

201224108A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 星野 幹雄

平成25（2013）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	----- 15
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	----- 23
早瀬 ヨネ子	
3. 精神遅滞バイオリソースの整備と <i>EPI-IER</i> 遺伝子の異常による ヒト疾患の同定	----- 29
後藤 雄一	
4. ヒト「精神遅滞+てんかん」の神経病理像の解析	----- 35
伊藤 雅之	
5. イハラてんかんラットの関連遺伝子の解析	----- 39
中尾 啓子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 47

# 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 科研費研究員	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
研究分担者	中尾啓子	埼玉医科大学 医学部生理学教室	講師

#### 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* がその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24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、ZFN を用いたノックアウトラットを作製することによって証明しつつある。さらに、*Epi-IER* が神経突起の伸長と分岐に関与するだけでなく（これは平成23年度の成果）、神経細胞の配置や神経突起の束化抑制にも関与していることを示した。また、FDG-PET および cFOS 解析により、IER では扁桃体や海馬などの辺縁系で神経活動が活発になっていること、発作時の脳波解析により扁桃体や海馬が焦点となりうるようになった。また、発達障害をともなうてんかん症例のリサーチリソースの解析から、ヒトリンパ芽球における *EPI-IER* の発現が極端に低下する症例を見いだした。これらの中から、*EPI-IER* の異常によるヒト疾患の同定を行おうとしている。さらに、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*こそ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」の良好な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開くこと、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 24 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。平成 23 年度ま

での研究において、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 RT-PCR 法、ウエスタンブロット法によって定量し、その発現が激減していることが確定した。また、*Epi-IER* のノックアウトマウスにおいて IER と類似の表現型が認められたことから、*Epi-IER* が IER の原因遺伝子であることが強く示唆された。平成 24 年度は、*Epi-IER* のノックアウトラットを作製し、その表現型を観察することで、この遺伝子が IER の原因遺伝子であることをさらに確実なものとする (星野)。

(研究課題 2) *Epi-IER* 蛋白質の果たす生理学的役割を明らかにする。

平成 23 年の研究により、*Epi-IER* が海馬初代培養細胞の突起伸長や分岐に関与することが明らかにされていた。平成 24 年度は、*in vivo* 解析においても同様な役割が示唆されるのか調べる。さらに神経突起の束化抑制や、神経細胞体の配置への関与についても調べる (星野)。

(研究課題 3) *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。平成 23 年度の研究では、IER における脳の解剖学的、電気生理学的解析によって、発症の病理に迫ることができた。平成 24 年度は、このことを踏まえて、さらに生きた個体において、FDG-PET を用いた脳の活動性評価およびてんかん発作時における脳波解析を行う (早瀬)。

(研究課題 4) 国立精神神経医療研究センターの『精神遅滞てんかんリサーチリソース』に RNA および cDNA のバイオリソースを加え、そこからヒト *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 5)

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。また、ヒト自閉症である Rett 症候群関連遺伝子の解析も合わせて行う (伊藤)。

#### (研究課題 6)

*Epi-IER2* は、*Epi-IER* のファミリー分子であるが、その分子構造や発現様式から、神経発生における多くの場面で重要な働きを果たしているのではないかと想像される。そこで、本研究では、*Epi-IER2* 遺伝子の機能欠失変異体の表現型を詳細に解析することによって、この *Epi-IER2* 遺伝子および *Epi-IER2* 蛋白質が神経系の発生および機能に果たす役割をさらに明らかにする (中尾)。

## B. 研究方法

#### (研究課題 1)

Zinc Finger Nuclease(ZFN)法を用いて、*Epi-IER* 遺伝子のノックアウトラットを作製し、その表現型が IER と同様なのかどうかについて調べる。

#### (研究課題 2)

野生型ラットおよび IER 由来の海馬初代培養細胞を *Epi-IER* を発現する L 細胞と共培養

することによって、細胞間の接着やスペーシングなどを観察する。また、海馬初代培養細胞の長期培養によって、神経突起の束化が起こるかどうかを観察し、また *Epi-IER* の遺伝子導入によってレスキューできるかどうか観察する。

#### (研究課題 3)

ヒトてんかん症例においては脳波・PET などが実際の臨床場面において焦点探求に用いられている。本研究においてはラットでもこれらの機器を活用し、さらに計測後に免疫組織化学的に cFOS の反応状態をしらべることによって、実際にどの部位が焦点であるかを詳細にすることができるのではないかと考え、これらの生理機能検査と形態的観察に比較検討をおこなう。

