

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2006～2008
課題番号：18591154
研究課題名（和文）
てんかん発症に関連する変異型ナトリウムチャネルの機能喪失機序の解明
研究課題名（英文）Molecular mechanism of loss-of-function SCN1A mutations associated with epilepsy
研究代表者
大守 伊織（OOMORI IORI）
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20403488

研究成果の概要：難治てんかんの一種である乳児重症ミオクロニーてんかんに認められる電位依存性ナトリウムチャネル・1 サブユニット ($Na_v1.1$) をコードする SCN1A 遺伝子変異をもとに、その機能喪失メカニズムを解明した。変異の種類により、蛋白は合成されているが細胞膜へ移行できない障害とチャネル蛋白は膜に移行してきているがナトリウムイオンを透過することができない障害があることが推測された。蛋白が細胞膜へ移行できないある種の変異については、抗てんかん薬によって膜への移行が促進されることが分かった。これらの知見は、てんかん患者の遺伝子情報から、効果の高い治療薬を選択するテーラーメイド治療の開発に資することができると思われる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2006 年度 | 1,900,000 | 0 | 1,900,000 |
| 2007 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2008 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 450,000 | 3,850,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 (1103) 神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療、小児神経学、神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

てんかんは有病率 (0.8%) が高い疾患であり、診断治療のみならず、その発症機構の基礎的研究は重要な課題になっている。てんかんは種々の原因で発症するが、その一部は

神経細胞に発現しているイオンチャネルの異常であり、難治てんかん患者に見つかったチャネル遺伝子異常をもとに分子レベル、細胞レベルでの機能異常を解析し、病態解明を進める研究を考えた。

ある種の難治てんかん（乳児重症ミオクローニーてんかん）に電位依存性ナトリウムチャンネル・1サブユニット（ $\text{Na}_v1.1$ ）をコードするSCN1A遺伝子の異常がヘテロ接合で高率（80%以上）に検出されることが分かった。変異型SCN1A-cDNAをHEK293細胞に強制発現させ、パッチクランプ法を用いた機能解析により、乳児重症ミオクローニーてんかんや一部の熱性けいれん患者で発見された変異型ナトリウムチャンネル $\text{Na}_v1.1$ の多くはチャンネルとしての機能を喪失していることが報告された。

変異型ナトリウムチャンネル $\text{Na}_v1.1$ が機能を喪失する機序としては、神経細胞内での蛋白が合成できない障害、蛋白は合成されているが細胞膜へ移行できない障害、チャンネル蛋白は膜に移行してきているがナトリウムイオンを透過することができない障害、チャンネル結合蛋白が変異型チャンネル蛋白に結合できないための機能障害などが考えられる。

2. 研究の目的

てんかん関連性変異型がどのような機序で機能が喪失するか同定し、個々の患者で機能喪失機序が異なるかどうかを検索する。これらの結果から、SCN1A遺伝子変異をもつ個々の患者におけるてんかん発症の分子病態を解明することができる。また、機能喪失型のチャンネルの機能回復が可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 変異型ナトリウムチャンネル $\text{Na}_v1.1$ の細胞内局在の検討

てんかん患者で発見されたSCN1A遺伝子異常をもとに、SCN1A遺伝子と相同性が高いSCN5Aを用い、EGFP付加SCN5A-cDNAをHEK細胞に発現させた。細胞膜を染色し、変異型蛋白の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。

(2) 変異型ナトリウムチャンネル $\text{Na}_v1.1$ の電気生理学的検討

HEK細胞に変異型ナトリウムチャンネルを強制発現させ、パッチクランプ法を用いて微小電流を計測する。

(3) 変異型ナトリウムチャンネル $\text{Na}_v1.1$ の機能回復実験

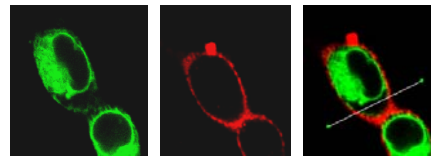
小胞体に変異蛋白が留まっていると考えられる変異型ナトリウムチャンネル $\text{Na}_v1.1$ に対し、膜移行回復の実験を行う。細胞の低温培養や種々の薬剤により、膜発現量の回復を検索する。

4. 研究成果

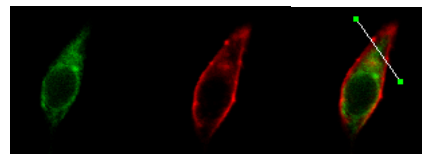
(1) 変異型ナトリウムチャンネル $\text{Na}_v1.1$ の細胞内局在の検討

