

— 研究助成報告 —

新たに発見された乳児重症ミオクロニーてんかんマウス： 原因遺伝子のポジショナルクローニングと病態解析

A new mouse model for severe myoclonic epilepsy in infancy :
positional cloning of the causative gene and pathological analysis

松 島 芳 文

要旨：乳児重症ミオクロニーてんかん（ドラベ症候群）は、1978年にDravet によって初めて記載された重篤な知能障害を伴う難治てんかんであり、効果的な治療方法、治療薬は皆無であり、自然発症モデルの出現が渴望されていた。

我々は、このような背景において、特異な行動異常を示し生後15日前後で死亡する突然変異マウスを発見し、原因遺伝子がマウス2番染色体の*Scn1a*であることを明らかにした。ヒトの*SCN1A*は、ドラベ症候群の主要な原因遺伝子であることから、本変異マウスがヒトのドラベ症候群のモデルとなる可能性が強く示唆された。

本ドラベ症候群マウスの遺伝様式は、単純なメンデル遺伝に従い、ヒトと同様に常染色体性優性遺伝であり、原因遺伝子*Scn1a*の変異は、Exon14への～9 kbの挿入変異であった。脳波測定の結果からは、スパイク波の焦点は右後頭葉近辺にあると推定された。

個の医療に対応したモデルの樹立を目指し、遺伝的背景の異なる複数系統のドラベ症候群コンジュニク系の作出を行った。これらの系統は、系統差を手掛りにした早期致死性、発作誘発剤に対する反応性、遺伝子診断、および創薬研究に有用なモデルマウスとなる。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2015；26：69-76

Key Words : Severe myoclonic epilepsy in infancy, Dravet syndrome, *Scn1a*, spontaneous mouse model

はじめに

乳児重症ミオクロニーてんかんは、1978年にDravet¹⁾によって初めて記載された重篤な知能障害を伴う難治てんかん（以下ドラベ症候群）であり、頻度は4万人に1人である。

効果的な治療方法、治療薬は皆無であり、病態の基礎的研究、創薬および治療法研究のために、自然発症ドラベ症候群モデルの出現が渴望されていた。

このような状況下、我々は生後12日前後で

発症し、同15日で死亡する突然変異マウスを発見した。Fig. 1は、発症時のゆったりと動く特徴的な行動と姿勢であり、当初は常染色体性劣性遺伝子による脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy；SMA）を疑った。しかし、遺伝子解析の結果、SMAの原因遺伝子*Smn*（*survival motor neuron*）に変異箇所は見当たらず、SMAの修飾遺伝子*Naip*（*neuronal apoptosis inhibitory protein*）にも変異箇所は認められなかった。

こうして表現型から疾患が推定出来なかった

ので、基本に戻り種々の系統との交配実験から得られた発症個体とDNAのマイクロサテライトマーカーを用いて、マウス染色体の1番からポジショナルクローニングを行った。その結果、幸運にも本疾患は、第2番染色体の*Scn1a*遺伝子 (*sodium channel, voltage-gated, type1, alpha*) と連鎖していることがわかった。

*Scn1a*遺伝子とシンテニーであるヒトのSCN1Aは、ドラベ症候群の原因遺伝子であることから、本変異マウスが自然発症ドラベ症候群のモデルとなる可能性が強く示唆された。



Fig. 1 自然発症変異マウスの特異な行動異常 (12日齢ホモ個体) 四肢は協調しないスローモーション様な動きを示す。ホモ個体は15日前後で死亡するが、すでに削瘦が認められる。

ドラベ症候群のマウスモデルは、Mouse Genome Informatics²⁾によれば、これまでに遺伝子組換えによるノックアウトマウスとノックインマウスが10例、遺伝子トラップ法マウスが1例で、計11例のモデルマウスが報告されているが³⁻¹⁰⁾、自然発症マウスの記載や報告はなく、本ドラベ症候群マウスが初めてと思われる。

ドラベ症候群では、発熱や入浴により発作を起こしやすいことを知り、発症個体に加温刺激を負荷した結果、Fig. 2の動画からの静止画像¹¹⁾に示すような強直・間代発作が誘発され、新規自然発症ドラベ症候群モデルマウスとなることを確信した。

方法

(1) 温熱刺激による正常ホモ個体とヘテロ個体の識別方法は、マウス用アルミケージに、木片の床敷きを2~3cmの厚さに入れ、温度計を設置し、透明アクリル版を蓋にしてケージ内が観察出来るようにした。加温は、プレパラート作製のヒーターを用いて間接的にケージ内を35~39℃程度に保った。

