

—— 研究助成報告 ——

Dravet症候群発症機構解明のための SCN1A遺伝子発現可視化マウスの開発

Generation of transgenic mouse lines that express the green fluorescent protein
under the control of the *Scn1a* promoters

萩原 郁夫^{1,2)}, 立川 哲也²⁾, 眞崎 恵美²⁾, 山川 和弘²⁾

要旨：Dravet症候群は乳児期発症の難治てんかんであり、電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 1$ (*SCN1A*) 遺伝子を責任遺伝子とする。モデルマウス研究は、パルブアルブミン陽性 (PV+) 抑制性細胞の発火減弱が発症機構であり、興奮性細胞は、逆に、症状軽減に寄与することを示唆した。本研究は、病態発現に関わる神経細胞サブタイプ解明を目的に、*SCN1A* 遺伝子プロモーター制御下で緑色蛍光タンパク (GFP) を発現するマウスを作成し、GFPとサブタイプマーカーの共発現を解析した。結果、抑制性細胞ではほぼ100%のPV+細胞がGFPを発現し、GFP発現細胞の約20%がPV+であった。また、海馬の興奮性細胞にはGFP発現を認めなかったが、大脳皮質では、興奮性細胞の7-15%がGFPを発現し、GFP発現細胞の12-30%を興奮性細胞が占めた。以上の結果は、モデルマウス研究の示唆する病態発現機構と一致する。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2017；28：47-54

Key Words : Dravet syndrome, *SCN1A*, GFP, excitatory neuron, inhibitory neuron

【はじめに】

Dravet症候群は、1978年にDravet博士が記載した乳児重症ミオクロニーてんかん (severe myoclonic epilepsy in infancy, SMEI) を中核群とする乳児期発症の難治てんかんである¹⁾。最初の発作は1歳未満に起こる熱性けいれんであることが多く、1歳を過ぎると、熱性けいれんに加えて無熱性の強直間代発作やミオクロニー発作も出現する。そして、2歳以降、知的退行や自閉症様行動異常、運動失調が表出し、てんかん性脳症と呼ばれる病態に陥る。2001年

にClaesらは、Dravet症候群患者の電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 1$ (Nav1.1) をコードする*SCN1A* 遺伝子に変異を報告した²⁾。その報告以降、全世界から800を超える*SCN1A* 遺伝子変異の報告がある³⁻⁸⁾。

2007年に我々は、Dravet症候群患者の*SCN1A* 遺伝子変異を導入した遺伝子改変ノックインマウスを作製した⁹⁾。ヘテロ接合型ノックインマウスは正常に出生したが、Dravet症候群患者同様に、乳児期にてんかんを発症し、さらに、熱誘発性けいれんや多動、社会性行動低下、記憶学習障害も呈した^{10,11)}。免疫組織化

¹⁾ 日本医科大学 医学部 システム生理学
[〒113-8602 東京都文京区千駄木1-1-5]

²⁾ 理化学研究所 脳科学総合研究センター 神経遺伝研究チーム
Ikuo Ogiwara^{1,2)}, Tetsuya Tatsukawa²⁾, Emi Mazaki²⁾, Kazuhiro Yamakawa²⁾

¹⁾ Department of Physiology, Nippon Medical School, Tokyo
[1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan]

²⁾ Laboratory for Neurogenetics, RIKEN Brain Science Institute, Saitama

学染色は、パルブアルブミン陽性(PV+)抑制性神経細胞の軸索起始部へのNav1.1の局在性発現を明らかにした⁹⁾。そして、電気生理学的解析は、Nav1.1欠損がPV+抑制性神経細胞の持続的刺激に対する連続性発火を著しく減弱させることを明らかにした⁹⁾。

近年、任意の細胞選択的に*Scn1a*遺伝子を破壊できるコンディショナル*Scn1a*遺伝子ノックアウトマウスが我々を含む複数の研究チームによって開発され¹²⁻¹⁴⁾、PV+抑制性神経細胞の機能低下がてんかんの発症機序であること^{13,14)}、さらには、興奮性神経細胞の*Scn1a*遺伝子破壊が発作に伴う突然死のリスクを低下させることが見出された¹⁴⁾。しかしながら、多種多様な興奮性および抑制性神経細胞の中で、どのサブタイプが*SCN1A*遺伝子を発現しているかについては、その多くが不明である。RNA in situ ハイブリダイゼーション法は、*SCN1A* mRNA発現量が少ないために検出強度が弱い。さらには、*SCN1A*遺伝子が*SCN2A*、あるいは*SCN3A*遺伝子との類似性が高いために検出感度を上げることが難しい。免疫組織化学染色は、生化学的、あるいは形態的に明らかな場合に限定して適用可能であるため、*SCN1A*遺伝子発現細胞の同定に不足がある。そこで、本研究は、*SCN1A*遺伝子発現細胞の細胞体が緑色蛍光タンパク(GFP)で可視化できるトランスジェニックマウスを開発・解析し、*SCN1A*遺伝子を発現する神経細胞のサブタイプ分けを試みた。

