

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461572

研究課題名(和文) ナトリウムチャンネル遺伝子変異が引き起こすてんかん性脳症の発症機序解明

研究課題名(英文) Molecular pathophysiology of neurodevelopmental disorders associated with mutations in the genes encoding voltage-gated sodium channels

研究代表者

荻原 郁夫 (OGIWARA, Ikuo)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30373286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性ナトリウムチャンネル 2 (SCN2A) 遺伝子は、乳幼児発症てんかん性脳症、自閉症スペクトラム障害、そして知的障害の責任遺伝子として報告されている。本研究は、SCN2Aが興奮性神経細胞や抑制性神経細胞サブタイプに発現していることを見出した。また、興奮性神経細胞、あるいは抑制性神経細胞特異的にSCN2A遺伝子を破壊したマウスにけいれん惹起剤に対する感受性に異常がないことを見出した。さらに、SCN2A遺伝子ノックアウトマウスに空間学習能力の低下を認めるとともに、恐怖刺激に敏感で恐怖体験が記憶から消去されにくいことを見出した。

研究成果の概要(英文)：De novo mutations of the SCN2A encoding a voltage-gated sodium channel Nav1.2 have been associated with epileptic encephalopathy, autism spectrum disorder and intellectual disability. We here found that, in mouse brain, SCN2A was expressed in excitatory neurons and subsets of inhibitory neurons. We also found that mice with a conditional SCN2A deletion in excitatory neurons and those in inhibitory neurons showed normal threshold for seizures induced by chemoconvulsant. We furthermore found that SCN2A knockout mice had deficits in spatial learning and memory, showed enhanced consolidation and decreased extinction of fear-related memory.

研究分野：神経科学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ 知的障害 てんかん 自閉症スペクトラム障害 ナトリウムチャンネル遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳幼児期発症のてんかん性脳症にヘテロ接合型電位依存性ナトリウムチャンネル 2 (SCN2A) 遺伝子変異が認められている。最初の SCN2A 遺伝子変異は、菅原らによって、全般性熱性けいれんプラス家系に認められた (Sugawara et al. 2001 Proc Natl Acad Sci USA 98:6384-6389)。続いて、Heronらは、家族性良性乳児新生児けいれんの複数家系に SCN2A 遺伝子のミスセンス変異を見出した (Heron et al. 2002 Lancet 360:851-852)。全般性熱性けいれんプラスや家族性良性乳児新生児けいれんは、発作予後良好なてんかんで、認められた SCN2A 遺伝子変異は家族性であった。

一方、de novo SCN2A 遺伝子変異は、てんかん性脳症で認められている。2004年、神谷らは、精神遅滞を合併した孤発型難治局在性てんかん患者に de novo SCN2A 遺伝子変異を見出した (Kamiya et al. 2004 J Neurosci 24:2690-2698)。続いて、2009年、荻原らは、精神遅滞を合併した難治性点頭てんかん患者、ならびに非典型新生児発症てんかん性脳症患者に de novo SCN2A 遺伝子変異を見出した (Ogiwara et al. 2009 Neurol 73:1046-1053)。さらに、石らは、Dravet 症候群患者に de novo SCN2A 遺伝子変異を見出した (Shi et al. 2009 Brain Dev. 31:758-762)。これらてんかん性脳症で認められた de novo SCN2A 遺伝子変異は、電位依存性ナトリウムチャンネル 2 の電気生理学特性を著しく変化させた (Kamiya et al. 2004 J Neurosci 24:2690-2698; Ogiwara et al. 2009 Neurol 73:1046-1053; Lossin et al. 2012 Neurobiol Dis 47:378-384)。これらの結果は、電位依存性ナトリウムチャンネル 2 の劇的な機能変化がてんかん性脳症の発症機序であることを示唆する。

(2) SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスは、Planells-Cases らによって作製された (Planells-Cases et al. 2000 Biophys J 78:2878-2891)。残念なことに、ホモ接合体 SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスは、生後 2 日以内に全例が死亡した。荻原らは、週産期致死を回避するため、コンディショナル SCN2A 遺伝子破壊マウスを作製し、興奮性神経細胞特異的、あるいは GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊を行った (Miyamoto, Ogiwara, Tatsukawa et al. in preparation)。目論見通りにいかず、ホモ接合型興奮性神経細胞特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスは生後 2 日以内に全例が死亡し、ホモ接合型 GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスは生後 10 日前後に全例が死亡した。しかしながら、このコンディショナル SCN2A 遺伝子破壊マウスの致死性は、SCN2A 遺伝子が興奮性神経細胞と GABA 作動性インターニューロンの両方に発現する生命活動に必須な分子であることを示唆

