

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461284

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたナトリウムポンプ病 - 家族性片麻痺性片頭痛 2 型 - の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of sodium pump knockout mice as a pathophysiological model for familial hemiplegic migraine type 2

研究代表者

池田 啓子 (IKEDA, KEIKO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10265241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Naポンプ 2サブユニットは脳(アストロサイトと海馬の錐体細胞)に高発現し、家族性片麻痺性偏頭痛2型(FHM2)の原因遺伝子である。常染色体優性遺伝形式のFHM2は痙攣や小脳症状を合併する。研究代表者はその病態解明と新しい治療法・治療薬の開発を目指し、2サブユニット遺伝子ノックアウトマウスを用いて解剖・組織学的解析、電気生理学的解析を行った。ノックアウトマウスでは皮質拡延性抑制(CSD)の誘発閾値が低い傾向が観察された。また、ヒトで見つかる遺伝子変異をマウス相同部位に導入したトランスジェニックマウス3種類の作成と、疾患モデルマウスとしてのスクリーニングを行い、今後の研究の基盤作りを試みた。

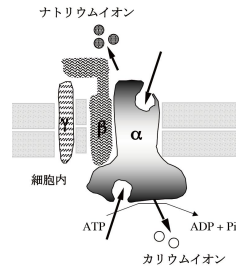
研究成果の概要(英文)：The sodium pump 2 subunit is expressed in central nervous tissue, particularly astrocytes and pyramidal cells in the hippocampus. Mutations in ATP1A2 encoding the sodium pump 2 subunit cause Familial hemiplegic migraine type 2 (FHM2), an autosomal dominant inheritance migraine with aura and motor weakness and in some cases with seizures and cerebellar symptoms. To understand pathophysiology of migraine and develop novel therapeutics and drugs, we examined the Atp1a2 knockout heterozygous mice by histological and electrophysiological analyses. We found that increased sensitivity of induction of CSD (cortical spreading depression) response in the knockout heterozygous mice compared with wild-type littermate mice. We also established the novel transgenic mouse line harboring homologous mutations found in patients. We have examined their sensitivities to seizures and behaviors, and evaluated them as migraine-model mice.

研究分野：神経生理学

キーワード：ナトリウムポンプ 2サブユニット 片頭痛 痙攣 皮質拡延性抑制 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

ナトリウムポンプ(下図)は細胞内外の Na^+ および K^+ 濃度を維持する能動輸送酵素で、ほぼすべてのほ乳動物細胞の形質膜に存在する。本酵素は、 α 、 β 、 γ の3つのサブユニットからなる。本酵素によって細胞



膜を隔てて維持される Na^+ 濃度勾配は、他のイオンや栄養物の輸送、浸透圧の制御に関わり、神経細胞における興奮性の基盤、さらにシナプス伝達における伝達効率の調節に関与する。サブユニットは陽イオンの通過孔を形成し、ATPやジギタリスやウワバイン(ナトリウムポンプの特異的阻害剤)の結合部位を有する。ほ乳類の脳においては、 α 、 β 、 γ の3つのサブユニットが発現しており、 α と β が神経細胞の機能発現に重要であることが知られている。200年以上前から心不全治療薬として使われてきたジギタリスの標的タンパク質であるナトリウムポンプは、1957年にSkou博士により発見(1997年ノーベル化学賞)されて以来、膨大な研究対象としての歴史を有するが、ここ10数年間で2つの大きな新展開があった。1つめは東大の豊島博士らによってその立体構造が明らかになったこと(2009年、2013年)、2つめはナトリウムポンプサブユニット遺伝子の変異による疾患(ナトリウムポンプ病)が次々と明らかになったことである。ヒトナトリウムポンプ α サブユニットをコードする遺伝子 $ATP1A2$ の点突然変異は、家族性片麻痺性片頭痛2型(片頭痛前兆時に運動麻痺(脱力)を伴う。小脳失調・てんかん・精神発達遅滞・ジストニアを併発する例や脳底型片頭痛を示す例、片麻痺が明確でない例もある。)

(Familial hemiplegic migraine type 2, FHM2)をひきおこす。片頭痛は、耐えがたい頭痛、吐き気や光に対する過敏を伴う疾患で、

日常生活に多大な支障を来す四大慢性疾患(WHO)の1つである。一方、 α サブユニットをコードする遺伝子 $ATP1A3$ の点突然変異もしくは欠失変異は、急速発症性ジストニアパーキンソニズム(Rapid-onset dystonia parkinsonism, RDP, DYT12)や小児交互性片麻痺(Alternating hemiplegia of childhood, AHC)をひきおこす。RDPおよびAHCは神経難病であり、罹患者の身体的・精神的負担が大きい。さらに、 β サブユニットをコードする遺伝子 $ATP1A1$ の体細胞変異がアルドステロン産生腺腫でみつかかり、Naポンプ遺伝子が発現することによるポンプ活性低下が疾患発症に深く関わることが報告された。

