

201122094A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

細胞表面認識分子の異常により引き起こされる  
新規ヒトてんかんの同定と、その病態進展機構の解明、  
および診断法・治療法の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 星野 幹雄

平成24（2012）年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
細胞表面認識分子の異常により引き起こされる新規ヒトてんかんの同定と、 その病態進展機構の解明、および診断法・治療法の開発	-----1
星野 幹雄	
II. 分担研究報告	
1. イハラてんかんラットの原因遺伝子の同定と機能解明	-----11
星野 幹雄	
2. イハラてんかんラットの解剖学的、生理学的解析	-----17
早瀬 ヨネ子	
3. 精神遅滞バイオリソースの整備と Epi-IER 遺伝子の異常による ヒト疾患の同定	-----21
後藤 雄一	
4. ヒト「精神遅滞+てんかん」の神経病理像の解析	-----25
伊藤 雅之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----31

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
総括研究報告書

細胞表面認識分子の異常により引き起こされる新規ヒトてんかんの同定と、  
その病態進展機構の解明、および診断法・治療法の開発

研究代表者	星野幹雄	国立精神・神経医療研究センター 病態生化学研究部 部長	神経研究所
研究分担者	早瀬ヨネ子	国立精神・神経医療研究センター 病態生化学研究部 流動研究員	神経研究所
研究分担者	後藤雄一	国立精神・神経医療研究センター 疾病研究第二部 部長	神経研究所
研究分担者	伊藤雅之	国立精神・神経医療研究センター 疾病研究第二部 室長	神経研究所

#### 研究要旨

イハラてんかんラット (IER: Ihara epileptic rat) は生後から発達障害様症状 (社会性行動異常、記憶・学習障害) を、5 ヶ月からてんかん症状を呈し約一年で死に至る原因不明の自然発症ラット突然変異体である。我々の予備実験により、IER ではてんかん発症前から大脳皮質および海馬のニューロサーキットに形態学的異常が認められ、脳の興奮性が異常に高まっていることが示唆されていた。また、我々の連鎖解析によりその原因遺伝子領域がかなり狭められ、その領域内には Epi-IER という大きな遺伝子しかデータベース上存在しなかったために、Epi-IER が原因遺伝子であろうと考えられた。その遺伝子は分子間相互作用モチーフを持つ細胞膜蛋白質をコードしていたが、IER ではその発現が失われている。以上から、IER は細胞表面認識分子を失ったためにニューロサーキットに異常をきたし発症すると考えられ、「ニューロサーキット異常型」の良い発達障害を伴うてんかんのモデルとなる。そこで、本研究では、IER 型の「細胞表面認識分子の異常によりもたらされる発達障害およびてんかん」の発症・病態進展機構をモデル動物を使って明らかにすること、そして、それに相当するヒト疾患を新たに同定し、将来の診断法や有効な治療法の開発に道を拓くこと、を研究目的としている。

平成 23 年度の研究においては、Epi-IER が IER の原因遺伝子であることを完全に証明した。さらに、Epi-IER 遺伝子ゲノム上の一塩基置換がスプライシング異常を引き起こしていることが原因であることを突き止めた。また、Epi-IER が神経突起の伸長と分岐に関与すること、IER ではその発現が失われるために脳の各部位の神経細胞の形態が異常になり、特に抑制系の機能が低下していることを明らかにした。さらに、精神遅滞リサーチリソースに RNA と cDNA のバイオリソースを加え、そこから Epi-IER の発現量の定量を行い、Epi-IER 遺伝子異常によってもたらされるヒト疾患のスクリーニングを開始した。また、ヒト大脳皮質の層構造の評価系を、免疫染色法により確立した。

#### A. 研究目的

イハラてんかんラット (IER: Ihara epileptic rat) は生後から発達障害様症状 (社会性行動異常、記

憶・学習障害) を、5 ヶ月からてんかん症状を呈し約一年で死に至る原因不明の自然発症ラット突然変異体である。我々の予備実験により、IER で

はてんかん発症前から大脳皮質および海馬のニューロサーキットに形態学的異常が認められ、脳の興奮性が異常に高まっていることが示唆された。また、我々の連鎖解析によりその原因遺伝子領域がかなり狭められ、その領域内には Epi-IER という大きな遺伝子しかデータベース上存在しなかったために、Epi-IER が原因遺伝子であろうと考えられた。その遺伝子は分子間相互作用モチーフを持つ細胞膜蛋白質をコードしていたが、IER ではその発現が失われている。以上から、IER は細胞表面認識分子を失ったためにニューロサーキットに異常をきたし発症すると考えられ、「ニューロサーキット異常型」の良い発達障害を伴うてんかんのモデルとなる。

そこで、本研究では、IER 型の「細胞表面認識分子の異常によりもたらされる発達障害およびてんかん」の発症・病態進展機構をモデル動物を使って明らかにすること、そして、それに相当するヒト疾患を新たに同定し、将来の診断法や有効な治療法の開発に道を拓くこと、を研究目的とする。

以上の研究目標を達成するために、平成 23 年度は以下の研究課題について取り組んだ。

(研究課題 1) Epi-IER が真に IER の原因遺伝子であるということを証明する (星野)。

(研究課題 2) Epi-IER 遺伝子のゲノム上のいかなる以上が IER を引き起こしているのかを調べる (星野)。

(研究課題 3) その遺伝子がコードする Epi-IER 蛋白質の果たす生理学的役割を明らかにする (星野)。

(研究課題 4) Epi-IER 蛋白質のいかなる機能異常が IER で見られる「精神発達障害を伴うてんかん」症状を引き起こすのか、を解剖学的・生理学的に

明らかにする (早瀬)。

(研究課題 5) 国立精神神経医療研究センターの『精神遅滞リサーチリソース』に RNA および cDNA のバイオリソースを加え、そこから Epi-IER の発現量の異常を示す症例を抽出し、ヒト疾患の同定を目指す (後藤)。