#### (研究課題 4)

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 5)

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。また、ヒトの発達障害・てんかん・自閉症をしめす Rett 症候群の原因遺伝子である *MeCP2* の isoformophome である *MeCP2\_e2* のノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析する(伊藤)。

#### (研究課題 6)

(1) *Epi-IER2<sup>dell7/dell7</sup>*マウス(機能欠失変異体)の遺伝型の決定。

*Epi-IER2<sup>dell7/dell7</sup>*マウスのヘテロ同士の親を掛け合わせ、生後2-3週の子の尻尾からゲノムの抽出を行う。

Forward primer : CTTTGC GCGTTATGATCCT、Reverse primer: GTGGTGTGCGATACTGATG を用いて、94°C (5分) → [94°C (30秒) → 55°C (30秒) → 72°C (2分)] x35cycles → 72°C (7分) → 4°Cの条件でPCRを掛け、4%ゲルにて電気泳動し、遺伝型の決定をした。

(2) ルクソール・ファストブルー染色:

ルクソール・ファスト染色液(ルクソール・ファストブルーMBS1g、95%アルコール1000ml、10%酢酸5ml)に浸透(56°C、24時間) → 0.05%炭酸リチウム水溶液で脱色 → 70%アルコールで脱色 → エタノール上昇系列(70%エタノール → 90% → 100% → 100%)により脱水 → 封入を行う。

(3) Nissle 染色:

H<sub>2</sub>O で洗浄 → クレシル溶液に浸透(6分) → 95%エタノールで分別 → 100%エタノール → キシレンx2 → 封入を行う。

(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)

Zinc Finger Nuclease (ZFN) を用いた遺伝子ノックアウトラットを作成し、*Epi-IER* の欠損によって IER の症状が再現できるか検討した。ZFN は下図 1 に示すように DNA 結合ドメインである Zinc-Finger 部位がゲノム上 (target) の特異的な配列を認識し、DNA 切断ドメインである *FokI* 部分が切断することにより非常に特異性の高い“はさみ”となり DNA の二重鎖切断を引き起こす。この修復過程において、標的陰電子の切断部位で遺伝子の欠損、挿入、改変(置換)が生じフレームシフトがおこれば、最終的に遺伝子がノックアウトされる。

今回の target の配列はラット 8 番染色体の *Epi-IER* exon11(48658065..CT.48658104 図 2) であり、この target された ZFN をラット受精卵に injection し、6 系統のノックアウトラットを得ることができた。

系統 1 ~ 4 は target の塩基 CT を中心とした exon 内の short deletion であり、系統 5, 6 は target の塩基 CT より下流の Exon 11 から Intron 11 にかけての large deletion であった。Exon 内の変異は in frame のものも、frame

shift しているものも IER と同様の眼球 RDG (Retinal Dysgenesis) や海馬 MDG (Microdysgenesis) の表現型を示していた。系統 5, 6 の exon intron にかかる large deletion では in frame になってしまうためか表現型がでなかった。

しかし、これらの系統 1~6 では いずれも IER との combined hetero で IER と同様な網膜および海馬形態における表現型が観察された。IER もこれらの ZFN rats もいずれも wild type との hetero ではこれらの表現型は観察されないの (劣性変異) であるが、IER/ZFN の combined-hetero 変異体では表現型が出現したため、IER の原因遺伝子は *Epi-IER* であるとの確認が得られた。

#### (研究課題 2)

i) *Epi-IER* 蛋白質の神経突起束化抑制機能を明らかにした。

*Epi-IER* の発現を失う IER の海馬初代培養を長期培養すると、神経突起の束化形成が認められた。同様な束化は、IER 個体におけるゴルジ染色においても、大脳皮質や海馬で観察される。この束化は、IER か初代培養細胞に *Epi-IER* 遺伝子を導入することでレスキューできたため、*Epi-IER* が神経突起の束化抑制に働いていることが明らかになった。

ii) *Epi-IER* 蛋白質が、ある種の神経細胞の配置に関与していることを明らかにした。

IER および *Epi-IER* ノックアウトマウスにおいて、海馬の抑制性神経細胞の配置に偏りが認められた。通常ならばある程度細胞間距離を保ったまま均等配置される抑制性神経細胞

