

— 研究助成報告 —

DNAダメージを介したてんかん病態メカニズムの解明

DNA damage in the neuropathology of epilepsy

榎 戸 靖

要旨：脳発達異常を伴うヒト疾患の多くがてんかんを症状とするが、その病態には依然明らかでない点が多い。本研究では、ホモシステイン代謝経路の鍵酵素であるシスタチオニンβ-シンターゼ（CBS）の遺伝子変異を病因とするヒト先天性アミノ酸代謝異常疾患（ホモシスチン尿症）に注目し、その病態とDNAダメージとの関わりを*in vivo*ならびに*in vitro*で解析した。

発達過程のマウス脳におけるCBSの発現は、ラジアルグリア及びアストロサイトに特異的であることから、本疾患はアストロサイト系譜細胞の異常が一次的病因と考えられた。さらに、CBS遺伝子欠損マウス（CBS^{-/-}マウス）由来のアストロサイトから放出された高濃度のホモシステインによってニューロンにDNAダメージが蓄積し、アポトーシスが誘導された。本研究結果は、アストロサイト系譜細胞の異常がもたらすてんかん発作や細胞非自律的な神経細胞死にDNAダメージが関与している事を示唆している。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2015；26：41-46

Key Words：homocysteine, DNA damage, glia, astrocyte, epilepsy

【序論】

てんかんの発症には脳の発達異常が深く関わるとされるが、その病態メカニズムの詳細は明らかでない。こうした中、てんかんを症状とするヒト先天性遺伝子疾患の原因の一つがDNA修復遺伝子変異であること¹⁻³⁾や、てんかんの病巣に生じたDNA二重鎖切断がそれに続く神経変性の引き金となること⁴⁾が報告され、てんかんの病態解明ならびにその治療標的としてのDNAダメージ／修復経路に大きな関心が寄せられている。またこれに加え、てんかんを惹起するニューロンネットワークの破綻が、これまで単なる支持細胞と考えられてきたグリア細胞、特にアストロサイトとニューロンの相互作用

の異常によることが明らかとなり、その分子病態の解明が急務の課題となっている^{5,6)}。

以上の背景から、今回、てんかん発症に関わるアストロサイトの異常とDNAダメージとの関係について、てんかん及び精神発達遅滞を症状とするホモシスチン尿症モデルマウス（CBS^{-/-}マウス）を用いて解析した。ホモシスチン尿症（MIM236200）は約30万人に1人の割合で発症する常染色体劣性遺伝子疾患であり、メチオニンからシステインを合成する際に必要な一連のアミノ酸代謝経路の異常によって発症する⁷⁾。CBS遺伝子変異によるものが最も多く（>90%）、その他メチルコバラミン合成障害およびメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）の変異によるものが知られる。発症メカニズムとして

は、細胞毒性を持つ含硫アミノ酸であるホモシステイン (Hcy) が細胞内に蓄積することで酸化ストレスが生じ、DNAやミトコンドリアが障害を受けるとする説が有力である。本研究では、グルタミン酸のアゴニストとしても働くHcyの異常蓄積がもたらす神経病態とDNAダメージとの関係を解析する事で、脳代謝を標的とする新たなてんかん治療の可能性を探る事を目的とした。

【方法】

(1) 神経系の細胞マーカータンパク質 (MAP2, RC2, GLAST, GFAP, Calbindin D) に対する抗体を用いてCBS発現細胞を同定するとともに、ホモシステチン尿症モデル動物であるCBS^{-/-}マウスを用い、発達過程で観察される脳形成異常とDNAダメージの蓄積の様子を正常マウスと比較した。まず、脳構造がほぼ完成する生後2週齢の大脳皮質を層構造マーカータンパク質 (CDP, Foxp1, Trb1) 抗体で染色し、正常及びCBS^{-/-}マウスでそれぞれ比較した。DNAダメージの蓄積は、DNA二重鎖切断マーカーである γ H2AX抗体を用いた免疫組織染色とウェスタンブロットにより比較・定量した。細胞死は活性化カスパーゼ3抗体を用いた免疫組織染色で検出した。

