

—— 研究助成報告 ——

難治性てんかん大田原症候群：二つの独立したモデルマウスの解析による てんかんと知的障害発症の神経メカニズムの解明

宮 本 浩 行

要旨：太田原症候群は新生児から乳児早期に発症する難治性てんかんであり、重度の精神発達遅滞と運動障害を伴う。発症要因として変異が想定される*STXBPI*遺伝子は神経伝達物質放出を制御するMunc18-1をコードしているが、その発症機序は不明である。本研究は*Stxbp1*遺伝子ヘテロ欠損マウスを用いて、シナプス伝達異常の観点から大田原症候群をはじめ神経発達障害・てんかん性脳症の神経基盤を明らかにし、有効な治療法開発へとつなげることを目的とした。野生型に比し自発行動量等に変化はなかったが、*Stxbp1*マウスはてんかん性脳活動や記憶・学習障害を示した。さらにヒト神経発達障害などでも頻発する攻撃性の顕著な亢進が観察された。グルタミン酸興奮性シナプス伝達をuse-dependentに促進するAmpakine (CX516) の腹腔内投与により攻撃性は有意に低下した。これらの結果は、てんかんや記憶障害そして攻撃性の亢進がMunc18-1の低下により生じ、攻撃性は興奮性伝達促進により軽減され得ることを示唆している。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2018；29：43-50

Key Words：STXBPI, 大田原症候群, 興奮性シナプス伝達, Ampakine, 攻撃性

【序論】

ヒト遺伝学の大規模な調査により遺伝子*STXBPI*および*SCN2A*の変異が、てんかん性脳症、知的障害、自閉症スペクトラム、統合失調症も含め広く神経発達障害において見出されている¹⁾。ヒト*STXBPI*遺伝子は神経シナプス前膜に局在し神経伝達物質放出に必須のMunc18-1タンパクをコードし、また*SCN2A*遺伝子は活動電位生成や細胞興奮性に関与する電位依存性ナトリウムチャネルNav1.2タンパクをコードしている。両分子は神経細胞間のシナプス伝達に関わるが、これらがどのようにして難治性てんかんや知的障害を引き起こすのかその機序と有効な治療法は明らかになっていない。太田原症候群（早期乳児てんかん性脳症）は新生児から乳児早期に発症する難治性てんかんであり、重度の精神発達遅滞と運動障害を示す。大田原症候群発症の要因としても

STXBPI, *SCN2A*の遺伝子変異が想定されている。

本研究は*Stxbp1*および*Scn2a*, 2種類の独立した大田原症候群の候補遺伝子欠損マウスを用いて両遺伝子loss-of-functionと大田原症候群てんかん発症との因果関係を調べる。ついで個体レベルの神経生理学的アプローチを適用して(A) てんかん発生部位, (B) 興奮性・抑制性シナプス伝達の関与, (C) てんかんの神経回路と制御, (D) 脳内活動と認知機能への影響, の各視点から比較検討し、両者に共通する特徴を抽出し分析する。これにより大田原症候群をはじめ神経発達障害の基盤となるシナプス伝達異常による難治性てんかんや知的障害の分子・神経機構を統合的に明らかにし、難治性てんかんの有効な治療法開発へとつなげることを目的としている。*Stxbp1*および*Scn2a*遺伝子欠損マウスのてんかん発症メカニズム、行動異常解析が同時に進行しているが、今回*Stxbp1*遺伝子欠

損マウスの行動解析結果が先にまとまったのでここに報告する²⁾。

【方法】

本研究は理化学研究所動物実験委員会の承認とガイドラインのもと行われた。また実験の詳細は文献2に記述されている。

〔動物〕 各種*Stxbp1*ヘテロ欠損マウスはexon3の両端にloxP配列を挿入したfloxマウスと全身性 (*Elia*)、終脳の興奮性細胞 (*Emx1*)、抑制性細胞 (*Vagt*) 特異的にCreを発現するマウスとの交配で得た。*Stxbp1*ヘテロ欠損マウス (*Stxbp1*マウス) はC57BL6Nと交配・維持された。

〔Western blotting〕 脳ホモジネートをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて展開し、Munc18-1抗体 (Synaptic Systems) で検出、glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH) (Enzo Life Sciences) で標準化した。