正常蛋白と、変異型蛋白の細胞内局在の画像を下記に示す。正常蛋白は、膜への移行が確認されたが、R568XとK1027Xは細胞質のみに傾向が観察され、細胞膜に移行できていなかった。R931Cは膜への移行が確認された。

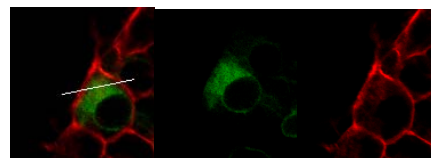
正常蛋白 膜染色 重複画像



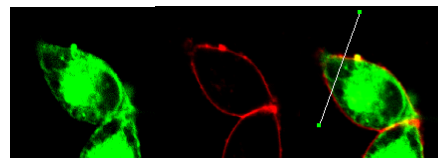
R568X 膜染色 重複画像



K1027X 膜染色 重複画像



R931C 膜染色 重複画像



(2) 変異型ナトリウムチャンネル $\text{Na}_v1.1$ の電気生理学的検討

R568X, K1027X, R931Cともにナトリウム電流は測定できなかった。R568X, K1027Xは蛋白分断型の変異であり、変異蛋白は小胞体内に留まると考えられた。R931Cについては、変異の部位がナトリウムイオンの透過性を

選択する部位にある。このチャンネル蛋白の膜への移行が観察されたことから、チャンネル蛋白は膜に移行してきているがナトリウムイオンを透過することができない障害を有すると推測された。

(3) 変異型ナトリウムチャンネル $Na_v1.1$ の機能回復実験

ナトリウム電流密度が減弱している T1909I, Y426N 変異について、抗てんかん薬（フェニトイン、カルバマゼピン、リドカイン）存在下で細胞培養し、パッチクランプ法を用いて、電気生理学的特性の変化を検討した。その結果、T1909I 変異において、フェニトイン含有メディアウムで培養すると、電流密度が回復することがわかった。

これらの知見は、てんかん患者の遺伝子情報から、効果の高い治療薬を選択するテーラーメイド治療の開発に資することができると思われる。

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 7 件）

1. Ohmori I, Ouchida M, Kobayashi K, Jitsumori Y, Inoue T, Shimizu K, Matsui H, Ohtsuka Y, Maegaki Y. Rasmussen encephalitis associated with SCN1A mutation. *Epilepsia*. 2008; 49: 521-526. 査読有
2. Hattori J, Ouchida M, Ono J, Miyake S, Maniwa S, Mimaki N, Ohtsuka Y, Ohmori I (Corresponding author). A Screening test for the prediction of Dravet syndrome before one year of age. *Epilepsia*. 2008; 49: 626-633. 査読有
3. Ohmori I, Ouchida M, Miki T, Mimaki N, Kiyonaka S, Nishiki T, Tomizawa K, Mori Y, Matsui H. A CACNB4 mutation shows that altered $Ca(v)2.1$ function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurobiol Dis*. 2008; 32: 349-354. 査読有

4. 大内田守, 大守伊織. 乳児重症ミオクロニーてんかんとその辺縁てんかん症候群における SCN1A 遺伝子異常. てんかん治療研究振興財団研究年報 第 18 集 2007 年 pp13-19. 査読なし

5. Wu Y, Liang S, Oda Y, Ohmori I, Nishiki T, Takei K, Matsui H, Tomizawa K. Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation. *EMBO J*. 2007;26:2981-90. 査読有

6. 大内田守, 大守伊織, 大塚頌子. 乳児重症ミオクロニーてんかんにおける変異遺伝子の検索と変異型イオンチャンネルの機能解析. てんかん治療研究振興財団研究年報 第 17 集 2006 年 pp55-62. 査読なし

7. Ohmori I, Kahlig KM, Rhodes TH, Wang DW, George AL Jr. Nonfunctional SCN1A is common in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia*. 2006 ;47:1636-42. 査読有