【方法】

本研究における組換えDNA実験、ならびに動物実験は、日本国の定める生命倫理、安全規定に関する法令、指針に準じた理化学研究所内部規定の範囲内で行われた。遺伝子改変動物を用いた実験は、理化学研究所安全管理委員会で認可され、ガイドラインに従って行われた。

1. *SCN1A*遺伝子発現可視化マウスの作製

*Scn1a*遺伝子転写開始領域とタンパクコード領域を含むバクテリア人工染色体(BAC)をthe BACPAC Resource Center at Children's

Hospital Oakland Research Instituteより購入し、Red/ET 組み換え酵素相同組換え法(Gene Bridges社)を用いて、BACインサート上の*Scn1a*遺伝子第一コーディングエクソン内翻訳開始コドン部位にGFP遺伝子(TaKaRa BIO社)をインフレームに挿入した。次に、改変BACを制限酵素Sac II(Toyobo社)で消化し、ゲルろ過クロマトグラフィー法(CL-4B sepharose; GE Healthcare社)を用いてインサートDNA(~190 kb)を精製した。その後、精製改変BACインサートDNAをC57BL/6Jマウス受精卵の前核に注入し、仮親マウスの卵管へ移植して産仔を得た。その産仔の中でもGFP遺伝子がPCR法で確認された個体について、C57BL/6Jマウスと交配し、次世代にGFP遺伝子を引き継ぐか検討した。そして、GFP遺伝子を次世代に伝播した系統について、GFP発現を蛍光顕微鏡下で観察し、特に蛍光強度の強い2系統(#184と#233)を選別し、C57BL/6Jと戻し交雑して系統維持を行った。本研究では、蛍光強度が一番強かった#233を主に使用したが、#184と#233の間に蛍光発現様式の差は認めなかった。

2. *Emx1-Cre*ノックインマウスとAi14マウス

*Emx1-Cre*ノックインマウスは、糸原博士(理化学研究所 脳科学総合研究センター 行動遺伝学技術開発チーム)と岩里博士(理化学研究所 脳科学総合研究センター 行動遺伝学技術開発チーム、現 国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門)より入手した。このマウスは、終脳の興奮性細胞特異的にCre組み換え酵素を発現する¹⁵⁾。C57BL/6Jと戻し交雑して系統維持を行った。

Ai14マウス(#007914, B6. Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J)は、the Jackson Laboratoryより購入した。このマウスは、Cre組み換え酵素を発現する細胞で赤色蛍光タンパク(RFP)を発現する。兄妹交配で系統維持を行った。

興奮性神経細胞をRFPで可視化するために、*Emx1-Cre*ノックインマウスとAi14マウスを交配し、*Emx1-Cre*;Ai14ダブル変異マウスを得た。

3. ウエスタンブロット法

マウス脳を摘出して0.32Mシヨ糖緩衝液中でホモジナイズし、低速遠心で核や未破壊細胞を取り除いた後に、高速遠心で上清（細胞質画分）とペレット（膜画分）に分離した。次に、膜画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離し、ニトロセルロースメンブレン（Bio-Rad社）に転写し、抗Nav1.1抗体⁹⁾、抗GFP抗体（Abcam社）、あるいは抗 β -チューブリン抗体（Sigma-Aldrich社）と反応させた。メンブレンを洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した二次抗体（Promega社、Santa Cruz Biotechnology社）と反応させ、ペルオキシダーゼ活性を利用した高感度化学発光法（Western Lightning Plus；PerkinElmer社）により目的タンパクを検出した。