が、お互いにクラスターを作ったりして、不均等に分布していた。また扁桃体におけるソマトスタチン陽性抑制性神経細胞でも同様な偏りが認められた。このことは、*Epi-IER* が相互反発作用を持つことによって、細胞間の距離を保っているのかもしれないと考え、次のような in vitro の実験を行った。

*Epi-IER* を発現する L 細胞と発現しない L 細胞の細胞株を作製し、それぞれ GFP および DsRed でラベルした。それと、海馬初代培養細胞とを共培養したところ、海馬初代神経細胞が *Epi-IER* を発現する L 細胞を避けることがわかった。しかしながらそのような傾向は、IER 由来の神経細胞では認められない。このことは、*Epi-IER* が分子間相互反発的に作用し、細胞間の距離を適切に保つことに働いていると考えられた。

#### (研究課題 3)

(1) IER の脳活動の FDG ( $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glucose) PET を用いた解析と cFOS 発現解析

脳のエネルギー需要は全身で消費されるブドウ糖の約 25%におよび、そのため正常脳組織は非常にブドウ糖の集積が強い。しかし、てんかんの原因となっている領域では発作間歇期には血流やブドウ糖代謝が低下していることが知られておりヒトでは FDG ( $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glucose) による PET (Positron Emission Tomography) が発作間歇期のてんかん焦点の探索に用いられている。我々は、イハラてんかんラットの発作間歇期に FDG 撮像を行うことにより発作焦点の同定を試みた。



IER は、この撮影時 10 ヶ月での状態はおおよそ 1~3 回/ 日の発作を起こしている。しかし、まだてんかん重積状態には至っていない。このとき IER では海馬では FDG の取り込みが減少しており、扁桃体からの出力路 (線条体・BNST (Bed Nucleus of Stria Terminalis) で強い FDG の取り込みが上昇していた。

これらの部位を詳細に調べるために PET 撮影後、1 週間で脳を環流固定し、immediately early gene である c-FOS 染色を行った。c-Fos 遺伝子は発作後約 15~30 分で上昇し、c-FOS 蛋白は発作後約 2-4 時間で上昇する。発作後約 2-4 時間を狙って脳を環流固定して c-FOS 蛋白の発現を調べた。

IER ラットでは脳の辺縁系 (海馬・扁桃体) で、比較的 FDG 集積が弱かったことに加え、cFOS は扁桃体 BLA 核、CEA 核で発現しており、とくに CEA 核での cFOS 発現が高度であった。FDG の低集積と c-FOS の高度発現は、てんかん焦点を示唆する所見であり、IER では扁桃体がてんかん原性部位であることが示唆された。これは、以下の(2)の脳波測定においても、IER の発作焦点が扁桃体や海馬であることが示唆されていることに合致する。

## (2) IER のてんかん発作時における脳波解析。

てんかん発作時の IER の脳波の同時記録を行った。IER では脳波的には発作の initial spike が扁桃体から出現することが多いことがわかった。その次に頻度が高いのが海馬であった。このことは、IER の発作焦点が扁桃体や海馬であることを示唆している。

## (研究課題 4)

### (1) *EPI-IER* 遺伝子の発現量の解析。

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 24 年度末時点において、98 家系 255 サンプルについて real time PCR を行い cDNA 量を定量した。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。

また、この中より *EPI-IER* cDNA 発現量の低い家系を選択して家系内での *EPI-IER* の発現量を比較した。すると、同じ家系でも健常人では発現が正常なのに、患児では発現が極端に低下する例が認められたため、これが候補の症例となりうると考えられた。

## (研究課題 5)

①正常脳組織 (ヒト胎齡 19 週から 37 週と生後 1 か月齡、1 歳): 19 から 25 週齡では、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。

②10 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。

③ヒトの発達障害・てんかん・自閉症をしめす Rett 症候群の原因遺伝子である *MeCP2* の isoformophome である *MeCP2\_e2* のノックアウトマウスを作成した。このマウスでは、Rett 症候群の神経症状の発現には十分ではなかったが、胎盤形成の不全をしめし、胎内発育不全をもたらすことがあきらかとなった。

