

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 22 日現在

機関番号：14301  
研究種目：若手研究(A)  
研究期間：平成 21 年度～平成 24 年度  
課題番号：21680037  
研究課題名（和文）：新規てんかんモデルラットの開発および分子病態解明研究  
研究課題名（英文）：Development of novel rat models for epilepsy and their molecular pathologic analysis

研究代表者：真下 知士（MASHIMO TOMOJI）  
京都大学大学院医学研究科・特定准教授（Kyoto University Graduate School of Medicine・Associate Professor）

研究者番号：80397554

## 研究成果の概要（和文）：

Phenotype-driven ENU ミュータジェネシス法により、ヒト発作性運動失調 EA1 の原因遺伝子である電位依存性カリウムチャンネル *Kcna1* にミスセンス変異を有するモデルラット、酸化ストレス遺伝子に変異を有するけいれん発作モデルラットを開発した。Gene-driven 法では、ヒト常染色体性優性外側側頭葉てんかん ADLTE の原因遺伝子 *Lgii1* 変異ラットを開発し、てんかん焦点形成機序の一端を明らかにした。てんかんモデルラットは、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」から利用可能である。

## 研究成果の概要（英文）：

By phenotype-driven ENU mutagenesis approach, we identified a S309T missense mutation in voltage-gated potassium channel, *Kcna1* gene, which was the causative gene of human Episodic ataxia type1 (EA1). We have also identified a missense mutation in the gene associated with the oxidant stress as an epileptic rat model. By gene-driven ENU mutagenesis, we have generated *Lgii1* mutant (L385R) rats as a rat model for the human autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy (ADLTE). These epileptic rats are freely available from the National Bio-Resource Project for the rat in Japan.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
平成 22 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
平成 23 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
平成 24 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
総計	20,700,000	6,210,000	26,910,000

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、ENU ミュータジェネシス、遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんの患者は全人口の約1%と推定され、約80%は発作の原因が明らかでない「特発性てんかん」、約20%は脳の外傷、異常形成、変性などによる器質的障害に起因する「症候性てんかん」に分類される。治療法は、症候性てんかんにおいては一部外科的手術がなされるが、主にはてんかん発作を抑制する薬による対処療法が取られている。しかしながら、約20-30%の患者は薬物用法に対し難治を示し、また多くの場合、抗てんかん薬を長期服用しなければならず、副作用や社会生活の制限など深刻な問題を抱えている。従って、根本的な治療法および副作用のない優れた抗てんかん薬の開発が強く望まれている。

てんかんは、その症状が患者により多種多様であり、またその誘因も取り巻く環境によって大きく異なることから非常に複雑な病気とされている。モデル動物は、遺伝素因と環境素因とを制御することができ、生理解剖学的解析や個々の神経細胞レベルにまで評価ができるため、てんかん研究には必須である。ラットは特に、脳の電気生理実験、免疫組織学検査、薬理薬効試験などに適しており、これまでもさまざまな実験誘発てんかんモデルや遺伝性てんかんラットが開発されてきた。我々の研究室でも、欠神様発作と強直性発作を自発的に高頻度に発症するSERラット (Serikawa T *et al.* *Epilepsia* 31:9-14, 1990, Kuramoto T *et al.* *PNAS* 98:559-64, 2001)、強直間代性けいれんを自然発症するNERラット (Maihara T *et al.* *Epilepsia* 41:941-9, 2000)、電位依存性カルシウムチャンネル *Cacna1a* の遺伝子変異により欠神様発作を発症するGRYラット (Tokuda *et al.* *Brain Res* 1133:168-77, 2007)

などを開発し、原因遺伝子の同定、病態生理学的解析、薬理薬効の評価系としての有用性などを示してきた。

しかしながら、ラットでは実用可能なES細胞がないため、ヒトてんかん遺伝子を標的とした遺伝子改変ラットを作製することができなかった。近年、我々はゲノムDNAに点突然変異を誘発する化学変異原 ENU (エチルニトロソウレア) を利用した ENU ミュータジェネシス法により、ラットでも標的とする遺伝子に変異を誘発することが可能なシステムを構築した (Mashimo *et al.* *Nat Genet* 40:514-5, 2008)。さらに、この ENU ミュータジェネシスを利用して、電依存性ナトリウムチャンネル *Scn1a* 遺伝子にミスセンス変異をもつラットを作製した。この *Scn1a* 変異ラットは、高温刺激 (温浴 45°C) により有意にけいれん発作が誘発されることを発見し、熱性けいれんモデルとなることを報告した (Mashimo *et al.* *J Neurosci* 30(16):5744-53, 2010)。

