

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06960

研究課題名(和文) イノシン三リン酸分解酵素欠損症の分子病態解明とそれを利用した治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of molecular pathogenesis of ITPA deficiency and development of its treatment

研究代表者

土本 大介 (Tsuchimoto, Daisuke)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70363348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イノシン三リン酸分解酵素(ITPA)欠損によるてんかん性脳症の分子病態解明を目的として神経幹細胞特異的Itpa遺伝子ノックアウトマウス(cK0マウス)を作成、解析した。cK0マウスは自発性および聴原性にてんかん発作を示した。cK0マウスの脳神経細胞では静止膜電位脱分極と活動電位発火頻度上昇、微小興奮性シナプス後電流の頻度と振幅の上昇、微小抑制性シナプス後電流の頻度上昇を認めた。ITPA欠損による神経細胞の静止膜電位脱分極による興奮性の上昇がてんかん発作の原因と考えられた。また、ITPA欠損症治療薬探索を目的としてマウス神経芽腫由来細胞株Neuro2aのItpaノックアウトクローンを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期乳児てんかん性脳症(EIEE)は重篤な先天性疾患であるがその原因遺伝子は多岐にわたる。一部のタイプは神経細胞の興奮性に関わるイオンチャネル関連遺伝子の変異によって引き起こされていることが知られているがメカニズムが不明の原因遺伝子が多い。EIEEの一つEIEE35はITPA遺伝子の変異が原因であることが2015年に報告されたがメカニズムは不明であった。ITPA欠損が神経細胞の静止膜電位脱分極を引き起こし神経細胞の易興奮性とてんかん発作を引き起こすことを明らかにした本研究はITPA欠損症のみならず他のてんかん性脳症のメカニズム解明と治療法確立にも繋がる可能性があり学術的意義と社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：To clarify a molecular mechanism of epileptic encephalopathy caused by ITPA deficiency, we established and analyzed neural stem cell specific Itpa knockout mice (cK0 mice). The cK0 mice showed spontaneous and audiogenic epilepsy. Patch clamp analysis revealed depolarization of resting membrane potential of neuronal cells in cK0 mouse brains. These cells also exhibited increased frequency of action potential firing, increased frequency and amplitude of miniature excitatory post synapse current, and increased frequency of miniature inhibitory post synapse current. These results are suggesting that depolarization of ITPA-deficient neurons may cause epilepsy. In addition, we established an ITPA-deficient clone of Neuro2a, a mouse neuroblastoma derived cell line for a screening system of medical drug for human ITPA-deficiency.

研究分野：神経科学、生化学、分子生物学、核酸代謝、

キーワード：てんかん イノシン三リン酸分解酵素 脱分極

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内のヌクレオチド分子は、DNA や RNA などの核酸の生合成前駆体単量体として使用される生体にとって必須の分子である。一方、ヌクレオチド自身がそのままの構造で核酸合成以外の反応に関与することが知られている。アデノシン三リン酸 (ATP) がエネルギー通貨として機能し、グアノシン三リン酸 (GTP) が細胞内シグナル伝達分子スイッチとして機能するのはその代表的な例である。これら生体内のヌクレオチド分子の品質を保つために、損傷したヌクレオチドを分解、排除する酵素がヒト細胞には複数種類存在しておりヌクレオチドプール浄化酵素と呼ばれている。このヌクレオチドプール浄化酵素の一つにイノシン三リン酸分解酵素 (ITPA) がある。ITPA は ATP の酸化的脱アミノ化によって生じるイノシン三リン酸 (ITP) をイノシン一リン酸 (IMP) に分解する。ヒトにおける ITPA の完全欠損は 2015 年に初めて報告され、拡張型心筋症を伴う早期乳児てんかん性脳症 35 を引き起こす (Ann Neurol. 2015, 78(4):649-58)。ITPA 欠損による心筋症のメカニズムに関しては、我々は以前に Itpa 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、ミオシンへの ITP の結合によって起こるサルコメア構造の乱れが原因で心機能異常が起こることを報告していた (Cell Death Differ. 2009, 16(10):1315-1322)。一方、ITPA の欠損がなぜてんかん発作を含む脳症の原因となるのかは不明のままであった。また、ヒト ITPA 遺伝子には活性が 20%程度まで低下する多型 (198C>A (P32T)、アレル頻度 0.14) が知られており、その酵素活性の個人差が大きいと考えられていた。更にこの遺伝子多型は結核易感性との相関が報告されていた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、(1)「ITPA 欠損脳症の分子病態解明」、(2)「ITP 蓄積と結核易感性の関係の解明」、(3)「ITPA 欠損症治療法開発」、(4)「P32T 遺伝子多型モデルマウス作成と解析」を目的とした。

