

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20240042

研究課題名（和文） ラットてんかん発作における遺伝的素因の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the genetic factors in rat epileptic seizures

研究代表者：芹川 忠夫 (SERIKAWA TADAO)
京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：30025655

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：てんかん、ラット、疾患モデル、原因遺伝子、NER、コンジュニック系統、遺伝解析、BAC クローン

1. 研究計画の概要

てんかん患者は全人口の 1～2%と推定されている。てんかんを原因によって分類すると、その約 8 割は原因不明な「特発性てんかん」と言われており、残りは、脳の外傷、腫瘍、脳形成異常、変性疾患などによる脳の器質的な病変に起因する「症候性てんかん」である。臨床では一部に外科的手術もなされるが、主には、てんかん発作を抑制する薬による対症療法がなされている。多くの場合、抗てんかん薬を長期間服用し続けざるを得ないので、患者は副作用、妊娠・出産の不安、社会生活の制限など深刻な問題を抱えている。それゆえ、副作用のない優れた抗てんかん薬の開発および根治的な治療法が開発が強く求められている。この究極の目標を達成するには、臨床研究に加えて、遺伝と環境を厳格に統御できるラットを用いたてんかん研究が必須である。強直間代発作(GTC)を自然発症するてんかんモデルラット NER は、脳に器質的な病変がなく、未知の複数の遺伝子変異の関与が推定されている。よって、NER は、ラットにおける「特発性てんかん」として位置づけられる。また、「特発性てんかん」や頭痛に関与する遺伝子の一つとして、ナトリウムチャンネル遺伝子 SCN1A の変異が取り上げられている。この中には、熱性けいれんプラスの患者に SCN1A のチャンネルポア構造部位をコードしている領域にアミノ酸置換を伴う変異が見つけられている。我々は、これとほぼ同じ部位に同様のアミノ酸置換変異をもつラットを、ENU 誘発突然変異個体群の遺伝子スクリーニングから樹立した。本研究の目的は、1) NER における GTC に関与する複数の原因遺伝子を明らかにする

こと、また、2) F344 に NER のてんかん感受性遺伝子と Scn1a 遺伝子変異を共に導入して、自発性の GTC が生じるかどうかを調べることから、ラットモデルにおけるてんかん発作の遺伝素因を明らかにし、ヒトのてんかんの予防と治療に新たな切り口を提示することにある。

2. 研究の進捗状況

NER 系統の自発性の強直間代発作(GTC)に關与する遺伝子の存在領域は、(F344 x NER)F1 x NER の戻し交雑子の GTC 発症時期を指標にした量的遺伝解析により、第 1 染色体上の Ner1 と第 5 染色体上の Ner3 が強く關与していることを明らかにした。そこで、NER 系統を背景して、Ner1 あるいは Ner3 の 1 ヶ所を、GTC を発症しない F344 系統との交配によって置き換えたコンジュニック系統、および Ner1 と Ner3 の 2 ヶ所を共に置き換えたダブルコンジュニック系統を作製した。Ner1 あるいは Ner3 の 1 ヶ所のみを置き換えたコンジュニック系統では GTC を抑制しなかったが、ダブルコンジュニックにおいては抑制した。次いで、その置換え領域を共に狭めた複数ラインを作製して GTC の発症形質を調べ、結果として、GTC 抑制系のダブルコンジュニックを確立することができた。今後、GTC 発症系の NER と、この GTC 抑制系のダブルコンジュニック系統を用いて、全遺伝子 DNA チップによる脳各部位の遺伝子発現の解析を行う。そして、狭められた Ner1 と Ner3 領域において遺伝子発現が両系統において異なる遺伝子を、GTC 発症の候補遺伝子として抽出して、それらの遺伝子機能を解析する。ENU ミュータジェネ

シスにて開発した F344-Scn1a 遺伝子変異ラットと、新たに作製した F344-Ner1, Ner3, Scn1a ラットは、共に自発性の GTC は生じなかった。しかし、両系統において、顕著な熱性けいれんが誘発され、F344-Ner1, Ner3, Scn1a ラットは、F344-Scn1a に比べてその感受性が高いことが明らかになった。SCN1A 遺伝子変異をもつヒトにおいて、必ずしも熱性けいれんの感受性が一様でないことが知られている。Ner1 と Ner3 領域のてんかん関連遺伝子の同定は、ヒトのてんかん発症機構の理解を、より深めるものとして期待される。