(2) 原因遺伝子*Scn1a*のDNAシーケンスは、ExonPrimerプログラム¹²⁾を用いてエクソン領域のDNA配列決定に用いるPCRプライマーを



Fig. 2 温熱刺激により誘発された11日齢のホモ個体、尿失禁を伴う強直・間代発作の様子を動画¹¹⁾からの静止画像で示した。

設定した。それらのプライマーを用いて、正常ホモ個体と発症ホモ個体のゲノムをテンプレートとしてそれぞれPCR反応を行ない、変異箇所の探索を行った。

(3) 脳波測定は、日本獣医生命科学大学の斎藤によって開発された慢性埋め込み電極法(Chronic Implantation Electrode method)を用いた(Fig. 3)^{13,14)}。手術により、微小銀ボール電極を脳硬膜上の前後左右の4点に配置して非拘束下で脳波導出を行った。

この慢性埋め込み電極法は、術後2週間にわたり脳波記録が可能であった。脳波は脳波計よりデジタルレコーダに記録し、スパイク波の有無やパターン、周波数分析(FFT: Fast Fourier Transform)を用いてPSD(Power Spectral Density)を解析した。

(4) コンジェニックドラベ症候群モデルセットの作出は、温熱刺激および遺伝子型で、ドラベ症候群のヘテロ型であることを確認した個体を選び、導入しようとする系統(例えばC57BL/6マウス)の正常個体と交配し、得られた産子(F1)からヘテロ個体を選択し、またC57BL/6マウスに交配する。このような戻し交配を12回行うことで理論上、遺伝的背景が99%以上C57BL/6となり、C57BL/6コンジェニックドラベ症候群マウスが完成する。

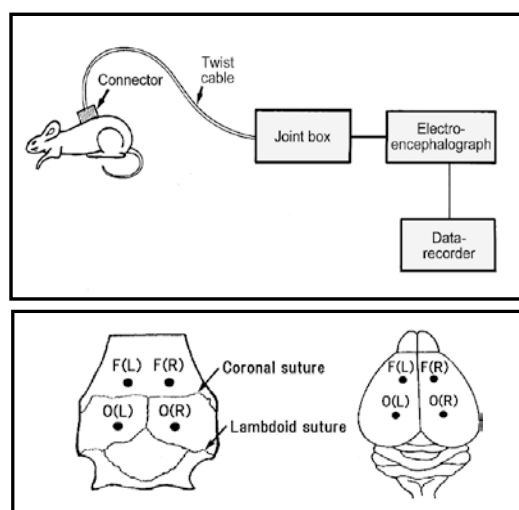


Fig. 3 慢性埋め込み電極法による脳波測定方法と電極の位置
F:frontal; O:occipital; R:right; L:left

本変異個体はBALB/c系に自然発症したので、BALB/cドラベ症候群マウスの継代が進んでいるが、実験用マウスの代表であるC57BL/6マウス、および聴原性てんかんに高い感受性を示すDBA/2マウスに原因遺伝子を導入したコンジェニックモデルマウスの樹立を目指した。

また、我々が新規遺伝子導入のために野生マウスを捕獲し、樹立した日本産野生マウス由来の近交系、KOR1マウス(*Mus musculus molossinus*)¹⁵⁾をバックグランドとしたコンジェニックKOR1ドラベ症候群マウスの樹立も行ない、遺伝的背景の異なる4系統のコンジェニックドラベ症候群モデルセットを完成させる。

結果

(1) 温熱刺激による正常ホモ個体とヘテロ個体の識別法は、生後15日前後のマウスからアダルトマウスまで用いられ、再現性に優れた。なお、加温のエンドポイントを最長10分、40℃未満に規定して行った。また、発作の開始が確認された個体は、直ちに加温したケージから取り出し、室温に戻した。このような方法により、死亡した個体は認められなかった。