(研究課題 6) ヒト症例の脳組織標本を調べるための、有効な評価系を確立する (伊藤)。

## B. 研究方法

(研究課題 1)

IER における Epi-IER 遺伝子・蛋白質の神経系における発現量を定量 PCR 法、ウエスタンブロット法によって低量し、評価する。

Epi-IER のノックアウトマウスを作製し、その表現型が IER と同様かどうかについて解析する。

(研究課題 2)

IER ゲノムにおける Epi-IER 遺伝子をシーケンシングし、野生型と異なるゲノム配列を抽出する。異常を検出したゲノム変異がスプライシングドナー上に認められたので、正常型と異常型ゲノムをそれぞれ培養細胞発現系に導入し、IER と同様なスプライシング異常が再現されるかどうかについて見当する。

(研究課題 3)

野生型ラットおよび IER 由来の海馬初代培養細胞において、神経細胞の突起形成や分岐形成についてニューロルシダシステムを用いて定量的に評価する。また、野生型ラットの海馬初代培養細胞に Epi-IER を遺伝子導入し、その形態形成におよぼす影響について評価する。

(研究課題 4)

i) 解剖学的解析

ゴルジ染色法を用いて、IER の各発生段階にお

ける様々な部位の脳における、各種神経細胞の形態を染色する。そして、ニューロルシダシステムを用いて、個々の神経細胞の神経突起構造を全て入力し、様々なパラメータで統計処理を行い、神経細胞形態の異常を検出する。また、各種神経細胞種マーカーを用いてそれぞれの神経細胞の位置を可視化し、その細胞体の配置について解析する。

#### ii) 電気生理学的解析

IER および野生型ラット個体において、扁桃体での誘発刺激閾値について測定する。また、扁桃体の頻回刺激によるキンドリング形成の完成のしやすさについても測定する。さらに、海馬スライスにおいて、paired pulse facilitation について調べる。(研究課題 5)

#### i) ヒトリンパ芽球デポジトリーからの RNA 精製。

ヒトリンパ芽球 ( $1 \times 10^6$  細胞) から、カラム式の High Pure Isolation RNA Kit(Roche)を用いて DNaseI 処理を行い、RNA を約  $15 \mu\text{g}$  精製する。

#### ii) 精製した RNA からの cDNA 作成。

精製した RNA の一部を、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO)を用いて逆転写反応させ、cDNA を作成する。cDNA の濃度は約  $50\text{ng}/\mu\text{L}$  にし、1 サンプルにつき  $100 \mu\text{L}$  作成する。

#### iii) RNA&cDNA バイオリソースの管理。

作成した RNA と cDNA は、1 サンプルにつき、

- ・ RNA  $50 \mu\text{L}/1$  本
- ・ 中期保存用 cDNA  $50 \mu\text{L}/1$  本
- ・ 外部機関持ち出し用 cDNA  $10 \mu\text{L}/3$  本

の計 5 本を、一家系で一箱にまとめて  $-80^\circ\text{C}$  で保存する。

それとは別に、外部機関持ち出し用に RNA  $10 \mu\text{L}/2$  本を  $-80^\circ\text{C}$  で保存する。先に作った  $100 \mu\text{L}$  の cDNA のうち、残った cDNA  $20 \mu\text{L}$  は、研究部で

の実験用として別のチューブにストックし、 $-20^\circ\text{C}$  で保存しておく。

#### iv) Real-time PCR による Epi-IER の定量。

蛍光標識プローブに TaqMan プローブを、RealTimePCR には Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System を使用して、実験用に作成した cDNA を用い RealTimePCR を行う。内在コントロールとして Actin を用い、標的遺伝子 Epi-IER の発現量と Actin の発現量を比較して、サンプルごとの遺伝子 Epi-IER の発現量を解析する。

#### (研究課題 6)

正常脳組織 (ヒト 19 週から 37 週と生後 1 か月齢) および滑脳症患者脳組織 (10 ヶ月例) において、各種抗体を用いて免疫染色を行った。利用した抗体は、Layer-specific marker としてげっ歯類の研究が進んでいる SATB homeobox 2 (SATB2)、COUP-TF interacting protein 2 (CTIP2)、Forkhead box protein P1 (FOXP1)、Cut homeobox like 1 (CUTL1)、T-box brain 1 (TBR1) である。

#### (倫理面への配慮)

利用するマウス、ラット個体は、麻酔をかけてから速やかに処理をし、動物に苦痛が生じないように配慮している。本研究で用いるヒトサンプルの解析に関しては、国立精神神経医療研究センター倫理委員会において承認を得ている。患者の試料は全てインフォームドコンセントを得た上で取得し、人権擁護の観点から匿名化後研究に使用した。

## C. 研究成果

#### (研究課題 1)

Epi-IER 遺伝子と蛋白量が IER において極端に減少していることを、網膜、大脳皮質、海馬、扁桃体などで明らかにした。また、Epi-IER 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その表現型を詳細

に調べたところ、以下の点で IER と類似点が認められた。

- i) Epi-IER 遺伝子の発現量が激減すること。
- ii) IER と同様な、網膜形成異常、海馬アンモン角の断裂、ゴルジ染色による神経突起伸長異常、などが認められたこと（詳細は分担研究者の早瀬の項参照）。
- iii) 海馬の初代培養において、IER と同様な（後述）神経細胞形態異常が認められたこと。
- iv) IER と同様に、てんかん誘発刺激薬剤（PTZ）に対する抵抗性が低下すること（詳細は分担研究者の早瀬の項参照）。