4. 免疫組織化学染色

マウスを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、脳を摘出して凍結、薄切した。次に、薄切切片を4%ブロックエース（DSファーマバイオメディカル社）でブロッキングし、抗Nav1.1抗体⁹⁾や抗GFP抗体（ナカライテスク社）、抗アンキリンG抗体（Santa Cruz Biotechnology社）、抗パルプアルブミン抗体（Swant社）、抗ソマトスタチン抗体（Merck社）、抗カルレチニン抗体（Swant社）、抗RFP抗体（医学生物学研究所社）と反応させた。切片を洗浄後、蛍光、あるいはbiotinで標識した二次抗体（Thermo Fisher Scientific社、Jackson ImmunoResearch Laboratories社）と反応させた。biotin標識二次抗体で反応させた切片については、さらに、蛍光標識したstreptavidin（Thermo Fisher Scientific社）と反応させた。そして、切片の蛍光を共焦点レーザースキャン顕微鏡システム（TCS SP2；Leica Microsystems社）で検出・撮影し、画像をソフトウェア（Adobe Photoshop Elements；Adobe Systems社）で処理した。

【結果】

1. *SCN1A*遺伝子発現可視化マウスの作出と解析

*SCN1A*遺伝子を発現する細胞の細胞体を可視化するため、*Scn1a*遺伝子プロモーター制御下⁸⁾でGFPを発現するBACトランスジェニックマウスを作出した（Fig. 1a）。そして、2系統（#184, 233）について、ウエスタンブロット法を実施してGFP発現を確認した（Fig. 1b）。GFP発現が内在性Nav1.1発現に影響を与えないことを、ウエスタンブロット法により、確認した（Fig. 1c）。次に、海馬と大脳皮質を含む薄切切片を作製して蛍光顕微鏡下でGFP発現を観察した（Fig. 1d）。海馬において、主要細胞であるアンモン角のピラミダル細胞や歯状回の顆粒細胞にGFP発現を検出しなかったが、アンモン角や歯状回に散在する介在性細胞にGFP発現を検出した。大脳皮質では、帯状のGFP発現をII/III—IV層、そしてV層に検出したが、その帯状のGFP発現よりも強い蛍光強度を示す細胞体を皮質II/III—VI層に散在性に認めた。さらに、Nav1.1とGFP、アンキリンGとの多重免疫組織化学染色は、Nav1.1をGFP発現細胞のアンキリンG陽性軸索起始部に検出した（Fig. 1e-l）。以上の観察結果は、GFP発現が*Scn1a*遺伝子発現を再現できていることを示唆する。

2. 神経細胞サブタイプマーカーとGFPの共発現解析

次に、パルプアルブミンやソマトスタチン、カルレチニンといった抑制性神経細胞サブタイプマーカーとGFPの共発現解析を行った。まず、抗パルプアルブミン抗体を用いて染色した切片について、ほぼ100%のPV+細胞がGFPを発現し、GFP発現細胞の約20%がPV+であった（Fig. 2a-f）。PV+細胞のGFP蛍光強度は、パルプアルブミン陰性の細胞より強い傾向にあった。次に、抗ソマトスタチン抗体で染色した切片について、海馬では約90%のソマトスタチン陽性細胞がGFPを発現していたが、GFP発現細胞の約15%がソマトスタチン陽性であった（Fig. 2g-i）。大脳皮質では、約20%のソマトス