てんかん発作の前兆は、前肢で鼻を掻くような仕草であり、個体によっては温熱刺激開始、1~2分後に激しい発作が観察された(動画)¹⁶⁾。(2) 原因遺伝子*Scn1a*のDNAシーケンスの結果、調べた24のエクソンのうち、エクソン14を除いた全てのエクソンでDNA配列を決定し、これらに正常ホモ個体と発症ホモ個体との差異は認められなかった。しかし、エクソン14のプライマーでは、発症ホモ個体のゲノムでのみPCR反応物が全く認められなかったことから、このゲノム領域にリアレンジなどの変異があることが予想された。そこで、正常ホモ個体と発症ホモ個体の脳組織より*Scn1a*全長を増幅するプライマーを用いてRT-PCRを行った結果、正常ホモ個体では3 kbの産物、発症ホモ個体では約6 kbの産物が検出された。そこで、この6 kbのPCR産物のDNA配列を決定したところ、エクソン14直下にIAP(intracisternal A-type particle)のLTR(long terminal repeat)の配列が認められた。このことから、変異マウスでは



Fig. 4 ドラベ症候群モデルマウスの原因遺伝子 *Scn1a* のDNAマイクロサテライトマーカーとPCRアガロースゲル電気泳動法による遺伝子型判定。サンプル6, 7, 8は、発症ホモ個体で5.5Kbの変異バンドのみを示し、サンプル3は正常ホモ個体で、2.4Kbの正常バンドを示した。1, 2, 4, 5はヘテロ個体で、5.5Kbと2.4Kbのバンドを示した。Lは、1Kbラダー。

Scn1a 遺伝子のエクソン14領域に~9kbの挿入が起こったことが推察された。

このように原因遺伝子 *Scn1a* の変異箇所が明らかになった時点で、Fig. 4に示したように、DNAのマイクロサテライトマーカーによる遺伝子診断が可能になり、加温テストの結果と照合しつつ交配用ヘテロ個体を選別する事が可能になった。

(3) ヘテロ個体を用いた脳波測定の結果をFig. 5¹⁷⁾に示した。O(R)に連続する振幅の高いスパイク波が観察され、F(R)の脳波には、振幅は小さいがO(R)に同期する波形が観察された。F(L)の脳波にも一部のスパイク波でF(R)とO(R)に同期していた。しかし、O(L)の脳波はO(R)と近い位置にあるにもかかわらず、O(R)の発作スパイク波は観察されなかった。

右後頭部の発作時脳波の周波数分析結果をFig. 6¹⁷⁾に示した。ピークIの周波数は5.7Hzであり、連続するスパイク波の周波数を示し、ピークII (11.7Hz) およびIII (17.6Hz) が定倍波であることが伺えた。

(4) コンジェニックドラベ症候群モデルセットは、N12世代以上で完全コンジェニックとなるが、樹立までに5~6年を要するため、未だ作出途上であり、BALB/c (N8世代)、C57BL/6 (N6世代)、DBA/2 (N5世代) およびKOR1 (N5世代) マウスを背景としたコンジェニック化の樹

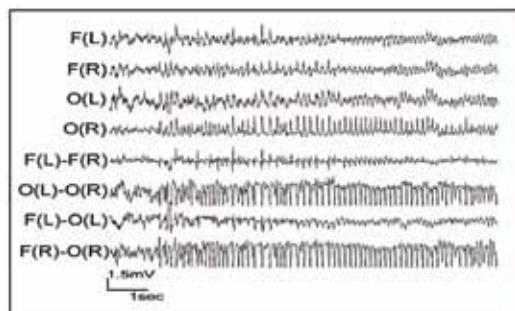


Fig. 5 ヘテロ個体の温熱刺激による発作時の脳波。O(R)に、連続したスパイクが観察され、焦点は右後頭葉近辺にあると推定された。

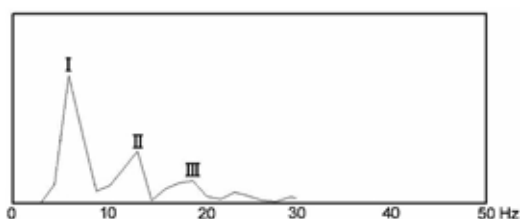


Fig. 6 ヘテロ個体、発作中のO(R)導出脳波のPSD分析

立を目指した交配実験が進められている。

考察

(1) 温熱刺激による発作の誘発は、発症ホモ個体のみならず、見かけ上正常なヘテロ個体でも温熱刺激により発作を誘発することから、本ドラベ症候群マウスの遺伝様式は単純なメンデル遺伝に従い、ヒトと同様に常染色体性優性遺伝を示すことがわかった。