以上から、Epi-IER が IER の原因遺伝子であると結論付けた。

#### (研究課題 2)

IER における Epi-IER 遺伝子ゲノムをシークエンスしたところ、野生型に対しての一塩基置換が認められた。その G から A への一塩基置換は、あるエクソンのドナーサイトのコンセンサス配列の中にあるが、置換があるとそのコンセンサスは破壊される。実際に、RT-PCR によって IER のスプライシングを調べると、このエクソンと次のエクソンとの間のスプライシングの異常が認められた。本来のスプライシングドナーが使えなくなり、その前後の異所性ドナーを使うことによって、スプライシング異常が生じ、フレームシフトが生じることが予想された。そこで、野生型および（一塩基置換の入った）IER 由来のゲノムを発現ベクターに入れて COS 細胞に導入したところ、IER と全く同様なスプライシング異常が検出された。このことから、IER におけるこの一塩基置換によってスプライシング異常が生じ、フレームシフトが起きストップコドンが入ることによって Epi-IER が機

能できなくなることが、IER の原因となっていると予想された。おそらく、その過程で、nonsense-mediated RNA decay などが起こっていると思われる。

#### (研究課題 3)

Epi-IER の発現を失う IER の海馬初代培養において、神経突起の伸長と分岐が野生型に比べて減少していた。また、野生型ラット海馬初代培養細胞において、Epi-IER の強制発現ベクターを導入すると、逆に神経突起の伸長および分岐が促進されていることが観察された。以上から、Epi-IER は神経細胞の突起伸長と突起分岐に対して、正に関与していることが示唆された。

#### (研究課題 4)

##### (解剖学的解析)

ゴルジ染色法によって、脳の各部位の個々の神経細胞の形態について解析し、以下の結果を得た。

- (1) IER では、大脳皮質の特に第 5 層の錐体神経細胞では、樹状突起の形態が未熟で、突起の長さも分岐も野生型よりもかなり減少していた。
- (2) 扁桃体の spiny neuron（興奮性神経細胞と考えられる）も non-spiny neuron（抑制性神経細胞と考えられる）も、IER では樹状突起の形態が未熟で、突起の長さも分岐も野生型よりもかなり減少していた。
- (3) 海馬においては、CA1、CA3 の神経細胞の樹状突起の形態に軽微な異常が認められた。（細胞体から出た樹状突起が第一分岐にさしかかるまでの距離が短くなっていた。）
- (4) 大脳皮質、海馬において、神経細胞の樹状突起の異常な束化を観察した。

#### (電気生理学的解析)

電気生理学的解析により、以下の結果を得た。

- (1) 扁桃体における誘発刺激閾値が IER で優位に低下していることを見いだした。これは、扁桃体での興奮性が、異常に上昇していることを示唆していた。
- (2) 扁桃体刺激によるキンドリングが、IER では遥かに少ない日数で完成することが明らかになった。これも、扁桃体から海馬および大脳皮質へ至る神経回路が興奮しやすくなっていることを示唆していた。
- (3) 扁桃体において、特に複数回の刺激を行った際に IPSC の顕著な低下が認められたことから、IER の扁桃体における抑制系の機能の低下が認められた。
- (4) IER の海馬スライスにおいて CA3 から CA1 への入力における paired pulse facilitation の顕著な低下が認められた。

#### (研究課題 5)

(1) RNA および cDNA バイオリソースの構築  
病院各診療科及び臨床検査部、TMC 臨床開発部バイオリソース管理室と連携し、「精神遅滞リサーチリソース」の各症例のリンパ芽球より各種遺伝子発現検索をするための RNA および cDNA バイオリソースシステムを構築した。

平成 23 年末までに、合計で 215 症例 (215 検体) の RNA および cDNA の調製が完了した。引き続き次年度以降も残りの症例について調製を続ける。

#### (2) Epi-IER 遺伝子の発現量の解析

上記(1)で構築された cDNA バイオリソースを用いて、定量 RT-PCR 法によって、各症例のリンパ芽球における Epi-IER 遺伝子の発現量を定量した。平成 23 年度末時点において、189 症例についての

定量を終えた。次年度以降も引き続き残りの症例における発現量の定量を続ける。

#### (研究課題 6)

(1)正常脳組織 (ヒト胎齢 19 週から 37 週と生後 1 か月齢、1 歳) : 19 から 25 週齢では、SATB2 陽性細胞が cortical plate(CP)浅部に、CTIP2、FOXP1 陽性細胞は CP 深部に、CUTL1 陽性細胞は CP 全層に分布していた。また、TBR1 陽性細胞は CP 浅部と subplate に分布していた。29 週以降では、SATB2 陽性細胞は II 層、CUTL1 陽性細胞は II から V 層、CTIP2 は V 層、FOXP1 陽性細胞は V 層、TBR1 陽性細胞は II、VI 層に特異的に発現していた。これらの発現パターンは、いままでの動物実験の結果に類似していた。生後 1 か月以降では、SATB2、CUTL1 陽性細胞のみ認められたが、層特異性はなくなった。

(2)10 か月の滑脳症の脳組織の滑脳症 : FOXP1、TBR1 陽性細胞が浅層に観察された。つまり、これは大脳皮質の層構造の乱れを意味しており、さらには神経細胞移動の異常を示唆していると言える。

#### D. 考察

本研究から、IER において Epi-IER の発現量が減少していること、Epi-IER のノックアウトマウスで IER と同様な表現型が認められたことなどから、Epi-IER が IER の原因遺伝子であることが確定された。

また、IER における Epi-IER 遺伝子ゲノム上の一塩基置換がスプライシング異常を引き起こしていることが、IER におけるこの遺伝子の発現減少を引き起こし病態に繋がっているということも明らかにされた。一塩基置換によるスプライシング異常によって引き起こされる疾患は、ヒト遺伝病で



もしばしば認められるために、IER はスプライシング異常疾患としても良いモデルとして扱えるかもしれない。Epi-IER においては、mRNA 量も激減しているが、これはスプライシング異常によって引き起こされるフレームシフトによって異所性のストップコドンが生じるための、nonsense-mediated RNA decay が関与しているのではないかと予想している。しかし、それを証明した訳ではない。

