した原因遺伝子を含む発現ベクターを作成し、大脳皮質培養錐体神経細胞に対して電気穿孔法により発現ベクターを導入して、変異蛋白質産物を神経細胞に強制発現させることで機能解析を行った。後期では、患者と同じ遺伝子変異をCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を用いて受精卵に導入し、その受精卵を母体マウス子宮内に着床させ発育させることにより、遺伝子改変マウスを作成した。神経発火パターンやシナプス伝達の評価は、そのマウス胎仔の大脳皮質より作成した培養錐体神経細胞の電気生理学的解析により行った。また、生後マウスの脳組織に対する免疫組織化学染色や蛋白量アッセイ、さらに個体マウスの脳波の解析も行った。

4. 研究成果

(1) 発達性てんかん性脳症（DEE）の原因遺伝子 *KCNBI* 変異を遺伝子導入したマウスでの大脳皮質錐体神経発火様式の解明

KCNBI は大脳皮質・海馬の興奮性神経の主要な遅延整流性電位依存性 K^+ チャンネル *Kv2.1* をコードしている。以前我々は発達性てんかん性脳症の病因として、2種類の *KCNBI* 新生突然変異（p. R306C, p. G401R）を患者とその家族の遺伝子解析により同定し、その変異 *Kv2.1* を大脳皮質興奮性錐体神経に発現させると、活動電位の連続発火が強く抑制されることを見出した（文献①）。しかし、その実験は強制発現系によるもので、変異の影響が強く出過ぎていた可能性があった。本研究では1患者の有する変異（p. R306C）を導入した遺伝子改変マウスの開発に成功し、そのマウスの大脳皮質錐体神経の発火活動を調べたところ、患者と同じく変異がヘテロ接合で導入されたマウス及び変異がホモ接合で導入されたマウスともに、興奮性電流入力により誘起された連続発火活動中の発火間欠期の有意な延長が認められ、変異の発火抑制効果が確認された。我々の以前の報告（文献①）以降、DEE患者で本遺伝子の別の部位の変異が次々に報告されたが（2021年時点で64か所）、変異の錐体神経発火活動への影響を、患者と同じ変異を有するマウスを用いて細胞レベルで確認した報告は未だ無い。てんかん発作は錐体神経群の異常な同期的周期的発火活動により引き起こされるが、本研究で確認された変異の発火抑制効果が、如何にして神経群の異常な発火活動を誘発するのか、今後引き続き細胞レベルでその機序を明らかにすることを通じて、異常発火を制御しうる治療標的分子を探索する。さらに、マウス個体の脳

波計測により、その治療標的分子の抑制効果を生きた個体レベルで検証することを通じて、効果的な治療薬の探索・開発につなげるべく研究を進める。

(2) 重度難治性てんかん疾患の新規原因遺伝子変異 4 種類の発見

本研究では、連携研究者ら（才津・松本）のグループにより引き続き重度難治性てんかん疾患患者の遺伝子解析が行われ、そこで挙げられた候補原因遺伝子変異について、本研究代表者と連携研究者（才津）共同の機能解析により、新たに 4 種類の原因遺伝子変異を同定し報告した。

まず、神経のシナプス可塑性に関わる 2 種類の Ca^{2+} 依存性リン酸化酵素 CaMKII α 及び CaMKII β について、それらの新生突然変異が原因とみられる 5 名の神経発達障害を有する患者が見つかった。何れの変異酵素も、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が無い時の CaMKII の自己抑制機能が障害され、酵素活性の基礎値が上昇していた。海馬初代培養神経細胞に変異酵素を発現させたところ、発火

パターンの変化から、電位依存性 K^+ チャンネル Kv4 の発現レベルが上昇していることが判明し、それにより神経細胞が情報を受け取った後の、樹状突起上の情報伝播（脱分極）が速く減衰してシナプス可塑性が誘導されにくくなることから、疾患発症の一因と考えられた（図 1）。本変異の報告（発表論文 Akita et al., 2018）は、惜しくも他の研究グループに 2 か月先行されてしまったが、変異の発火パターンへの影響を調べたのは、現時点においてもやはり我々の報告以外には無い。

（図 1）。本変異の報告（発表論文 Akita et al., 2018）は、惜しくも他の研究グループに 2 か月先行されてしまったが、変異の発火パターンへの影響を調べたのは、現時点においてもやはり我々の報告以外には無い。

