

この target された ZFN をラット受精卵に injection し、以下のノックアウトラット系統（表 1）を得ることができた。

系 統	欠損 塩基数	Exon	表現 型	IER/ZFN で の 表現型
系 統 1	-6 (in frame)	Exon11 内	あり	あり
系 統 2	-17 (frame shift)	Exon11 内	あり	あり
系 統 3	-58 (frame shift)	Exon11 内	あり	あり
系 統 4	-7+9 (stop codon 挿 入)	Exon11 内	あり	あり
系 統 5	-499 (in frame)	Exon11 Intron 11	なし	あり
系 統 6	-670 (in frame)	Exon11 Intron 11	なし	あり

表 1 ZFN により得られたノックアウトラットの系統（系統 1

系統 1 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 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（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 3)

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。このことから、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。

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。

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。

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. 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. 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) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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, 池中一裕, 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.

- 11) 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.
- 12) 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 Aut2 の分子機能の解明. 第6回神経発生討論会. 和光, 3.14-15, 2013.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.

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 科研費研究員

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や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。平成24年度においてはこれらの事実をふまえ、IER のてんかん発症の機序をしるために、脳波・PET・cFOS 発現による形態学的観察をおこないてんかん焦点について詳細な検討をおこなった。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。平成23年

度の研究では、以下の二つのアプローチで IER における脳の解剖学的、機能的異常に迫った。

(a) 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の詳細な解析。

(b) IER の脳における機能について、電気生理学的な解析。

上記、(a)、(b)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することができた。

平成 24 年度は、このことを踏まえて、さらに FDG-PET、cFos 解析、および発作時の脳波記録を行った。これらの解析から、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

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った。

(倫理面への配慮)

利用するラット個体は、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

(1) IER の脳活動の FDG (^{18}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}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。(図 1)

コントロール

IER 10 ヶ月

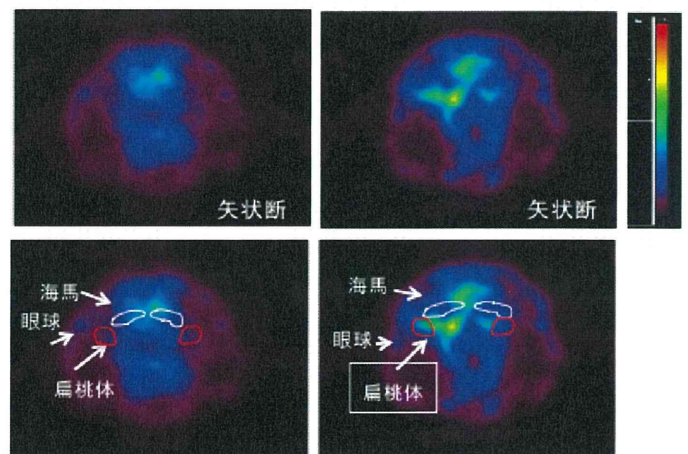


図 1 ^{18}F -FDG PET による脳内 Glucose 取り込みの観察 (発作間歇期)

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

(図 1、2)。

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(図 2)。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 時間で発作焦点部位に発現上昇する蛋白である。発作後約 2-4

時間を狙って脳を環流固定して c-FOS 蛋白をの発現を調べた。(図 2)

