

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659522

研究課題名（和文） チャネル病における発達障害の新規治療法の開発

研究課題名（英文） New approaches of treating developmental disorders in channelopathy

研究代表者

大守 伊織 (OHMORI IORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20403488

研究成果の概要（和文）：発達障害には、精神遅滞、自閉症、学習障害、注意欠陥多動性障害などが含まれる。記憶や学習、情動をつかさどるシナプスの発達や可塑性、神経伝達物質の放出に関わる分子など、シナプス機能の恒常性に関わる分子が原因として注目されている。本研究課題では、神経細胞の興奮にかかわるチャネル遺伝子の異常によっても発達障害を発症し、これはてんかん発作の二次的障害や抗てんかん薬の副作用ではないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Neurodevelopmental disorders includes mental retardation, autism spectrum disorder, learning disability, and attention deficit hyperactivity disorder. Molecules that modulate synaptic homeostasis are considered to be important substrates of pathogenesis in these disorders. This project reveals that dysfunction of neuronal channels also leads to neurodevelopmental disorders. These neuropsychiatric phenotypes are not caused by secondary effects of epileptic seizures or antiepileptic drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：発達障害、チャネル病、神経伝達物質、SCN1A 遺伝子、CACNA1A 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

発達障害は、脳の機能障害に起因する精神、運動の発達の障害で、これには精神遅滞、広汎性発達障害（自閉症）、学習障害、注意欠陥多動性障害、発達性協調運動障害などが含まれる。発達障害は、様々な原因で発症するが、記憶や学習、情動をつかさどるシナプスの発達や可塑性、シナプスからの神経伝達物

質の放出に関わる分子の異常等が明らかになってきている。

発達障害患者の20-50%はてんかんを合併し、一方てんかん患者の約30%は発達障害を合併しており、両者の病態の一部はオーバーラップしていると考えられている。実際、電位依存性ナトリウムチャネル（SCN1A 遺伝子）異常では、熱性けいれん、難治性てんか

んのほか、自閉症、注意欠陥多動性障害、精神遅滞を合併する。また、電位依存性カルシウムチャンネル(*CACNA1A* 遺伝子)異常では、欠伸発作、精神遅滞、学習障害などの合併が見られる。

発達障害としては、レット症候群、結節性硬化症、脆弱 X 症候群など特殊症候群での研究がなされてきたが、これまでに全く着手されていなかったチャンネル異常の観点から、発達障害の発症メカニズムの解明と治療法の開発を試みるのは、斬新な取り組みである。

2. 研究の目的

特に、チャンネル遺伝子である *SCN1A* 遺伝子や *CACNA1A* 遺伝子に変異を持つ患者では、高率にてんかんと発達障害を合併する。しかし、てんかん患者における発達障害の合併には以下の3つの可能性が考えられる。すなわち、①抗てんかん薬の副作用、②てんかんの二次的障害、③もともとの病因がてんかんと発達障害を発症している可能性である。ヒトにおいては、抗てんかん薬治療の中止や、てんかん発作の誘発はできないことから、①や②の要因を完全に除外して原因を特定することはできない。そこで、モデル動物を用いて、チャンネル遺伝子変異に伴う発達障害の病態の解明と病態に基づく治療法の開発をめざした。

3. 研究の方法

研究材料:*Scn1a* 遺伝子にミスセンス変異(ホモ接合)または *Cacna1a* 遺伝子にミスセンス変異(ヘテロ接合)を持つラットを用いた。

(1) 長時間ビデオ脳波解析によるてんかん発作の評価

4週齢の雄ラットを用いてペントバルビタールナトリウム35mg/kgにより麻酔し、脳

定位固定装置に固定したうえで、両側の前頭葉皮質 (AP:0.5, ML:3.0) 及び後頭葉皮質 (AP:-7.0, ML:3.0) にステンレス製ネジ電極を埋め込んだ。1週間の回復期間を置いたのち、5週齢から8週齢まで1週間ごとに、10-12時間のビデオ脳波同時記録を行った。