するが、マウス脳において GABA 作動性インターニューロンが SCN2A 遺伝子を発現しているとする報告はない。

Planells-Cases らは、ヘテロ接合体 SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスはけいれん発作もなく正常と報告した (Planells-Cases et al. 2000 Biophys J 78:2878-2891)。

(3) けいれん発作の既往歴のない知的障害や自閉症スペクトラム障害の症例でヘテロ接合型 de novo SCN2A 遺伝子ナンセンス変異が相次いで認められ、報告されている (Rauch et al. 2012 Lancet. 380:1674-1682; Sanders et al. 2012 Nature 485:237-241; de Ligt et al. 2012 N Engl J Med 15;367:1921-1929)。これら症例は、電位依存性ナトリウムチャンネル 2 の機能不全がけいれん発作なしに知的障害を引き起こすことを示唆する。

2. 研究の目的

(1) 発生段階に応じた Nav1.2 脳内発現様式変化について、GABA 作動性インターニューロンマーカー、興奮性神経細胞マーカー、そして軸索マーカーを用いて免疫組織学的に解析し、SCN2A 遺伝子産物 (Nav1.2) の脳内発現局在様式の詳細を明らかにしたい。

(2) Floxed SCN2A 遺伝子変異マウス (Miyamoto, Ogiwara, Tatsukawa et al. in preparation) と興奮性神経細胞特異的 Cre 発現マウス (Iwasato et al. 2004 Genesis 38:130-138) あるいは GABA 作動性インターニューロン特異的 Cre 発現マウス (Ogiwara et al. 2013 Hum Mol Genet 22:4784-4804) を交配させ、得られたヘテロ接合型コンディショナル SCN2A 遺伝子破壊マウスのけいれん誘発剤に対する感受性の解析と脳波の記録を行い、興奮性神経細胞特異的 SCN2A 遺伝子破壊、あるいは GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊がけいれん誘発剤に対する閾値を変化させるか明らかにしたい。

(3) ヘテロ接合体 SCN2A 遺伝子ノックアウトマウス (Planells-Cases et al. 2000 Biophys J 78:2878-2891) の空間学習能力と文脈記憶能力を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウスや GABA 作動性インターニューロン特異的に緑色蛍光タンパク Venus を発現する Vgat-Venus マウス (Wang et al. 2009 Neurosci 164:1031-1043) の脳をパラフォルムアルデヒドで固定した後、抗 Nav1.2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Miyamoto, Ogiwara, Tatsukawa et al. in preparation) 抗 Venus (GFP) 抗体 (Roche Diagnostics, Nacalai Tesque) 抗 Ankyrin-G 抗体 (Life Technologies, Santa Cruz Biotechnology)、ならびに抗 Tbr1 抗体

(Abcam)で多重免疫組織学的に染色した。GABA 作動性インターニューロンは GFP で、興奮性細胞は Tbr 1 で、軸索起始部は Ankyrin-G で識別した。

(2) ヘテロ接合型興奮性神経細胞特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウス、ならびにヘテロ接合型 GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスにけいれん発作誘発剤 (pentylentetrazol; PTZ, 50 mg/kg) を腹腔内投与し、発作型と発作発現までの潜時を記録した。同腹のヘテロ接合体 floxed SCN2A 遺伝子変異マウスと Cre 発現マウスをコントロール群とした。

ヘテロ接合型興奮性神経細胞特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウス、ならびにヘテロ接合型 GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスの頭蓋骨内に電極を埋め込み、脳波を記録した。同腹のヘテロ接合体 floxed SCN2A 遺伝子変異マウスと Cre 発現マウスをコントロール群とした。