〔電気生理〕 成熟した野生型および*Stxbp1*マウス (2か月齢以上, 雄・雌) の大脳皮質・体性感覚野にステンレス製ネジ電極 (1.1 mm径) および頸筋にステンレス製ワイヤ (100 μ m径) を埋め, 自由行動下にて皮質脳波 (electrocorticogram: ECoG) および筋電図を計測して脳活動の異常性の有無を検証した。さらにてんかん発生部位を探索するため前頭前皮質 (prefrontal cortex: mPFC), 大脳基底核・線条体 (striatum: CPU), 扁桃核 (basolateral amygdala: BLA), 視床 (ventroposterior thalamus: VP), 海馬 (hippocampal CA1: CA1), 視覚皮質 (visual cortex: VC) から小脳を基準電極 (1.1 mm径) として局所電場電位 (local field potentials: LFPs) を単極導出電極 (200 μ m) より同時記録した。脳活動計測後, これらマウスはcue-evoked fear learning testにも使用された。

〔行動実験〕 *Stxbp1*成熟マウス (野生型及びヘテロ欠損型, オス, 2-7か月齢) について各種行動実験を行った。さらに背側終脳・興奮性細胞特異的*Stxbp1*ヘテロ遺伝子欠損マウス (*Emx1-Cre/Stxbp1^{flox/+}*) および抑制性

細胞特異的*Stxbp1*ヘテロ遺伝子欠損マウス (*Vgat-Cre/Stxbp1^{flox/+}*) についても同様の行動実験を行った。各種テスト (1-8) を同一個体に適用する場合は以下の順序で実行された。Resident-intruder testにおいて実験者はマウス遺伝子型・薬物処理に対してブラインドで解析した。その他実験結果はソフトウェア (小原医科産業) による自動処理にて定量した。

- 1) Nobel open field activity test
- 2) Elevated-plus maze test
- 3) Light-dark transition test
- 4) Y-maze test
- 5) Three-chambered social interaction test
- 6) Open field-interaction test
- 7) Resident-intruder test
- 8) Contextual fear and cue-evoked fear learning test
- 9) Rotarod test

〔CX516薬物投与実験〕

Resident-intruder test, Rotarod testにおいてCX516 (8 mg/ml in saline) は実験開始の10分前に腹腔内投与した。

【結果】

*Stxbp1*ホモ欠損マウスは生後間もなく死亡するが, *Stxbp1*ヘテロ欠損マウス (*Stxbp1*マウス) は野生型に比して体重の低下はあるも (Fig. 1A) 離乳時の外見は野生型と区別がつかず離乳後も性成熟し繁殖も可能であった。Western blot解析により*Stxbp1*ホモ・ヘテロ欠損マウスの全脳Muc18-1タンパク量はそれぞれ半減・消失していた (Fig. 1B, C)。

Novel open field activity testにおいて*Stxbp1*マウスに運動障害等は見出されず, 行動量に野生型との差は見出されなかった (Fig. 2A-C)。不安傾向の指標となるフィールド中心部の滞在時間に変化はなかった (Fig. 2C)。次に不安傾向を見るためelevated plus maze testとlight-dark transition testを行った結果, elevated plus maze testでは野生型と差を見出さなかったが (Fig. 2D-F), light-dark transition testにおいては明るいボックスへの移動が有意に低下していた (Fig. 2G-I)。環境・文脈によっては