### 3. 研究の方法

目的(1)に関しては脳神経系特異的 ITPA 欠損マウスを作成、解析する。目的(2)(4)に関しては P32T モデルマウスを作成し、神経系および免疫系の解析を行う。目的(3)については ITPA 欠損培養細胞を樹立して表現形を消失させる薬剤の網羅的探索を行う。

### 4. 研究成果

目的(1)「ITPA 欠損脳症の分子病態解明」に関して、神経幹細胞特異的 Itpa 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス (Itpa-flox/Nes-Cre、cKO マウス) を作成し、詳細に解析した。その結果、cKO マウスは脳神経系における ITPA の発現をほとんど消失していることが脳切片の免疫染色および脳抽出液を用いたウェスタンブロットにより確認された。わずかに残存する ITPA 発現はミクログリアや血管内皮細胞など神経幹細胞に由来しない細胞によるものと考えられる。cKO マウスは出生時には明らかな表現形は示さないものの生後 8 日以降に発育遅延を示し、生後約 3 週間で死亡した。ヒト ITPA 欠損症で認められる小頭症は示さなかったが、自発性てんかん発作と聴原性てんかん発作が観察され ITPA 欠損がてんかん発作の原因となることがマウスモデルでも確認された。脳切片の病理学的解析ではコントロールマウスと比較して顕著

な違いを認めなかった。脳神経細胞の機能解析を目的として新鮮脳スライス中の嗅内皮質錐体細胞を対象としたホールセルパッチクランプ解析を実施したところ、約 10mV の有意な静止膜電位上昇、すなわち脱分極を認めた。更に活動電位発火頻度上昇や、微小興奮性シナプス後電流の頻度と振幅の増加と微小抑制性シナプス後電流の頻度上昇を認めた。ITPA 欠損により嗅内皮質錐体細胞のみならず上流の興奮性神経細胞ならびに抑制性神経細胞の易興奮性がもたらされた結果であると推察された。これらの結果より ITPA 欠損神経細胞では静止膜電位脱分極が生じ、そのことが原因で興奮性神経と抑制性神経のどちらも易興奮性となりそのバランスの結果てんかん性脳症を発症すると考えられた。このことはまた、ヒト ITPA 遺伝子多型による部分的な ITPA 活性低下が脳神経系の活動に影響を与える可能性も示唆している。脳以外の組織に関しては cKO マウスのメスの副腎において低形成を認めた。副腎の髄質、皮質ともに ITPA の発現が cKO マウスでは低下していた。髄質細胞は NESTIN 陽性の神経堤由来であり、また皮質細胞を供給しているとされる前駆細胞が存在する領域でも NESTIN の発現が報告されていることから両方の領域において Itpa 遺伝子がノックアウトされた結果と考えられた。メスと異なり、オス副腎では cKO とコントロールマウスで有意な差を認めなかったが、このことはげっ歯類においてはメスの副腎がオスよりも大きいことと関連している可能性がある。またこの cKO メスマウスの副腎低形成はヒト ITPA 欠損症で認める小頭症と共通した機構を持つ可能性があり今後さらに解析する必要があると思われる。以上の神経幹細胞特異的 Itpa 遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究成果をまとめた論文は JCI Insight 誌に掲載された (JCI Insight. 2020, 5(22):140229)。目的 (1) のための研究と成果発表のために時間がかかったため、他の目的のための研究は予定より遅れた。詳細は以下に示す。