図 1、2 に示す様に 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。

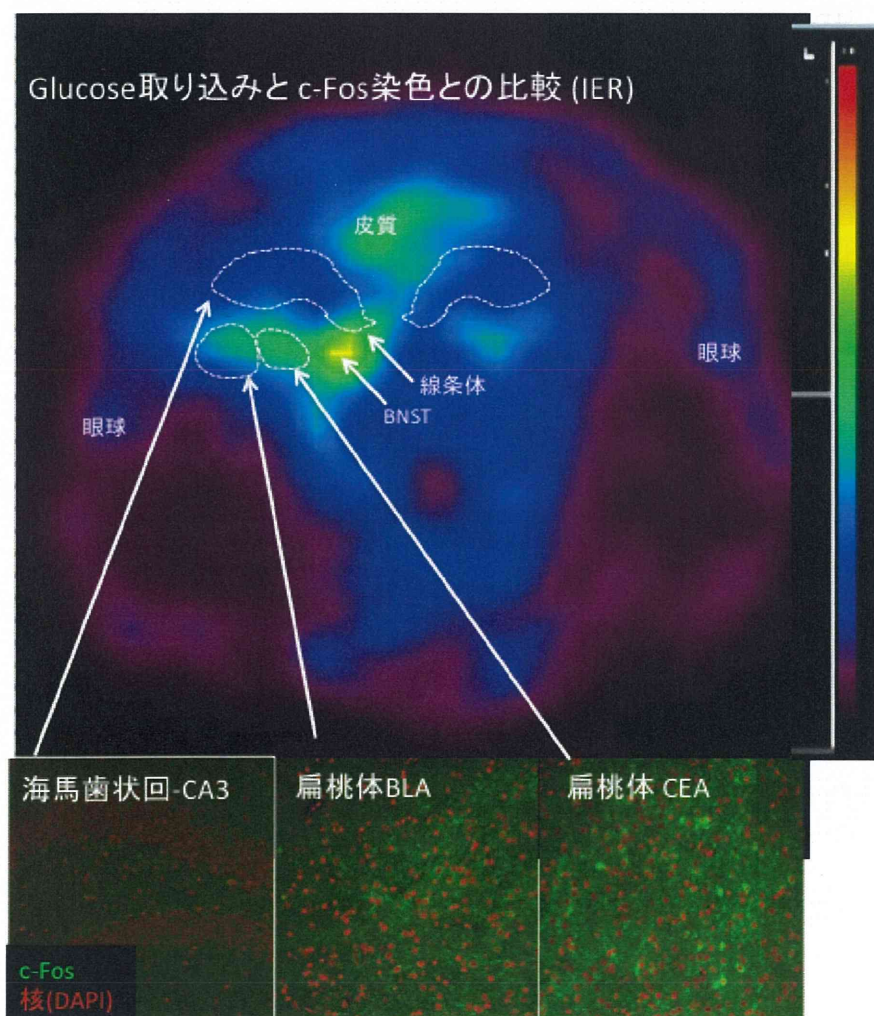


図 2 IER 発作間期におけるグルコースとりこみと c-FOS 染色の比較

(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 (図 3)。IER では脳波的には発作の initial spike が扁桃体 (図 3 中 AMD↑) 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る。

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。

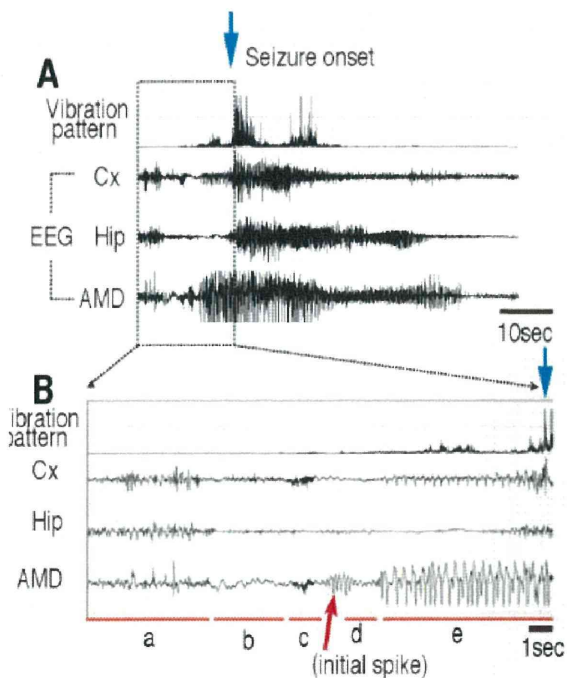


図 3 IER の発作時脳波

D. 考察

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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 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 Ptfla-cre & Ptfla-flox mice. 第35回日本神経科学大会. 名古屋, 9.18-21, 2012.
- 2) 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 Ptfla-genetically modified mice. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡, 12.11-14, 2012.
- 3) 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 Ptfla-genetically modified mice. 第6回神経発生討論会. 和光, 3.14-15, 2013.

