

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08058

研究課題名(和文) EFHC1およびICK遺伝子変異によるてんかんに共通する発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidating the pathology of epilepsy caused by EFHC1 and CILK1 variants

研究代表者

鈴木 俊光 (Suzuki, Toshimitsu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：20373318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：若年ミオクロニーてんかん(JME)責任遺伝子であるEFHC1およびCILK1遺伝子変異によるてんかん発症メカニズムの解明を目的とし、Efhc1-KOマウスがCilk1-KOマウスで観察されたイソフルラン誘導性の痙攣発作を引き起こすかどうか感受性の評価およびこれらKOマウスの線条体での抑制性神経細胞数の評価を行った。また、Efhc1遺伝子のコードするタンパクmyoclonin1が運動性繊毛でのみ観察され、神経細胞および細胞分裂装置では観察されないことを見出した。この結果は、JMEが運動性繊毛関連疾患である可能性を示唆している。

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異性てんかん責任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、申請者らはこれまでに非イオンチャネル遺伝子であるEFHC1およびCILK1からJME患者に特異的な変異を発見しており、これら遺伝子変異によるてんかん発症メカニズムの解析を行なっている。本研究での成果は、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およびCILK1変異によるてんかん発症メカニズムを理解することは、JME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、本疾患の病態への理解が深まり、新しい治療法や発症予防法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To understand the pathological mechanism for juvenile myoclonic epilepsy (JME) caused by EFHC1 and CILK1 variants, we investigated whether Efhc1 knockout (Efhc1-KO) mice show increased seizure susceptibility to isoflurane, which has been reported in Cilk1-KO mice. We also carried out the cell counting of inhibitory interneurons in striatum of both Efhc1- and Cilk1-KO mice. Furthermore, we found that myoclonin1, which is encoded by Efhc1, is expressed only in cells with motile cilia but not in neurons in mouse brain or mitotic apparatuses such as mitotic spindle and midbody in dividing cultured cells including mouse neurosphere cells and human embryonic kidney (HEK) cells. We further found that the complete elimination of myoclonin1 in homozygous Efhc1-KO mouse did not critically affect cell division and migration of neurons in cerebral cortex. These results indicate that EFHC1 and CILK1 variant-dependent JME is a motile ciliopathy.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：てんかん EFHC1 CILK1 ICK 若年ミオクロニーてんかん JME

## 1. 研究開始当初の背景

(引用参考文献のうち申請者らが発表したものを太字とした)

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、白人の若年性欠神てんかん、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多くがイオンチャンネルをコードしているが、*EFHC1* はイオンチャンネルをコードしない機能未知のタンパクミオクロニン1をコードしている。ミオクロニン1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* ノックアウトマウスを作製・解析し、ノックアウト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) 20790866 平成20年度~21年度の研究成果)。さらに、ノックアウト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)。さらに未発表・予備データとして申請者は、*Efhc1*-floxed マウスを作製し、脳室の内壁を覆う上皮細胞で 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との交配で得た *Efhc1* コンディショナルノックアウトマウス (cKO) を解析することで、脳室の内壁を覆う上皮細胞におけるミオクロニン1発現の消失が PTZ 誘導性のけいれん発作を誘発するが自然誘発的なミオクロニー発作は誘発しないという結果を得ている (科学研究費補助金 基盤 (C) 24591689 平成24年度~26年度の研究成果)。一方で、ベルギーのグループは、ミオクロニン1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ている (de Nijs *et al.*, 2009)。これらのことから、発達期の神経細胞におけるミオクロニン1発現変化によるてんかん発症の可能性もあり、現在 *EFHC1* 変異が引き起こすてんかん発症メカニズムは不明である。また、申請者は、抑制性神経細胞数の変化を *Efhc1* 欠損マウスの線条体で発見している (未発表・予備データ)。線条体は、大脳基底核を構成する核 (線条体、淡蒼球、視床下核、黒質) の一つで、ハンチントン病やパーキンソン病などの疾患の主症状である運動異常 (運動の過剰によるジスキネジア、ミオクローヌスなどの不随意運動や、その逆の運動量の低下) に関

わる重要な領域であることから、*Efhc1* 変異により引き起こされるミオクロニー発作およびてんかん発作の発生メカニズムの解明において非常に興味深い領域である。線条体の抑制性神経細胞数の変化が及ぼす自然誘発的なミオクロニー発作および PTZ 誘導性のけいれん発作への影響について、*Efhc1*-floxed マウスと Cre リコンビナーゼを発現する rAAV を用いて結果を得つつある(科学研究費補助金 基盤 (C) 16K10199 平成 28 年度~30 年度の研究)。さらに最近申請者は、共同筆頭著者として腸管細胞キナーゼをコードする *CILK1* 遺伝子の変異を複数の JME 家系から発見し報告した(Bailey JN+, de Nijis L+, Bai D+, Suzuki T+, *et al.* (+:共同筆頭著者) *New England Journal of Medicine*, 2018)。*CILK1* の変異は JME 患者の 7%に見出され、これらの変異が神経前駆細胞の移動を阻害すること、*Cilk1*-KO マウスがイソフルランによる麻酔の傾眠時に強直間代発作を引き起こすことなどを明らかにした。ミオクロニン 1 と腸管細胞キナーゼは共に微小管を介した繊毛や神経細胞増殖・分化・細胞死に関わる機能を持っていることから、これらタンパクをコードする遺伝子の異常が共通のメカニズムを通して、てんかん発作を引き起こしていると想定されるが、この発症メカニズムの解明にはさらなる検討が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Efhc1*-KO のてんかん発作の発症に関わる細胞群を同定し、その細胞の変化がてんかん病態とどのように係わっているのかを検証する。また、同時に、*Efhc1*-KO マウスについても *Cilk1*-KO マウスで観察されているのと同様なてんかん発作などを示すかどうかを検討し、新たなてんかん発症機序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