(2) 本ドラベ症候群マウスでは、*Scn1a* 遺伝子のエクソン14領域にIAPの挿入が起こったことが推察されたため、転写産物にIAP配列が含まれ、そのことによって *Scn1a* のタンパク質が機能不全になったと予想された。

(3) 本ドラベ症候群マウスのヘテロ個体を用いた脳波測定の結果から、スパイク波の焦点はO(R)の位置に近い右後頭葉近辺にあると推定された。また、右後頭部の発作時脳波の周波数分析結果から、睡眠時の脳波には呼吸性 (3Hz 近辺) が観測されるが、発作時脳波にはこの周波数帯にピークが観察されないことから呼吸は停止していることが示唆された。

(4) 今回発見されたドラベ症候群モデルマウスは、自然発症モデルであり、既存の遺伝子組換えモデルに加えてドラベ症候群の病態解明、早期遺伝子診断、および遺伝子治療薬の開発研究に用いるモデルの選択肢が増えた。

また、日本産野生由来のKOR1マウスのコンジェニックドラベ症候群モデルマウスは、BALB/c、C57BL/6マウスなどの所謂、実験用マウス (*Mus musculus domesticus*) とは、亜種レベルで異なり、遺伝的に約100万年の隔りがある。これらの遺伝的背景の差異は、人種差や個体差に相当し、今日求められている「個の医療」あるいは「個の治療」に対応したモデルとなる。

Ogiwara³⁾は、*Scn1a*ノックアウトマウスの遺伝的背景の違いにより、重篤度に差が認められると報告しており、4系統のコンジェニックドラベ症候群モデルマウスの完成後は、原因遺伝子*Scn1a*以外のドラベ症候群に関与する修飾遺伝子の探索を行う。

最近、Miller AR⁹⁾は、*Scn1a*以外に早期致死性に関与する修飾遺伝子を、複数の染色体上に見いだしている。したがって、4系統の遺伝的背景の異なるドラベ症候群マウスモデルを用いる事により、本疾患に関与する新規修飾遺伝子発見の可能性があり、遺伝子治療薬の効果、副作用の有無など病態生理学を検討する手がかりとなることが期待される。

一方、Figure N¹⁸⁾は、ドラベ症候群の患者さんから採取した皮膚由来のiPS細胞を樹立し、誘導した神経細胞で病態を反映した機能異常の再現に成功した。従って、自然発症である本ドラベ症候群モデルマウスも、iPS細胞を用いた診断・治療の基礎研究に活用可能と思われる。

また、本疾患モデルマウスの完成、樹立後には、バイオリソース化を勧め、理化学研究所バイオリソースセンターにマウスを寄託し、国内外の研究者が、新規ドラベ症候群疾患モデルセットとして自由に使用できるようにする。

理研バイオリソースセンターではマウス生体での維持と凍結胚の状態でも保存されるため、貴重な遺伝子資源が安全に保持され、国内外へのリソースは、生体マウスあるいは凍結胚の状

態で輸送が行える。

また、ドラベ症候群モデルマウスは自然発症モデルであり、既報の遺伝子組み換えモデルマウスが、課せられるカルタヘナ法やその他の法令、条例等の対象外であり、マウスの輸送、繁殖飼育、および屍体の処理等にもなう煩雑な事務手続きと不活化処理などの作業が省かれ、人件費および研究費の削減にもなり、研究者はもとより、実験動物施設管理者にとっても極めて有用なモデルマウスといえる。

謝辞

本研究の遂行に対し、研究助成をいただいた公益財団法人てんかん治療研究振興財団に深謝いたします。なお、本研究は、東海大学医学部基礎医学系 阿部 幸一郎、元日本獣医生命科学大学 食品科学科 斎藤 賢一、笹本 枝里との共同研究によって行われました。

文献

- 1) Dravet C. Les épilepsies graves de l'enfant. Vie Med 1978 ; 8 : 543-8.
- 2) Mouse Genome Informatics; *Scn1a*, sodium channel, voltage-gated, type I, alpha <<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:98246>>, (accessed 2014-03-26).
- 3) Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. J Neurosci. 2007 ; 30 : 5903-14.
- 4) Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, et al. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. Nat Neurosci. 2006 ; 9 : 1142-9.
- 5) Martin MS, Dutt K, Papale LA, Dubé CM, Dutton SB, de Haan G, et al. Altered function of the SCN1A voltage-gated sodium channel leads to gamma-aminobutyric acid-ergic (GABAergic) interneuron abnormalities. J Biol Chem. 2010 ; 285 : 9823-34.