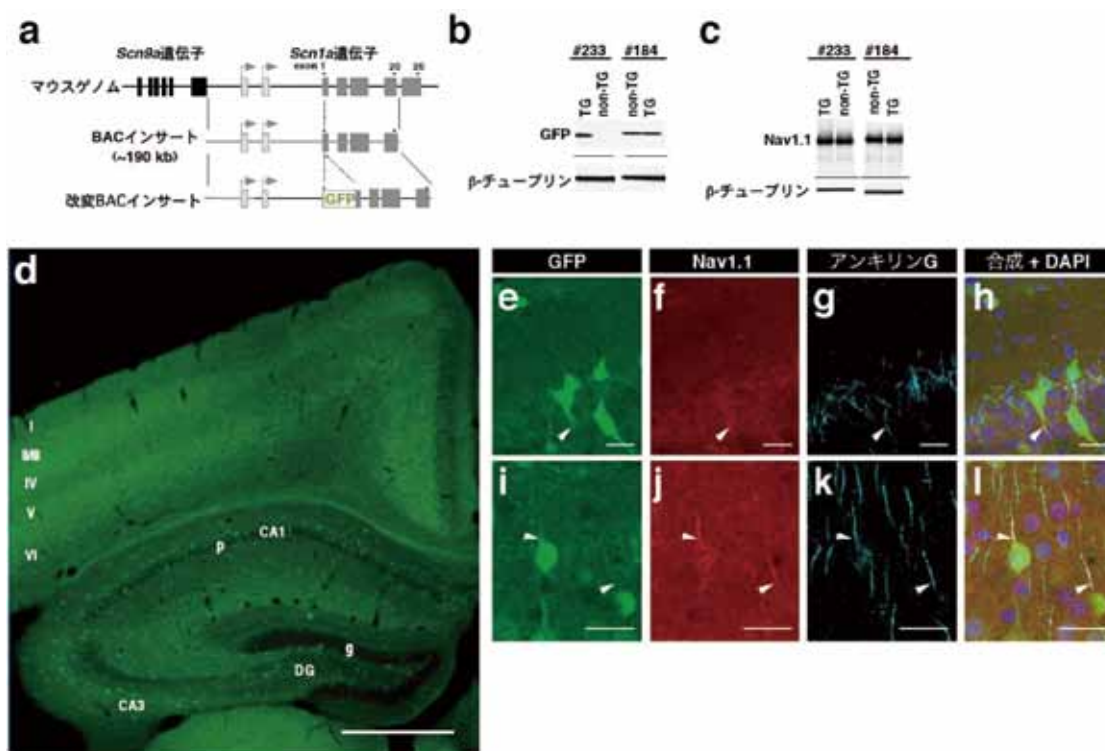


Fig. 1 SCN1A遺伝子発現可視化マウスの作製

(a) BACトランスジェニックマウスのGFP遺伝子発現は*Scn1a*遺伝子プロモーター（矢印）によって制御される。(b) ウェスタンブロット法はBACトランスジェニックマウス (TG) にGFP発現を検出する。(c) GFP発現は内在性Nav1.1発現に影響しない。(d) 16.5日齢トランスジェニックマウスの海馬・大脳皮質において、GFP発現細胞は散在性に分布する。また、海馬アンモン角のピラミダル細胞や歯状回の顆粒細胞にGFP発現を検出しない。CA；アンモン角、DG；歯状回、p；ピラミダル細胞層、g；顆粒細胞層、スケールバー：600 μ m。(e-l) GFP発現細胞の軸索起始部にNav1.1が局在する。GFP (e, i；緑)、Nav1.1 (f, j；赤)、アンキリンG (g, k；紫)、+DAPI (核酸、青) 合成 (h, l)。矢印は、GFP発現細胞において、Nav1.1が局在するアンキリンG陽性の軸索起始部を示す。海馬 (e-h)、大脳皮質 (i-l)、スケールバー：25 μ m。

タチン陽性細胞がGFPを発現し、GFP発現細胞の約2%がソマスタチン陽性であった (Fig. 2j-l)。さらに、抗カルレチニン抗体で染色した切片について、約30から40%のカルレチニン陽性細胞がGFPを発現し、GFP発現細胞の約6%がカルレチニン陽性であった (Fig. 2m-r)。

トランスジェニックマウスをRFPで興奮性神経細胞を可視化した*Emx1-Cre*; *Ail4*ダブル変異マウスと交配し、産仔脳のRFPとGFPの蛍光発色パターンを比較した。大脳皮質において、II/III層では、RFP発現興奮性神経細胞の約15%がGFPを発現し、GFP発現細胞の約30%がRFP発現興奮性神経細胞であった。V、VI層で

は、RFP発現興奮性神経細胞の約7%がGFPを発現し、GFP発現細胞の約12%がRFP発現興奮性神経細胞であった (Fig. 3)。

【考察】

本研究は、我々のこれまでの知見と一致して^{9,14)}、*Scn1a*遺伝子が抑制性神経細胞と興奮性神経細胞の両方に発現していることを示唆した。そして、PV+抑制性神経細胞のほぼすべてにGFP発現が認められたこと、さらに、その発現強度が相対的に高かったことは、PV+抑制神経細胞のてんかん発症への関与を支持する。また、ソマスタチン陽性抑制神経細胞に