(3) 遺伝的背景を C57BL/6J とするヘテロ接合体 SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスをバーンズ迷路テスト (Ito et al. 2013 Neurobiol Dis 49:29-40; O'HARA & CO) と恐怖条件付けテスト (Nakajima et al. 2008 Mol Brain 1;7; O'HARA & CO) で解析した。バーンズ迷路テストでは、トレーニングを 4 日間行い、5 日目にプローブ試験を行った。恐怖条件付けテストでは、条件付けを 1 日目に行い、2 日目に文脈試験を、3 日目に手がかり試験を行った。同腹の野生型マウスとの比較で、ヘテロ接合体 SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスの学習能力を判定した。

興奮性神経細胞と GABA 作動性インターニューロンのどちらが知的障害に関わっているか明らかにするため、ヘテロ接合型興奮性神経細胞特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウス、ならびにヘテロ接合型 GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスをバーンズ迷路テストで解析した。同腹のヘテロ接合体 floxed SCN2A 遺伝子変異マウスと Cre 発現マウスをコントロール群とした。

4. 研究成果

(1) 発生段階に応じた Nav1.2 脳内発現様式変化を解析するため、新生児期、乳児期、そして成体期の C57BL/6J マウス脳スライスについて、抗 Nav1.2 抗体を用いた免疫組織染色を施行した。Nav1.2 の発現量は、新生児期脳では非常に低レベルであったが、乳児期から成体期にかけて急激に増加していた。乳児期では、Nav1.2 が興奮性細胞の軸索起始部や苔状線維に主に局在していた。そして、成体期になると、軸索への局在に加え、Nav1.2 はスミア状にも発現していた。

次に、Vgat-Venus マウス脳について、免疫組織染色を施行した。Nav1.2 は、Venus 陽性 GABA 作動性インターニューロンのサブタ

イプに発現していた。Nav1.2 を発現する Venus 陽性 GABA 作動性インターニューロンの発現様式はパルプアルブミン陽性インターニューロンやソマトスタチン陽性インターニューロンの発現様式とは異なっていた。

Nav1.2 は、従来、興奮性神経細胞でのみ発現すると考えられていたが (Westenbroek et al. 1989 Neuron 3:695-704; Gong et al. 1999 J Comp Neurol 412:342-352)、本研究の知見から、Nav1.2 が抑制性神経細胞にも発現していることが示唆される。

(2) 6 週齢のヘテロ接合型興奮性神経細胞特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウス、ならびにヘテロ接合型 GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスに PTZ (50 mg/kg) を腹腔内投与した。どちらのマウスにおいても、欠神発作やミオクロニー発作、間代発作、そして強直間代発作に至る個体数、ならびに発作潜時に顕著な異常は認められなかった。

脳波記録は、ヘテロ接合型興奮性神経細胞特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスに異常なスパイクを検出したが、ヘテロ接合型 GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスには顕著な異常を認めなかった。

以上の知見から、興奮性神経細胞が SCN2A 遺伝子関連てんかん性脳症の発症に重要な役割を担っていることが示唆される。GABA 作動性インターニューロンが発症に重要な役割を担っていることが報告されている SCN1A 遺伝子関連てんかん性脳症とは発症機序が異なることが想定される (Ogiwara et al. 2007 J Neurosci 27: 5903-5914; Ogiwara et al. 2013 Hum Mol Genet. 22:4784-4804)。

(3) 19-23 週齢の SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスについて、バーンズ迷路テストを施行した。SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスは、4 日間のトレーニングの中でターゲットホールを学習する速度が遅かった。5 日目のプローブ試験では、ターゲットホールとその近傍にある穴との区別がやや曖昧であった。以上の結果から、SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスに空間学習能力の低下が示唆される。

29 週齢の SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスについて、恐怖条件付けテストを施行した。2 日目の文脈試験では、SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスは恐怖を強く感じていた。3 日目の手がかり試験では、SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスは手がかりを与える前から恐怖を強く感じており、手がかり終了後も恐怖を強く感じていた。以上の結果から、SCN2A 遺伝子ノックアウトマウスは恐怖刺激に敏感で恐怖体験が記憶から消去されにくいことが示唆される。

ヘテロ接合型興奮性神経細胞特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスとヘテロ接合型 GABA 作動性インターニューロン特異的 SCN2A 遺伝子破壊マウスにもバーンズ迷路テストを施

行したが、トレーニングとプローブ試験において、どちらのマウスにも、コントロールと比較して、顕著な異常は認められなかった。以上の結果から、興奮性神経細胞か GABA 作動性インターニューロンのどちらか一方というよりは、恐らくは、これら神経細胞の相互作用が SCN2A 遺伝子関連知的障害の発症に重要である可能性が示唆される。