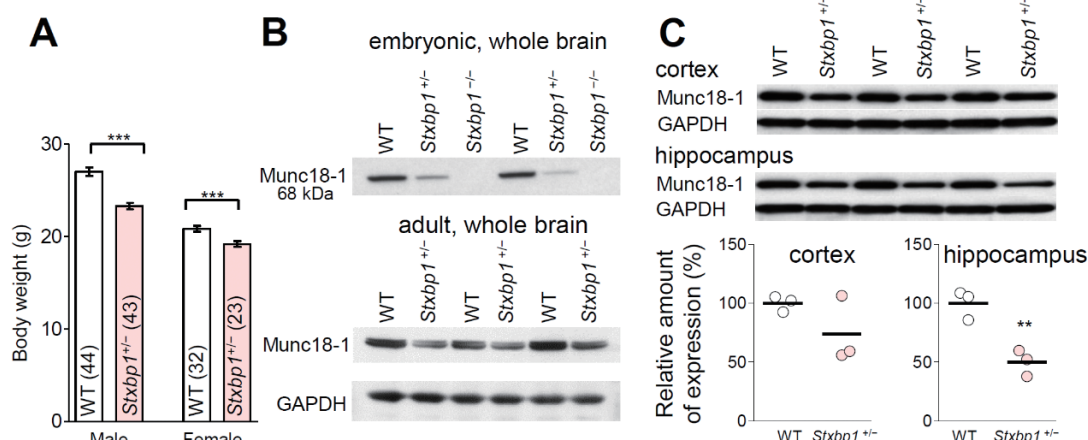


Fig. 1 *Stxbp1*ヘテロ欠損マウス (*Stxbp1*マウス) の作成

(A) *Stxbp1*マウスは低い体重を示す。9週齢, カッコ内に匹数。WT: 野生型, *Stxbp1*^{+/-}: *Stxbp1*ヘテロ欠損マウス, t-test, ***P<0.0001, **P<0.001, *P<0.05。

(B) Western blots解析。胎生期 (2 WT, 2 *Stxbp1*^{+/-}, 2 *Stxbp1*^{-/-}) および離乳期 (3 WT, 3 *Stxbp1*^{+/-}, 4週齢) 全脳サンプルを使用した。

(C) 4週齢*Stxbp1*マウス的大脑皮質および海馬サンプルのMunc18-1の減少。GAPDHによってMunc18-1タンパク量を標準化した。

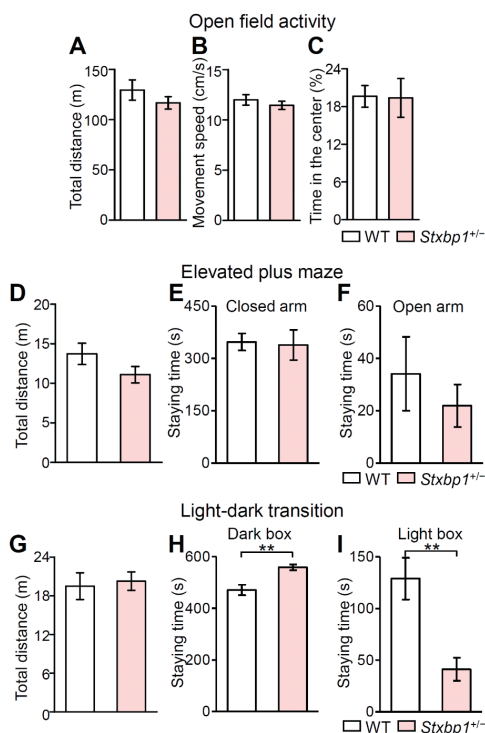


Fig. 2 条件依存的な*Stxbp1*マウスの不安傾向の増加

(A-C) Novel open field test. 自発行動量に変化はなかった。*Stxbp1* (10匹), WT (10匹) オスマウス (2.5ヵ月齢)。

(D-F) Elevated plus maze test. 各アームでの滞在時間に統計的有意差はなかった。*Stxbp1* (10匹), WT (10匹) オスマウス (2ヵ月齢)。

(G-I) Light-dark transition test. 暗室に滞在する時間が有意に増加していた。*Stxbp1* (10匹), WT (10匹) オスマウス (2ヵ月齢)。

不安傾向の指標に差が現れると考えられる。大田原症候群など神経発達障害はしばしば重度の知的障害を伴うことから, fear conditioning memory testを用いて*Stxbp1*マウスの記憶・学習能力を調べた。音と電気ショックでマウスは恐怖条件付けされたが, 24時間後の音のみの条件刺激に対してのすくみ (freezing) 反応は野生型に比して有意に低下していた (Fig. 3A-C)。Contextual fear memoryも*Stxbp1*マウスでは低下していた。記憶の保持や再生など記憶・学習機能の重度の障害が示唆された。なおY-maze testの結果に差はなく, 短期記憶・作業記憶の低下は起きていない可能性がある。

Gamma活動は認知活動に関連すると推定されており, その異常は統合失調症や自閉症スペクトラムの疾病モデル動物でも報告されている。恐怖条件付け前後の*Stxbp1*マウスのECoG及びLFPs記録を用いて覚醒中の脳活動について検討した。条件付け前の覚醒時では海馬

