

## 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 5 月 15 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2011～2012  
 課題番号： 23659564  
 研究課題名（和文） 発症予防を目的とした機能性疾患治療薬開発スクリーニング法の開発  
 研究課題名（英文） Prevention of neuropsychiatric functional disease

## 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

研究成果の概要（和文）：常染色体優性夜間前頭葉てんかんの責任遺伝子に相同する、S286L 型ラット Chrna4 遺伝子とナチュラルプロモーターを導入した S286L-TG を作出した。S286L-TG は、ヒト常染色体優勢夜間前頭葉てんかんモデルとしての、表現的妥当性・構造的妥当性・予測的妥当性が保証された。常染色体優勢夜間前頭葉てんかん発症後に、S286L-TG の責任遺伝子を失活させたが、夜間前頭葉てんかんは改善しなかった。

研究成果の概要（英文）：To explore the pathogenesis of autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy and to develop novel antiepileptic drug, the present study develop the S286L transgenic rats. The validations of S286L transgenic rats were demonstrated by several examinations. However, after onset epilepsy in S286L transgenic rat, prevention of expression of S286L mutant Chrna4 could not affect the phenotypes of S284L transgenic rats.

## 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	2,800,000	840,000	3,640,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の情報伝達機能障害が中核病態として想定されている、中枢神経系機能性疾患の分子病態に、多くの情報伝達機構に関連するタンパクをコードする遺伝子変異が関与している可能性が多く臨床研究で報告された。特に、中枢神経系機能性疾患の中で、てんかんと熱性けいれんは発作関連性疾患として分類されるが、多くの発作関連性疾患の分子病態に、電位依存性イオンチャネルとイオンチャネル内蔵型神経伝達物質受容体をコードする遺伝子の変異が数多く同定された。このため、発作関連性疾患の大部分がチャネロパチーである可能性が指摘され

た。このチャネロパチー仮説に従い、発作関連性疾患の病態解析を進め、従来の治療法と比較して、より寛解率の高い治療法（根治可能な薬物療法＝根治療法）と、発作関連性疾患発症前の診断（発症前診断）に基づいた、発症前治療介入（予防療法）の開発が可能と考えられた。

## 2. 研究の目的

チャネロパチーとしての、ヒト発作関連性疾患の病態解明を試み、病態に応じた、合理的な治療法の実践するために、以下の

3 事項を実施することにした。

(1) 本邦で同定された、常染色体優勢夜間前頭葉てんかんの責任遺伝子である、中枢性ニコチン受容体 $\alpha 4$  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 S286L 変異 Chrna4 遺伝子を導入した、遺伝子改変モデルラットの作出。

(2) S286L 変異 Chrna4 遺伝子導入モデルラットの、ヒト常染色体優勢夜間前頭葉てんかんモデル動物としての妥当性評価。

(3) 妥当性が評価された S286L 変異 Chrna4 遺伝子導入モデルラットを用いた、寛解率の高い新規治療法（根治療法）と、発症予防法の開発。

### 3. 研究の方法

(1) S286L 変異 Chrna4 遺伝子導入モデルラット作出方法。

SD ラット大脳のライブラリーから、Chrna4 遺伝子を抽出し、PCR にて増幅した。S286L 変異を生じうる変異塩基を合成し、制限酵素を用い、献上塩基配列から S286L 変異型塩基配列に入れ替えた。同時に、SD ラットゲノムから Chrna4 のプロモーター領域をクローニングし、S286L 変異 Chrna4 とプロモーターを組み込んだベクターを作成し、SD ラット受精卵に注入し、トランスジェニックラットを作出した。

(2) S286L 変異 Chrna4 遺伝子導入モデルラットの妥当性検証。

ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかんモデル動物としての妥当性を、

①表現的妥当性：ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかん患者と同等の疾病性症状を獲得しているか否かを、ビデオ脳波テレメトリーシステムを用い検討した。

②構造的妥当性：ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかん患者と同等の病態を獲得しているか否かを、S286L 変異 Chrna4 遺伝子導入モデルラットの、脳内に発現している野生型 Chrna4 遺伝子と S286L 変異型 Chrna4 遺伝子の発現量を real-time PCR を用い比較検討した。

③予測的妥当性：S284L 変異型 CHRNA4 遺伝子を獲得している、ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかん患者の治療反応性と同等の

反応性を獲得しているか否かを、ビデオ脳波テレメトリーシステムを用い検討した。

(3) 新規治療法の開発スクリーニングの検討

発症前後の治療介入による治療反応性（寛解率）の差異を検討する目的と、責任遺伝子の病態への寄与率を検証する目的で、常染色体優勢夜間前頭葉てんかん発症後の S286L 変異 Chrna4 遺伝子（責任遺伝子）失活操作を施し、症状の消褪率と軽快率をビデオ脳波テレメトリーシステムを用い検討した。