(2) Hcy代謝異常がてんかん誘発刺激に対する感受性に個体レベルで影響を及ぼすか否かを調べるため、生後2週齢から2ヶ月齢の正常ならびにCBS^{-/-}マウスの脳組織サンプルを用い、神経分化マーカーとDNAダメージマーカー抗体による免疫組織染色を行なった。脳組織中のHcy含量は長谷川らの方法に従ってGC/MS法により定量した⁸⁾。てんかんの誘発は、マウスにカイニン酸 (生理食塩水に溶解) を10~25mg/kgを腹腔内投与し、3時間行動を解析した。てんかん発作時の行動解析はRacine scaleに従い⁹⁾、1~6にscoringした。

(3) 脳組織中のDNA-PK活性はSignaTECT[®] DNA-Dependent Protein Kinase Assay Systemを用い、添付のプロトコールに従って測定した。核蛋白質の抽出は-80℃で凍結保存した脳組織からSchreiberらの方法¹⁰⁾に従って

おこなった。また、DNA-PK以外のバックグラウンド・キナーゼ活性の測定は、DNA-PKの活性化因子である二重鎖DNA断片を添加していない反応液に100 μ g/mlとなるようDNaseIを加え、氷上で2時間処理した核抽出液を用いて行った。得られたバックグラウンド・キナーゼ活性を、二重鎖DNA断片を添加して得られたトータルキナーゼ活性から差し引くことにより正味のDNA-PK活性の値とした。

【結果】

(1) CBSはCBS^{-/-}マウスの大脳皮質層構造は正常であったが、脳の広範囲でニューロン死の亢進が観察された。脳組織中のHcy含量を測定したところ、神経ネットワーク形成が最も盛んな生後2~3週齢のCBS^{-/-}マウス脳でHcy濃度が最も高くなることがわかった (正常マウスの約20~40倍)。

(2) 相同組換え修復を除き、正常ならびにCBS^{-/-}マウス脳組織において、様々なDNA修復関連蛋白質が同様に発現していることが確認されたが (Fig. 1)、CBS^{-/-}マウス脳では顕著なDNA二重鎖切断の増加が観察された (Fig. 2)。

(3) カイニン酸によるてんかん誘発刺激への感受性はCBS^{-/-}マウスが最も高く、次いでCBS^{+/-}マウス、CBS^{+/+}マウスの順であった。またこれと正に相関する形で、てんかん病態の早期マーカーであるDNA二重鎖切断の増加が、それぞれのマウスの大脳皮質及び海馬で観察された。

(4) 非分裂ニューロンにおけるDNA二重鎖切断修復の鍵酵素であるDNA-PK活性を測定した結果、正常ならびにCBS^{-/-}マウスの大脳皮質で有意な差は見られなかった。

【考察】

(1) CBSはアストロサイト系譜細胞特異的に発現することから、ホモシステチン尿症で見られる神経症状は、ニューロン-アストロサイト相互作用の異常が原因と考えられた。