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

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

研究分担者 後藤雄一
国立精神・神経医療研究センター 神経研究所
疾病研究第二部 部長

研究要旨

国立精神・神経医療研究センターでは、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費（後藤雄一班）の活動として、精神遅滞およびてんかん家系の血液 DNA およびリンパ芽球の試料と臨床症状の情報を合わせた『精神遅滞およびてんかんリサーチリソース』を蓄積してきており、それは平成 24 年度末の段階で累計 421 家系に達している。本研究では、イハラてんかんラット（IER: Ihara epileptic rat）の原因遺伝子として同定された *EPI-IER* 遺伝子の異常によって引き起こされるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例を見つけることを目的とする。

まずは各症例のリンパ芽球を培養し、そこから RNA を抽出し、cDNA を合成することによって、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ることとした。このバイオリソースを用いることで、各症例において様々な遺伝子の発現量を調べることができる。平成 23 年度からこのバイオリソース調製を初め、平成 24 年度末の段階で 215 検体の RNA と cDNA の作製を完了した。また、この cDNA サンプルを用いて、各症例における *EPI-IER* 遺伝子の発現量を定量 PCR を用いて測定することを開始した。実際に、*EPI-IER* の発現が極端に低い症例を同定し、さらにその家族におけるこの遺伝子の発現量と比較することができた。平成 25 年度以降は、引き続き残りの症例の RNA・cDNA バイオリソース調製を行うと共に、*EPI-IER* の発現量解析、そして *EPI-IER* ゲノムのシークエンス解析を行うことによって、*EPI-IER* 異常によるヒト精神遅滞およびてんかん症例の同定に努める。

A. 研究目的

国立精神・神経医療研究センターでは、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費（後藤雄一班）の活動として、精神遅滞家系の血液 DNA およびリンパ芽球の試料と臨床症状の情報を合わせた『精神遅滞てんかんリサーチリソース』を蓄積してきており、それは平成 24 年度末の段階で累計 421 家系に達している。本研究では、イハラてんかんラット（IER: Ihara epileptic rat）の原因遺伝子として同定された *EPI-IER* 遺伝子の異常によって引き起こされるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例を見つけることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 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 (1×10^6 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 μ g 精製する。

(2) 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 50ng/ μ L にし、1 サンプルにつき 100 μ L 作成する。(図 1)

(3) 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 μ L/1 本
- ・ 中期保存用 cDNA 50 μ L/1 本

・ 外部機関持ち出し用 cDNA 10 μ L/3 本の計 5 本を、一家系で一箱にまとめて -80°C で保存する。

それとは別に、外部機関持ち出し用に RNA 10 μ L/2 本を -80°C で保存する。先に作った 100 μ L の cDNA のうち、残った cDNA 20 μ 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°C で保存しておく。(図 1)

まずリンパ芽球デポジトリーから RNA および cDNA のリソースを作成して、一般に共用できるバイオリソースとして保存する。(図 1)

バイオリソース作成の流れ

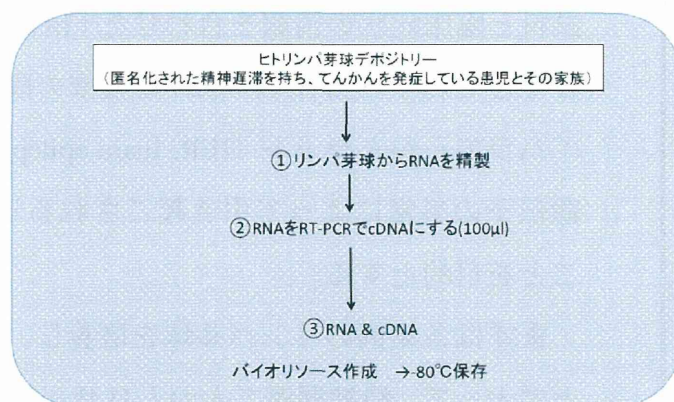


図 1: バイオリソース作成手順

(4) 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。(図 2)