(2) 網羅的行動テストによる発達障害の評価

1週間のハンドリングによる馴化ののち、各種行動テストを実施した。内容は、**self-grooming**時間(常同行為の評価)、**Open field**テスト(活動量、不安の評価)、高架十字迷路(不安の評価)、バーンズ迷路(空間学習能力評価)、ロータロッドテスト(協調運動能評価)、バランスビームテスト(協調運動能評価)、新奇物体探索行動テスト、社会性相互作用テスト(社会性の評価)、ホットプレートテスト(痛覚評価)である。

(3) 組織学的検討

組織には6~8週齢の脳を用いた。灌流固定には、50mLのリン酸緩衝液を1回灌流した後、100mLの4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液(pH=7.4)で固定した。その後、脳を4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液に3~7日間浸透後、パラフィン包埋し、4mmの薄切切片を作成した。パラフィン切片は脱パラフィン処理後、HE染色を行った。

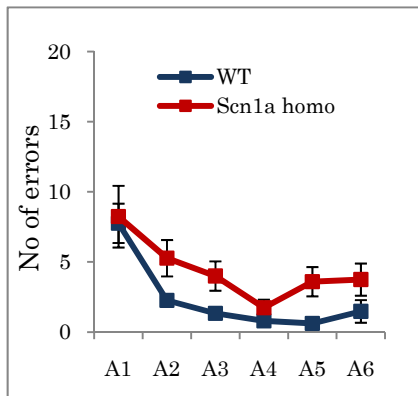
4. 研究成果

(1) 長時間ビデオ脳波解析

Scn1a 遺伝子にミスセンス変異(ホモ接合)または *Cacna1a* 遺伝子にミスセンス変異(ヘテロ接合)を持つラットともに自発発作は認められなかった。

(2) 網羅的行動テストによる発達障害の評価

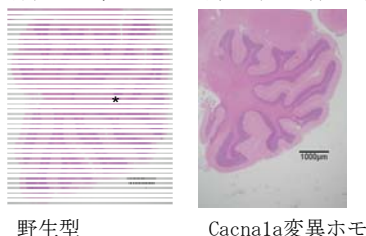
*Scn1a*遺伝子にミスセンス変異（ホモ接合）をもつラットでは、常同運動、多動、空間学習障害、固執、不安、協調運動障害が認められ、*Cacna1a*遺伝子にミスセンス変異（ヘテロ接合）を持つラットでは空間学習障害、衝動性、空間学習障害、固執、協調運動障害が認められた。



図：バーンズ迷路におけるエラー回数の推移。*Scn1a*遺伝子ミスセンス変異ラットでは、野生型に比べ、有意にエラー回数が多く、空間学習障害があることを示している。

(3) 組織学的検討

*Scn1a*遺伝子にミスセンス変異（ホモ接合）および、*Cacna1a*遺伝子にミスセンス変異（ヘテロ接合）では大きな形態学的変化は認めなかった。*Cacna1a*遺伝子にミスセンス変異ホモ接合では、小脳虫部の低形成を認めた。



てんかんと発達障害の合併例においては、発達障害の原因について、抗てんかん薬の影響、てんかん発作による二次的障害の可能性

が考えられたが、これらの影響がなくとも発達障害を発症することが明らかになった。

発達障害発症のメカニズムとしてセロトニンなどの脳内モノアミンの変化が示唆されている。発達障害モデルラットでの脳内モノアミン変化や選択的セロトニン再取り込阻害薬などの向精神薬による症状の改善の検索、向精神薬のてんかんへの影響を検討すべきである。電位依存性ナトリウムチャンネル（*SCN1A*遺伝子）変異は、てんかん患者の中で最も高頻度に検出されており、てんかんに合併する発達障害の病態解明・治療開発研究の意義は大きい。

