

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390224

研究課題名(和文) 中枢神経系機能性疾患における病態成熟過程の解析

研究課題名(英文) Exploring the development of functional disorders in central nervous system

研究代表者

岡田 元宏 (Okada, Motohiro)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10281916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性夜間前頭葉てんかん(ADNFLE)責任遺伝子、CHRNA4 遺伝子のS284L変異に相同する、ラットChrna4変異遺伝子(S286L)とCre遺伝子を導入した、遺伝子組換えラット(S286L-TG)を作成した。このS286L-TGは、ヒトADNFLE患者と同等のてんかん発作特性を獲得しており、S286L変異がADNFLE病態の中核的役割を果たしている可能性が示唆された。しかし発症後にS286L変異Chrna4遺伝子を失活させたが、ADNFLEは改善せず、S286L変異はADNFLEのてんかん原性に深く関与するが、発作原性には影響しない可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Mutations of genes (CHRNA4, CHRNB2, or CHRNA2) of neuronal nicotinic ACh receptor (nAChR) cause autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) in human. ADNFLE-related seizures are seen exclusively during slow wave phase sleep. We generated transgenic rat strains that harbor a missense mutation S286L rat Chrna4 gene, which had been identified in CHRNA4 in ADNFLE with Cre gene (S286L-TG). S286L-TG was free of biological abnormalities, such as dysmorphology in CNS, and behavioral abnormalities. To clarify the effects of S286L mutation on epileptogenesis and ictogenesis of ADNFLE, after ADNFLE onset, S286L-TG was administered tamoxifen (Cre inducer agent). The degradation of S286L mutant Chrna4 induced by Cre did not affect ADNFLE seizures. These results suggest that S286L mutant Chrna4 gene probably plays important roles in the development of epileptogenesis, but did not affect ictogenesis.

研究分野：神経科学

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：てんかん 病態 トランスジェニックラット

### 1. 研究開始当初の背景

1995年にADNFLE家系からCHRNA4遺伝子変異(S280F)が同定され、これ以降、数多くの機能性神経精神疾患の病態に遺伝子変異が関与する可能性を示唆する研究結果が報告されてきていた。本邦でも、1999年にADNFLE日本人家系からCHRNA4のS284L変異の発見以降、多くのてんかん・熱性けいれんの責任遺伝子・感受性遺伝子が発見されてきた。特に、このS284L変異は、韓国・ポーランド・レバノンのADNFLE家系でも同様の変異が発見され、オーストラリアでは孤発性夜間前頭葉てんかん(NFLE)からも発見されるなど、ADNFLE/NFLEの責任遺伝子の中では最もメジャーな変異と考えられている。しかし、これら変異がADNFLEの病態に及ぼす機序を介して関わるのかは明かにはされていなかった。

### 2. 研究の目的

過去15年間にわたる、特発性てんかん家系調査とゲノム解析から、“てんかん”及び“熱性けいれん”で構成される発作関連性疾患の責任遺伝子と感受性遺伝子と予想される、数多くの点変異を同定してきた。しかし、これらの候補遺伝子が、いかなる機構を介して発作関連性疾患の病態に関わるかは明らかにされていない。本研究計画では、本邦で同定された、常染色体優性夜間前頭葉てんかん(ADNFLE)家系で同定された、ニコチン性アセチルコリン受容体4サブユニットをコードするCHRNA4遺伝子のS284L変異を標的とした、ADNFLE病態解析を試み、今後開発が期待される、慢性疾患に対する遺伝子治療の可能性を模索した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用動物

ヒトS284L変異型CHRNA4遺伝子に相同する、ラットS286L変異型Chrna4遺伝子とCre遺伝子を導入した、S286L-TGを作出した。本研究計画は、三重大学動物実験委員会及び三重大学組換えDNA実験安全委員会の承認を受けて、これら委員会の策定する指針に従い実験を行った。

#### (2) 脳波解析(発作焦点解析)

発作焦点解析には、1.8%イソフルレン麻酔下で、twisted bipolar stainless steel wire electrodesを、sensorimotor cortex (A=2.0 mm, L=4.0 mm, V=1.8 mm relative to bregma)、basolateral amygdala (A=2.8 mm, L=5.0 mm, V=7.5 mm)、ventrolateral thalamic nucleus (A=2.3 mm, L=1.8 mm, V=5.4 mm)に挿入した。

#### (3) 睡眠覚醒リズムと発作発現解析

1.8%イソフルレン麻酔下で、I-typeマイクロダイアリースプロブをsensorimotor cortex (A=2.0 mm, L=4.0 mm, V=1.8 mm relative to bregma)に挿入した。同時にビ

ス電極を前頭葉と後頭葉に挿入し、radiotelemetry unit (UniMec 1000TE-10202, Unimec, Tokyo, Japan)に接続した。脳波は、receiver unit (UniMec ITE1000R, Unimec)で受信し、NOTOCORD-hem system (Primetech, Tokyo, Japan)でアナログ信号をデジタル化し解析を行った(9-11)。