目的 (2) 「ITP 蓄積と結核易感染性の関係の解明」および目的 (4) 「P32T 遺伝子多型モデルマウス作成と解析」に関してはヒト ITPA 遺伝子多型 (198C>A (P32T) のモデルマウスの樹立が必要となる。しかしこの多型による活性低下の原因は アミノ酸置換による比活性の低下、同じくアミノ酸置換によるタンパク質安定性の低下、塩基配列変異によるスプライシング異常、などが報告されている一方でマウスとヒトでこの多型付近の塩基配列やアミノ酸配列に若干相違があることからマウスゲノムへの 1 塩基変異のみの導入でヒト多型表現形を完全に再現できない可能性があるかと判断した。また活性低下の影響の観察を容易にするためにはヒト多型による活性低下よりもさらに低下したモデルが望ましいと考えられた。そのため、現在全く異なる方法により ITPA タンパク質や mRNA へ不安定性を導入したモデルマウスの作成を検討中である。

目的 (3) に関しては、マウス神経芽腫由来細胞株 Neuro2a を用いて CRISPR/Cas9 法により Itpa 遺伝子ノックアウトクローンを樹立した。現在この細胞を用いて ITPA 欠損症治療薬のスクリーニング系を構築中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Koga Yuichiro, Tsuchimoto Daisuke, Hayashi Yoshinori, Abolhassani Nona, Yoneshima Yasuto, Sakumi Kunihiko, Nakanishi Hiroshi, Toyokuni Shinya, Nakabeppu Yusaku	4. 巻 5
2. 論文標題 Neural stem cell-specific ITPA deficiency causes neural depolarization and epilepsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	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） 10.1172/jci.insight.140229	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 土本大介
2. 発表標題 神経幹細胞特異的イノシン三リン酸分解酵素ノックアウトマウスは脳神経細胞脱分極とてんかん発作を示す
3. 学会等名 2020年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土本大介、古賀祐一郎、林良憲、アボルハッサニ・ノナ、米嶋康臣、作見邦彦、中西博、豊國伸哉、中別府雄作
2. 発表標題 神経幹細胞特異的Itpaノックアウトマウスは神経細胞脱分極とてんかん様けいれん発作を示し、早期に死亡する
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Tsuchimoto, Yuichiro Koga, Yoshinori Hayashi, Nona Abolhassani, Yasuto Yoneshima, Kunihiko Sakumi, Hiroshi Nakanishi, Shinya Toyokuni, and Yusaku Nakabeppu
2. 発表標題 Neural stem cell specific ITPA deficiency causes depolarization of neurons, resulting in epileptic seizure and early death in mice.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1.Daisuke Tsuchimoto, Yuichiro Koga, Yoshinori Hayashi, Nona Abolhassani, Yasuto Yoneshima, Hiroshi Nakanishi, Yusaku Nakabeppu
2. 発表標題 Neural stem cell-specific Itpa knockout mouse as a model of human ITPA deficiency
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 2.Daisuke Tsuchimoto, Yuichiro Koga, Yoshinori Hayashi, Nona Abolhassani, Yasuto Yoneshima, Hiroshi Nakanishi, Yusaku Nakabeppu
2. 発表標題 Neural stem cell-specific Itpa knockout mouse as a model of human ITPA deficiency
3. 学会等名 The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences joint with the 3rd Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 3.土本 大介, 古賀 祐一郎, 林 良憲, アボルハッサニ ノナ, 米嶋 康臣, 中西 博, 中別府 雄作
2. 発表標題 ITPA欠損によるヒトてんかん性脳症のモデルとしての神経幹細胞特異的Itpaノックアウトマウス
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会出席
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 4.土本 大介, 古賀 祐一郎, 林 良憲, アボルハッサニ ノナ, 米嶋 康臣, 中西 博, 豊國 伸哉, 中別府 雄作
2. 発表標題 ITPA欠損によるヒトてんかん性脳症のモデルとしての神経幹細胞特異的Itpaノックアウトマウス
3. 学会等名 平成30年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2019年

〔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
連携研究者	林 良憲  (Hayashi Yoshinori)  (80582717)	日本大学・歯学部・准教授    (32665)	

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
---------	---------