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 14 件）

1. Ohmori I, Ouchida M, Kobayashi K, Jitsumori Y, Mori A, Michiue H, Nishiki T, Ohtsuka Y, Matsui H. CACNA1A variants may modify the epileptic phenotype of Dravet syndrome. *Neurobiol Dis.* 査読有 2013 Feb;50:209-17.
2. Ohmori I, Hayashi K, Wang H, Ouchida M, Fujita N, Inoue T, Michiue H, Nishiki T, Matsui H. Inhalation of 10% carbon dioxide rapidly terminates *Scn1a* mutation-related hyperthermia-induced seizures. *Epilepsy Res* 査読有 2013 Jan 30. doi:pil: S0920-1211(13)00016-8. 10.1016/j.epilepsyres.2013.01.003.
3. Kobayashi K, Ohmori I, Hayashi K, Kitagawa Y, Ouchida M, Inoue T, Ohtsuka Y. High-frequency EEG oscillations in hyperthermia-induced seizures of *Scn1a* mutant rats.

- Epilepsy Res.* 査読有 Epub 2012 Aug 21. 2013 Feb;103(2-3):161-6. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2012.07.020
4. Kobayashi K, Ohzono H, Shinohara M, Saitoh M, Ohmori I, Ohtsuka Y, Mizuguchi M. Acute encephalopathy with a novel point mutation in the SCN2A gene. *Epilepsy Res.* 査読有 2012 Nov;102(1-2):109-12. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2012.04.016. Epub 2012 May 14
 5. Kobayashi K, Ohtsuka Y, Ohmori I. Additional information regarding "Dravet syndrome: Inroads into understanding epileptic encephalopathies" *J Pediatr.* 査読有 2012 Mar;160(3):532-3. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.11.058. Epub 2012 Jan 9.
 6. Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T. Acute Encephalopathy in Children with Dravet Syndrome *Epilepsia* 査読有 2012 Jan; 53(1):79-86. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03311.x.
 7. Kobayashi K, Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y. Dravet syndrome with an exceptionally good seizure outcome in two adolescents. *Epileptic Disord.* 査読有 2011 Sep;13(3):340-4. doi: 10.1684/epd.2011.0453.
 8. 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.* 査読有 2011;52: 1010-7. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03046.x. Epub 2011 Apr 11
- [学会発表] (計 7 件)
1. 大守 伊織, Wang Haijiao, 大内田 守, 小林 勝弘, 松井 秀樹 「SCN9A遺伝子変異/多型がドラベ症候群の臨床型におよぼす影響」第 46 回日本てんかん学会 2012 年 10 月 11-12 日 東京
 2. 大守 伊織, 大内田 守 「Scn1a遺伝子変異ラットにおける発達障害」第 54 回日本小児神経学総会 2012 年 5 月 17 日-19 日 札幌
 3. 大守 伊織, 小林勝弘, 大内田 守 「熱性けいれん既往患者におけるSCN9A遺伝子解析」第 54 回日本小児神経学総会 2012 年 5 月 17 日-19 日 札幌
 4. 大内田守, 大守伊織 「P/Q型電位依存性カルシウムチャンネル変異に伴う発達障害」第 54 回日本小児神経学総会 2012 年 5 月 17 日-19 日 札幌
 5. 大守伊織 「自閉症の病態生理とモデル動物を用いた最新研究」旭川荘療育センター児童院医局セミナー 2012 年 4 月 10 日 岡山
 6. Ohmori I, Ouchida M, Kobayashi K, Michiue H, Nishiki T, Matsui H. "Epilepsy-related voltage-gated calcium channel variants Cav2.1 shows a gain-of-function biophysical

property.” 第 89 回日本生理学大会
2012 年 3 月 29-31 日 松本

7. Ohmori I “Pathophysiology and
treatment in a rat model of GEFS+”
Epilepsy Forum in Okayama 2012 年
2 月 20 日 岡山

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称: Dravet 症候群の発症可能性の判定方法
およびその利用
発明者: 大守伊織, 大内田守
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/051636
出願年月日: 2011 年 1 月 27 日
国内外の別: 国際

名称: てんかん波を伴う疾患治療剤
発明者: 大内田守, 大守伊織, 改田祐子
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/65845
出願年月日: 2011 年 7 月 12 日
国内外の別: 国際

〔その他〕
ホームページ等
<http://seiri1.med.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
大守 伊織 (OHMORI IORI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20403488