#### (研究課題 6)

##### (1) *Epi-IER2<sup>del17/del17</sup>* マウス系統の繁殖。

*EPI-IER2* の個体レベルの機能を解析するために、C57B6 が遺伝的背景 (バックグラウンド) の自然発症 *Epi-IER<sup>+del17</sup>* マウスを米国ジャクソン研究所より購入し、野生型 C57B6 マウスと交配し、さらにヘテロ型同士を交配した。しかし、C57B6 バックグラウンドのヘテロ型 (+/*del17*) 母マウスは、仔を食殺するため、仔をあまり得ることができなかった。また、わずかに生存した仔の中にもホモ型は得られなかったため、ホモ型も致死であることが疑われた。そこで、129SvEv、BALB/c 系統の野生型マウスとも交配し、遺伝的背景を変えることを考えた。その結果、129SvEv および BALB/c バックグラウンドの系統のヘテロ型 (+/*del17*) 母マウスは食殺することなく、多くの仔を産み育てることが認められた。ただし、129SvEv バックグラウンドの場合には、ホモ型は生まれて来ないため、恐らくホモ型は胎生期か生直後に致死となると考えられた。それに対して、BALB/c バックグラウンドの場合には、ホモ型 (*del17/del17*) が生まれ育つことがわかった。従って、本研究では、BALB/c

系統のバックグラウンドの個体を用いて研究を遂行した。

ちなみに、遺伝的バックグラウンドを変えるには 7 世代のバッククロスが必要であると一般的には言われているが、今回の BALB/c 系統との交配では、かけ合わせの 2 世代目 (F2) で致死ではないホモ型 (*del17/del17*) マウスが得られている。

##### (2) *Epi-IER2<sup>del17/del17</sup>* マウスの身体的特徴

生後 10 日目のホモ型 (*del17/del17*) マウスは、野生型、ヘテロ型マウスに比べて、雄雌共に体重は半分程度で全体的に身体が小さい。

しかし、生後 100 日以降に雌の体重は、野生型に追いついた。一方、ホモ型 (*del17/del17*) マウスの雄の体重は、野生型に追いつくことはなかった。現段階で、雌雄差による成育の違いを説明することはできないが、性ホルモン等の影響が示唆される。また、雌は生殖能力を有するが、雄は生殖能力がほとんどないことが観察された。

##### (3) *Epi-IER2<sup>del17/del17</sup>* マウスの脳の観察

成体のホモ型 (*del17/del17*) マウスでは、中脳の露出部が拡大していた。しかし、大脳や小脳の肥大は顕著ではなかった。

次にどの部位が肥大しているのか調べるため、ルクソール・ファストブルー染色を行った。ルクソール・ファストブルー染色は、髄鞘を青く染色し、それによって、大まかな脳の構造を観察することができる。図 3. 10 に記した赤の点線で囲んでいる中脳の部位において、中脳全体が肥大していることが観察された。

さらに、脳の各部位の大きさを定量するために、断面積を測定し比較した。前脳 (大脳

皮質・海馬・交連線維)、間脳、中脳に着目し lateral 0.8mm・lateral 1.0mm・lateral 1.2mm の 3 点におけるサジタル切片を作成し、各部位の断面積を解析ソフトの Metamorph を用いて計測した。生後 1 年のホモ (*del17/del17*) マウスにおいては、大脳皮質、海馬の断面積に変化は認められなかった。しかし、交連線維に関しては 0.44 倍と有意に小さくなっていた。また、間脳および中脳ではそれぞれ 1.31 倍、1.64 倍にと有意に増大していた。特に、中脳の肥大が著しい。

#### D. 考察

*Epi-IER* 遺伝子をラットにおいてもノックアウトした場合であっても、やはり IER と同様な表現型が認められたため、この遺伝子が IER の原因遺伝子であることがさらに確実になった。しかしながら、このラットはまだできたばかりであり、網膜および海馬における解剖学的解析しか行っていない。今後は、さらなる *in vitro* および *in vivo* の解析、てんかん発作などの行動学的解析を行って行く必要がある。

平成 23 年度の研究によって、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された。これは、一つの細胞にのみ *Epi-IER* を導入した場合でも突起伸長・分岐が観察されたことから、恐らくは *Epi-IER* が何らかのリガンドに対する受容体として働き、突起伸長や分岐に働いているのではないかと考えられていた。それに対して、平成 24 年度で見つけられた新たな分子機能、すなわち、神経細胞のスペーシング維持機能および神経突起束化抑制機能は、