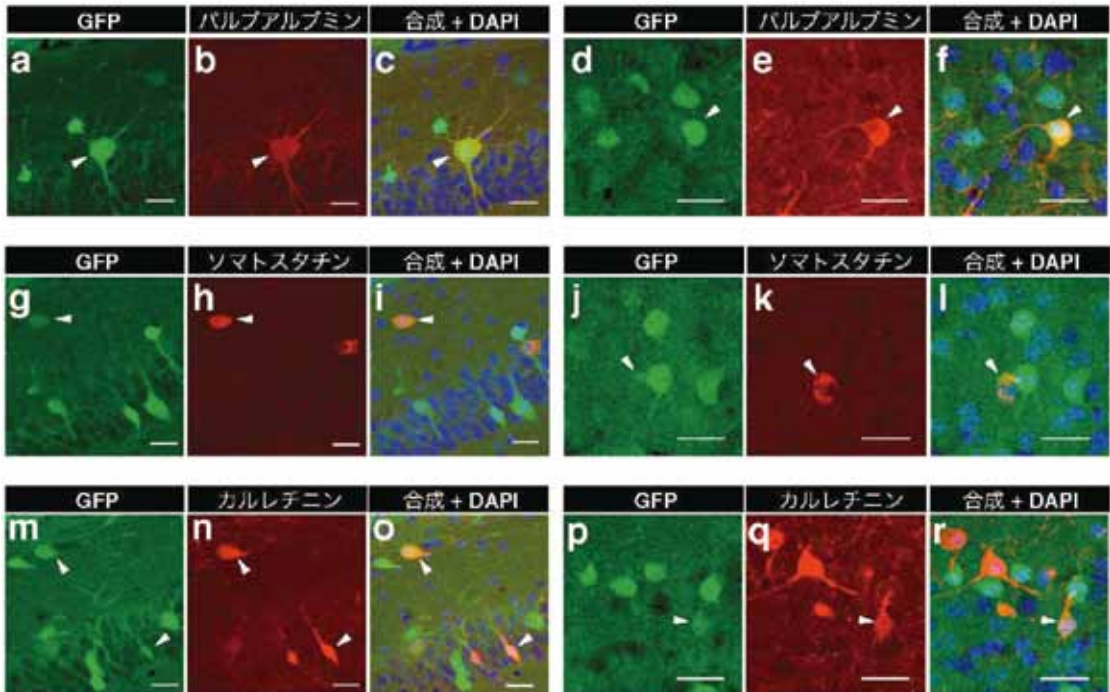


Fig. 2 抑制性神経細胞マーカーとGFPの共発現解析

(a-f) GFPはパルブアルブミン陽性神経細胞のほとんど全てに検出される。(g-l) ソマトスタチン陽性神経細胞について、海馬ではほぼ全てにGFPが検出されるが、大脳皮質では稀である。(m-r) GFPがカルレチニン陽性神経細胞に検出されることは稀である。矢頭はGFPと各神経細胞マーカーの両方が検出される細胞を示す。海馬 (a-c, g-i, m-o), 大脳皮質 (d-f, j-l, p-r), スケールバー: 25 μ m.

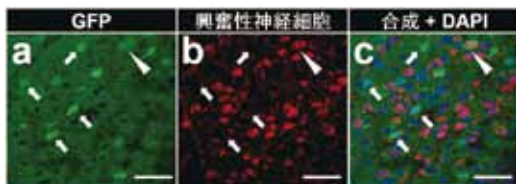


Fig. 3 大脳皮質興奮性神経細胞におけるGFPの発現解析

(a-c) GFPが大脳皮質興奮性細胞に観察されることは稀である。矢印はGFP発現細胞を示す。矢頭はGFP発現が検出される興奮性神経細胞を示す。スケールバー: 50 μ m.

についてもGFP発現を認めたが、この神経細胞が病態に関与するとする最近の研究報告と矛盾しない¹⁶⁾。さらにカルレチニン陽性抑制神経細胞についてもGFP発現を認めたが、この神経細胞の病態への関与については今後の研究を必要とする。興奮性神経細胞について、海馬アンモン

角のピラミダル細胞や歯状回の顆粒細胞にはGFP発現を認めなかったが、大脳皮質では約1割の興奮性神経細胞にGFP発現を認め、終脳興奮性神経細胞の突然死リスクへの関与を示唆する我々の知見と一致する¹⁴⁾。本研究は、およそ半数のGFP発現細胞のサブタイプを明らかにできたが、残りの半数はサブタイプ不明で、更なる実験を必要とする。

【引用文献】

- 1) Dravet C, Bureau M, Oguni H, Cokar O, Guerrini R. Dravet syndrome (severe myoclonic epilepsy in infancy). In : Bureau M, Genton P, Dravet C, Delgado-Escueta AV, Tassinari CA, Thomas P, et al. eds. *Epileptic Syndromes in Infancy, Childhood and Adolescence*, 5th edition. Montrouge, France : John Libbey Eurotext, 2012 : 125-156.