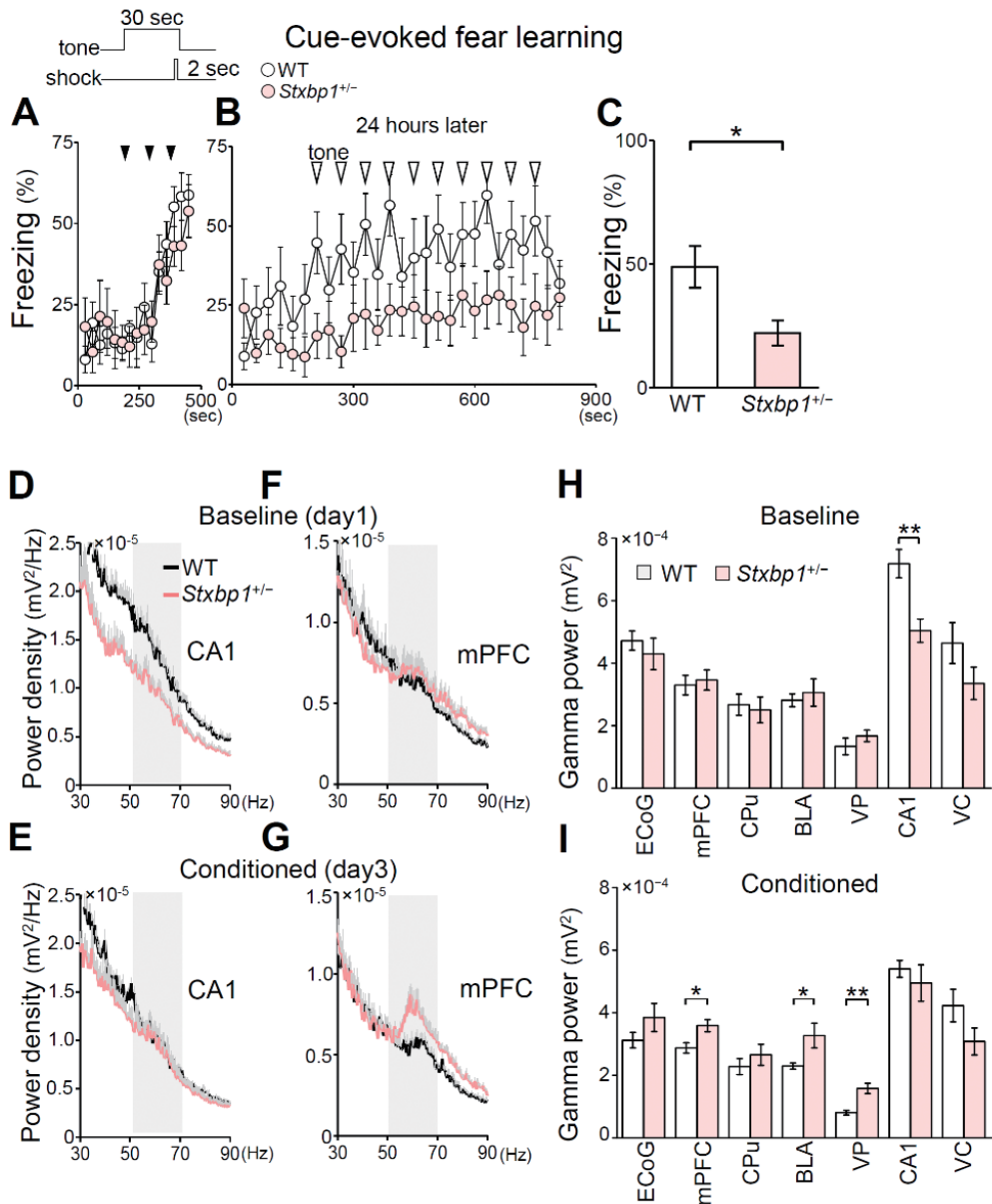


Fig. 3 *Stxbp1*マウスの恐怖条件付け学習の障害と脳内ガンマ活動の上昇

(A) 音と電気ショックを連合させる恐怖条件付け。30秒ごとのすくみ反応 (freezing) 時間の割合 (%) を表示している。(▼) は電気ショックのタイミング。