2. 研究の目的

研究代表者は、主に神経系におけるナトリウムポンプの生体内機能の解明を目指し、 α および β 遺伝子ノックアウトホモマウス($Atp1a2^{-/-}$)、ノックアウトヘテロマウス($Atp1a2^{+/-}$)の作成と解析を行ってきた。この経験を活かし、本研究では β 遺伝子変異が原因である疾患の病態解明を行う。研究代表者が作成・解析を続けてきた α サブユニット遺伝子モデルマウスの解剖・組織学的解析、生化学的解析、電気生理学的解析をする。またヒトで見つかる遺伝子変異の、マウス相同部位に変異を入れた、新たなトランスジェニックマウスの作成と、疾患モデルマウスとしてのスクリーニングを開始し、今後の研究の基盤作りを試みる。なお、ヒトで報告されている変異は、多くがポンプとしての機能欠失変異であることから、下記の(1)では研究代表者が既に有する $Atp1a2^{+/-}$ を用いた。

3. 研究の方法

- (1) β 欠失マウス($Atp1a2^{-/-}$)を用いた解析
脳スライス標本を用いた電気生理学的解析
皮質拡延性抑制(Cortical spreading

depression: CSD) の測定
通常飼育や CSD 誘発後に発火する脳部
位領域の c-Fos の抗体染色による組織
学的解析

(2) 患者で見つかる変異のほとんどは点突
然変異であり、変異遺伝子産物がドミナント
ネガティブに働き、片頭痛の発症につながる
ことが示唆されている。欠失マウスの解析に
加え、上記(1)と平行して 2 サブユニッ
トの点突然変異(ヒトで見つかる変異につい
てのマウス相同部位に変異を導入する)を有
する新たな 2 トランスジェニック(Tg)マ
ウスを構築・作成する。

4. 研究成果

(1) 2 欠失マウス(*Atp1a2*^{-/-})を用いた解析
脳の神経回路の動作様式や神経素子の特性
が、野生型とどのように異なるのかという点
について、以下の実験を行った。

電気生理学的解析(自然科学機構生理学
研究所・佐竹伸一郎助教との共同研究)
我々は以前,*Atp1a2*^{-/-}は情動不安行動が
顕著に増強するとともに扁桃体や梨状
野において神経細胞の過興奮が起きて
いることを報告した。この過興奮が片頭
痛の発症に関係している可能性を考え、
扁桃体スライス標本を用いてシナプス
伝達特性を観察した。しかし *Atp1a2*ヘ
テロノックアウトマウスと同腹野生型
の間で興奮性シナプス後電流(EPSC)や
抑制性シナプス後電流(IPSC)のペアパ
ルス比に有意差は認められなかった。
皮質拡延性抑制(Cortical spreading
depression:CSD)の測定を行った。慶応
大学神経内科・畝川美悠紀講師、鈴木則
宏教授との共同研究である。*Atp1a2*ヘ
テロノックアウトマウスでは CSD の誘
発閾値が低い傾向が観察されたが血流
変化には野生型との差異は観察されな
かった(論文投稿中)。

片頭痛発症に關与する神経回路同定を
目的として CSD 誘発側と対側の脳各部
位での c-Fos の発現を定量化し、野生型
とノックアウトヘテロマウスで比較し
た。ヘテロマウスの側頭葉等での部位特
異的発現増強が見られた。CSD の感受性
の差異の基盤になる可能性があると考え
、活性化マクロファージや HMGB1 抗体
染色を行った。

(2) 2 トランスジェニック(Tg)マウスの
作成および解析
異なる変異を有する、3 系統の Tg マウスの構
築・作成を行った。疾患モデル動物としての
妥当性を行動学的観点(痙攣発作発症や情動
行動の変化)から検証した。野生型兄弟と比
較し、通常飼育下での行動・外観に差異は観
察されなかった。熱刺激による痙攣誘発時の
閾値に差異があるという予備的結果を得た
(論文準備中)。

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、*は Corresponding Author)

[雑誌論文](計 13 件)

Ikeda K*, Onimaru H, Kawakami K.
(2017) Knockout of sodium pump $\alpha 3$
subunit gene (*Atp1a3*^{-/-}) results in perinatal
seizure and defective respiratory rhythm
generation. Brain Res. 1666:27-37.