海馬初代培養系において、Epi-IER が神経細胞の突起伸長と分岐に関与していることが示唆された。これは、分担研究者の早瀬が行った IER のゴルジ染色による脳の解析実験の結果とも良く整合する。

また、解剖学的解析によって、IER における大脳、海馬、扁桃体などの脳領域の神経細胞の形態異常を見いだした。特に、樹状突起の形成が未発達であること、さらには異常な束化が認められることから、本来の神経回路が果たす情報処理がうまくいかない可能性が高い。特に扁桃体では、抑制性神経細胞の形態異常が認められると同時に、抑制性神経細胞系の機能低下も検出された。実際に、扁桃体全体の誘発刺激閾値の低下からも明らかである。IER では、扁桃体を初発とするてんかん発作が生じることが最も多いので、この形態学的・生理学的異常が IER のてんかん様症状の直接的な原因となっているのではないかと考えられる。

さらに、海馬においては paired pulse facilitation の異常が認められた。もしかするとこれは、海馬のシナプス機能にも異常があるかもしれないことを示唆しているが、今の段階ではそれを確定できるデータは持ち合わせていない。しかし、この海馬での機能異常や、大脳皮質における神経細胞形態の異常が、IER における記憶・学習障害や社会性行動障害などに関与しているのではないかと、考えられた。

以上を総合すると、IER では Epi-IER 蛋白質の機能が失われた結果、大脳、海馬、扁桃体などでの神経細胞の形態形成がうまくいかず、その結果としてその神経回路の機能が損なわれ、発達障害やてんかん様の症状が引き起こされているのではないかと考えられた。

また後藤の分担研究では、これまでの「精神遅滞リサーチリソース」に対して、さらにリンパ芽球の RNA および cDNA をバイオリソースとして加えることができた。このバイオリソースを用いれば、それぞれの症例のリンパ芽球におけるあらゆる遺伝子の発現量を調べることができる。確かに、リンパ芽球での発現が、必ずしも脳神経系での発現と相関があるとは限らない。しかし、例えば IER のようにゲノム上のスプライシング異常を引き起こす突然変異が入ったような場合には、組織を問わず発現量に影響が出るはずであるから、このバイオリソースはやはり、有効かつ貴重であると考えて良い。RNA・cDNA バイオリソースは今なお作製中であり、順調に進めば平成 24 年度中には全ての症例について調製することができるであろう。

また、cDNA バイオリソースを用いた Epi-IER 遺伝子発現の定量についても、順調に進んでおり、平成 24 年度中にはほとんどの症例について定量することができると思われる。Epi-IER 遺伝子の発現量が極端に高い、あるいは、低い症例については、さらに Epi-IER 遺伝子のゲノムを詳細に調べ、あるいは可能であれば、患者において網膜異常を疑わせる所見（視力低下や ERG 異常など）があるかどうかについても検討する。（IER では、網膜形成異常が認められるため。）さらに、将来的には次世代シーケンサーを用いて、全ての症例の Epi-IER 遺伝子ゲノムの配列を読むことも考えている。

また、伊藤による分担研究により、ヒト大脳皮質標本の層構造形成の評価システムを確立することができた。これは、Epi-IER が原因となるヒト疾患の脳標本だけでなく、あらゆる脳神経疾患の患者標本を評価することを可能としている。層構造の乱れは、神経細胞移動の異常によってもたらされると考えられるが、精神遅滞やてんかんは神経細胞移動の異常との関連が強く示唆されているため、今後この方法を活用し、様々な脳標本を評価していく予定である。Epi-IER が原因となるヒト疾患が同定された暁には、手術標本などが手に入る限りは最優先でそれを解析することは言うまでもない。

かように、本研究は初年度としては当初の予定通り進んでいると評価できると思われる。次年度以降もひきつづき研究を進展させていきたい。

## E. 結論

Epi-IER を IER の原因遺伝子として完全に確定することに成功した。IER において、Epi-IER 遺伝子ゲノム上の一塩基置換が、スプライシング異常を引き起こし、結果として Epi-IER の発現異常をもたらしていることを明らかにした。Epi-IER が、神経突起の伸長と分岐に関与していることを明らかにした。また、IER の大脳皮質、海馬、扁桃体などにおいて、神経細胞の特に樹状突起の形成不全を検出した。さらに、扁桃体の抑制性神経細胞システムの機能が低下しているということ、扁桃体が興奮しやすい状態にあること、海馬での paired pulse facilitation が低下していることなどを、電気生理学的に明らかにした。

これまでの精神遅滞リサーチリソースに、さらに RNA・cDNA バイオリソースを加えた。また、その cDNA リソースを用いることで、Epi-IER の発

現量の解析を開始した。さらに、実際のヒトの脳組織を用いた免疫染色、およびそれによる大脳皮質の層構造の評価法を確立した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Goto A, Hoshino M, Matsuda M, Nakamura T: Phosphorylation of STEF/Tiam2 by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dibutyl cAMP-treated PC12D cells. *Mol Biol Cell* 22, 1780-1790, 2011
- 2) Komine O, Nagaoka M, Hiraoka Y, Hoshino M, Kawaguchi Y, Pear WS, Tanaka K: RBP-J promotes the maturation of neuronal progenitors. *Dev Biol* 354, 44-54, 2011
- 3) Matsumoto A, Susaki E, Onoyama I, Nakayama K, Hoshino M, Nakayama KI: Deregulation of the p57-E2F1-p53 axis results in nonobstructive hydrocephalus and cerebellar malformation in mice. *Mol Cell Biol* 31, 4176-4192, 2011
- 4) Morinaka A, Yamada M, Itofusa R, Funato Y, Yoshimura Y, Nakamura F, Yoshimura T, Kaibuchi K, Goshima Y, Hoshino M, Kamiguchi H, Miki H: Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse. *Science Signaling* 4 (170) ra26, 2011
- 5) Itoh M, Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A: Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2\_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem*