- 2) Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P. De novo mutations in the sodium-channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* 2001 ; **68** : 1327-1332.
- 3) Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, Oka E, Shimizu K. Significant correlation of the *SCN1A* mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; **295** : 17-23.
- 4) Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Fukushima K, Shimomura J, Fujiwara T, Hamano S, et al. Frequent mutations of *SCN1A* in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology* 2002 ; **58** : 1122-1124.
- 5) Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Takahashi Y, Fukushima K, Watanabe M, et al. Mutations of sodium channel α subunit type 1 (*SCN1A*) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 2003 ; **126** : 531-546.
- 6) Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, Miyajima T, Yasumoto S, et al. Mutations of neuronal voltage-gated Na^+ channel α 1 subunit gene *SCN1A* in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia* 2004 ; **45** : 140-148.
- 7) Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, An I, Bouteiller D, Carpentier W, et al. Spectrum of *SCN1A* gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet* 2009 ; **46** : 183-191.
- 8) Nakayama T, Ogiwara I, Ito K, Kaneda M, Mazaki E, Osaka H, et al. Deletions of *SCN1A* 5' genomic region with promoter activity in Dravet syndrome. *Hum Mutat* 2010 ; **31** : 820-829.
- 9) 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 ; **27** : 5903-5914.
- 10) Cao D, Ohtani H, Ogiwara I, Ohtani S, Takahashi Y, Yamakawa K, et al. Efficacy of stiripentol in hyperthermia-induced seizures in a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* 2012 ; **53** : 1140-1145.
- 11) Ito S, Ogiwara I, Yamada K, Miyamoto H, Hensch TK, Osawa, M, et al. Mouse with Nav1.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment. *Neurobiol Dis* 2013 ; **49** : 29-41.
- 12) 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 USA* 2012 ; **109** : 14646-14651.
- 13) Dutton SB, Makinson CD, Papale LA, Shankar A, Balakrishnan B, Nakazawa K, et al. Preferential inactivation of *Scn1a* in parvalbumin interneurons increases seizure susceptibility. *Neurobiol Dis* 2013 ; **49** : 211-220.
- 14) Ogiwara I, Iwasato T, Miyamoto H, Iwata R, Yamagata T, Mazaki E, et al. Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of Dravet syndrome. *Hum Mol Genet* 2013 ; **22** : 4784-4804.
- 15) Iwasato T, Datwani A, Wolf AM, Nishiyama H, Taguchi Y, Tonegawa S, et al. Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature* 2000 ; **406** : 726-731.
- 16) Rubinstein M, Han S, Tai C, Westenbroek RE, Hunker A, Scheuer T, et al. Dissecting the phenotypes of Dravet syndrome by gene deletion. *Brain* 2015 ; **138** : 2219-2233.

Summary

Generation of transgenic mouse lines that express the green fluorescent protein under the control of the *Scn1a* promoters

Ikuo Ogiwara, Tetsuya Tatsukawa, Emi Mazaki, Kazuhiro Yamakawa

Dravet syndrome is an epileptic encephalopathy, associated with mutations in the *SCN1A* gene encoding a voltage gated sodium channel α subunit type I. Our previous studies on Dravet syndrome model mice suggested that parvalbumin-positive (PV+) inhibitory neurons contribute to the development of epileptic seizures, while excitatory neurons have an ameliorating effect on the pathology. In order to determine which neuronal subtypes express *SCN1A*, we generate transgenic mouse lines, in which GFP is expressed under the control of the *Scn1a* promoters. Co-labeling of GFP with neuronal subtype-specific markers show that almost all PV+ neurons express GFP, while about 20% of GFP-expressing cells are PV+ neurons. We also show that hippocampal pyramidal excitatory cells are negative for GFP. However, in neocortex, 7-15 % of excitatory neurons express GFP, while 12-30% of GFP-expressing cells are excitatory ones. These observations seem to be consisted with our proposed pathophysiologic mechanisms of epileptic seizures in Dravet syndrome.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2017 ; 28 : 47-54

