

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591361

研究課題名 (和文) 夜間前頭葉てんかんの治療法の確立：てんかん抑制機構の分子病態
解明研究課題名 (英文) Establishment of preventive strategies for nocturnal frontal lobe
epilepsy - Elucidation of molecular mechanism to inhibit epileptic
seizures

研究代表者

森 文秋 (MORI FUMIAKI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60200383

研究成果の概要 (和文)：ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかん (ADNFLE) で見いだされた、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ サブユニットをコードする *CHRNA4* 遺伝子の S284L 変異に相同する、ラット *Chrna4* 変異遺伝子を導入した遺伝子組換えラットを用いて解析した。睡眠-覚醒リズムに伴う発作焦点領域の神経伝達機能の変化が、S284L 変異型 $\alpha 4$ nAChR 機能変異との相互作用によって、睡眠誘発性の ADNFLE 発作を発現する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Mutations of genes encoding $\alpha 4$, $\beta 2$ or $\alpha 2$ subunits (*CHRNA4*, *CHRNA2* or *CHRNA2*, respectively), of neuronal nicotinic acetylcholine (ACh) receptor (nAChR) cause nocturnal frontal lobe epilepsy (NFLE) in human. NFLE-related seizures are seen exclusively during sleep and characterized by three distinct seizure phenotypes; "paroxysmal arousals", "paroxysmal dystonia" and "episodic wandering". We generated transgenic rat strains that harbor a missense mutation S284L, which had been identified in *CHRNA4* in NFLE. The transgenic rats were free of biological abnormalities, such as dysmorphology in the central nervous system, and behavioral abnormalities. The mRNA level of the transgene (mutant *Chrna4*) was similar to the wild-type and no distorted expression was detected in the brain. However, the transgenic rats showed epileptic seizure phenotypes during slow wave sleep (SWS) similar to those in NFLE exhibiting three characteristic seizure phenotypes and thus fulfilled the diagnostic criteria of human NFLE. The therapeutic response of these rats to conventional antiepileptic drugs also resembled that of NFLE patients with the S284L mutation. The rats exhibited two major abnormalities in neurotransmission; 1) Attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and 2) abnormal glutamate release during SWS. The currently available genetically engineered animal models of epilepsy are limited to mice, thus, our transgenic rats offer another dimension to the epilepsy research field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神薬理学、夜間前頭葉てんかん、遺伝子変異モデル、ラット、ニコチン性アセチルコリン受容体

1. 研究開始当初の背景

てんかんは人口の約1%が罹患する最も頻度の高い神経疾患である。現在のてんかん治療は、てんかん原性を獲得した患者が複数回のてんかん発作を経験した場合に、発作頻度の減少を目的に抗けいれん薬を用いる薬物療法が第一選択として推奨されている。つまり、現有の治療法はてんかんの病因そのものを標的とした“抗てんかん薬による根治的治療”ではなく、“抗けいれん薬を用いた発作頻度の低下”を目的としたものであり、てんかん発作による中枢神経系の二次的な損傷の進展を防止する治療にすぎない。てんかん患者とてんかん治療に携わる医療者は、根治的てんかん治療を達成しうる新たな治療法の開発と実用化を望んでいる。

本研究計画では、根治的てんかんの治療を達成しうる“真の抗てんかん薬の開発”を目標とし、その開発に必要な研究の方向性を以下の如く設定した。真の抗てんかん薬の開発には、分子生物学的／神経科学的なてんかん病態の解明が必要であり、従来のけいれんモデル動物ではなく、ヒトのてんかん病態を獲得した真のてんかんモデル動物を用いた分子病態の解明が必要である。しかし、過去10年間で特発性てんかんの責任遺伝子が多数同定されたが、これらの変異遺伝子が如何なる機序を介して、てんかん病態に関わるのか、換言すれば、「てんかん焦点の形成」ならびに「てんかん焦点からの過剰放電伝播」の病態メカニズムは明らかにされていない。