- 2012; 287 (17): 13859–13867.
- 6) Takeshita E, Saito Y, Nakagawa E, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Nezu A, Kitamura J, Itoh M, Sawano Y, Goto Y: Late-onset mental deterioration and fluctuating dystonia in a female patient with a truncating MECP2 mutation. *J Neurol Sci* 2011; 308:168–172.
- 7) Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakagawa T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T: The protocadherins, PCDHB1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neuroscience* 2011, 12:81 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2202/12/81>).
- 8) Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M: Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011; 21:588-596.
- 9) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K: Therapeutic Chaperone Effect of N-Octyl 4-Epi-b-Valienamine on Murine GM1-Gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 92-98.
- 10) Kaido T, Otsuki T, Saito Y, Sugai K, Takahashi A, Kaneko Y, Sakakibara T, Saito Y, Takahashi H, Honda R, Nakagawa E, Sasaki M, Kakita A, Itoh M: Novel pathological abnormalities of deep brain structures including dysplastic neurons in anterior striatum associated with focal cortical dysplasia in epilepsy. *J Neurosurg Pediatr* 2012 (in press).
- 11) Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Kimura S, Nakano T, Fukushima H, Inoue T, Tomiwa K, Itoh M: Progressive Leukoencephalopathy with Intracranial Calcification, Congenital Deafness and Developmental Deterioration. *Am J Med Genet A* 2011;155:2832-2837.
- 12) Wang W, Takashima S, Segawa Y, Itoh M, Shi X, Hwang SK, Nabeshima K, Takeshita M, Hirose S: The Developmental Changes of Na<sub>v</sub>1.1 and Na<sub>v</sub>1.2 Expression in the Human Hippocampus and Temporal Lobe. *Brain Res* 2011;1389:61-70.
- 13) Honda T, Fujino K, Okuzaki D, Ohtaki N, Matsumoto Y, Horie M, Daito T, Itoh M, Tomonaga K: Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic 4 mice expressing Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* 2011;85:4567-4571.

## 2. 著書

- 1) 星野幹雄：小脳皮質のないマウス「セレベレス」モデル動物利用マニュアル・疾患モデルの作製と利用・脳神疾患. エル・アイ・シー, 第4章 第2節, pp269-276, 2011
- 2) 後藤雄一：MELAS 症候群. 症候群ハンドブック, 中山書店, 東京, pp73-74, 2011
- 3) 後藤雄一：ミトコンドリア病. 小児科診療ガイドライン-最新の診療指針-第2版, 総合医学社, 東京, pp250-251, 2011
- 4) 後藤雄一：ミトコンドリア病. 標準神経病学第2版, 医学書院, 東京, pp46-52, 2012
- 5) 伊藤雅之：急性脳症の病理. 小児科臨床ピクシス 28 急性脳炎・脳症. 中山書店, 東京, pp16-21, 2011

### 3. 総説

- 1) 星野幹雄：小脳発達の分子機構と小脳無形性モデルマウス“セレベレス”。医学のあゆみ Vol.239 No.6, 精神発達遅滞・自閉症の分子医学, pp670-674, 2011
- 2) Hoshino M: Neuronal subtype specification in the cerebellum and dorsal hindbrain. Dev Growth Differ. 54:317-326, 2012
- 3) 高嶋幸男, 伊藤雅之, 小保内俊雅：発達障害の脳組織バンクの重要性と課題。医学のあゆみ Vol.239 No.6, 精神発達遅滞・自閉症の分子医学, pp627-630, 2011

### 4. 学会発表

1. Hoshino M: Roles of transcription factors in specifying neuron subtypes in the cerebellar system. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011
2. Yamada M, Taya S, Owa T, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M: Spatial specification of cerebellar neuroepithelium by bHLH transcription factors, Ptf1a and Atoh1, during development. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011
3. Owa T, Taya S, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M: Searching for novel binding partners of Atoh1 and Ptf1a, cerebellar development-related proteins using Proteomic analyse. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011
4. Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Minaki Y,

Kumai M, Hamaguchi A, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M: Gsh1 and Olig2 regulate cell fate decisions in embryonic cerebellum. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011

5. 瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 皆木康子, 熊井実, 濱口晶子, マークマグヌソン, 川口義弥, 池田一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星野幹雄: Gsh1 and Olig2 regulate cell fate decisions in embryonic cerebellum. 2011年度包括脳夏のワークショップ, 神戸, 8.22, 2011
6. Fujiyama T, Nagaoka M, Kumanogoh H, Yanagawa Y, Magnuson M, Obata K, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M: Genetic studies on the Development and Function of the Hypothalamus using Ptf1a-Cre & -flox knock-in mice. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 9.14-17, 2011
7. Owa T, Taya S, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M: Proteomic analyses of novel binding partners of Atoh1 and Ptf1a, cerebellar development-related proteins. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 9.14-17, 2011
8. 藤山知之, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 柳川右千夫, マークマグヌソン, 小幡邦彦, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄: Ptf1a ミュータントマウスを用いた視床下部の発生および機能の解析. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.13, 2011
9. 瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 皆木康子, 熊井実, 濱口晶子, マークマグヌソン, 川口義弥, 池田一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星野幹雄: Olig2 and Gsh1 regulate cell fate decisions in embryonic cerebellum. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.13, 2011