(4) S286L変異型Chrna4遺伝子失活のADNFLE発作に対する効果  
生殖可能週齢以降にADNFLE発作を呈したS286L-TGに対し、Cre誘導薬であるタモキシフェンを慢性投与し、S286L変異型Chrna4遺伝子を失活させたのち、脳波解析を行い、発作発現頻度の変化を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) S286L-TGの生物学的特性

中枢神経系における形態学的変異、行動変異は認められなかった  
発達過程の偏倚も野生型と比較し大きな変化を検出できなかった。  
生殖能力も野生型と比較し大きな変化は検出できなかった。

#### (2) てんかん発作特性

6週齢以降に前頭葉を焦点とする、interictal dischargeが観察され、生殖可能週齢である8週齢以降ictal dischargeが観察された。  
S286L-TGのADNFLE発作は、ヒトS284L変異型CHRNA4遺伝子を保有するADNFLE患者と同等の抗てんかん薬感受性を獲得していた。

#### (3) ADNFLE病態におけるS286L変異型Chrna4遺伝子

8週齢以降にタモキシフェン(Cre誘導薬)を慢性投与し、タモキシフェンのS286L-TGの前頭葉を焦点とする、ictal dischargeおよびinterictal dischargeの発現頻度に対する効果を脳波解析により検討した。  
タモキシフェン投与後もADNFLE発作頻度に変化はなく、S286L変異型Chrna4は、少なくとも、ADNFLE発症後におけるictogenesisに対する影響は非常に軽微である可能性が示された。  
一方、S286L変異型Chrna4遺伝子導入が、相同するヒトS284L変異型CHRNA4を有するADNFLE患者同様の発作徴候を有することから、てんかん原生発達に対しては大きな役割をはたしてはいる可能性が示された。

本研究結果から、少なくとも家族性てんかん家系から同定された変異遺伝子は、家族性てんかんの分子病態における、てんかん発症前段階の病態成熟過程における中核的役割を

果たしていると考えられるが、発症後の発作発現機序に対する影響は軽微であり、発症後の治療標的としては合理的ではない可能性が示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

[全て査読あり]

Fukuyama, K., Tanahashi, S., Hoshikawa, M., Shinagawa, R., Okada, M., 2014. Zonisamide regulates basal ganglia transmission via astroglial kynurenine pathway. *Neuropharmacology* 76 Pt A, 137-145(10.1016/j.neuropharm.2013.08.002)

Ishii, A., Kanaumi, T., Sohda, M., Misumi, Y., Zhang, B., Kakinuma, N., Haga, Y., Watanabe, K., Takeda, S., Okada, M., Ueno, S., Kaneko, S., Takashima, S., Hirose, S., 2014. Association of nonsense mutation in GABRG2 with abnormal trafficking of GABA receptors in severe epilepsy. *Epilepsy Res*, 420-432(10.1016/j.epilepsyres.2013.12.005)

Konishi, Y., Tani, H., Otowa, T., Sasaki, T., Tochigi, M., Uekage, T., Motomura, E., Shiroyama, T., Kaiya, H., Okazaki, Y., Okada, M., 2014. Genexgender interaction of BDNF and COMT genotypes associated with panic disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 51C, 119-125 (10.1016/j.pnpbp.2014.01.020)

Fukuyama, K., Tanahashi, S., Haraguchi, T., Nakagawa, M., Shiroyama, T., Motomura, E., Okada, M., 2013. Differential mechanisms underlie the regulation of serotonergic transmission in the dorsal and median raphe nuclei by mirtazapine: a dual probe microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)* 229, 617-626(10.1007/s00213-013-3122-9)

Yamamura, S., Hoshikawa, M., Kato, D., Saito, H., Suzuki, N., Niwa, O., Okada, M., 2013. ONO-2506 inhibits spike-wave discharges in a genetic animal model without affecting traditional convulsive tests via gliotransmission regulation. *Br J Pharmacol* 168, 1088-1100(10.1111/j.1476-5381.2012.02132.x)

Fukuyama, K., Tanahashi, S., Nakagawa, M., Yamamura, S., Motomura, E., Shiroyama, T., Tani, H., Okada, M., 2012. Levetiracetam

inhibits neurotransmitter release associated with CICR. *Neurosci Lett* 518, 69-74(S0304-3940(12)00440-5 [pii]10.1016/j.neulet.2012.03.056)

Hara, N., Nishimura, Y., Yokoyama, C., Inoue, K., Nishida, A., Tani, H., Okada, M., Kaiya, H., Okazaki, Y., 2012. The development of agoraphobia is associated with the symptoms and location of a patient's first panic attack. *Biopsychosoc Med* 6, 12(1751-0759-6-12 [pii]10.1186/1751-0759-6-12)

Motomura, E., Inui, K., Choyama, K., Nishimura, Y., Nakagawa, M., Maeda, M., Matsushima, N., Ushiro, K., Suzuki, D., Kakigi, R., Okada, M., 2012. Electroencephalographic dipole source modeling of frontal intermittent rhythmic delta activity. *Neuropsychobiology* 65, 103-108(000330011 [pii]10.1159/000330011)