【IF=2.561】査読有

Ikeda K, Kawakami K, Onimaru H*,
Okada Y, Yokota S, Koshiya N, Oku Y,
Iizuka M, Koizumi H. (2017) The
respiratory control mechanisms in the
brainstem and spinal cord: integrative
views of the neuroanatomy and
neurophysiology. J Physiol Sci.
Jan;67(1):45-62. 【IF= 2.165】査読有
Tani M, Kotani S, Hayakawa C, Lin ST,

Irie S, Ikeda K, Kawakami K, Onimaru H*. (2017) Effects of a TRPV1 agonist capsaicin on respiratory rhythm generation in brainstem-spinal cord preparation from newborn rats. *Pflugers Arch*. 469(2):327-338. 【IF=3.6.54】 査読有

Sato S*, Yajima H, Furuta Y, Ikeda K, Kawakami K. (2016) Activation of Six1 Expression in Vertebrate Sensory Neurons. *PLoS One* 10(8):e0136666. doi: 10.1371/journal.pone.0136666. 【IF=3.057】 査読有

Igarashi H, Koizumi K, Kaneko R, Ikeda K, Egawa R, Yanagawa Y, Muramatsu S, Onimaru H, Ishizuka T, Yawo H*. (2016) A Novel Reporter Rat Strain That Conditionally Expresses the Bright Red Fluorescent Protein tdTomato. *PLoS One* 11(5):e0155687. doi: 10.1371/journal.pone.0155687. 【IF=3.057】 査読有

Tsuzawa K, Yazawa I, Shakuo T, Ikeda K, Kawakami K, Onimaru H*. (2015) Effects of ouabain on respiratory rhythm generation in brainstem-spinal cord preparation from newborn rats and in decerebrate and arterially perfused in situ preparation from juvenile rats. *Neuroscience* 286, 404-411. 【IF=3.231】 査読有

Ikeda K*, Takahashi M, Sato S, Igarashi H, Ishizuka T, Yawo H, Arata S, Southard-Smith EM, Kawakami K, Onimaru H. (2015) A *Phox2b* BAC transgenic rat line useful for understanding respiratory rhythm generator neural circuitry. *PLoS One* 10(7):e0132475. doi: 10.1371/journal.pone.0132475. 【IF=3.057】 査読有

Tani M, Yazawa I, Ikeda K, Kawakami K,

Onimaru H*. (2015) Long-lasting facilitation of respiratory rhythm by treatment with TRPA1 agonist, cinnamaldehyde. *J. Neurophysiol.* 114, 989-998. 【IF=2.653】 査読有

Sugimoto H, Ikeda K, Kawakami K*. (2014) Heterozygous mice deficient in *Atp1a3* exhibit motor deficits by chronic restraint stress. *Behav. Brain Res.* 272, 100-110. 【IF=3.002】 査読有

Onimaru H*, Ikeda K, Mariho T, Kawakami K. (2014) Cytoarchitecture and CO₂ sensitivity of Phox2b-positive parafacial neurons in the newborn rat medulla. *Prog. Brain Res.* 209, 57-71. 【IF=1.655】 査読有

Heinzen EL*, et al. and *ATPIA3* Working Group. (Ikeda K. is one of the member of the working group) (2014) Distinct neurological disorders with *ATPIA3* mutation. *Lancet Neurol.* May 13(5), 503-514. 査読有

Onimaru H*, Ikeda K, Tani M, Kawakami K. (2014) Cytoarchitecture and CO₂ Sensitivity of Phox2b-Positive Parafacial Neurons in the Newborn Rat Medulla. *Progress in Brain Research* 209, 57-71. *The Central Nervous System Control of Respiration.* 【IF=1.655】 査読有

Yajima H, Suzuki M, Ochi H, Ikeda K, Sato S, Yamamura K, Ogino H, Ueno N, Kawakami K*. (2014) Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates. *BMC Biol.* May 29;12:40, doi: 10.1186/1741-7007-12-40. 【IF=6.967】 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

Onimaru H, Ikeda K, Ogawa M, Ihara K-I, Kobayashi K, Kawakami K. Optogenetic analysis of neuronal network of medullary respiratory center in brainstem-spinal cord preparations from transgenic newborn rats expressing Archaelhodopsin in Phox2b positive cells. (poster P3-300) Neuroscience2016, Nov.12-16, 2016, Walter E. Washington Convention Center, San Diego, USA

Ikeda K, Onimaru H, Kawakami K. A novel transgenic rat harboring Phox2b BAC useful for analysis ontogeny of and function of respiratory rhythm generator neuronal complex. (poster) Society for Developmental Biology 75th Annual Meeting International Society of Differentiation 19th International Conference, Aug. 4-8, 2016, Marriott Copley Place, Boston, USA

池田啓子, 川上潔. Exploring the neural hyper-active regions in the Sodium pump disease model mice. (poster) 第39回日本神経科学大会, 2016年7月20-22日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

鬼丸洋, Lin, S-T, 池田啓子, 大隅典子. Developmental defect of respiratory center in the medulla of Pax6 mutant rats. (poster P3-140) 第39回日本神経科学大会, 2016年7月20-22日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