*Epi-IER* 同士の間での分子間相互反発作用によると考えられる。つまり、*Epi-IER* は multifunctional な分子なのではないかと考えられる。

また、本研究では、FDG-PET 実験により、IER 脳活動が、扁桃体からの出力系で亢進していることがわかった。また、脳波計測によって IER の発作焦点が扁桃体優位であることがわかった。(一部は海馬優位である。) また、平成 23 年度の電気生理学的解析によって、IER の扁桃体における抑制性神経細胞系の機能低下が示されているので、これが IER 扁桃体の活動性亢進につながり、扁桃体を発作焦点としたてんかんの原因となっているということが考えられる。また、平成 24 年度の星野の研究から、扁桃体におけるソマトスタチン陽性抑制性神経細胞の配置異常が観察されたということ、さらにその突起形成異常も観察されたということから、扁桃体のこれら抑制性神経細胞の機能異常がその原因となっているのではないかと考えられた。

また、ヒト疾患という観点からの解析についてであるが、これまでの「精神遅滞てんかんリサーチリソース」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いる。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25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。

『知的障害+てんかん』のデポジットリーは患者および家族血液からリンパ芽球を作成しており、このリンパ芽球のRNAから患児における *EPI-IER* の相対発現量を計測し、さらにリンパ芽球ゲノム DNA から *EPI-IER* 遺伝子をシークエンスすることで、*EPI-IER* の発現量の多寡と遺伝子変異 (SNP 等) との関連を見つけ出すことができる可能性があり、『知的障害+てんかん』の疾患の一因が明らかになることを期待している。

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25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）。

*EPI-IER* のゲノム領域長は369487bpと長大であり、現実的には *EPI-IER* 全ゲノム領域を解読するには次世代シーケンサなどが必要であるが、まず cDNA の低発現を示す患児から *EPI-IER* のエクソン部（6899bps）において直接サンガー法による直接シーケンスを施行中である。今のところ数多くのSNPを検出しているが、それが疾患と関連したもので

あるかどうかは、さらなる解析が必要である。）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計画中であると考えている。

ヒト大脳皮質の形成過程でも、動物実験の報告と同様に層特異的分子が発現していた。今回検討した胎生中期から出生時期まで個々の分子の局在には変化がなかったが、乳児期早期にこれらの分子の発現はなくなるか層特異性が失われる。しかし、滑脳症では、Layer-specific markers の分布異常がみられ、神経細胞の移動障害を反映しているものと考えられた。また、生後では発現しないはずの marker の発現があり、神経細胞の成熟障害が存在するものと考えられた。

本研究では、*Epi-IER* のファミリー分子である *Epi-IER2* の機能欠変異失体の表現型を解析した。C57B6 バックグラウンドでは、生後すぐに致死であったが、BALB/c 系統とのバッククロスによって生体まで生きることになり、生後の解析が可能となった。とはいえ、生後に発達不良が見られ、正常な発達ではないことが想像された。この分子は、神経系の神経細胞に広く発現している。機能欠変異失体の中枢神経系においては、中脳や間脳の肥大が認められたが、その原因については平成25年度の研究で明らかにしていくつもりである。

## E. 結論

ZFN によるノックアウトラットを作製することにより、*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。*Epi-IER* が、神経突起の伸長と分岐だけでなく、神経細胞

のスペーシング維持や、神経突起の束化抑制にも関与していることを明らかにした。また、FDG-PET 実験および cFos 発現解析により、IER 脳活動が、扁桃体からの出力系で亢進していることを見いだした。また、発作時の脳波測定から、IER の発作焦点は主として扁桃体であること（一部は海馬）が明らかになった。

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ることができた。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することができた。そして、精神遅滞を伴うてんかん症例の中で、*EPI-IER* の発現量が極端に低下する症例を見だし、さらに同家系の健常人との発現比較を行った。次年度も引き続き解析を行い、*EPI-IER* 遺伝子の異常によるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例の同定に努めて行きたい。

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は確立できた。今後、*EPI-IER* 遺伝子の異常によるヒト症例を同定した際には、インフォームドコンセントを得るなど倫理的問題点を解決した上で、その脳標本の解析を行って行きたい。また平成 24 年度の研究においては発達障害・てんかん・自閉症に関わるノックアウトマウスを作成し、その病態を調べることで、発達障害・てんかんの発生機序を調べる手がかりを得た。