Motomura, E., Tani, H., Usami, A., Choyama, K., Nakagawa, M., Okada, M., 2012. Lamotrigine-induced neuroleptic malignant syndrome under risperidone treatment: a case report. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 24, E38-39(1214012 [pii]10.1176/appi.neuropsych.11040093)

Nakagawa, M., Yamamura, S., Motomura, E., Tani, H., Okada, M., 2012. Combination Therapy of Zonisamide With Aripiprazole on ECT- and Benzodiazepine-Resistant Periodic Catatonia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 24, E9-10(1214012 [pii]10.1176/appi.neuropsych.11040093)

Choyama, K., Motomura, E., Inui, K., Nishihara, M., Otsuru, N., Oi, M., Kakigi, R., Okada, M., 2012. Memory-based pre-attentive auditory N1 elicited by sound movement. *Neurosci Res* 73, 248-251(S0168-0102(12)00078-8 [pii]10.1016/j.neures.2012.04.003)

Saito, Y., Inoue, T., Zhu, G., Kimura, N., Okada, M., Nishimura, M., Kimura, N., Murayama, S., Kaneko, S., Shigemoto, R., Imoto, K., Suzuki, T., 2012. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and Abeta generation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* 7, doi:10.1186/1750-1326-1187-1150 (S0304-3940(12)00440-5 [pii]10.1016/j.neulet.2012.03.056)

Tanahashi, S., Ueda, Y., Nakajima, A., Yamamura, S., Nagase, H., Okada, M., 2012. Novel

delta1-receptor agonist KNT-127 increases the release of dopamine and L-glutamate in the striatum, nucleus accumbens and median pre-frontal cortex. *Neuropharmacology* 62, 2057-2067(S0028-3908(12)00017-2 [pii]10.1016/j.neuropharm.2012.01.005)

Tanahashi, S., Yamamura, S., Nakagawa, M., Motomura, E., Okada, M., 2012. Effect of lamotrigine and carbarazepine on corticotropin-releasing factor-associated serotonergic transmission in rat dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)* 220, 599-610(10.1007/s00213-011-2506-y)

Tanahashi, S., Yamamura, S., Nakagawa, M., Motomura, E., Okada, M., 2012. Dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptors mediate the actions of aripiprazole in mesocortical and mesoaccumbens transmission. *Neuropharmacology* 62, 765-774(S0028-3908(11)00364-9 [pii] 10.1016/j.neuropharm.2011.08.031)

Tanahashi, S., Yamamura, S., Nakagawa, M., Motomura, E., Okada, M., 2012. Clozapine, but not haloperidol, enhances glial D-serine and L-glutamate release in rat frontal cortex and primary cultured astrocytes. *Br J Pharmacol* 165, 1543-1555(10.1111/j.1476-5381.2011.01638.x)

Zhu, G., Yoshida, S., Migita, K., Yamada, J., Mori, F., Tomiyama, M., Wakabayashi, K., Kaneratsu, T., Hirata, M., Kaneko, S., Ueno, S., Okada, M., 2012. Dysfunction of extrasynaptic GABAergic transmission in phospholipase C-related, but catalytically inactive protein 1 knockout mice is associated with an epilepsy phenotype. *J Pharmacol Exp Ther* 340, 520-528(jpet.111.182386 [pii] 10.1124/jpet.111.182386)

Ohoyama, K., Yamamura, S., Hamaguchi, T., Nakagawa, M., Motomura, E., Shiroyama, T., Tanii, H., Okada, M., 2011. Effect of novel atypical antipsychotic, blonanserin, on extracellular neurotransmitter level in rat prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 653, 47-57(S0014-2999(10)01193-3 [pii]10.1016/j.ejphar.2010.11.023)

Yamamura, S., Abe, M., Nakagawa, M., Ochi, S., Ueno, S., Okada, M., 2011. Different actions for acute and chronic administration of mirtazapine on serotonergic transmission associated with raphe nuclei and their innervation cortical regions. *Neuropharmacology* 60, 550-560(S0028-3908(10)00360-6 [pii]

10.1016/j.neuropharm.2010.12.025)

Okada, M., 2010. Generation of epilepsy animal model bearing a genetic abnormality identified in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) of humans. *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.* 30, 9-14

〔学会発表〕(計 2 件)

岡田 元宏, 新たな治療標的としてのグリア伝達, 47回日本てんかん学会学術集会(2013/10/11)北九州国際会議場

岡田 元宏, 「個別化治療 up to date: 遺伝子診断の現状と治療への応用」(指定討論), 46回日本てんかん学会学術集会(2012/10/11)都市センターホテル

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 元宏 (Okada Motohiro)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 10281916

### (2) 研究分担者

鈴木 昇 (Suzuki Noboru)  
三重大学・生命科学研究支援センター・准教授  
研究者番号: 00202135

福澤 雅志 (Fukuzawa Masashi)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号 : 10231557

齋藤 浩充 (Saito Mitsuhiro)  
三重大学・生命科学研究支援センター・助教  
研究者番号 : 50303722

溝口 明 (Mizoguti Akira)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 90181916