## 2. 研究の目的

本研究では、ENU ミュータジェネシスによりランダムに点突然変異が誘発された G1 ミュータントラット群の中から、1) **Phenotype-driven** として、ヒトてんかんに類似する表現型を有するモデルラットを確立する。2) **Gene-driven** として、ヒトてんかん遺伝子に変異を有する個体を同定し、顕微授精法により個体復元して、標的遺伝子変異ラットを作製する。

作製したてんかんモデルラットについて、それぞれ遺伝子異常を同定するとともに、遺伝子発現および遺伝子間相互作用の解析を行う。また、病理学的解析、脳波ビデオ測定、行動学的解析、および抗てんかん薬

を用いた薬理薬効評価などを行う。以上により、それぞれの遺伝子変異と病態特性との関連、ヒト疾患におけるてんかん発作発症メカニズムを解明する

### 3. 研究の方法

#### 1) Phenotype-driven ENU mutagenesis

これまでに、科学研究費補助金基盤研究 (A)「遺伝子改変技術を用いたてんかんモデルラットの開発研究」(代表: 芹川忠夫)により、ゲノム上にランダムに ENU 誘発点突然変異を有する G1 ラット 1735 頭を作製した。G1 ラットを行動異常等によりスクリーニングした結果、E0739 ラットと E1897 ラットの二つのてんかん様発作を示すラットを発見した。E0739 ラットは、生後 8 週齢頃までは外見上正常個体と見分けがつかないが、9-10 週齢頃から少しずつ“びくつき”や自発性の不随意運動を示すようになる。また、この頃から音刺激に対して驚愕反応を示す。12 週齢を超えると不随意運動が目立つようになり、前肢のけいれん、転倒、全身の強直間代性けいれんを起こす。E1897 ラットは、生後異常は見当たらないが、4-5 週齢頃に wild running/jumping および強直間代性けいれんを示す。それ以降、このけいれん様発作は消失する。これは一般的な小児良性てんかんあるいは若年ミオクロニーてんかんに類似する。これら 2 系統の遺伝性てんかんラットについて、ポジショナルクローニングにより原因遺伝子を同定する。

#### 2) Gene-driven ENU mutagenesis

上述の基盤研究 (A) では、ヒトてんかん遺伝子として報告されているナトリウムやカルシウム、GABA などのイオンチャンネル遺伝子を中心にスクリーニングを行った。これまで原因不明の特発性てんかんは

イオンチャンネルの異常によるとされてきたが、近年、LGI1 というチャンネル以外の遺伝子が同定された。LGI1 は、常染色体優性外側側頭葉てんかん (ADLTE) の原因遺伝子として発見され (Kalachikov S *et al.* Nat Genet 30:335-41, 2002)、これまで 20 家系以上で様々な挿入、欠失、置換変異が報告されている。このに LGI1 遺伝子について、標的遺伝子変異ラットを作製する。

LGI1 てんかん遺伝子について、ラット ENU ミュータントアーカイブから標的遺伝子変異ラットの作製を行う。すでに基盤研究 (A) により作製した京都大学ラット ミュータントアーカイブ (KURMA) 1,735 頭分、NEDO 産業技術研究助成事業により作製している KURMA 3,265 頭分を対象に MuT-POWER 法によりスクリーニングを行い、点突然変異を検索する。発見された変異については、顕微授精法により個体復元を行う。対応する ENU ミュータントアーカイブの凍結精子を F344/NS1c 未授精卵に注入し、Wsitar ラット偽妊娠雌に移植することにより産仔を得る。得られた産仔は、尾から DNA を抽出して LGI1 遺伝子変異を確認する。さらに、てんかん遺伝子における点突然変異以外にゲノム上に導入された変異を取り除くため、F344/NS1c 雌への戻し交配を 5 世代以上継続する。遺伝子変異ヘテロ個体同士を交配することで、ホモ個体動物を作製する。