また、*Epi-IER* のファミリー遺伝子である *Epi-IER2* の機能喪失変異マウスを解析し、体重減少や脳の各部位の肥大化などについて明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Terakawa YW, Inoue YU, Asami J, Hoshino M, Inoue T. A Sharp Cadherin-6 Gene Expression Boundary in the Developing Mouse Cortical Plate Demarcates the Future Functional Areal Border. *Cereb Cortex*, 2012.
- 2) Arai A, Saito T, Hanai S, Sukigara S, Nabatame S, Otsuki T, Nakagawa E, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal maturation and differentiation of neocortical neurons in epileptogenic cortical malformation: unique distribution of layer-specific marker cells of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. *Brain Res*, 1470:89-97, 2012.
- 3) Sakakibara T, Sukigara S, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Imbalance of interneuron distribution between neocortex and basal ganglia: Consideration of epileptogenesis of focal cortical dysplasia. *J Neurol Sci*, 323: 128-133, 2012.
- 4) Sakakibara T, Saito T, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Delayed maturation of neurons of focal cortical dysplasia IIA and IIB: consideration from specific neocortical-layer

marker expression. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71 (8): 741-749, 2012.

## 2. 著書

- 1) Hoshino M, Seto Y, Yamada M. Specification of cerebellar and precerebellar neurons. *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*, Springer, Netherlands, 75-87, 2012.
- 2) 田谷真一郎, 星野幹雄. 培養皿上の成熟神経細胞への遺伝子導入. 実験医学別冊 目的別で選べる遺伝子導入プロトコール, 羊土社, 東京, 131-136, 2012.
- 3) 伊藤雅之. てんかんの病理. 最新医学別冊. 新しい診断と治療の ABC 74. てんかん. 最新医学社. 大阪. 72-82pp, 2012.

## 3. 総説

- 1) Hori K, Hoshino M. GABAergic neuron specification in the spinal cord, the cerebellum and the cochlear nucleus. *Neural Plast*, (2012): Article ID 921732-11pages, 2012.

## 4. 学会発表

- 1) Hoshino M. Neuron subtype specification in the cerebellum. Joint symposium between Max Planck Institute and National Center of Neurology and Psychiatry. Munich, Germany, 10. 3-5, 2012.
- 2) Hoshino M. Analysis of a rat model for human temporal lobe epilepsy. International Synapse Research Workshop 2012, Okazaki, Japan, 11.8-9, 2012.
- 3) Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Minaki Y,

Kumai M, Hamaguchi A, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. Transcriptional regulation of the diversity of cerebellar GABAergic neurons. *Neuroscience* 2012, Society for Neuroscience's 42nd annual meeting. New Orleans, USA, 10.13-17, 2012.

- 4) Itoh M, Okazaki S, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. GABAergic interneurons lead to the epileptogenesis: Interneuron pathology associated with ARX mutation. Symposium 1, Basic Science. The 10th European Congress on Epileptology. London, UK, 10.1, 2012.
- 5) 藤山知之, 星野幹雄. Ptf1a 遺伝子改変マウスを用いた視床下部の発生および機能の解析. 平成 24 年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ. 仙台, 7.24-27, 2012.
- 6) Hori K, Taya S, Nishioka T, Kumanogoh H, Kaibuchi K, Hoshino M. Characterization of a novel Autism-related gene in the CNS development. 第 35 回日本神経科学大会. 名古屋, 9.18-21, 2012.
- 7) 藤山知之, 早瀬ヨネ子, 長岡麻衣, 熊ノ郷晴子, 柳川右千夫, マグヌソン マーク, 小幡邦彦, 田中智宏, 伊村明浩, 船戸弘正, 川口義弥, 鍋島陽一, 星野幹雄. A genetic analysis of hypothalamic development and function using Ptf1a-cre & Ptf1a-flox mice. 第 35 回日本神経科学大会. 名古屋, 9.18-21, 2012.
- 8) 瀬戸裕介, 中谷智哉, 増山典久, 皆木康子, 熊井実, 濱口晶子, 川口義弥, 池田一裕, 竹林浩秀, 石渡信一, 尾野雄一, 星野幹雄.