(B) 条件付けから24時間後に音のみ (▽) を提示した時のすくみ反応は*Stxbp1*マウスで大きく低下していた。*Stxbp1* (10匹), WT (10匹) オスマウス (9ヵ月齢)。

(C) (B) におけるすくみ反応の定量。

(D-G) 恐怖条件付け前後の覚醒時の脳各領域におけるガンマ活動の変化。条件付け前 (D) および条件付け後 (E) の海馬CA1 LFP平均power spectrum。条件付け前 (F) および条件付け後 (G) の mPFC LFP平均power spectrum。条件付け後WTに比し*Stxbp1*マウスのガンマ帯域50-70 Hzの増加がみられた。*Stxbp1* (5匹), WT (5匹) オスマウス (5ヵ月齢)。

(H, I) 恐怖条件付け前 (H)・後 (I) の覚醒時の脳各領域におけるガンマ活動の定量。条件付け後 mPFC, BLA, VPにおいて有意に上昇していた。

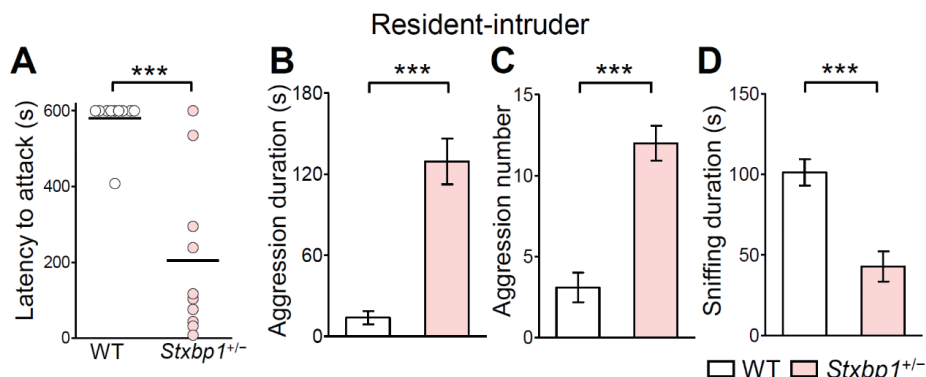


Fig. 4 *Stxbp1*マウスの攻撃性の亢進

(A-D) Resident-intruder test. *Stxbp1* (10匹), WT (10匹) オスマウス (7ヵ月齢)。10分間のテストで攻撃までの潜時 (A), 攻撃時間 (B), 攻撃回数 (C) が有意に増加していた。一方、スニフing時間 (D) は減少していた。

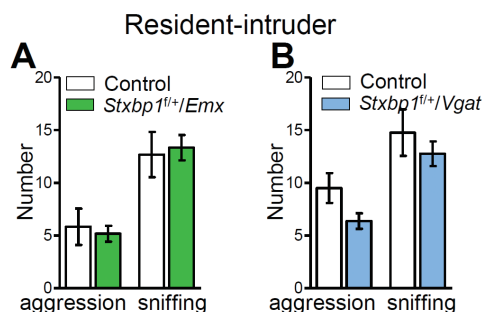


Fig. 5 背側終脳の興奮性細胞 (*Stxbp1*^{fl/+}/Emx) あるいは全脳の抑制性細胞 (*Stxbp1*^{fl/+}/Vgat) 特異的コンディショナルノックアウトマウスでは攻撃性は亢進していない

(A) Resident-intruder test. *Stxbp1*^{fl/+}/Emx (6匹) と control (6匹) オスマウス (4ヵ月齢) で攻撃性に差はなかった。
(B) Resident-intruder test. *Stxbp1*^{fl/+}/Vgat (6匹) と control (6匹) オスマウス (2ヵ月齢) で攻撃性に差はなかった。

CA1のガンマ活動 (50-70 Hz) が野生型に比して有意に低下しており、条件付けから24時間後ではmPFC, BLA, VPにおいて上昇していた (Fig. 3D-I)。これら脳領域のガンマ活動の変化は*Stxbp1*マウスの認知活動情報処理の障害を反映している可能性がある。