(2) CBS欠損マウスでは顕著な脳形成不全が観察されるが、大脳皮質層構造は正常であることから、細胞移動は正常であると考えられた。

(3) CBS欠損はてんかん感受性とニューロンへ

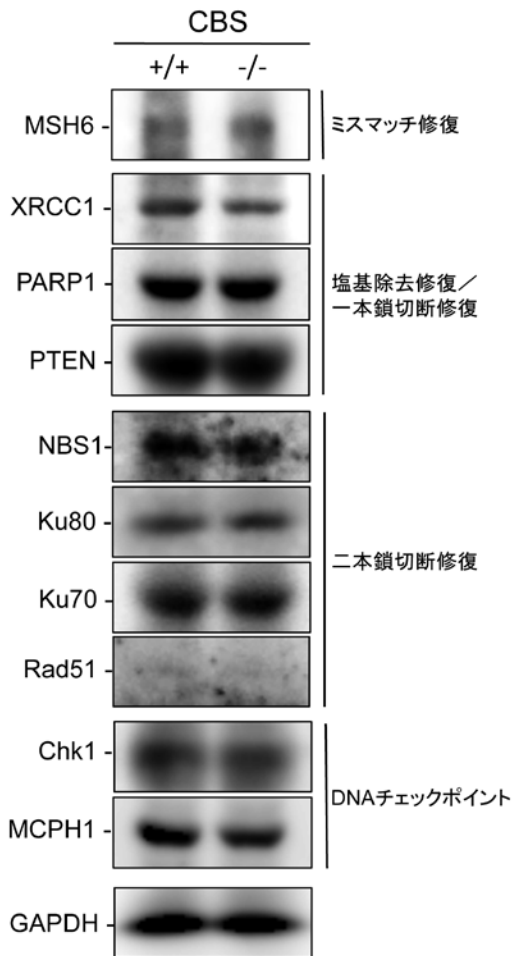


Fig. 1 生後2週齢CBS^{-/-}マウス大脳皮質におけるDNA修復関連タンパク質の発現。相同組換え修復に関わるRad51タンパク質の発現は極めて低いことから、脳組織におけるDNA二重鎖切断修復は主に非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ) によって修復されると考えられる。

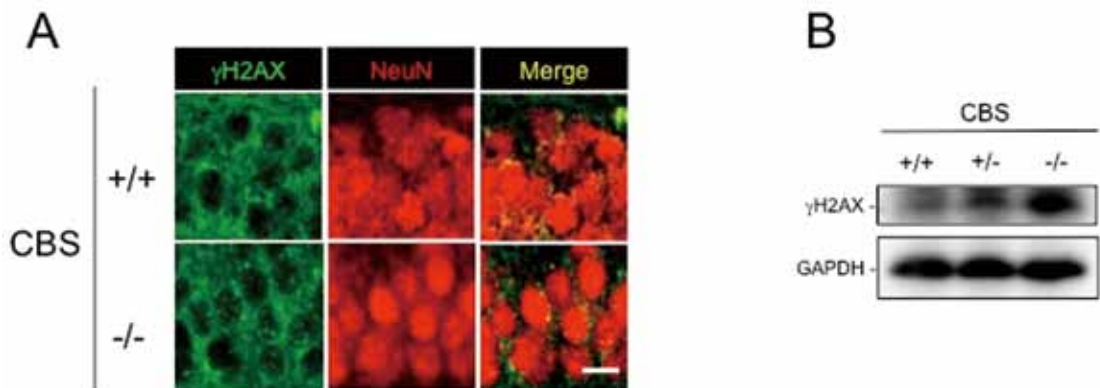


Fig. 2 生後2週齢海馬CA1領域に見られるDNA二重鎖切断の蓄積。(A) DNA二重鎖切断マーカーであるγH2AX抗体 (緑), ニューロンマーカーであるNeuN抗体 (赤) でそれぞれ染色した様子。(B) 海馬組織をγH2AX抗体でウェスタンブロットした結果。