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 3 件)

Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, Aosaki T, Abe T, Kiyonari H, Kino Y, Kurosawa M, Shimizu J, Ogiwara I, Yamakawa K, Koshimizu Y, Fujiyama F, Kaneko T, Shimizu H, Nagatomo K, Yamada K, Shimogori T, Hattori N, Miura M, Nukina N (2014) Singular localization of sodium channel 4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. *Nature Communications* 5:5525. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms6525

Auerbach DS, Jones J, Clawson BC, Offord J, Lenk GM, Ogiwara I, Yamakawa K, Meisler MH, Parent JM, Isom LL (2013) Altered cardiac electrophysiology and SUDEP in a model of Dravet syndrome. *PLoS One* 8(10): e77843-1-15. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0077843.

Ogiwara I, Iwasato T, Miyamoto H, Iwata R, Yamagata T, Mazaki E, Yanagawa Y, Tamamaki N, Hensch TK, Itohara S, Yamakawa K (2013) Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of Dravet syndrome. *Human Molecular Genetics* 22(23):4784-4804. 査読有
DOI: 10.1093/hmg/ddt331

[学会発表](計 12 件)

荻原郁夫、パルプアルブミン陽性細胞特異的 SCN1A 遺伝子破壊マウスに認められた社会的行動異常と空間記憶学習障害、第 49 回日本てんかん学会学術集会、2015 年 10 月 30 日、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

宮崎晴子、線条体無髄投射神経におけるナトリウムチャンネル 4 サブユニットの発現解析、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 29 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

立川哲也、電位依存性ナトリウムチャンネル Nav1.2 の時空間的発現パターン、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 29 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

荻原郁夫、海馬パルプアルブミン抑制性神経細胞における Nav1.1 発現低下がけいれん発作を生じる、第 56 回日本小児神経学会総会、2014 年 5 月 30 日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

Ogiwara I、Neuron-type-specific gene deletion reveals a previously unrecognized Nav1.1 distribution in excitatory neurons、第 36 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

荻原郁夫、Dravet 症候群成因解明のための Scn1a 遺伝子発現可視化マウスの解析、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 3 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

Auerbach DS、Heart rate variability analysis altered autonomic tone in a mouse model of Dravet syndrome、American Epilepsy Society 67th annual meeting、2013 年 12 月 9 日、Walter E. Washington Convention Center (Washington DC, USA)

荻原郁夫、SCN1A 遺伝子の抑制性細胞特異的ノックアウトは高致死性てんかんを生じるが、興奮性細胞特異的ノックアウトで生存率が上昇する、日本人類遺伝学会第 58 回大会、2013 年 11 月 23 日、江陽グランドホテル(宮城県仙台市)

Ogiwara I、Nav1.1 haploinsufficient excitatory and inhibitory neurons play distinct roles in the epileptic pathology in Dravet syndrome model mice、Neuroscience 2013、San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)

荻原郁夫、抑制性神経細胞の Nav1.1 ハプロ不全がてんかんの原因で、興奮性神経細胞の Nav1.1 ハプロ不全は症状を軽減する、第 47 回日本てんかん学会学術集会、2013 年 10 月 11 日、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

Ogiwara I、Nav1.1 haploinsufficient excitatory and inhibitory neurons play distinct roles in epilepsy、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

荻原郁夫、パルプアルブミン陽性細胞を標的とした Scn1a 遺伝子破壊はマウスに

てんかん発作と運動失調を引き起こす、第
55 回日本小児神経学会総会、2013 年 6 月
1 日、iichiko 総合文化センター（大分県
大分市）

〔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

理研プレスリリース

http://www.riken.jp/pr/press/2013?20130807_1/

理化学研究所・脳科学総合研究センター・神
経遺伝研究チームホームページ

<http://www.brain.riken.jp/labs/ngs/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻原 郁夫 (OGIWARA, Ikuo)

日本医科大学・医学部・准教授 (平成 27 年度)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・副

チームリーダー (平成 26 年度)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・研
究員 (平成 25 年度)

研究者番号：3 0 3 7 3 2 8 6

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

眞崎 恵美 (MAZAKI, Emi)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・技
術員