*STXBPI*変異をもつ患者に自閉傾向が報告されていることから¹⁾, *Stxbp1*マウスの社会性行動を検討した。しかしthree-chambered social interaction testで差は検出されなかった。一方、

open field interaction testやresident-intruder test (Fig. 4A-D) では, *Stxbp1*マウスは相手マウスへの攻撃潜時が短縮し, 攻撃回数, 時間ともに有意に増加していた。攻撃性の亢進と一致して, 通常のホームケージ内でも頻繁な闘争とケガが観察された。さらに興奮性あるいは抑制性伝達の*Stxbp1*マウス攻撃性への寄与を推定するため,

[1] *Emx1*-Cre (大脳皮質, 海馬, 扁桃体などの終脳の興奮性細胞に特異的) ライン

[2] *Vgat*-Cre (全脳の抑制性細胞に特異的) ラインと交配したconditional knockout マウスを作製し, resident-intruder testを行ったが攻撃性に有意な差を得なかった (Fig. 5A, B)。

*Stxbp1*ハプロ不全は興奮性シナプス伝達の急速な低下をもたらすことから³⁾, 興奮性シナプス伝達の補強によって*Stxbp1*マウスの攻撃性亢進を緩和できるかを検討した。Ampakineはシナプスにおけるグルタミン酸存在下でグルタミン酸AMPA受容体の機能を促進させることが知られており⁴⁾, これまでも認知機能を促進させる薬物として種々の動物モデルで効果が確認されている。CX516は第一世代のAmpakineで短期の半減期を有するが, resident-intruder testの10分前に腹腔内投与すると*Stxbp1*マウスの攻撃性を用量依存的に劇的に低下させた (Fig. 6A, B)。一方, 運動機能の変化は観察されず, rotarod testで評価した運動能力

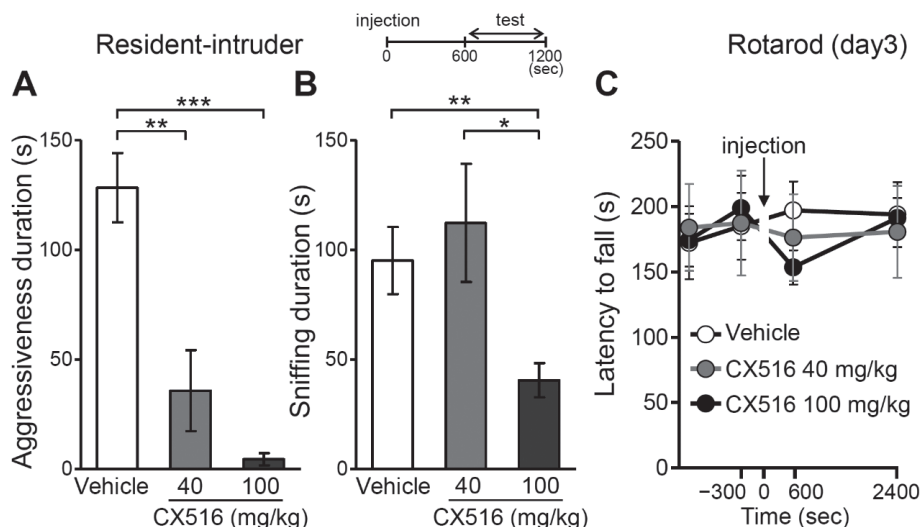


Fig. 6 Ampakineによる攻撃性の緩和

(A, B) Resident-intruder test. *Stxbp1*マウス攻撃性はAmpakine (CX516) 腹腔内投与量に容量依存的に減少した。*Stxbp1*オスマウス (3-7ヵ月齢) に対してテスト10分前に40 mg/kg CX516 (8匹)、100 mg/kg CX516 (10匹)、生理食塩水 (9匹) をそれぞれ投与した。

(C) Rotarod testによる評価ではCX516投与による運動への影響に有意な差は検出されなかった。*Stxbp1*オスマウス (4-7ヵ月齢) に対してテスト10分前に40 mg/kg CX516 (6匹)、100 mg/kg CX516 (6匹)、生理食塩水 (6匹) をそれぞれ投与した。