- Temporal identity transition of GABAergic neural precursors in embryonic cerebellum. 第35回日本神経科学大会. 名古屋, 9.18-21, 2012.
- 9) 大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 貝淵弘三, 星野幹雄. 小脳発達制御因子 Atoh1 の結合分子の網羅探索および機能解析. 第35回日本神経科学大会. 名古屋, 9.18-21, 2012.
- 10) Taya S, Owa T, Nishioka T, Kaibuchi K, Hoshino M. Roles of Atoh1 and Atoh1-interacting molecules in cerebellar development. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡, 12.11-14, 2012.
- 11) Hori K, Taya S, Nishioka T, Kumanogoh H, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Kaibuchi K, Hoshino M. Characterization of the molecular function for a novel Autism-related gene in the CNS development. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡, 12.11-14, 2012.
- 12) Fujiyama T, Nagaoka M, Kumanogoh H, Hayase Y, Funato H, Tanaka T, Imura A, Yanagawa Y, Magnuson M, Obata K, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M. A genetic analysis of hypothalamic development and function using Ptf1a-genetically modified mice. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡, 12.11-14, 2012.
- 13) 堀啓, 田谷真一郎, 西岡朋生, 熊ノ郷晴子, 安部学, 山崎真弥, 崎村健司, 貝淵弘三, 星野幹雄. 新規自閉症感受性遺伝子 Auts2 の分子機能の解明. 第6回神経発生討論会. 和光, 3.14-15, 2013.
- 14) Fujiyama T, Nagaoka M, Kumanogoh H, Hayase Y, Funato H, Tanaka T, Imura A, Yanagawa Y, Magnuson M, Obata K, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M. A genetic analysis of hypothalamic development and function using Ptf1a-genetically modified mice. 第6回神経発生討論会. 和光, 3.14-15, 2013.
- 15) Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue Y, Inoue T, Fujiyama T, Yamada M, Magnuson M, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. Temporal identity transition of cerebellar GABAergic neuron progenitors. 第6回神経発生討論会. 和光, 3.14-15, 2013.
- 16) 橋本了哉, 増山典久, 川口 義弥, 秋山治彦, 星野幹雄. Sox9 controls oligodendrocyte differentiation in the cerebellum and the midbrain. 第6回神経発生討論会. 和光, 3.14-15, 2013.
- 17) 堀永実, 丹羽直也, 平澤陽介, 勝井政博, 花島文成, 中平洋子, 矢内原仁, 朝倉博孝, 中尾啓子. 正所性膀胱癌モデルにおける in vivo エレクトロポレーション法の検討: 第10回日本泌尿器科学会総会, 横浜, 4.21-24, 2012.
- 18) Orihara-Ono M, Toriya M, Nakao K, Okano H. Downregulation of Notch mediates the seamless transition of individual Drosophila neuroepithelial progenitors into optic medullar neuroblasts during prolonged G1. ISSCR 2012, Yokohama, 6.13-16, 2012.
- 19) Nakao K, Itami C, Yamada M, Kimura F. Electrophysiological and neurochemical

analyses of neurons in the developing barrel cortex following in utero gene-transfer directed to the medial ganglionic eminence. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 9.18-21, 2012.

- 20) Koizumi K, Nakao K, Nakajima H. Study of new candidate genes critical for human developmental disorders. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Kobe, 9.30-10.2, 2012.
- 21) Nakao K, Kumagai M, Mizoi R, Tani E, Matsumoto M, Ikeda M, Araki N. Development of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy (OPMD) Disease Model by Persistent Expression of Patient-type PABPN1 Mutant Genes by High-efficiency in vivo Electroporation to Muscle Tissues. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 12.11-14, 2012.
- 22) Koizumi K, Nakao K, Higashida H, Nakajima H. New Candidate Genes Critical for Human Developmental Disorders Such as Autism and Mental Retardation. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 12.11-14, 2012.