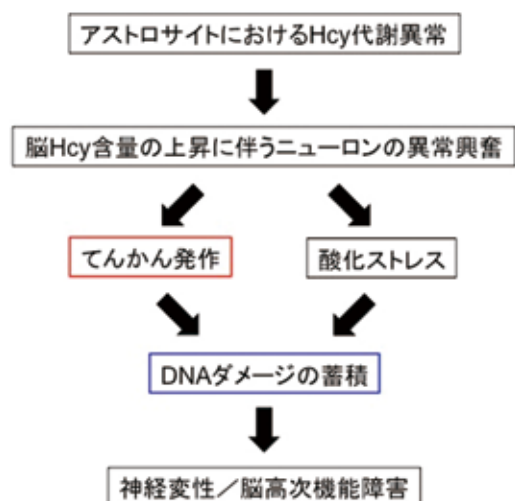


Fig. 3 アストロサイトのHcy代謝異常によって惹起されるてんかん病態モデル

のDNAダメージを増加させた。また、CBS欠損マウス脳DNA-PK活性は正常およびCBS^{-/-}マウス大脳皮質で差が見られなかった。HcyはNMDA型グルタミン酸受容体（NMDA受容体）のアゴニストとして働く¹¹⁾。一方、NMDA受容体を介した神経毒性がてんかん発作やDNAダメージを誘導することが知られる¹²⁾。これらのことから、発達期の脳に蓄積したHcyがNMDA受容体の異常興奮によるニューロン死とDNAダメージの蓄積をもたらす可能性が強く示唆された（Fig. 3）。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成を賜りましたてんかん治療研究振興財団に心より御礼申し上げます。また、脳組織中のHcy含量を測定して頂いた東京薬科大学薬学部長谷川弘先生ならびに実験サポートをして頂いた愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 運動障害病理研究室の皆様へ深く御礼申し上げます。

【文献】

- 1) Gómez-Herreros F, Schuurs-Hoeijmakers JH, McCormack M, Grealley MT, Rulten S, Romero-Granados R, et al. TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is

required for normal neural function. *Nat Genet.* 2014 ; **46** : 516-521.

- 2) Woodbine L, Neal JA, Sasi NK, Shimada M, Deem K, Coleman H et al. PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J Clin Invest.* 2013 ; **123** : 2969-2980.
- 3) Shen J, Gilmore EC, Marshall CA, Haddadin M, Reynolds JJ, Eyaid W., Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet.* 2010 ; **42** : 245-249.
- 4) Crowe S.L. et al., Phosphorylation of histone H2A.X as an early marker of neuronal endangerment following seizures in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 2011 ; **31** : 7648-7656.
- 5) Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 2013 ; **36** : 174-184.
- 6) Wetherington J, Serrano G, Dingledine R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron.* 2008 ; **58** : 168-178.
- 7) Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Irreverre, F., Laster, L. Homocystinuria: An enzymatic defect. *Science* 1964 ; **143** : 1443-1445.
- 8) Shinohara Y, Hasegawa H, Kaneko T, Tamura Y, Hashimoto T, Ichida K. Analysis of [(2)H7] methionine, [(2)H4]methionine, methionine, [(2)H4]homocysteine and homocysteine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry to follow the fate of administered [(2)H7] methionine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010 ; **878** : 417-422.
- 9) Racine R.J., Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1972 ; **32** : 281-294.
- 10) Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989 ; **17** : 6419.
- 11) Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV et al., Neurotoxicity

associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 ; **94** : 5923-5928.

12) Yu HC, Sloan JL, Scharer G, Brebner A,

Quintana AM, Achilly NP et al., An X-linked cobalamin disorder caused by mutations in transcriptional coregulator HCFC1. Am J Hum Genet. 2013 ; **93** : 506-514.

Summary

DNA damage in the neuropathology of epilepsy

Yasushi Enokido, PhD

Accumulating evidences have suggested that astrocytic dysfunction in the brain closely associates with the neuropathology of epilepsy. Moreover, recent studies have revealed that defects of a few DNA repair genes responsible for DNA double-strand break (DSB) repair have direct link to some inherited human diseases with a symptom of epilepsy. However, the relationship between astrocytic dysfunction which may cause epilepsy and DNA damage has yet to be elucidated.

In this study, we have found that abnormally accumulated homocysteine secreted from astrocytes which lack cystathionine β -synthase (CBS) mediates DSB and apoptosis in neurons. CBS is a key enzyme that participates in the folate pathway and catalyzes the transsulfuration of homocysteine and serine to cystathionine as a cysteine precursor. A deficiency of CBS leads to homocystinuria, an inherited human disease characterized by mental retardation, seizures and vascular disorders. Our results suggest that DNA damage caused by defective homocysteine metabolism in astrocytes mediates neurotoxicity and apoptosis which may result in epilepsy.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2015 ; 26 : 41-46