にもvehicle 投与群と有意差はなかった (Fig. 6C)。

なお*Stxbp1*ヘテロ欠損マウス大脳皮質からてんかんに特徴的な陰性棘徐波の出現を覚醒・睡眠の各状態で確認した (および文献5)。この皮質の陰性棘徐波と強く関連して線条体で陽性棘徐波が有意に増加していた (Miyamoto et al., in preparation)。さらに*Scn2a*ヘテロ欠損マウス大脳皮質からも陰性棘徐波の出現を確認している (Ogiwara, Miyamoto et al., in preparation)。

【考察】

今回の研究により、*Stxbp1*ハプロ不全によるシナプス伝達の障害が記憶・学習などの認知機能不全と攻撃性亢進が生じることが示唆された。さらに興奮性シナプス伝達の促進により攻撃性を緩和することができた。攻撃性は種々の精神疾患、神経発達障害 (てんかん、自閉症、統合失調症、うつ病、認知症) に随伴することが知られている。*Stxbp1*マウスはこれら疾病の臨床症状の一部を再現していると考えら

れる。大田原症候群患者で攻撃性の亢進の報告はないが、重度の精神運動遅滞によるためかもしれない。大田原症候群の75%がWest症候群に、さらにその59%はLennox-Gastaut症候群に移行するが、高い比率で攻撃性を示す⁶⁾。我々の知る限り、グルタミン酸興奮性伝達の強化によって攻撃性の緩和を示した最初の報告である。運動障害は観察されず、これまでCX516などampakineは種々の認知機能を促進することが示されてきており、感覚・運動・認知系の非特異的な鈍麻によって攻撃性が低下したとは考えにくい。近年導入された抗てんかん薬 perampanelは非競合的AMPA受容体拮抗薬だが、時に攻撃性の出現が副作用として報告される⁷⁾。本研究結果はペランパネルによる攻撃性を説明するかもしれない。

Emx1-Cre依存的な終脳 (大脳皮質、海馬など) 興奮性細胞特異的*Stxbp1*欠損では攻撃性は生じなかったことから皮質下構造、とくに脳幹セロトニン系や視床下部への興奮性伝達が*Stxbp1*マウスの攻撃性に関与している可能性がある。非定型の向精神薬が統合失調症、自閉

症、認知症にともなう攻撃性の緩和に用いられる場合があるが、今回の知見は、これらとは薬理学的にスペクトルの異なる興奮性伝達の調整によっても攻撃性をコントロールできる可能性を示す。

*Stxbp1*および*Scn2a*欠損マウスに共通して皮質陰性棘徐波⁵⁾、線条体の陽性棘徐波が観察されたことから (Miyamoto et al., in preparation), てんかん生成メカニズムを共有している可能性が示唆された。発達障害はてんかんを併発することも多く、*STXBP1*、*SCN2A*は自閉症、知的障害との関連でも多くの変異がヒトで報告されている。これらマウスモデルの基本的知見が大田原症候群を含め広く発達障害の病態生理の理解につながる事が期待される。

【文献】

- 1) Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, Accorsi P, Angriman M, Baier H, et al. STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 2016 ; **86** : 954-962.
- 2) Miyamoto H, Shimohata A, Abe M, Abe T, Mazaki E, Amano K, et al. Potentiation of excitatory synaptic transmission ameliorates aggression in mice with *Stxbp1* haploinsufficiency. *Human Molecular Genetics* 2017 ; **26** : 4961-4974.
- 3) Toonen RF, Wierda K, Sons MS, de Wit H, Cornelisse LN, Brussaard A, et al. Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. 2006 ; **103** : 18332-18337.
- 4) Lynch G, Cox CD, Gall CM. Pharmacological enhancement of memory or cognition in normal subjects. *Frontiers in Systems Neuroscience* 2014 ; **8** : 90.
- 5) Kovacevic J, Maroteaux G, Schut D, Loos M, Dubey M, Pitsch J, et al. Protein instability, haploinsufficiency, and cortical hyperexcitability underlie STXBP1 encephalopathy. *Brain* 2018 ; doi : 10.1093/brain/awy046.
- 6) Ferlazzo E, Nikanorova M, Italiano D, Bureau M, Dravet C, Calarese T, et al. Lennox-Gastaut syndrome in adulthood: clinical and EEG features. *Epilepsy Research* 2010 ; **89** : 271-277.
- 7) Rugg-Gunn, F. Adverse effects and safety profile of perampanel: a review of pooled data. *Epilepsia*, 2014 ; **55** : 13-15.