- 10.堀啓, 西岡朋生, 熊ノ郷晴子, 貝淵弘三, 星野  
幹雄: 新規自閉症感受性遺伝子 *Auts2* の分子機  
能の解析. 第 5 回神経発生討論会, 福井,  
3.15-16, 2012
- 11.山田真弓, 田谷真一郎, 大輪智雄, 鍋島陽一,  
星野幹雄: 小脳神経発生における *Ptf1a* と *Atoh1*  
の役割. 第 5 回神経発生討論会, 福井, 3.15-16,  
2012
- 12.大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 貝淵弘三,  
星野幹雄: 小脳発生制御分子 *Ptf1a*, *Atoh1* の結  
合分子の探索, 機能解析. 第 5 回神経発生討  
論会, 福井, 3.15-16, 2012
- 13.瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 皆木康子, 熊  
井実, 濱口晶子, マークマグヌソン, 川口義弥,  
池中一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星  
野幹雄: 小脳抑制性神経細胞 前駆細胞の時間  
形質の制御機構の解明. 第 5 回神経発生討論  
会, 福井, 3.15-16, 2012
- 14.藤山知之, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 柳川右千夫,  
マークマグヌソン, 小幡邦彦, 川口義弥, 鍋島  
陽一, 星野幹雄: A genetic analyses on the  
Development and Function of the Hypothalamus  
using *Ptf1a-Cre* & *-flox* knock-in mice. 第 5 回  
神経発生討論会, 福井, 3.15-16, 2012
15. Itoh M, Okazaki S, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y.  
Abnormal distribution of GABAergic interneurons  
leads to the epileptogenesis: Interneuron pathology  
associated with *ARX* mutation. Prague Symposium  
of Child Neurology and Developmental  
Epileptology. Prague, Czech Republic, 3-5,  
November, 2011
16. 伊藤雅之: レット症候群の研究最前線. 第 53  
回日本小児神経学会 シンポジウム 3, 横浜,  
5.26, 2011
17. 伊藤雅之: レット症候群 治療の試み. レッ  
ト症候群シンポジウム 2011 「レット症候群の  
基礎・臨床研究から治療へ」, 大阪, 12.4, 2011

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## II. 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
分担研究報告書

イハラてんかんラットの原因遺伝子の同定と機能解明

研究分担者 星野幹雄

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所  
病態生化学研究部 部長

研究要旨

イハラてんかんラット（IER: Ihara epileptic rat）は我々の連鎖解析によりその原因遺伝子領域がかなり狭められ、その領域内には Epi-IER という大きな遺伝子しかデータベース上存在しなかったために、Epi-IER が原因遺伝子であろうと考えられていた。本研究では、(1) Epi-IER が真に IER の原因遺伝子であるということを証明すること、(2) Epi-IER 遺伝子のゲノム上のいかなる異常が IER を引き起こしているのかを調べることにし、そして(3) その遺伝子がコードする Epi-IER 蛋白質の果たす生理学的役割を明らかにすること、および(4) Epi-IER 蛋白質のいかなる機能異常が IER で見られる「精神発達障害を伴うてんかん」症状を引き起こすのか、を明らかにすることを、目的としている。上記(4)は、もう一人の分担研究者である早瀬ヨネ子も担当し、そちらの報告書に記載するため、ここでは(1)~(3)について報告する。

平成 23 年度の研究において、Epi-IER のノックアウトマウスの解析などから Epi-IER を原因遺伝子として確定することができた ((1)の研究成果)。また、Epi-IER の一塩基置換によるスプライシング異常が IER の発症につながっていることを見いだした((2)の研究成果)。さらに、Epi-IER 蛋白質が神経突起の伸長や分岐に関与していることを見いだした((3)の研究成果)。今後さらに Epi-IER の機能について調べ、さらにその異常によっていかにして精神発達遅滞やてんかんが引き起こされるのかについて調べて行く予定である。

A. 研究目的

イハラてんかんラット（IER: Ihara epileptic rat）は我々の連鎖解析によりその原因遺伝子領域がかなり狭められ、その領域内には Epi-IER という大きな遺伝子しかデータベース上存在しなかったために、Epi-IER が原因遺伝子であろうと考えられていた。本分担研究では以下の 4 つの研究課題について明らかにすることを研究目的としている。

(研究課題 1) Epi-IER が真に IER の原因遺伝子であるということを証明する。

(研究課題 2) Epi-IER 遺伝子のゲノム上のいかなる以上が IER を引き起こしているのかを調べる。

(研究課題 3) その遺伝子がコードする Epi-IER 蛋白質の果たす生理学的役割を明らかにする。

(研究課題 4) Epi-IER 蛋白質のいかなる機能異常が IER で見られる「精神発達障害を伴うてんかん」症状を引き起こすのか、を明らかにする。

上記(研究課題 4)は、もう一人の分担研究者である早瀬ヨネ子との共同担当研究であり、そちらの報告書に記載するため、以下には研究課題(1)~(3)について報告する。

## B. 研究方法

### (研究課題 1)

IER における Epi-IER 遺伝子・蛋白質の神経系における発現量を定量 PCR 法、ウエスタンブロット法によって低量し、評価する。

Epi-IER のノックアウトマウスを作製し、その表現型が IER と同様かどうかについて解析する。

### (研究課題 2)

IER ゲノムにおける Epi-IER 遺伝子をシーケンスし、野生型と異なるゲノム配列を抽出する。異常を検出したゲノム変異がスプライシングドナー上に認められたので、正常型と異常型ゲノムをそれぞれ培養細胞発現系に導入し、IER と同様なスプライシング異常が再現されるかどうかについて見当する。

### (研究課題 3)

野生型ラットおよび IER 由来の海馬初代培養細胞において、神経細胞の突起形成や分岐形成についてニューロルシダシステムを用いて定量的に評価する。また、野生型ラットの海馬初代培養細胞に Epi-IER を遺伝子導入し、その形態形成におよぼす影響について評価する。