〔学会発表〕（計 14 件）

1. Ohmori I, Matsushita H, Nishiki T, Tomizawa K, Matsui H. Pharmacological effects of antiepileptic drugs on mutant Nav1.1 channels associated with epilepsy. 第 31 回 日本神経科学大会 2008 年 7 月 9 日-11 日 東京
2. 大守伊織, 服部旬里, 大内田守, 真庭聡, 御牧信義, 三宅進, 大塚頌子. 乳児重症ミオクロニーてんかんの早期診断スクリーニングテスト第 50 回 日本小児神経学会総会 2008 年 5 月 28 日-31 日 東京
3. 小林勝弘, 大守伊織, 大内田守, 井上拓志, 大塚頌子, 前垣義弘. SCN1A 変異を認めた Rasmussen 脳炎の 1 例 第 50 回 日本小児神経学会総会 2008 年 5 月 28 日-31 日 東京
4. Kobayashi K, Ohmori I, Ouchida M, Inoue T, Maegaki Y, Jitsumori Y, Matsui H, Shimizu K, Ohtsuka Y. A patient with Rasmussen encephalitis and SCN1A mutation. The 11th Annual Meeting of Infantile Seizure Society. 2008. 4. 10-11. Otsu.
5. Ohmori I, Hattori J, Ouchida M, Ono J, Miyake S, Mimaki N, Ohtsuka Y. Risk factors

for the prediction of Dravet syndrome before one year of age. The 11th Annual Meeting of Infantile Seizure Society. 2008.4.10-11. Otsu.

6. Ohmori I, Ouchida M, Kobayashi K, Ohtsuka Y, Shimizu K, Nishiki T, Tomizawa K, Matsui H. *SCN1A* missense mutation associated with infantile partial epilepsy. The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2007. 9. 10-12. Yokohama

7. Ohmori I, Ouchida M, Nishiki T, Tomizawa K, Matsui H. Trafficking defective SCN1A mutations associated with epilepsy. The 7th International Brain Research Organization. 2007. 7. 12-17. Melbourne, Australia.

8. 大守伊織, 大内田守. てんかん関連性ナトリウムチャネル異常の機能喪失機序. 第49回 日本小児神経学会総会 2007年7月5-7日 大阪

9. 大内田守, 大野順子, 大守伊織, 服部旬里, 三宅進, 真庭聡, 御牧信義, 大塚頌子. 熱性痙攣のSCN1A遺伝子異常. 第49回 日本小児神経学会総会 2007年7月5-7日 大阪

10. 服部旬里, 御牧信義, 大守伊織, 大野順子, 大内田守, 大塚頌子. SCN1A遺伝子変異I1616Tの臨床型. 第49回 日本小児神経学会総会 2007年7月5-7日 大阪

11. Ohmori I, Kahlig KM, Rhodes TH, Wang DW, Ouchida M, Matsui H, George AL. Nonfunctional SCN1A is common in severe myoclonic epilepsy in infancy. The 10th Annual Meeting of Infantile Seizure Society. 2007. 4. 7-8. Tokyo.

12. 大守伊織, 大内田守 乳児重症ミオクローニーてんかんとその辺縁てんかん症候群におけるSCN1A遺伝子異常. 第29回 日本分子生物学会年会 2006年12月6日-8日 名古屋

13. Ohmori I, Nishiki T, Tomizawa K, Matsui H. Pharmacological rescue of the trafficking defective Nav1.1 channel. 第29回 日本神経科学会 2006年7月19日-21日 京都

14. Ohmori I, Matsui H. Sodium channel Nav1.1 dysfunction in childhood

neurological disorders. 第48回 日本小児神経学会総会 2006年6月1日-3日 浦安

〔産業財産権〕

○出願状況 (計4件)

1. 名称: 脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法およびその利用、並びに熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法およびその利用

発明者: 大守伊織, 大内田守

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願2008-274887号

出願日年月日: 2008年10月24日

国内外の別: 国内

2. 名称: 急性脳炎または急性脳症の罹患リスク判定データの取得方法およびその利用

発明者: 大守伊織, 大内田守, 森泰生, 清中茂樹, 三木崇史

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願2007-288978号、

出願日年月日: 2007年11月6日

国内外の別: 国内

3. 名称: 脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法およびその利用

発明者: 大守伊織, 大内田守

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願2007-288978号

出願日年月日: 2007年11月6日

国内外の別: 国内

4. 名称: Dravet 症候群の早期診断を可能にするためのデータを取得する方法及びその利用

発明者: 大守伊織, 大内田守, 大塚頌子

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2007-007449 号

出願日年月日: 2007年1月16日

国内外の別: 国内

〔その他〕

1. 山陽新聞朝刊社会面2008年1月25日

「難治てんかん簡単判定 岡山大グループ考案 症状など点数化」

2. 山陽新聞全県版2007年7月12日

「急性脳症 発症遺伝子特定へ

岡山大グループ 血液使い変異分析」

3. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞
生理学教室ホームページ

<http://seiril.med.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大守 伊織 (OOMORI IORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教

研究者番号：20403488

(2) 研究分担者

松井 秀樹 (MATSUI HIDEKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教
授

研究者番号：30157234

大内田 守 (OUCHIDA MAMORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授

研究者番号：80213635