- 6) Cheah CS, Yu FH, Westenbroek RE, Kalume FK, Oakley JC, Potter GB, et al. Specific deletion of NaV1.1 sodium channels in inhibitory interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 ; **109** : 14646-51.
- 7) Tang B, Dutt K, Papale L, Rusconi R, Shankar A, Hunter J, et al. A BAC transgenic mouse model reveals neuron subtype-specific effects of a Generalized Epilepsy with Febrile Seizures Plus (GEFS+) mutation. *Neurobiol Dis*. 2009 ; **35** : 91-102.
- 8) Hansen GM, Markesich DC, Burnett MB, Zhu Q, Dionne KM, Richter LJ, et al. Large-scale gene trapping in C57BL/6N mouse embryonic stem cells. *Genome Res*. 2008 ; **18** : 1670-9.
- 9) Miller AR, Hawkins NA, McCollom CE, Kearney JA. Mapping genetic modifiers of survival in a mouse model of Dravet syndrome. *Genes Brain Behav*. 2014 ; **13** : 163-72.
- 10) Mouse Genome Informatics (MGI) and National Center for Biotechnology Information (NCBI), Mouse Gene Trap Data Load from dbGSS. Database Download. 2008 ; <<http://www.informatics.jax.org/reference/J:141210>> (accessed 2014-03-26).
- 11) 松島芳文. 乳児重症ミオクロニーてんかんマウス (ホモ個体) を加温した様子. <<https://www.youtube.com/watch?v=xVrwvo0xV2Y>> (参照 2014-03-26).
- 12) ExonPrimer < <http://ihg.gsf.de/ihg/ExonPrimer.html>> (参照2014-03-26).
- 13) Uchibori M, Saito K, Yokoyama S, Sakamoto Y, Suzuki H, Tsuji T, et al. Foci identification of spike discharges in the EEGs of sleeping El mice based on the electric field model and wavelet decomposition of multi monopolar derivations. *J Neurosci Methods* 2002 ; **117** : 51-63.
- 14) Saito K, Suzuki H, Kawakami Y. Power spectrum density of EEGs of sleeping epilepsy-prone El mice and their non-epileptic mother strain. *J Physiol Sci*. 2006 ; **56** : 313-316.
- 15) Matsushima Y. Japanese wild mice: a rich resource for new disease models. *Exp Anim*. 2012 ; **61** : 25-33.
- 16) 松島芳文. 乳児重症ミオクロニーてんかんマウス (ヘテロ個体) を加温した様子. <<https://www.youtube.com/watch?v=dQJBH7OEdHU>> (参2014-03-26).
- 17) 笹本 枝里, 松島 芳文, 齊藤 賢一. BALB/c系統より分離されたてんかんモデルマウスの脳波解析 (会) 智のシンポジウム論文集. 2012 ; **5** : 53-54.
- 18) Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, et al. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain*. 2013 ; **2** : 19-30.

Summary

A new mouse model for severe myoclonic epilepsy in infancy : positional cloning of the causative gene and pathological analysis

Yoshihumi Matsushima

Severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome), first described by Dravet in 1982, is a form of intractable epilepsy accompanied by severe mental retardation. Effective treatment methods and pharmacological agents are currently lacking and a spontaneous model for this condition is not yet established.

In this context, we established a mutant mouse line spontaneously developing unusual neurological signs like Dravet syndrome. The homozygotes died 15 days after birth. Subsequently, we identified the mutant gene *sodium channel voltage-gated type 1 alpha* (*Scn1a*) on mouse chromosome 2 as the causative factor.

Since human SCN1A is the main causative gene for Dravet syndrome, the possibility of using this mutant mouse as a model for human Dravet syndrome was strongly suggested. The mouse model showed simple Mendelian inheritance of the autosomal dominant type, as seen in human Dravet syndrome. The causative gene of the Dravet syndrome mouse *Scn1a* is an insertional mutation, approximately 9 kb in size, located on Exon 14. From electroencephalogram measurements, the spike-wave foci are presumably in the vicinity of the right occipital lobe.

Currently, we are in the process of generating Dravet syndrome congenic lines from multiple mouse lines with different genetic backgrounds, to establish models suited for individualized medical care. By exploiting the differences between these lines, these models can be useful to identify factors associated with early mortality, response to seizure-inducing agents, genetic diagnosis, and drug development.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2015 ; 26 : 69-76