NFLEは、孤発性(sNFLE)と優性遺伝するADNFLEに分類されるが、表現系と病態は単一疾患であると推測され、睡眠第II/III相に前頭葉を焦点とする運動発作、或いは発作の伝播に前頭葉がenhancerとして関与していると考えられている。申請者らは、本邦のADNFLE家系から、ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha 4$ サブユニットをコードするCHRNA4遺伝子のS284L変異を同定したが、このS284L遺伝子変異は、極東・中近東・欧州のADNFLE家系で発見され、さらにsNFLEでも発見されるなど、ADNFLE/sNFLEの分子病態として最も主要な変異である可能性が高い。そのような状況の中、研究代表者らはヒトCHRNA4のS284L変異に相同する変異を有するラットChrna4遺伝子を導入した遺伝子改変モデルラット(S284L-TG)の作出に成功した。S284L-TGはヒトADNFLE/sNFLEの主要発作型のnocturnal paroxysmal arousal、nocturnal paroxysmal dystonia、episodic nocturnal wanderingを獲得し、抗けいれん薬に対する感受性もS284L変異を有する

ADNFLE/sNFLE患者と同等である。つまり、この遺伝子改変ラットはADNFLE/sNFLEのモデル動物として、表現的・構造的・予測的な妥当性が保証され、世界初の機能性中枢神経系疾患のモデル動物であることが証明されたと言える。S284L-TGのinterictal dischargeは6週齢から、ictal dischargeは8週齢から発現しており、年齢依存性のmRNA・タンパク質の発現変化と神経伝達機能の変異を解析することで、従来の基礎てんかん学では明らかに出来なかった、“epileptogenesis”(発作焦点形成開始と発達過程)ならびに“ictogenesis”(焦点部位の過剰放電の開始と伝播過程)の病態解析が可能である。

近年、特発性てんかんはチャネル病であるという仮説が支持されている。しかしながら、この仮説に基づいて作製されたADNFLE(S280LとinsL)ならびに人工的なL9'A mutationで同定された変異(L283A、この変異はADNFLEならびにsNFLE患者では同定されていない)に対応するChrna4のmutationを有するノックインマウス[Fonk C et al (2005), Glykys J et al (2005), Klaassen A et al (2004)]は、けいれん感受性亢進を獲得しているが、てんかんの分子病態として重要なepileptogenesisを獲得していないのでNFLEの病態を反映しているとは言い難く、モデル動物として不適格である。一方、研究代表者らが作出したS284L-TGラットはヒトてんかんと同質のepileptogenesisを獲得した唯一のヒトてんかん遺伝子導入ラットである。しかも、マウスでなくラットを用いたことにより、発作焦点の解析やマイクロダイアリースを用いた神経化学的な解析にも信頼性が高い。さらに、てんかん発作と変異神経細胞との対応や薬物による治療効果の判定にも本モデル動物は有用である。つまり、本研究は、S284L-TGラットの特性を十分に生かしたもので、ADNFLEならびにsNFLEの病態解明に通じるとともに、その予防的治療の戦略を提示できる優先性の高い研究のひとつである。

2. 研究の目的

- (1) てんかん発症前後に発現変動する遺伝子(てんかん病態候補遺伝子)のスクリーニングを行い、てんかん病態候補遺伝子の経時的ならびに脳内分布変動を検証する。
- (2) NFLE病態に関与する遺伝子及びタンパク質の三次元的病態カスケードを明らかにする。
- (3) 遺伝子およびタンパク質の機能変異/発