実験の流れ

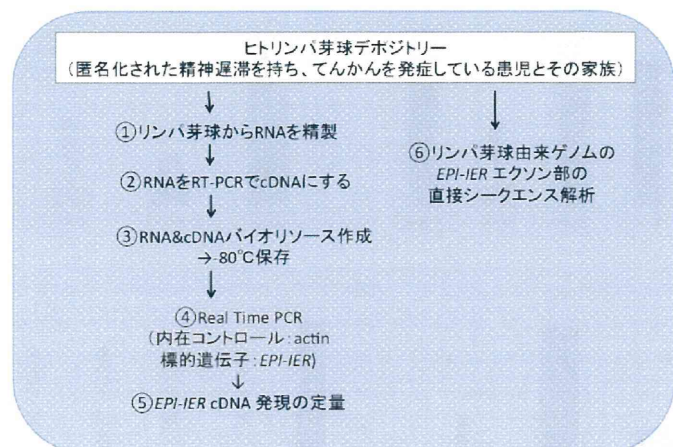


図2：バイオリソースを用いた実験の流れ

C. 研究成果

(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、「精神遅滞てんかんリサーチリソース」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 24 年末までに、合計で 255 症例 (255 検体) の RNA および cDNA の調製が完了した。

(図3) EPI-IER 遺伝子発現量の比較

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。

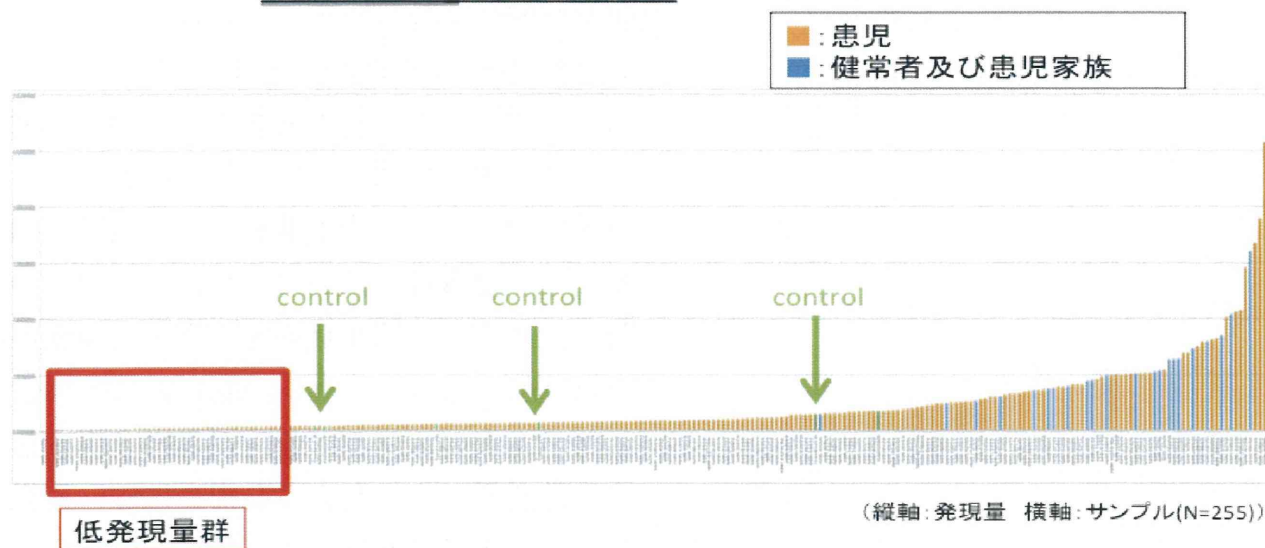
(2) EPI-IER 遺伝子の発現量の解析

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 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。全サンプルの発現量のヒストグラムをしめす (図3)。

また、この中より EPI-IER cDNA 発現量の低い家系 (図3 赤枠) を選択して家系内での EPI-IER の発現量を比較した (図4)。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。