- (1) *Efhc1*-KO マウスが *Cilk1*-KO マウスで観察されたイソフルラン誘導性の強直間代発作を引き起こすかどうかを検討する。
- (2) *Cilk1*-KO マウスが *Efhc1* 遺伝子を全身で欠損させたマウスで観察される自然誘発性のミオクロニー発作や線条体において抑制性神経細胞数の変化を示すかどうかを評価する。また、脳室上衣細胞のみで *Efhc1* 遺伝子を欠損させたマウスが *Efhc1* 遺伝子を全身で欠損させたマウスで観察される線条体での抑制性神経細胞数の変化を示すかどうかを評価する。
- (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、野生型マウスもしくは *Efhc1* ノックアウトマウスにおける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、自然誘発性ミオクロニー発作が再現もしくは改善するかどうかなどを検討する。*Cilk1*-KO マウスについても同様の検討を行う。

## 4. 研究成果

*Efhc1*-KO マウスが *Cilk1*-KO マウスで観察されたイソフルラン誘導性の強直間代発作を引き起こすかどうかを検証するために、*Efhc1*-KO マウスのイソフルランに対する痙攣発作閾値を対照群と比較検討した。けいれん感受性の評価は我々の既報に従い、けいれん誘発剤投与から発作が観察されるまでの時間および痙攣の種類を観察し、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、*Efhc1*-KO のイソフルラン誘導性の痙攣に対する感受性に関し結果を蓄積しつつある。次に、脳室上衣細胞のみで *Efhc1* を喪失させたマウスにおいても *Efhc1* を全身で喪失させたマウスで観察される線条体での抑制性神経細胞数の変化を示すかどうかを評価した。全身性の *Efhc1*-KO マウスと脳室上衣細胞のみで *Efhc1* を喪失させたマウスとの間で抑制性神経細胞数の変化を見出しているが使用動物数が少ないため、引き続き動物数を増やして検討する必要がある。また、DREADD を使用した検討については、痙攣感受性について結果を蓄積しつつある。さらに、*Efhc1* のコードするタンパク myoclonin1 の発現は脳室内壁を覆う運動性繊毛を有する細胞で観察されると我々を含む複数の報告がある一方で、神経細胞においても発現しているとの報告もあり、myoclonin1 の神経細胞での発現には議論の余地が残されていた。そこで我々の作成したマウスモノクローナル抗体 (6A3-mAb) およびホモ接合性 *Efhc1*-KO マウスを使用し、神経細胞における発現を検討した結果、myoclonin1 が運動性繊毛でのみ発現し、神経細胞および細胞分裂装置では発現していないことを見出し、その成果を学術論文で報告した(Suzuki *et al.*, *Scientific Reports*, 2020)。この結果は、JME が運動性繊毛関連疾患である可能性を示唆している。

<引用文献>

- Annesi F. *et al.* (2007) Mutational analysis of EFHC1 gene in Italian families with Juvenile Myoclonic Epilepsy. *Epilepsia* 48: 1686-1690.
- Bailey J.N., de Nijis L., Bai D., Suzuki T., *et al.*, (+: co-first authors) (2018) Variant Intestinal-Cell Kinase in Juvenile Myoclonic Epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 378:1018-1028.
- de Nijis L. *et al.*, (2009) EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. *Nat. Neurosci.* 2009 Oct;12(10):1266-74
- Ikeda T. *et al.*, (2005) The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Lett.* 579:819-822.
- Ma S. *et al.*, (2006) Mutations in the GABRA1 and EFHC1 genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res.* 71(2-3):129-134.
- Medina M.T., Suzuki T. *et al.*, (2008) Novel mutations in myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* 70:2137-2144.
- Stogmann E. *et al.*, (2006) Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology* 67:2029-2031.
- Suzuki T. *et al.* (2004) Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* 36:842-849.
- Suzuki 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. *et al.*, (2009) Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. *Hum. Mol. Genet.* 18:1099-1109.
- Suzuki T., *et al.*, (2020) Epilepsy protein Efhc1/myoclonin1 is expressed in cells with motile cilia but not in neurons or mitotic apparatuses in brain. *Sci. Rep.*10:22076.

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<br>Suzuki Toshimitsu, Inoue Ikuyo, Yamakawa Kazuhiro   | 4. 巻<br>10      |
| 2. 論文標題<br>Epilepsy protein Efhc1/myoclonin1 is expressed in cells with motile cilia but not in neurons or mitotic apparatuses in brain | 5. 発行年<br>2020年 |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-020-79202-4   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Suzuki T., Inoue I., and Yamakawa K.  |
| 2. 発表標題<br>Juvenile myoclonic epilepsy responsible protein is expressed in cells with motile cilia but not in neurons. |
| 3. 学会等名<br>第54回 日本てんかん学会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Suzuki T., and Yamakawa K.   |
| 2. 発表標題<br>Myoclonin1 deficiency in ependymal cells increases seizure susceptibility. |
| 3. 学会等名<br>第43回神経科学学会   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|