現変異を制御（補正）する薬剤による予防的治療法の基本的ストラテジーを提示する。

(4) この予防的治療法の分子機構を明らかにする。

以上により、てんかんの予防的治療法の臨床的応用に向けた基礎データの確立をめざす。

3. 研究の方法

1) てんかんの分子病態検索

1-1) てんかん発症前後に変動する mRNA のスクリーニング

1-2) てんかん発症前後に変動する遺伝子の定量

1-3) てんかん発症前後に変動する遺伝子の脳内分布の検討

1-4) てんかん発症前後に変動するタンパク質の発現量の変化の検討

1-5) てんかん発症前後に変動するタンパク質の脳内分布の検討

2) てんかんの神経科学的病態検索

2-1) in vitro での神経伝達機能変異の解析

2-2) in vivo での神経伝達機能変異の解析

3) 予防治療のための低分子化合物（薬剤）の選定

1) および 2) で得られた分子生物学的な変異と神経科学的変異を、wild-type と S284L-TG で比較検討し、ADNFLE/sNFLE の病態カスケードを立案し、仮説的病態カスケードに従ったてんかん原性機構の発生防止を標的とした低分子化合物の選定を行う

4) 選定した低分子化合物の効果判定

4-1) in vitro での神経伝達機能

4-2) けいれん発作モニタリング（行動観察と脳波記録）

5) てんかん原性発達抑制の分子機構の解析

4) で検証された、てんかん発現抑制効果を有する低分子化合物の分子生物学的／神経科学的機構を明らかにすることで、より合理的なてんかん抑制薬のゲノム創薬の開発ストラテジーを構築する。

5-1) てんかん抑制機序の分子生物学的解析

てんかんの完全抑制可能な低分子化合物を“てんかん防止薬”として、その薬理学的標的のスクリーニングを、マイクロアレイ、Real-time PCR、Western blotting で行い、標的分子の絞り込みを行う。

5-2) てんかん抑制の標的部位の確定

5-1) のスクリーニングで明らかにされ

た、低分子化合物投与によって発現が増加・減少した分子の、てんかん防止標的分子群の神経回路内における標的部位の確定を行う
目的で、In situ hybridization 及び免疫組織化学により部位特異性を検討する。

5-3) in vitro での神経伝達機能変異の解析

てんかん抑制ラットの前頭皮質の 350 μ m 厚切片を作製し、64 チャンネル細胞外電位測定電極を有する MED プローブ上に設置し、皮質内興奮性伝播と視床-皮質路の興奮性伝播を計測する（上野、右田）。同様のスライスを用い、スライスパッチクランプによる、興奮性グルタミン酸神経伝達と抑制性 GABA 伝達の機能も測定する。

5-4) in vivo での神経伝達機能変異の解析

てんかん抑制ラットを用いて in vivo microdialysis を行い、S284L-TG の興奮性伝達物質（グルタミン酸・アスパラギン酸）と抑制性神経伝達物質（GABA・モノアミン・スクレオチド）の開口分泌機構機能変異に対する、低分子化合物の機能的補正の機序を機能的側面から検証する。

6) 新たなてんかん治療法の確立

以上 1) ～ 5) の結果をふまえ、ヒトへの臨床応用に耐えうる、前臨床段階の基礎データの修得に努めると同時に、“てんかん防止薬”の候補化合物の臨床応用を実現する実績を有する製薬企業とのパートナーシップ探索も行う。

4. 研究成果

平成 20 年度：ヒトの夜間前頭葉てんかんの病態を獲得した真のてんかんモデル動物としてニコチン性アセチルコリン受容体 α 4 (nAChR alpha4) S284L 遺伝子導入 (TG) ラットならびにその対照として nAChR alpha4 S284L WT (LM) の 2, 4, 6, 8, 12 週齢を用いて、てんかん発症前後に発現変動する遺伝子（てんかん病態候補遺伝子）のスクリーニングを行い、発現変動した遺伝子の mRNA を標的とし、NGF, BDNF, NT3, KCC, KCC2, NKCC1, c-Fos, Ntf5, Ntrk1, Ntrk2, Ntrk3, Ngfr, Alpha-synuclein, nAChR alpha4 (wild), nAChR alpha4 (mutant) の cDNA を用いて in situ hybridization を行った。夜間前頭葉てんかんの発現に関連する脳部位である前頭葉ならびに視床においていくつかの遺伝子について変動が認められた。