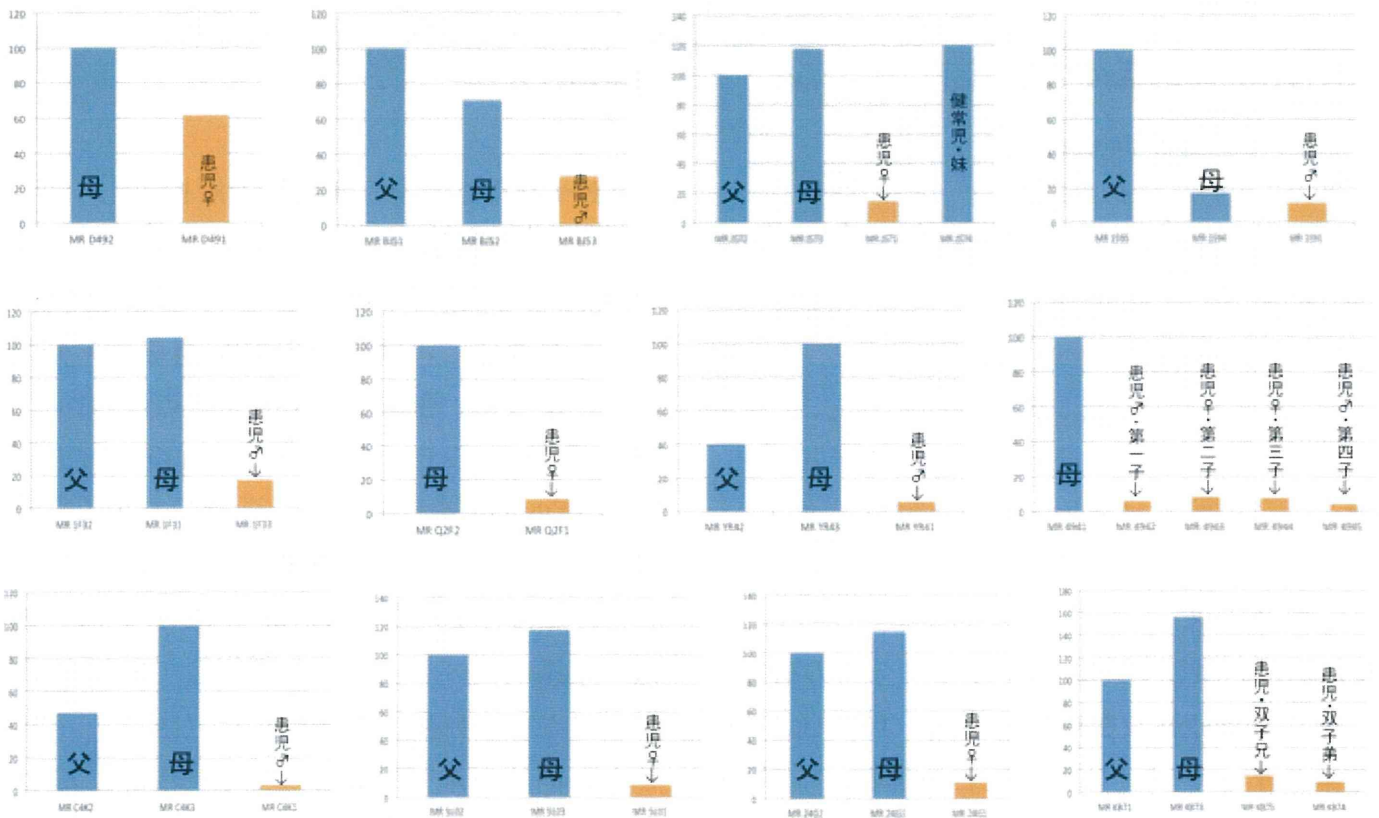
次年度以降も引き続き残りの症例における発現量の定量を続ける。

EPI-IER 発現量



家系内での EPI-IER 発現量の比較

(縦軸: % (父を100%とした時の他の家族の発現量。父が低い場合は母を100%とする))



→ 患児と健常な家族のあいだには発現量に差がみられた。

(図4)

患児家系内での EPI-IER cDNA 発現量の比較

D. 考察

本研究により、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*遺伝子をシーケンズすることで、*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ズを施行中である。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。

E. 結論

本研究により、これまでの精神遅滞てんかん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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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. 学会発表

- 1) 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.