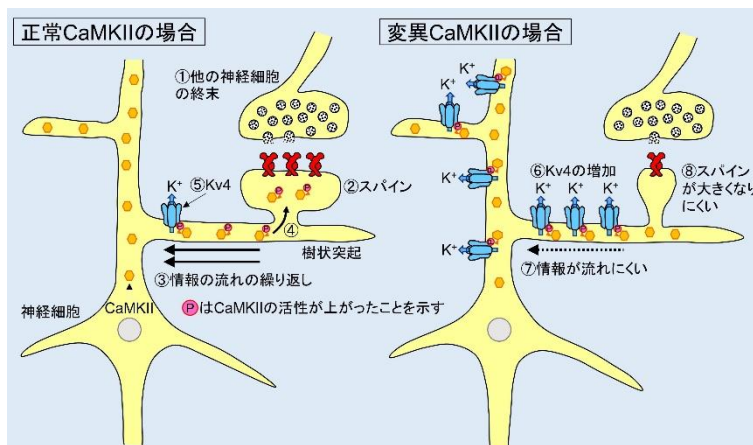


図 1 (日本生理学会サイエンスピックアップより引用 <http://physiology.jp/science-topic/20773/>)

続いて、細胞内小胞体で、自然免疫に関わる Toll 様受容体の分子シャペロンとして働く Canopy3 (PRAT4A) について、その変異による機能低下が原因とみられる 3 名のウェスト症候群（悪性点頭てんかん、指定難病 145）の患者が見つかった。東大・医科研の三宅健介教授のグループが、その遺伝子を欠失させたノックアウトマウスを所有していたため、そのマウスの神経学的な機能評価を行わせて頂いたところ、震えや筋緊張の亢進、多動や運動失調等の行動異常とともに、安静時脳波で周波数の高い β 波成分の増大が認められた。同様な β 波の増大は、正常マウスでもてんかん誘発薬物（ピロカルピン）の投与により誘起されたことから、その増大が行動異常の基となり、患者で認められる脳波異常に対応するものと考えられた。この原因遺伝子変異については、我々が世界に先駆けて報告した（発表論文 Mutoh et al., 2018）。

さらに、様々な細胞内小器官の膜に発現し、小器官内の酸性化を担う液胞型プロトンポンプ V-ATPase の変異が原因とみられる DEE が見つかった。変異は脳に豊富に発現するサブユニット ATP6VOA1 で見つかり、ポンプ機能を低下させることが判明した。そして患者と同じ変異を導入した遺伝子改変マウスを作成し、そのマウスを用いて変異の脳内神経シナプス伝達への影響を解析したところ、シナプス小胞内の伝達物質量が、興奮性のグルタミン酸及び抑制性の GABA ともに減少し、またシナプス総数も低下していることを明らかにした。これらは、変異によりシナプス小胞内の酸性化が弱まり伝達物質の充填が悪くなったことと、細胞内の老廃物を処理する小器官の機能不全で神経変性が促されたことによることが、他のデータからも示唆された。この原因遺伝子変異についても、我々が世界に先駆けて報告した（発表論文 Aoto et al., 2021）。

以上の何れの原因遺伝子変異についても、我々の報告は変異の神経発火活動やシナプス伝達への影響を評価したところ、他の報告にない際立った特徴がある。しかし、何れについても、てんかん発作に至る機序の詳細については今後の課題であり、やはり細胞レベルでその機序を明らかにすることが、効果的な治療薬の探索・開発につなげるために必要である。

(3) てんかん発症機序に関する招待総説の出版

さらに、本研究中の特記すべき実績として、1868 年創刊の伝統ある生理学雑誌 Pflügers Archiv - European Journal of Physiology より招待総説執筆の依頼を受け、出版したことが挙げられる（発表論文 Akita & Fukuda, 2020）。「イオンチャンネル病」特集号の一編として、神経細胞内塩素イオン (Cl^-) 濃度制御異常を病態の中心とする、てんかん発症機序について、Kv2.1 を含む様々なイオンチャンネルの異常が関わりうることを議論した。この議論は本研究代表者独自の視点に基づくものであり、原稿は査読者と編集者の双方から高評価を得た。今後この議論を踏まえた、てんかん発症機序の解明を目指して研究を継続する。

<文献>

① [Saitou H*](#), [Akita T*](#), Tohyama J, Goldberg-Stern H, Kobayashi Y, Cohen R, Kato M,