平成 21 年度：平成 20 年度の研究計画で得られた分子生物学的な変異と神経科学的変異を、wild-type と S284L-TG で比較検討し、ADNFLE/sNFLE の病態カスケードを立案し、仮説的病態カスケードに従ったてんかん原性機構の発生防止を標的とした低分子化合物の選定を行った。この薬剤（未発表のため薬剤名は記載しない）を用い、ヒトの夜間前頭

葉てんかんの病態を獲得した真のてんかんモデル動物としてニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ (nAChR $\alpha 4$) S284L 遺伝子導入(TG)ラットならびにその対照として nAChR $\alpha 4$ S284L WT (LM) の 8, 10, 12 週齢に対して、効果判定を行った。in vitro での神経伝達機能変異の解析 (パッチクランプ法)、けいれん発作モニタリング (行動観察と脳波記録) を実施したところ、けいれん発作の抑制が認められた。薬剤の投与量、時期、期間をさらに調整していくことにより、てんかん原性を完全抑制の可能であることが示唆された。

平成 22 年度：平成 20 および 21 年度の研究で得られた、てんかん原性機構の発生防止を標的とした薬剤 (未発表のため薬剤名は記載しない) を用いて、ヒトの夜間前頭葉てんかんの病態を獲得した真のてんかんモデル動物としてニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ (nAChR $\alpha 4$) S284L 遺伝子導入(TG)ラットならびにその対照として nAChR $\alpha 4$ S284L WT (LM) の 8, 10, 12 週齢に対して、in vitro での神経伝達機能変異の解析 (パッチクランプ法) 並びにてんかん発症前後に発現変動する遺伝子 (てんかん病態候補遺伝子) のスクリーニングを行い、てんかん病態候補遺伝子の経時的ならびに脳内分布変動を検証した。この薬剤がヒトへの臨床応用に耐えうる“てんかん防止薬”の候補化合物であることが示された。この成果を踏まえ“てんかん防止薬”の候補化合物の臨床応用を実現する実績を有する製薬企業とのパートナーシップを模索した。

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 1 件)

- ① Zhu G, Okada M, Yoshida S, Ueno S, Mori E, Takahara T, Saito R, Miura Y, Kishi A, Tomiyama M, Sato A, Kojima T, Fukuma G, Wakabayashi K, Hase K, Ohno H, Kijima H, Takano Y, Mitsudome A, Kaneko S, Hirose S. Rats harboring S284L Chrna4 mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype. J Neurosci 28: 12465-12476, 2008

[学会発表] (計 3 件)

- ① 森 文秋、富山誠彦、上野伸哉、吉田淑子、岡田元宏、廣瀬伸一、兼子直、若林孝一。夜間前頭葉てんかんの変異遺伝子 (S284L) 導入ラット脳におけるニコチン性アセチルコリン受容体の発現、第 43 回

- 日本てんかん学会 (弘前) 2010. 10. 22-24
② 朱 剛、岡田元宏、吉田淑子、上野伸哉、森 文秋、岸 昭宏、若林孝一、廣瀬伸一、兼子直、S284L トランスジェニックラット自発性けいれん発現機序の解明。第 43 回日本てんかん学会 (弘前) 2010. 10. 22-24
③ 上野伸哉、山田順子、右田啓介、富山誠彦、吉田淑子、岡田元宏、森 文秋、若林孝一、朱 剛、廣瀬伸一、兼子 直。ADNFLE モデルラットにおける GABA 伝達の障害機構。第 43 回日本てんかん学会 (弘前) 2010. 10. 22-24

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hippo.med.hirosaki-u.ac.jp/~neuro/p/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 文秋 (MORI FUMIAKI)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60200383

(2) 研究分担者

右田 啓介 (MIGITA KEISUKE)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10352262
上野 伸哉 (UENO SHINYA)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00312158
若林 孝一 (WAKABAYASHI KOICHI)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50240768