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

ヒト「精神遅滞+てんかん」の神経病理像の解析

研究分担者 伊藤 雅之

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

疾病研究第二部 室長

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り、ヒトの「精神遅滞を伴うてんかん」の良いモデルとなりうる。また、主任研究者星野の研究により、IERの原因遺伝子 *Epi-IER* が同定された。現在、分担研究者の後藤により「精神遅滞てんかんリサーチリソース」から、*Epi-IER* 遺伝子の異常によって引き起こされるヒト精神遅滞あるいはてんかん症例の探索が進められている。

本研究では、後藤により同定された *EPI-IER* 異常によるヒト症例について、手術標本や剖検標本を解析し、その疾患の病態に迫ることを最終目的とする。そこでまず、その準備段階として、実際のヒトの脳標本を用いて、大脳皮質の層構造についての評価方法を確立することを目的とした。具体的には、各層の特異抗体 (layer-specific markers) を用いて染色することで評価した。

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り、ヒトの「精

神遅滞を伴うてんかん」の良いモデルとなりうる。また、主任研究者星野の研究により、IERの原因遺伝子 *Epi-IER* が同定された。現在、分担研究者の後藤により「精神遅滞てんかんリサーチリソース」から、ヒト *EPI-IER* 遺伝子の異常によって引き起こされるヒト精神遅滞

あるいはてんかん症例の探索が進められている。

本研究では、同定された *EPI-IER* 異常によるヒト症例について、手術標本や剖検標本を解析し、その疾患の病態に迫ることを最終目的とする。本年度は、まず、その準備段階として、実際のヒトの脳標本を用いて、大脳皮質の層構造についての評価方法を確立することを目的とした。具体的には、各層の特異抗体 (layer-specific markers) を用いて染色することで評価した。

またヒトの発達障害・自閉症をしめす Rett 症候群の原因遺伝子である *MeCP2* の isoform である *MeCP2_e2* のノックアウトマウスを作成し、この遺伝子変化と Rett 症候群の関係について検討した。

B. 研究方法

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。インフォームドコンセントは全ての症例について得ている。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 isoform *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。

C. 研究成果

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。

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 isoform 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。

D. 考察

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。

E. 結論

本研究において、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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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) 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. 学会発表

- 1) 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.

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関連遺伝子の解析

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。その原因遺伝子が *Epi-IER* であることが星野らによって同定され、その分子機能や疾患との関連が少しずつ明らかになってきた。*Epi-IER* は免疫グロブリンDメインを持つ細胞膜蛋白質であるが、同様な構造を持つ *Epi-IER2* と分子ファミリーを構成している。*Epi-IER2* はショウジョウバエなどにおいて、神経発生に関与することが報告されているが、脊椎動物の脳における機能は良くわかっていない。また、*Epi-IER2* の機能を解析することは、*Epi-IER* とどのように機能を使い分けているのかを理解することにもつながるため、厚生労働科研の本研究課題を遂行するためにも重要であると考えられる。

本分担研究者は、平成24年度から本研究計画に従事した。平成24年度において、*Epi-IER2* の機能欠失変異体の表現型の解析を行った。C56B6 バックグラウンドでは生直後に致死であったが、BALBc バックグラウンドにすることによって生体まで生存可能となり、生後の解析が可能となった。その結果、体重が極端に低い発達障害が認められた。また、神経組織のいくつかの部位が異常に増大することなどを見いだした。平成25年度は、ひきつづきこの変異マウスの解析を行って行く。

A. 研究目的

EPI-IER2 は、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ことを、研究目的とした。

B. 研究方法

1. *Epi-IER2*^{del17/del17}マウス（機能欠失変異体）の遺伝型の決定。

Epi-IER2^{del17/del17}マウスのヘテロ同士の親を掛け合わせ、生後2-3 週の仔の尻尾からゲノムの抽出を行う。

Forward primer : CTTTGCGCGTTATGATCCT、Reverse primer:GTGGTGTCGATACTGATG を用いて、94℃ (5 分) → [94℃ (30 秒) →55℃ (30 秒) →72℃ (2 分)] x35cycles→72℃ (7 分) →4℃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-MBS 1 g、95%アルコール 1000ml、10%酢酸5ml）に浸透（56℃、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。

H₂O 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x 2 →封入を行う。

（倫理面への配慮）

利用するマウス個体は、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

1. *Epi-IER2*^{del17/del17}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*^{+del17}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。

（表 1）

genotype/background	C57B6系統	129系統	BALBC系統
WILD (+/+)	4	20	8
Hetero (+/del17)	4	24	31
Homo (del17/del17)	0	0	6

表 1 *Epi-IER2*^{del17/del17} マウスの 2 世代目の生育数（個体数）