鬼丸洋, 池田啓子, Lin, S-T, 小川正晃, 伊原寛一郎, 小林和人, 川上潔. Analysis of neuronal network of medullary respiratory center in transgenic rats expressing Archaelhodopsin in Phox2b expressing cells. (poster 3P-198) 第93回日本生理学会大会, 2016年3月22-24日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

畝川美悠紀, 池田啓子, 富田裕, 鳥海春樹, 海老根妙子, 川上潔, 鈴木則宏. 家族性片麻痺性片頭痛2型モデルマウスにおける皮質拡張性抑制感受性および反応性. (poster 02-2) 第43回日本頭痛学会総会, 2015年11月13-14日, 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

Kawakami K, Sugimoto H, Ikeda K. *Atp1a3* heterozygous knock-out mice show reduced social interaction and lower rank in social dominance compared with wild type. 4th Symposium on *ATPIA3* in Disease, August 27-29, 2015, Double Tree Bethesda Hotel & Conference center, Washington, USA

Ikeda K, Kawakami K. Spontaneous dystonia in *Atp1a3*^{+/-}. 4th Symposium on *ATPIA3* in Disease, August 27-29, 2015, Double Tree Bethesda Hotel & Conference center, Washington, USA

池田啓子, 鬼丸洋, 高橋将文, 佐藤滋, 川上潔. 呼吸中枢神経系解析に有用なトランスジェニックラット. (poster) 第38回日本神経科学大会 (Neuro2015), 2015年7月28-31日, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

佐竹伸一郎, 池田啓子, 川上潔, 井本敬二. *Atp1a3*^{+/-}マウス小脳プルキンエ細胞におけるグルタミン酸輸送体電流の減弱. (poster) 第38回日本神経科学大会 (Neuro2015), 2015年7月28-31日, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

飯塚真喜人, 池田啓子, 鬼丸洋, 川上潔, 泉崎雅彦. (poster) 新生ラット胸髄呼吸性介在ニューロンにおけるグルタミン酸トランスポーター-VGLUT1およびVGLUT2の発現. 第38回日本神経科学大会 (Neuro2015), 2015年7月28-31日, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

川上潔, 池田啓子, 知見聡美, 杉本弘樹.
ジストニアモデルとしてのナトリウム
ポンプ 3 サブユニット欠損マウ
ス. (poster) 第120回 日本解剖学会総
会・全国学術集会 第92回 日本生理学
学会合同大会, 2015年3月21-23日, 神戸国
際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

池田啓子. 呼吸リズムを司る神経群pFRG
の最近の話題. (Symposium, oral; オーガ
ナイザー 鬼丸洋, 池田啓子) 第120
回 日本解剖学会総会・全国学術集会
第92回 日本生理学学会合同大会, 2015年3
月21-23日, 神戸国際会議場・展示場(兵
庫県・神戸市)

五十嵐敬幸, 小泉 協, 金子 涼輔, 池田
啓子, 鬼丸洋, 柳川右千夫, 村松慎一,
石塚徹, 八尾寛. 赤色蛍光タンパク質
tdTomatoをコンディショナルに発現す
るレポーターラット. 第120回 日本解剖
学会総会・全国学術集会 (poster) 第92
回 日本生理学学会合同大会, 2015年3月
21-23日, 神戸国際会議場・展示場 (兵
庫県・神戸市)

鬼丸洋, Lin Shin Tien, 大隅典子, 池田
啓子. Pax6変異ラットの摘出脳幹-脊髄
標本における呼吸リズム形成
能. (poster) 第37回日本神経科学大会
(Neuro2014), 2014年9月11-13日 パシフ
ィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

五十嵐敬幸, 小泉協, 金子涼輔, 池田啓
子, 鬼丸洋, 柳川右千夫, 村松慎一, 石
塚徹, 八尾寛. 赤色蛍光タンパク質
tdTomatoをCre-loxPコンディショナル
に発現するレポーターラットの評
価. (poster) 第37回日本神経科学大会
(Neuro2014), 2014年9月11-13日 パシフ
ィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

南部篤, 知見聡美, 池田啓子, 川上潔.
ジストニアの基礎と臨床. (oral) 第29
回日本大脳基底核研究会, 2014年8月

23-24日 青森国際ホテル (青森県・青森
市)

池田啓子, 川上潔. c-Fos expression in
epilepsy-prone *Atp1a2* and *Atp1a3*
knockout mouse brains during
development. (poster) 第47回日本発生
生物学会, 2014年5月27-30日, ウィンク
愛知 (愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jjichi.ac.jp/biol/publication.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 啓子 (KEIKO, IKEDA)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10265641

(3) 連携研究者

川上 潔 (KIYOSHI, KAWAKAMI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10161283

佐竹 伸一郎 (SHIN-ICHIRO, SATAKE)
自然科学機構・生理学研究所・助教
研究者番号: 3036340