#### 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、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もこれらの研究目標はある程度達成されたが、平成 24 年度はさらに(1)(3)について、いくつかの研究成果を挙げる事ができた。

まず、*Epi-IER* のラットにおけるノックアウト動物を、Zinc Finger Nuclease (ZFN) 法を用いて作製した ((1)の研究成果)。IER と同様な網膜形成異常を観察したが、今後、IER の表現型をどのくらい再現できているのかをさらに調べる。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だけでなく、細胞のスペーシング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。平成 23 年度までの研究において、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 RT-PCR 法、ウエスタンブロット法によって定量し、その発現が激減していることが確定した。また、*Epi-IER* のノックアウトマウスにおいて IER と類似の表現型が認められたことから、*Epi-IER* が IER の原因遺伝子であることが強く示唆された。平成 24 年度は、*Epi-IER* のノックアウトラットを作製し、その表現型を観察することで、この遺伝子が IER の原因遺伝子であることをさらに確実なものとする。

(研究課題 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。

これについては、平成 23 年度の研究によって、IER ゲノム上の一塩基置換がスプライシング異常とフレームシフトを引き起こし、結果として正常な *Epi-IER* 蛋白質の産生を妨げていることを見いだしたので、平成 24 年度はこの研究課題についてはこれ以上の研究は進めていない。

(研究課題 3) *Epi-IER* 蛋白質の果たす生理学的役割を明らかにする。

平成 23 年の研究により、*Epi-IER* が海馬初代培養細胞の突起伸長や分岐に関与することが明らかにされていた。平成 24 年度は、in vivo 解析においても同様な役割が示唆されるのか調べる。さらに神経突起の束化抑制や、神経細胞体の配置への関与についても調べる。

(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)

Zinc Finger Nuclease(ZFN)法を用いて、*Epi-IER* 遺伝子のノックアウトラットを作製し、その表現型が IER と同様なのかどうかについて調べる。

(研究課題 2)

平成 23 年度までの研究によって、ほぼ目的は達成されたので、平成 24 年度にはこの課題の研究は行っていない。

(研究課題 3)

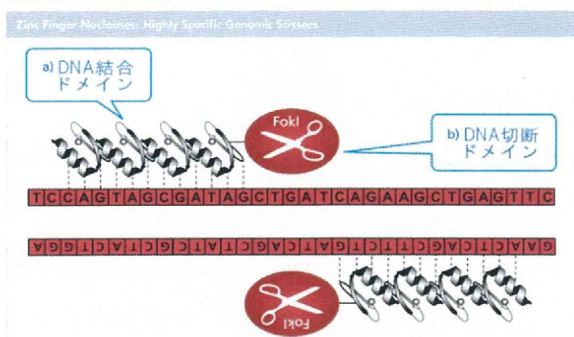
野生型ラットおよび IER 由来の海馬初代培養細胞を *Epi-IER* を発現する L 細胞と共培養

することによって、細胞間の接着やスペーシングなどを観察する。また、海馬初代培養細胞の長期培養によって、神経突起の束化が起こるかどうかを観察し、また Epi-IER の遺伝子導入によってレスキューできるかどうか観察する。

(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。

ZFN - その原理とシステム概要



cDNA YourSeq

GACATCGGCT ACTACCTnnG CCAGGCCAGC AACGGTGTGG

Genomic chr8 :

```

agggagtggg aaccctcagc aatatcacc agtgcccctc actggccgca 48658014
tccagatcct gcccaacagc tccttctga tacgccacgt cctggaagag 48658064
GACATCGGCT ACTACCTctG CCAGGCCAGC AACGGTGTGG gcactgacat 48658114
cagcaaggcc atgttctca cggtgaaaag tgagtctctgc ccctaccccc 48658164
atcctgccaa ggcccaccaa gggccaccaa gcacacacac
  
```

図2 Target 配列

C. 研究成果

(研究課題 1)

Zinc Finger Nuclease (ZFN) を用いた遺伝子ノックアウトラットを作成し、Epi-IER の欠損によって IER の症状が再現できるか検討した。ZFN は下図 1 に示すように DNA 結合ドメインである Zinc-Finger 部位がゲノム上 (target) の特異的な配列を認識し、DNA 切断ドメインである FokI 部分が切断することにより非常に特異性の高い“はさみ”となり DNA の二重鎖切断を引き起こす。この修復過程において、標的陰電子の切断部位で遺伝子の欠損、挿入、改変 (置換) が生じフレームシフトがおこれば、最終的に遺伝子がノックアウトされる。(図 1)

図1 Sigma ComproZ Zinc Finger Nuclease の原理 (instrunciton manual より)

今回の target の配列はラット 8 番染色体の Epi-IER exon11(48658065..CT..48658104 図 2) であり (図 2)