#### (倫理面への配慮)

利用するマウス、ラット個体は、麻酔をかけてから速やかに処理をし、動物に苦痛が生じないように配慮している。

## C. 研究成果

### (研究課題 1)

Epi-IER 遺伝子と蛋白量が IER において極端に減少していることを、網膜、大脳皮質、海馬、扁桃体などで明らかにした。また、Epi-IER 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その表現型を詳細に調べたところ、以下の点で IER と類似点が認め

られた。

i) Epi-IER 遺伝子の発現量が激減すること。

ii) IER と同様な、網膜形成異常、海馬アンモン角の断裂、ゴルジ染色による神経突起伸長異常、などが認められたこと（詳細は分担研究者の早瀬の項参照）。

iii) 海馬の初代培養において、IER と同様な（後述）神経細胞形態異常が認められたこと。

iv) IER と同様に、てんかん誘発刺激薬剤（PTZ）に対する抵抗性が低下すること（詳細は分担研究者の早瀬の項参照）。

以上から、Epi-IER が IER の原因遺伝子であると結論付けた。

### (研究課題 2)

IER における Epi-IER 遺伝子ゲノムをシーケンスしたところ、野生型に対しての一塩基置換が認められた。その G から A への一塩基置換は、あるエクソンのドナーサイトのコンセンサス配列の中にあるが、置換があるとそのコンセンサスは破壊される。実際に、RT-PCR によって IER のスプライシングを調べると、このエクソンと次のエクソンとの間のスプライシングの異常が認められた。本来のスプライシングドナーが使えなくなり、その前後の異所性ドナーを使うことによって、スプライシング異常が生じ、フレームシフトが生じることが予想された。そこで、野生型および（一塩基置換の入った）IER 由来のゲノムを発現ベクターに入れて COS 細胞に導入したところ、IER と全く同様なスプライシング異常が検出された。このことから、IER におけるこの一塩基置換によってスプライシング異常が生じ、フレームシフトが起きストップコドンが入ることによって Epi-IER が機能できなくなることが、IER の原因となっていると予想された。おそらく、その過程で、



nonsense-mediated RNA decayなどが起こっていると思われる。

#### (研究課題 3)

Epi-IER の発現を失う IER の海馬初代培養において、神経突起の伸長と分岐が野生型に比べて減少していた。また、野生型ラット海馬初代培養細胞において、Epi-IER の強制発現ベクターを導入すると、逆に神経突起の伸長および分岐が促進されていることが観察された。以上から、Epi-IER は神経細胞の突起伸長と突起分岐に対して、正に関与していることが示唆された。

#### D. 考察

本研究から、IER において Epi-IER の発現量が減少していること、Epi-IER のノックアウトマウスで IER と同様な表現型が認められたことなどから、Epi-IER が IER の原因遺伝子であることが確定された。

また、IER における Epi-IER 遺伝子ゲノム上の一塩基置換がスプライシング異常を引き起こしていることが、IER におけるこの遺伝子の発現減少を引き起こし病態に繋がっているということも明らかにされた。一塩基置換によるスプライシング異常によって引き起こされる疾患は、ヒト遺伝病でもしばしば認められるために、IER はスプライシング異常疾患としても良いモデルとして扱えるかもしれない。Epi-IER においては、mRNA 量も激減しているが、これはスプライシング異常によって引き起こされるフレームシフトによって異所性のストップコドンが生じるための、nonsense-mediated RNA decay が関与しているのではないかと予想している。しかし、それを証明した訳ではない。

海馬初代培養系において、Epi-IER が神経細胞の突起伸長と分岐に関与していることが示唆された。

これは、分担研究者の早瀬が行った IER のゴルジ染色による脳の解析実験の結果とも良く整合する。早瀬は、ゴルジ染色によって、IER の大脳皮質、扁桃体において、神経突起の伸長や分岐が極端に未熟であることを見いだしている。これは、私が初代培養系で見いだした所見と共に、この分子の突起形成への関与を強く示唆している。

#### E. 結論

Epi-IER を IER の原因遺伝子として完全に確定することに成功した。IER において、Epi-IER 遺伝子ゲノム上の一塩基置換が、スプライシング異常を引き起こし、結果として Epi-IER の発現異常をもたらしていることを明らかにした。Epi-IER が、神経突起の伸長と分岐に関与していることを明らかにした。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Goto A, Hoshino M, Matsuda M, Nakamura T: Phosphorylation of STEF/Tiam2 by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dibutyryl cAMP-treated PC12D cells. *Mol Biol Cell* 22, 1780-1790, 2011
- 2) Komine O, Nagaoka M, Hiraoka Y, Hoshino M, Kawaguchi Y, Pear WS, Tanaka K: RBP-J promotes the maturation of neuronal progenitors. *Dev Biol* 354, 44-54, 2011
- 3) Matsumoto A, Susaki E, Onoyama I, Nakayama K, Hoshino M, Nakayama KI: Deregulation of the p57-E2F1-p53 axis results in nonobstructive hydrocephalus and cerebellar malformation in mice. *Mol Cell Biol* 31, 4176-4192, 2011
- 4) Morinaka A, Yamada M, Itofusa R, Funato Y,

Yoshimura Y, Nakamura F, Yoshimura T, Kaibuchi K, Goshima Y, Hoshino M, Kamiguchi H, Miki H: Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse. *Science Signaling* 4 (170) ra26, 2011

## 2. 著書

- 1) 星野幹雄：小脳皮質のないマウス「セレベレス」モデル動物利用マニュアル・疾患モデルの作製と利用・脳神経疾患. エル・アイ・シー, 第4章 第2節, pp269-276, 2011

## 3. 総説

- 1) 星野幹雄：小脳発達の分子機構と小脳無形性モデルマウス“セレベレス”. *医学のあゆみ* Vol.239 No.6, 精神発達遅滞・自閉症の分子医学, pp670-674, 2011
- 2) Hoshino M: Neuronal subtype specification in the cerebellum and dorsal hindbrain. *Dev Growth Differ.* 54:317-326, 2012