3. 現在までの達成度

NER における GTC の発症が、主に Ner1 と Ner3 と名付けた 2 つの遺伝子によって、ほぼ決定されることが、ダブルコンジュニクラットの作製とその行動観察から明らかになってきた。本研究においては、GTC 抑制系のコンジュニクラットを開発することが大きな課題であった。これを達成することができたので、ほぼ 8 割の達成度と評価している。

4. 今後の研究の推進方策

GTC 発症系の NER と GTC 抑制系のダブルコンジュニクの比較研究を推進して、Ner1 と Ner3 の責任遺伝子を同定する。これには、遺伝子発現解析とゲノム解析を通じて、候補遺伝子を抽出することが可能であろう。抽出した遺伝子の NER と F344 における塩基配列を読み取り、両者での相違を明らかにする。次いで、Ner1 と Ner3 のそれぞれの候補遺伝子の中枢神経系における発現部位を明らかにして、各々の遺伝子がてんかん発作発症に如何に関与するかを、単独作用、および、相互作用について検討して、NER における自発性てんかん発作の遺伝的素因を明らかにする。さらに、これらの候補遺伝子が Scn1a 遺伝子変異によるてんかん発作の感受性を高めることに、どのように作用しているかを考察する。

5. 代表的な研究成果

(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 20 件)

① Mashimo T, Ohmori I, Ouchida M, Ohno Y, Tsurumi T, Miki T, Wakamori M, Ishihara S, Yoshida T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Sasa M, Mori Y, Serikawa T. A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Nav1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats. *J Neurosci*, 30,

(2010) 5744-5753 査読有

② Ohno Y, Ishihara S, Terada R, Serikawa T, Sasa M. Antiepileptogenic and anticonvulsive actions of levetiracetam in a pentylenetetrazole kindling model. *Epilepsy Res* 89 (2010) 360-364 査読有

③ Ishimaru Y, Chiba S, Serikawa T, Sasa M, Inaba H, Tamura Y, Ishimoto T, Takasaki H, Sakamoto K, Yamaguchi K. Effects of levetiracetam on hippocampal kindling in Noda epileptic rats. *Brain Res*. 1309 (2010) 104-109 査読有

④ Ohno Y, Ishihara S, Terada R, Kikuta M, Sofue N, Kawai Y, Serikawa T, Sasa M. Preferential increase in the hippocampal synaptic vesicle protein 2A (SV2A) by pentylenetetrazole kindling. *Biochem Biophys Res Commun*. 390 (2009) 415-420 査読有

⑤ Ohno Y, Shimizu S, Harada Y, Morishita M, Ishihara S, Kumafuji K, Sasa M, Serikawa T. Regional expression of Fos-like immunoreactivity following seizures in Noda epileptic rat (NER). *Epilepsy Res*. 87 (2009) 70-76 査読有

[学会発表] (計 22 件)

① 原田悠耶、清水佐紀、石原静、芹川忠夫、熊藤健太、笹 征史、大野行弘 自発性てんかんモデル NER (Noda epileptic rat) における脳内 Fos 発現解析 第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日~14 日、京都市

② 中西 聡、熊藤健太、山崎賢一、Birger Voigt、庫本高志、芹川忠夫 てんかん感受性遺伝子を同定するための NER コンジュニク系の作製 第 56 回日本実験動物学会、平成 21 年 5 月 14 日~16 日、さいたま市

③ 真下知士、大守伊織、大内田守、大野行弘、鶴見東志子、三木崇史、若森実、森泰生、芹川忠夫 熱刺激誘発けいれん感受性ラットの開発：新たな熱性けいれんモデルとして *Neuro2009* (第 32 回日本神経科学大会)、平成 21 年 9 月 16 日、名古屋

[図書] (計 1 件)

小畑裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通 (編集)、*生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール*、(株) エル・アイ・シー、2011