### 4. 研究成果

(1) S286L 変異 Chrna4 遺伝子導入モデルラットの妥当性。

S286L 変異 Chrna4 遺伝子導入モデルラットの作出に成功し、妥当性検証を行った。

① 表現的妥当性：睡眠（徐は睡眠期）状態に、前頭葉を焦点とする運動発作が確認され、表現的妥当性は保証された。

② 構造的妥当性：Chrna4 遺伝子発現は、若干増加していたが、野生型ラットの Chrna4 遺伝子発現量と比較し 120%程度に留まっていた。野生型 Chrna4 と S286L 変異型 Chrna4 の発現比率は概ね 1:1 に保たれ、構造的妥当性も保証された。

③ 予測的妥当性：S284L 変異を有するヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかん患者と同様に、カルバマゼピン反応性は不良であったが、ゾニサミドとジアゼパムに対する反応性は良好であり、予測的妥当性も保証された。

(2) 新規治療法の開発スクリーニングの検討

発症後の責任遺伝子失活操作では、症状改善は得られず、少なくとも常染色体優性夜間前頭葉てんかんの根治療法は、発症後ではなく発症予防でなければ実現できない可能性が示唆された。

### 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 16 件)

① 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. (査読有)
- ② Fukuyama, K., Tanahashi, T., Hamaguchi, 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*, (in press). (査読有)
- ③ Fukuyama, K., Tanahashi, S., Nakagawa, M., Yamamura, S., Motomura, E., Shiroyama, T., Tanii, H., Okada, M., 2012. Levetiracetam inhibits neurotransmitter release associated with CICR. *Neurosci Lett* 518, 69-74. (査読有)
- ④ Hara, N., Nishimura, Y., Yokoyama, C., Inoue, K., Nishida, A., Tanii, 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. (査読有)
- ⑤ Motomura, E., Inui, K., Ohoyama, K., Nishimura, Y., Nakagawa, M., Maeda, M., Matsushima, N., Ushiro, K., Suzuki, D., Kakigi, R., Okada, M., 2012a. Electroencephalographic dipole source modeling of frontal intermittent rhythmic delta activity. *Neuropsychobiology* 65, 103-108. (査読有)
- ⑥ Motomura, E., Tanii, H., Usami, A., Ohoyama, K., Nakagawa, M., Okada, M., 2012b. Lamotrigine-induced neuroleptic malignant syndrome under risperidone treatment: a case report. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 24, E38-39. (査読有)
- ⑦ Nakagawa, M., Yamamura, S., Motomura, E., Tanii, H., Okada, M., 2012. Combination Therapy of Zonisamide With Aripiprazole on ECT and Benzodiazepine-Resistant Periodic Catatonia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 24, E9-10. (査読有)
- ⑧ Ohoyama, 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. (査読有)
- ⑨ 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. (査読有)
- ⑩ Tanahashi, S., Ueda, Y., Nakajima, A., Yamamura, S., Nagase, H., Okada, M., 2012a. 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. (査読有)
- ⑪ Tanahashi, S., Yamamura, S., Nakagawa, M., Motomura, E., Okada, M., 2012b. Effect of lamotrigine and carbamazepine on corticotropin-releasing factor-associated serotonergic transmission in rat dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)* 220, 599-610. (査読有)
- ⑫ Tanahashi, S., Yamamura, S., Nakagawa, M., Motomura, E., Okada, M., 2012c. Dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptors mediate the actions of aripiprazole in mesocortical and mesoaccumbens transmission. *Neuropharmacology* 62, 765-774. (査読有)
- ⑬ Tanahashi, S., Yamamura, S., Nakagawa, M., Motomura, E., Okada, M., 2012d. 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. (査読有)
- ⑭ Zhu, G., Yoshida, S., Migita, K., Yamada, J., Mori, F., Tomiyama, M., Wakabayashi,

K., Kanematsu, 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. (査読有)

⑮ Ohoyama, K., Yamamura, S., Hamaguchi, T., Nakagawa, M., Motomura, E., Shiroyama, T., Tani, H., Okada, M., 2011. Effect of novel atypical antipsychotic, blonanserin, on extracellular neurotransmitter level in rat prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 653, 47-57. (査読有)

⑯ 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. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

① Okada M 9<sup>th</sup> Asian & Oceanian Epilepsy Congress (Manila), ILAE Lecture: Validation criteria for genetic animal models of epilepsy, (2012. 3. 21)

② Okada M 9<sup>th</sup> Asian & Oceanian Epilepsy Congress (Manila), Main Session: Epilepsy genes and beyond, (2012. 3. 22)

③ Okada M 9<sup>th</sup> Asian & Oceanian Epilepsy Congress (Manila), Poster: Mechanisms of absence epilepsy Validation criteria for genetic animal models of epilepsy, (2012. 3. 23)

[図書] (計 12 件)

① 岡田元宏, 抗てんかん薬の作用機序・薬物動態的特徴. In: 兼子直 (Ed.), てんかん教室改訂第3版, 新興医学出版社, 2012, pp. 141-162.

② 岡田元宏, 新薬の作用機序. In: 兼子直 (Ed.), てんかんの薬物療法, 進行医学出版

社, 2012, pp. 218-224.

③ 岡田元宏, 成人てんかんの薬物療法. In: 辻省次 (Ed.), 最新医学別冊 てんかんテキスト, 中山書店, 2012, pp. 42-47.

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