### 4. 研究成果

Phenotype-driven および Gene-driven 二つの ENU ミュータジェネシスアプローチから、てんかんモデルラット系統の作製を行った。

#### 1) Phenotype-driven ENU mutagenesis

E0739 と E1897 の二つの自然発症てんかんラットについて、ポジショナルクローニングアプローチにより原因遺伝子の同定を

行った。E0739 系統については、ヒト Episodic ataxia type1 (EA1)の原因遺伝子である電位依存性カリウムチャネル *Kcna1* において、S309T ミスセンス変異を同定した。E0739 ラットを利用することで、S309T 変異による *Kv1.1* チャネル機能異常および個体レベルでの EA1 神経病態発症メカニズムの一端を明らかにした。

E1897 系統については、第5染色体上に約 2M-bp にまで候補領域を狭め、次世代シーケンサーによるゲノムシーケンスを実施した結果、酸化ストレスに関与する遺伝子においてアミノ酸置換を発見した。E1897 ラットは、4-5 週齢にけいれん発作を発症し、18-24 ヶ月齢に腎不全を発症した。

## 2) Gene-driven ENU mutagenesis

ヒト常染色体性優性外側側頭葉てんかん ADLTE の原因遺伝子 *LGI1* について、ENU ミュータントアーカイブ KURMA から *Lgi1* 遺伝子変異 (L385R) ラットを開発した。ヘテロ型 L385R 変異ラットは、対象 F344 系統に比べて有意に音刺激誘発けいれん感受性を示すことを発見した。この音刺激誘発けいれん感受性の発症メカニズムを解明するために、1) 海馬、大脳皮質において DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。さらに、2) 音刺激誘発けいれん後のラット脳において、神経興奮マーカーである Fos 免疫染色解析を実施することで、てんかんの焦点形成機序の一端を明らかにした。現在、これら研究成果を論文として報告するための準備をしている。

ENU ミュータジェネシスアプローチにより、最終的に3つのてんかんモデルラットを開発した。本研究により開発された3つのてんかんモデルラット：1) *Kcna1* 変異ラット、2) 酸化ストレス遺伝子変異ラット (EGR)、3) *Lgi1* 変異ラットは、ナシ

ョナルバイオリソースプロジェクト「ラット」に寄託しており、国内外の研究者が自由にてんかんモデルを使える環境を整備した。今後、これら3つのてんかんモデルラットは、ヒトてんかん発症メカニズムの解明、根本的な治療法の確立、副作用のない抗てんかん薬の開発に有用なツールになると期待される。

## 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 17 件)

1. Ishida S, Sakamoto Y, Nishio T, Baulac S, Kuwamura M, Ohno Y, Takizawa A, Kaneko S, Serikawa T, \*Mashimo T: *Kcna1*-mutant rats dominantly display myokymia, neuromyotonia and spontaneous epileptic seizures. *Brain Research* 1435: 154-66, 2012 (doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.023)
2. \*Baulac S, Ishida S, \*Mashimo T, Boillot M, Fumoto N, Kuwamura M, Ohno Y, Takizawa A, Aoto T, Ueda M, Ikeda A, Leguern E, Takahashi R, Serikawa T. A rat model for *Lgi1*-related epilepsies. *Hum Mol Genet.* 21(16): 3546-57, 2012 (doi: 10.1093/hmg/dds184)
3. Ohno Y, Ishihara S, Mashimo T, Sofue N, Shimizu S, Imaoku T, Tsurumi T, Sasa M, Serikawa T. *Scn1a* missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures. *Neurobiol Dis.* 41(2):261-9, 2011 (doi: 10.1016/j.nbd.2010.09.013)
4. Hayashi K, Ueshima S, Ouchida M, Mashimo T, Nishiki T, Sendo T, Serikawa T, Matsui H, Ohmori I. Therapy for hyperthermia-induced seizures in *Scn1a* mutant rats. *Epilepsia* 52(5): 1010-7, 2011 (doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03046.x)
5. Ohno Y, Sofue N, Ishihara S, Mashimo T, Sasa M, Serikawa T. *Scn1a* missense mutation impairs GABA(A) receptor-mediated synaptic transmission in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(1):117-22, 2010 (doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.021)
6. \*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  $Na_v1.1$  confers susceptibility to febrile seizures in rats. *J Neuroscience* 30(16):5744-5753, 2010

(doi: 10.1523/JNEUROSCI.3360-09.2010)