Ohba C, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N
(2015) *De novo KCNB1* mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal
firing. *Scientific Reports* 5:15199. doi:10.1038/srep15199 (*equal contribution &
corresponding authors; 二重下線は研究代表者、下線は連携研究者) .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Aoto K, Kato M, Akita T, Nakashima M, Mutoh H, Akasaka N, Tohyama J, Nomura Y, Hoshino K, Ago Y, Tanaka R, Epstein O, Ben-Haim R, Heyman E, Miyazaki T, Belal H, Takabayashi S, Ohba C, Takata A, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H	4. 巻 12
2. 論文標題 ATP6V0A1 encoding the a1-subunit of the V0 domain of vacuolar H ⁺ -ATPases is essential for brain development in humans and mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22389-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Akita T, Fukuda A	4. 巻 472
2. 論文標題 Intracellular Cl ⁻ dysregulation causing and caused by pathogenic neuronal activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 977-987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-020-02375-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mutoh H*, Kato M*, Akita T* (*equal contribution), Shibata T, Wakamoto H, Ikeda H, Kitaura H, Aoto K, Nakashima M, Wang T, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Kakita A, Miyake K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H	4. 巻 102
2. 論文標題 Biallelic Variants in CNPY3, Encoding an Endoplasmic Reticulum Chaperone, Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 321-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajhg.2018.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akita T*, Aoto K*, Kato M*, Shiina M, Mutoh H, Nakashima M, Kuki I, Okazaki S, Magara S, Shiihara T, Yokochi K, Aiba K, Tohyama J, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H	4. 巻 5(3)
2. 論文標題 De novo variants in CAMK2A and CAMK2B cause neurodevelopmental disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 280-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計24件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 秋田天平、青戸一司、才津浩智、福田敦夫
2. 発表標題 発達性てんかん性脳症を引き起こすKv2.1 R306C変異の大脳皮質錐体神経発火活動への影響について
3. 学会等名 第68回中部日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋田天平、青戸一司、才津浩智、北野勝則、福田敦夫
2. 発表標題 神経連続発火活動低下を伴うてんかん性脳症発症機序の解明を目指して
3. 学会等名 第47回日本脳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akita T, Aoto K, Kato M, Shiina M, Mutoh H, Nakashima M, Kuki I, Okazaki S, Magara S, Shiihara T, Yokochi K, Aiba K, Tohyama J, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H
2. 発表標題 De novo mutants of CaMKII / responsible for neurodevelopmental disorders upregulate A-type voltage-dependent K ⁺ currents in hippocampal neurons.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mutoh H, Kato M, Akita T, Shibata T, Wakamoto H, Ikeda H, Kitaura H, Aoto K, Nakashima M, Wang T, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Kakita A, Miyake K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H
2. 発表標題 Biallelic variants in CNPY3, encoding an endoplasmic reticulum chaperone, cause early-onset epileptic encephalopathy.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akita T, Saitu H, Matsumoto N, Fukuda A
2. 発表標題 Exploring integrated regulation of membrane excitability through analyses of epilepsy-associated gene mutations.
3. 学会等名 International Symposium Neural Oscillation Conference 2017: Problems of consciousness and neuropsychiatric disorders as network diseases (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋田天平、青戸一司、加藤光広、椎名政昭、武藤弘樹、中島光子、九鬼一郎、岡崎伸、眞柄慎一、椎原隆、横地健治、相場佳織、遠山潤、大場ちひろ、宮武聡子、三宅紀子、緒方一博、福田敦夫、松本直通、才津浩智
2. 発表標題 てんかん及び神経発達障害をもたらすCaMKII新生突然変異体の発見
3. 学会等名 新学術領域研究「オンコロジー」第2回領域会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akita T, Aoto K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitu H
2. 発表標題 De novo CaMKIIalpha/beta mutants causing neurodevelopmental disorders upregulate A-type voltage-dependent K+ currents in hippocampal neurons.
3. 学会等名 The 95th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>リソソームの膜タンパク質ATP6V0A1の異常が発達性およびてんかん性脳症の原因となることを発見 https://www.hama-med.ac.jp/public-relations/press/index.html https://www.amed.go.jp/news/release_20210409-02.html https://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/20210405matsumoto_NC_.html</p> <p>小児期の難治性てんかん（ウエスト症候群）の責任遺伝子の同定 https://www.hama-med.ac.jp/dcdb9c577eca6cb36b0722342dc26961.pdf</p> <p>酵素タンパク質CaMKIIの神経発達障害を起こす突然変異体を発見 http://physiology.jp/science-topic/20773/</p>

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
連携研究者	才津 浩智 (Saitsu Hirotomo) (40402838)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
連携研究者	松本 直通 (Matsumoto Naomichi) (80325638)	横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (22701)	
連携研究者	福田 敦夫 (Fukuda Atsuo) (50254272)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	

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