## 4. 学会発表

1. Hoshino M: Roles of transcription factors in specifying neuron subtypes in the cerebellar system. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011
2. Yamada M, Taya S, Owa T, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M: Spatial specification of cerebellar neuroepithelium by bHLH transcription factors, Ptf1a and Atoh1, during development. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011

3. Owa T, Taya S, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M: Searching for novel binding partners of Atoh1 and Ptf1a, cerebellar development-related proteins using Proteomic analyse. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011
4. Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Minaki Y, Kumai M, Hamaguchi A, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M: Gsh1 and Olig2 regulate cell fate decisions in embryonic cerebellum. 4th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum, Tokyo, September 18, 2011
5. 瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 皆木康子, 熊井実, 濱口晶子, マークマグヌソン, 川口義弥, 池中一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星野幹雄: Gsh1 and Olig2 regulate cell fate decisions in embryonic cerebellum. 2011年度包括脳夏のワークショップ, 神戸, 8.22, 2011
6. Fujiyama T, Nagaoka M, Kumanogoh H, Yanagawa Y, Magnuson M, Obata K, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M: Genetic studies on the Development and Function of the Hypothalamus using Ptf1a-Cre & -flox knock-in mice. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 9.14-17, 2011
7. Owa T, Taya S, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M: Proteomic analyses of novel binding partners of Atoh1 and Ptf1a, cerebellar development-related proteins. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 9.14-17, 2011
8. 藤山知之, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 柳川右千夫, マークマク, 小幡邦彦, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄: Ptf1a ミュータントマウスを用いた視床下部の発生および機能の解析. 第34

回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.13, 2011

9. 瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 皆木康子, 熊井実, 濱口晶子, マークマグヌソン, 川口義弥, 池田一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星野幹雄: Olig2 and Gsh1 regulate cell fate decisions in embryonic cerebellum. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.13, 2011
10. 堀啓, 西岡朋生, 熊ノ郷晴子, 貝淵弘三, 星野幹雄: 新規自閉症感受性遺伝子 Auts2 の分子機能の解析. 第5回神経発生討論会, 福井, 3.15-16, 2012
11. 山田真弓, 田谷真一郎, 大輪智雄, 鍋島陽一, 星野幹雄: 小脳神経発生における Ptf1a と Atoh1 の役割. 第5回神経発生討論会, 福井, 3.15-16, 2012
12. 大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 貝淵弘三, 星野幹雄: 小脳発生制御分子 Ptf1a, Atoh1 の結合分子の探索, 機能解析. 第5回神経発生討論会, 福井, 3.15-16, 2012
13. 瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 皆木康子, 熊井実, 濱口晶子, マークマグヌソン, 川口義弥, 池田一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星野幹雄: 小脳抑制性神経細胞 前駆細胞の時間形質の制御機構の解明. 第5回神経発生討論会, 福井, 3.15-16, 2012
14. 藤山知之, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 柳川右千夫, マークマグヌソン, 小幡邦彦, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄: A genetic analyses on the Development and Function of the Hypothalamus using Ptf1a-Cre & -flox knock-in mice. 第5回神経発生討論会, 福井, 3.15-16, 2012

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
分担研究報告書

イハラてんかんラットの解剖学的、生理学的解析

研究分担者 早瀬ヨネ子

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所  
病態生化学研究部 流動研究員

**研究要旨**

イハラてんかんラット (IER: Ihara epileptic rat) は、生後から発達障害様症状を、5ヶ月からてんかん症状を呈し約一年で死に至る原因不明の自然発症ラット突然変異体である。我々の解析から、IER ではてんかん発症前から大脳皮質および海馬のニューロサーキットに形態学的異常が認められ、脳の興奮性が異常に高まっていることが明らかになった。本研究では、神経解剖学的、神経生理学的解析を通して、IER の脳の形態および機能にどのような異常が生じているのかを明らかにし、そしてそれがいかにして発達障害やてんかん様症状を招来するのか、について詳細に明らかにすることを目標としている。

平成23年度の研究において、扁桃体、大脳皮質、そして海馬において、個々の神経細胞（興奮性と抑制性を含む）の神経突起の形成が未熟であることを見いだした。また、神経突起の異常な束化も認められた。さらに電気生理学的解析としては、扁桃体での誘発刺激閾値が低下しているということ、抑制性神経細胞系の機能が低下しているということを見いだした。さらに、海馬における paired pulse facilitation の異常も検出した。以上から、IER では脳の各所に神経細胞の形態異常があるということ、そしてそのために電気生理学的にも異常をきたすことによって、発達障害様症状やてんかん様症状が招来されるのではないかと推測された。今後さらに詳細に IER の解剖学的、生理学的解析を行い、IER の病態について調べて行く予定である。

**A. 研究目的**

イハラてんかんラット (IER: Ihara epileptic rat) は生後から発達障害様症状（社会性行動異常、記憶・学習障害）を、5ヶ月からてんかん症状を呈し約一年で死に至る原因不明の自然発症ラット突然変異体である。以前の我々の解析から、IER ではてんかん発症前から大脳皮質および海馬のニューロサーキットに形態学的異常が認められ、脳の興奮性が異常に高まっていることが明らかになった。本研究では、以下の二つのアプローチで IER における脳の解剖学的、機能的異常に迫る。

(1) IER の発生過程および成体における脳神経系の

形態学的な異常について詳細に調べる。

(2) IER の脳における機能について、電気生理学的に調べる。

上記、(1)、(2)から、IER におけるいかなる形態的、機能的異常が発達障害およびてんかん様症状を招来するのかを明らかにし、ヒトの「発達障害を伴うてんかん」の発症・病態進展機構を知る手がかりとするのが本研究の目標である。

**B. 研究方法**

(解剖学的解析)

ゴルジ染色法を用いて、IER の各発生段階におけ