7. 芹川忠夫、大守伊織、大内田守、大野行弘、鶴見東志子、三木崇史、若森実、石原静、吉田卓史、滝沢明子、加藤めぐみ、平林真澄、笹征史、森泰生、真下知士：ナトリウムチャンネル遺伝子 *Scn1a* 変異ラットの開発解析研究、**てんかん治療研究振興財団** 研究年報、第 21 集、2010 (<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201102212688654898>)
8. \*Mashimo T, Serikawa T: Rat resources in biomedical research. *Curr Pharm Biotechnol.* 10(2):214-20. 2009 ([www.eurekaselect.com/68487/article](http://www.eurekaselect.com/68487/article))

[学会発表] (計 47 件)

1. 真下 知士「遺伝子改変ラットの開発研究」第 6 回ラットリソースリサーチ研究会・第 1 回実験動物科学シンポジウム、京都、2013 年 2 月 1 日
2. 真下 知士、芹川忠夫「ラットを中心とした遺伝子改変動物研究の現状」第 85 回日本生化学会大会、福岡、福岡国際会議場、2012 年 12 月 16 日
3. 麓直浩、真下知士、増井淳、水口祐登、南本翔子、石田紗恵子、池田昭夫、高橋良輔、芹川忠夫、大野行弘「LGI1 変異ラット音刺激誘発けいれんモデルにおける c-Fos 免疫染色による解析」第 8 回日本てんかん学会近畿地方会、大阪、薬業年金会館、2012 年 7 月 14 日
4. 真下知士、芹川忠夫「ラット遺伝子改変技術のめざましい進歩」第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、札幌、2011 年 9 月 6 日
5. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の開発：ENU ミュータジェネシスとジンクフィンガーヌクレアーゼ」筑波大学人間総合科学研究科医学セミナー、筑波、2010 年 12 月 17 日
6. Mashimo T: Genetically modified rat models of human epilepsy produced by a gene-targeting approach. *Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris*, Oct 25, 2010
7. 真下知士「遺伝子機能解析の新展開：ノックアウトラットの作製法」高血圧学会・高血圧関連疾患モデル学会合同シンポジウム、博多、2010 年 10 月 15 日
8. Mashimo T: Creation of Knockout Rats: A New Paradigm for Target Validation and Preclinical Development. 22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the KSMCB, Seoul, Korea, Oct 7,

2010

9. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の開発」BioJapan2010 アカデミックシリーズ発表会「京都大学」、横浜、2010 年 9 月 29 日
10. Mashimo T: Recent progress of gene-targeting technologies in rats: ENU mutagenesis and zinc finger nucleases. 14<sup>th</sup> international SHR symposium, Montreal, Canada, Sep 24, 2010
11. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術と表現型解析によるゲノム機能解析の現状」日本遺伝学会第 82 回大会、札幌、2010 年 9 月 20 日
12. 真下知士「遺伝子組み換えモデル動物作成の新技术」京都大学大学院医学研究科神経科学ミニコース、京都、2010 年 9 月 17 日
13. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の開発」京都大学「医学領域」産学連携推進機構／(社)芝蘭会 平成 22 年度第 1 回産学情報交流会、京都、2010 年 6 月 16 日
14. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Kuramoto T, Serikawa T: KURMA - Kyoto University Rat Mutant Archive. EURAT Meeting 2010, Berlin, Germany, 27<sup>th</sup> May 2010
15. 真下知士「ラットにおける遺伝子改変技術の開発」東海医学会講演会、伊勢原、2010 年 4 月 21 日
16. 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)、名古屋、2009 年 9 月 16 日
17. 真下知士、芹川忠夫「ラット ENU ミュータジェネシスプロジェクト」第 56 回日本実験動物学会総会、大宮、2009 年 5 月 15 日

[図書] (計 9 件)

1. 真下知士、芹川忠夫：ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、*細胞工学* Vol31(3), p296-301, 2012
2. 真下知士：ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラットの作製方法、生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール (モデル動物利用マニュアル) 編／小幡裕一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通、L I C、p487-493、2011
3. 真下知士、芹川忠夫：ラット：多様なニーズに応える実験動物、バイオリソース & データベース活用術 (細胞工学別冊)、

監修／ナショナルバイオリソースプロジェクト情報運営委員会、秀潤社、p146-148、2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

[http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/enu/home\\_jp.aspx](http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/enu/home_jp.aspx)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

真下 知士（特定准教授）

研究者番号：80397554

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし