

—— 研究助成報告 ——

年齢依存性てんかん性脳症の分子病態解析

大内田 守¹⁾，真 下 知 二²⁾，豊 國 伸 哉³⁾，大 守 伊 織⁴⁾

要旨：我々は、ラットを突然変異誘発剤処理し生まれた系列の表現型解析の過程で、4週齢から疾走発作とスパズム様発作が出現し7週齢以降には発作が消失するラットを発見した。本研究では当該ラットの表現型解析および、疾患の原因遺伝子である変異型Txnl遺伝子の分子病態解析を行った。長時間ビデオ観察により、てんかん発作は5週齢に集中し7週齢以降は消失していた。ビデオ脳波同時記録により、発作型は全般性強直発作、部分発作、ミオクロニ様発作、欠神様発作と多彩であった。組換え蛋白でTxnl活性を測定すると、変異型は野生型よりも活性が顕著に低下していた。Txnlは全身の各臓器で発現しており、野生型と変異型では発現量に差はなかった。脳領域は酸化ストレスマーカー抗体で濃染されることより、脳の発達に伴い発生する酸化ストレスを適切に処理できないことがてんかん発症の原因ではないかと考えられた。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2019；30：37-44

Key Words：年齢依存性てんかん，Txnl，チオレドキシン活性低下，酸化ストレス，疾患モデルラット

【はじめに】

小児期に発症するてんかんは、脳の発達の要因の影響を受けることが知られている。大田原らは、大田原症候群、West症候群、Lennox-Gastaut症候群へと変容することを明らかにして、年齢依存性てんかん性脳症という概念を確立した¹⁾。脳の発達の要因がてんかん表現型に影響するのはこれらの難治性てんかんだけではなく、特発性てんかん等においても同様である。例えば、小児欠神てんかんや中心・側頭部に棘波をもつ良性小児てんかんは年齢依存性に発症し、治癒する。様々なてんかん症候群で原因遺伝子の同定は進んでいるが²⁾、脳のどのような発達の要因がてんかん表現型を修飾するのか解明は進んでいない。

我々は、ラットを突然変異誘発剤処理し生まれた系列の表現型を解析する研究の過程で、4週齢から疾走発作とスパズム様発作が出現し、7週齢以降には発作が消失するラットを発見した。当該ラットは突然変異誘発剤を投与する手法で作製されていたため³⁾、てんかん発作を起こす個体を野生型と戻し交配を10世代以上繰り返して無関係の変異遺伝子を排除した後、連鎖解析と次世代シーケンス解析により原因がTxnl遺伝子のミスセンス変異であることをつぎとめた。

本研究では、当疾患ラットの病態解析、および、疾患の原因遺伝子である変異型Txnl遺伝子の分子病態解析を行い、脳の発達の要因の影響を明らかにしたいと考えた。

¹⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科分子腫瘍学

〔〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1〕

²⁾大阪大学医学系研究科動物実験学教室

〔〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2〕

³⁾名古屋大学大学院医学系研究科 病理病態学講座生体反応病理学/分子病理診断学

〔〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65〕

⁴⁾岡山大学大学院教育学研究科特別支援教育講座

〔〒700-8530 岡山市北区津島中3-1-1〕

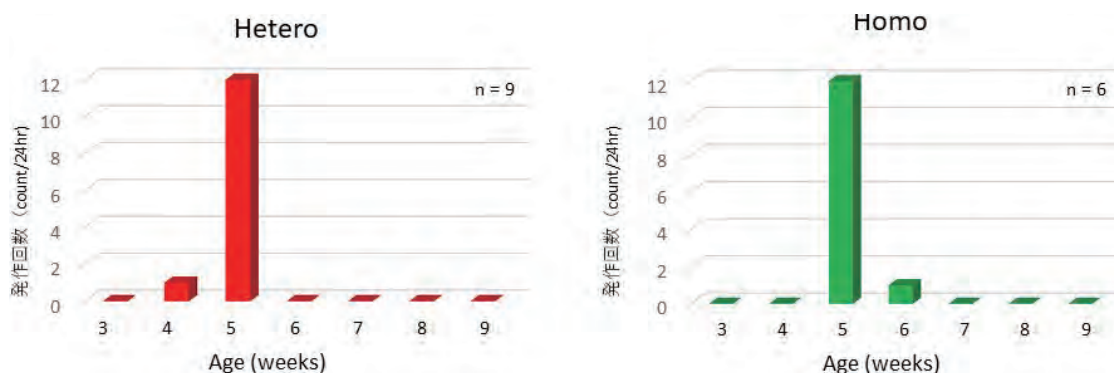


Fig. 1 長時間ビデオ行動観察結果

【対象・方法】

1. 変異ラットの表現型解析

1-1. 長時間ビデオ行動観察

生後3週齢から9週齢までのヘテロラット (n=9)、ホモラット (n=6) をホームケージ内の自由行動下で毎週24時間のビデオ観察を行った。

1-2. ビデオ脳波解析

生後4週齢で全身麻酔下にて両側の前頭部及び後頭部に慢性ネジ電極を埋込み、リファレンスは小脳領域に埋め込んだ。1週間後から脳波計Neurofax EEG-1200 (Nihon Koden, Japan) を用いて、ビデオ脳波モニタリングを行った。

2. 変異型Txn1遺伝子の分子生物学的解析

2-1. 蛋白活性測定

野生型と変異型ラットのmRNAから正常型と変異型Txn1 cDNAを作成後、pCMV-Tag2B プラスミド (Stratagene) に導入し発現ベクターを作製した。Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いてヒト胎児腎細胞HEK293細胞に発現ベクターを導入し、48時間後に細胞から蛋白抽出液を調整した。抗FLAG M2 affinity agarose beads (A2220, Sigma-Aldrich) を用いて発現したFLAG-Txn1蛋白を精製した。精製蛋白の濃度をPierce BCA Protein Assay kit (ThermoFisher) を用いて測定し、チオレドキシン抗体 (#2298, Cell Signaling Technology) およびFLAG抗体 (F3165, Sigma-Aldrich) を用い

てウエスタンブロットを行い蛋白量を確認した。Txn1蛋白の酵素活性はチオレドキシン活性測定キット (JaICA, KRX-711X) を用いて測定した。

2-2. ウエスタンブロット解析

生後1ヶ月、4ヶ月のラットの脳、心臓、肝臓、腎臓組織を摘出し、チオレドキシン抗体 (#2298, Cell Signaling Technology) とGAPDH抗体 (#2118, CST) を用いたウエスタンブロットにてTxn1蛋白の発現を比較した。

2-3. 酸化ストレス障害解析

酸化ストレスマーカーである8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), および、4-Hydroxynonenal (4-HNE) を認識する抗8-OHdG抗体、および、抗4-HNE抗体、細胞増殖マーカーであるKi67抗体を用いて脳組織の免疫染色を行った。

2-4. アポトーシスアッセイ

WTとホモラット胎児より作成した線維芽細胞の初代培養細胞を用いて、アポトーシスを検討した。In Situ Cell Death Detection Kit (Sigma-Aldrich) を使用した。

【結果】

1. Txn1遺伝子変異ラットの表現型解析

1-1. 長時間ビデオ行動観察

生後3週齢から9週齢までのヘテロラット、および、ホモラットを用いて、毎週24時間のビデオ観察を行った。てんかん発作は4週齢から6週齢まで観察されたが、5週齢がもっとも頻発した (Fig. 1)。6週齢以降は発作が減少し、7週

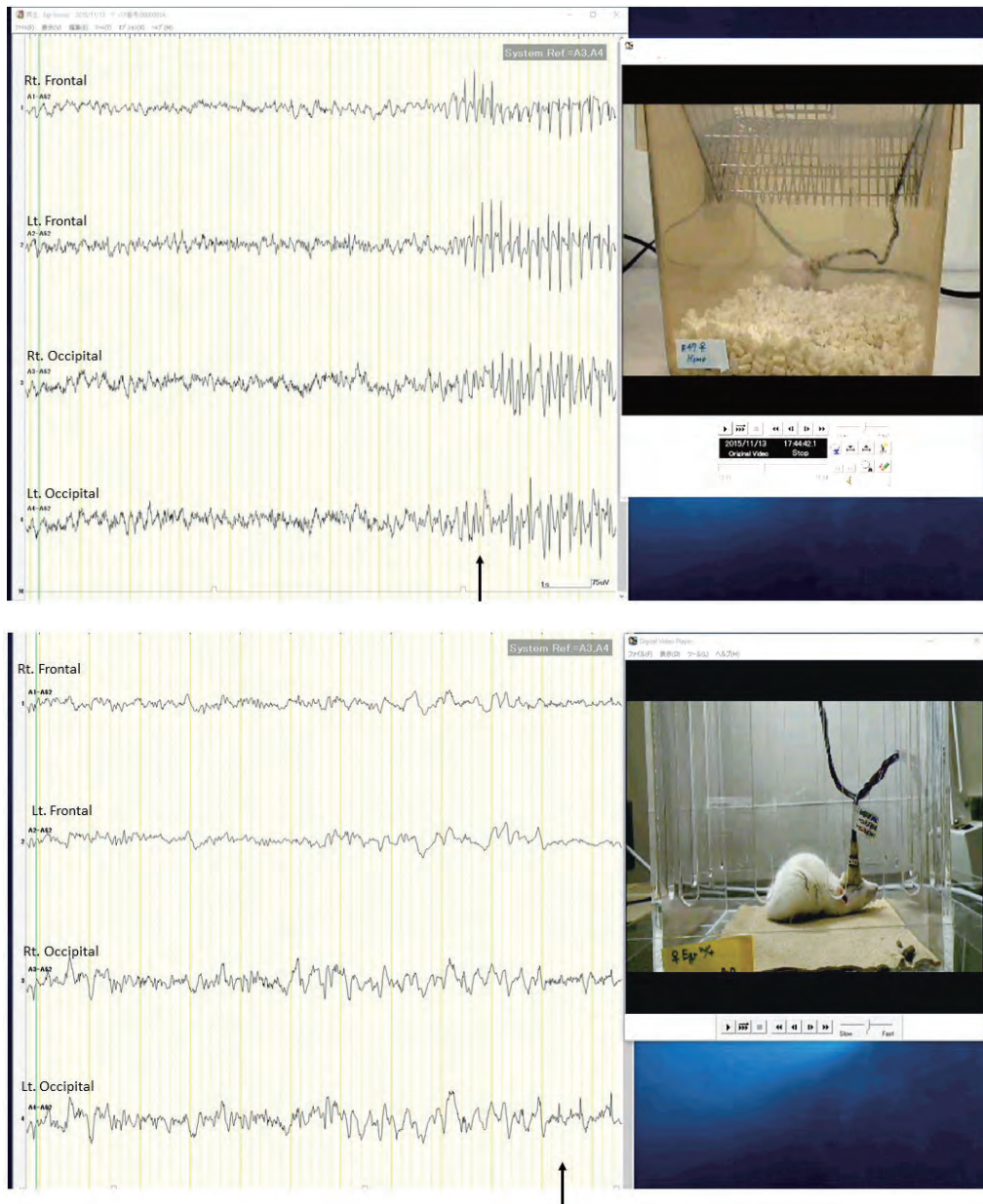


Fig. 2 ビデオ脳波解析の一例

上段は欠伸様発作時脳波で、動作の停止と伴に、脳波上、全般性6-7サイクル棘徐波バーストが出現。下段は後頭部起始の部分発作。急に覚醒し、落ち着かない様子でそわそわする。左後頭部から棘波が出現し始める。

齢以降は発作が捕捉されなかった。てんかん発作の様相は疾走発作、ジャンプの繰り返し、ミオクロニー様発作、全身強直発作と多彩で、1匹が発作をおこすと別個体のてんかん発作が誘発される傾向があった。また、発作は明期で入

眠中に発症することが多かった。

1-2. ビデオ脳波解析

そこで生後5週齢に集中して変異ラットのビデオ脳波解析を行った。いくつかの自然発症てんかん発作が捕捉された (Fig. 2)。全般性強

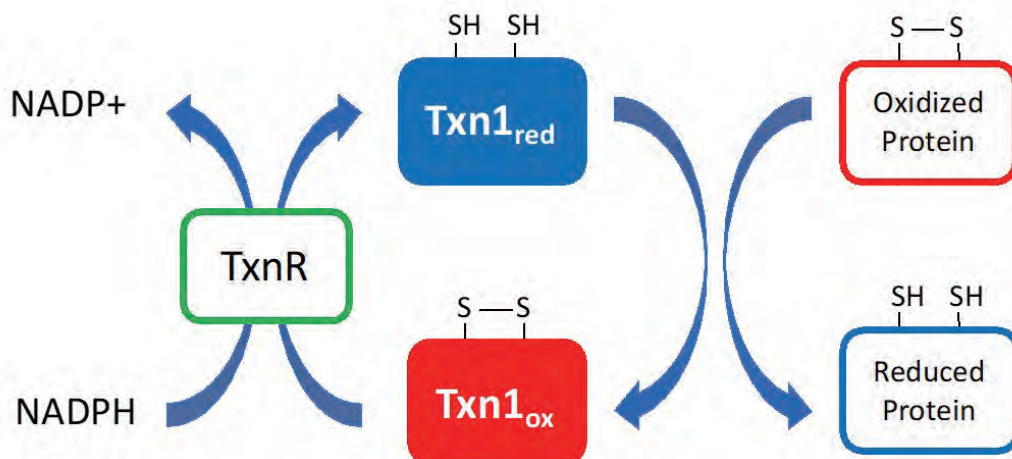


Fig. 3 Txn1蛋白の機能

直発作，後頭部起始の部分発作，全般性多棘徐波に伴うミオクロニー様発作，全般性6-7 c/s棘徐波複合の群発に伴う欠伸様発作が記録された。

2. 変異型Txn1遺伝子の分子生物学的解析

当疾患ラットの原因遺伝子はチオレドキシン遺伝子（Thioredoxin；Txn1）のミスセンス変異である。Txn1はヒト，ラット，マウスでアミノ酸105個から成る低分子量の酸化還元タンパク質である。32番目と35番目の2つのシステイン残基の間でジスルフィド結合を作る酸化型と，ジスルフィド結合が還元された還元型が存在する。Txn1は，他のタンパク質のシステイン残基が形成するジスルフィド結合の還元を促進することで抗酸化物質として機能している⁴⁾。還元型Txn1は基質蛋白のジスルフィド結合を還元してTxn1自身は酸化型となり，酸化型Txn1はNADPHとチオレドキシンレダクターゼにより還元される（Fig.3）。Txn1の標的蛋白は多数の報告があり，細胞の増殖，分化，アポトーシス，炎症，代謝等に関与している⁵⁾。Txn1はペルオキシレドキシンPrxと共役して過酸化水素H₂O₂を除去している。

2-1. 蛋白活性測定

変異型Txn1の活性を測定するために，本疾

患ラットで検出した変異型と正常型Txn1のcDNA発現ベクターを作成し，培養細胞を用いて発現させ，FLAG-Tag融合型のTxn1蛋白をFLAGに対する抗体ビーズで精製した。同様に，35番目のシステインをセリンに変えてジスルフィド結合の形成を阻害し還元活性の無いネガティブコントロールTxn1（C35S）も作成した。

定量した精製蛋白をウエスタンブロットで確認後，活性を測定した（Fig.4）。基質タンパクであるインシュリンのジスルフィド結合を還元する活性をNADPHの消費量で計測した。変異型Txn1の基質蛋白を還元する活性は正常型と比べて約1/3に低下していることが明らかになった。変異型と正常型を混合してみても活性は下がらないことより，変異型Txn1にドミナントネガティブ効果はないことがわかった。

また，ラットの脳組織から蛋白抽出液を作成しTxn1活性を調べると，ヘテロとホモではWTに比べて活性が低下していた。

2-2. ウエスタンブロット解析

生後1ヶ月，4ヶ月のラットの脳，腎臓，心臓，肝臓組織を摘出し，チオレドキシン抗体を用いたウエスタンブロットにてTxn1蛋白の発現を比較した。WT，ヘテロ，ホモラットで各臓器のTxn1蛋白質の発現量に顕著な差は見られなかった（Fig.5）。

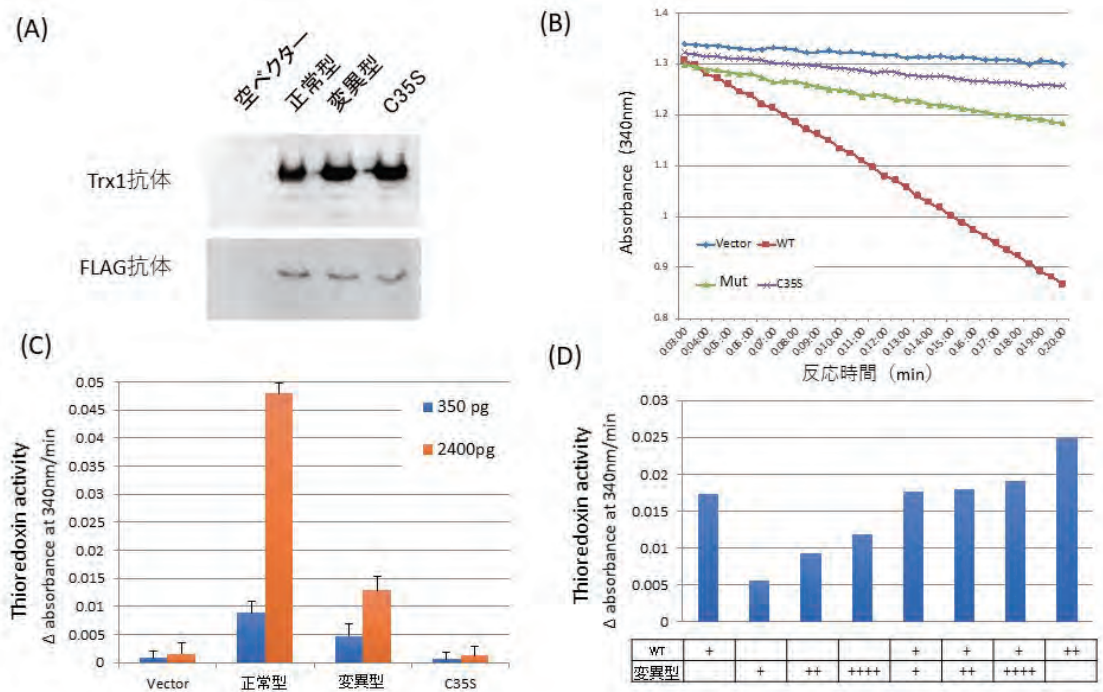


Fig. 4 変異型Txn1遺伝子組換え蛋白の活性測定
(A) ウェスタンブロットによる精製蛋白の確認。(B) NADPHの消費量計測による活性測定。
(C) 正常型、変異型Txn1の活性比較。(D) ドミナントネガティブ効果の検討

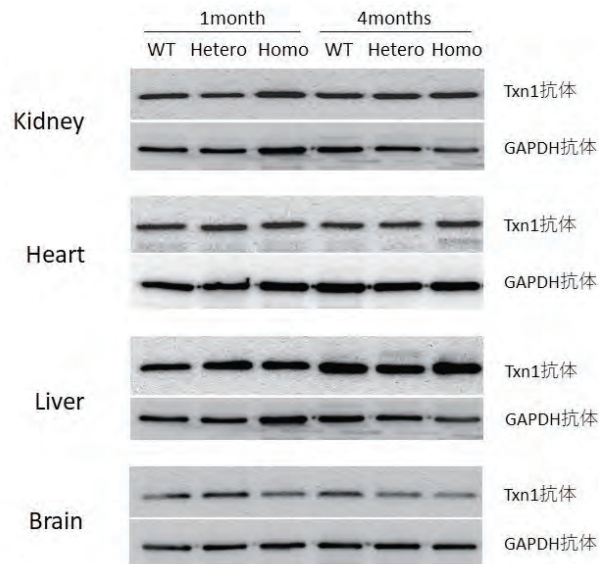


Fig. 5 Txn1蛋白の発現
上段から、腎臓、心臓、肝臓、脳のTxn1蛋白の発現を示す。

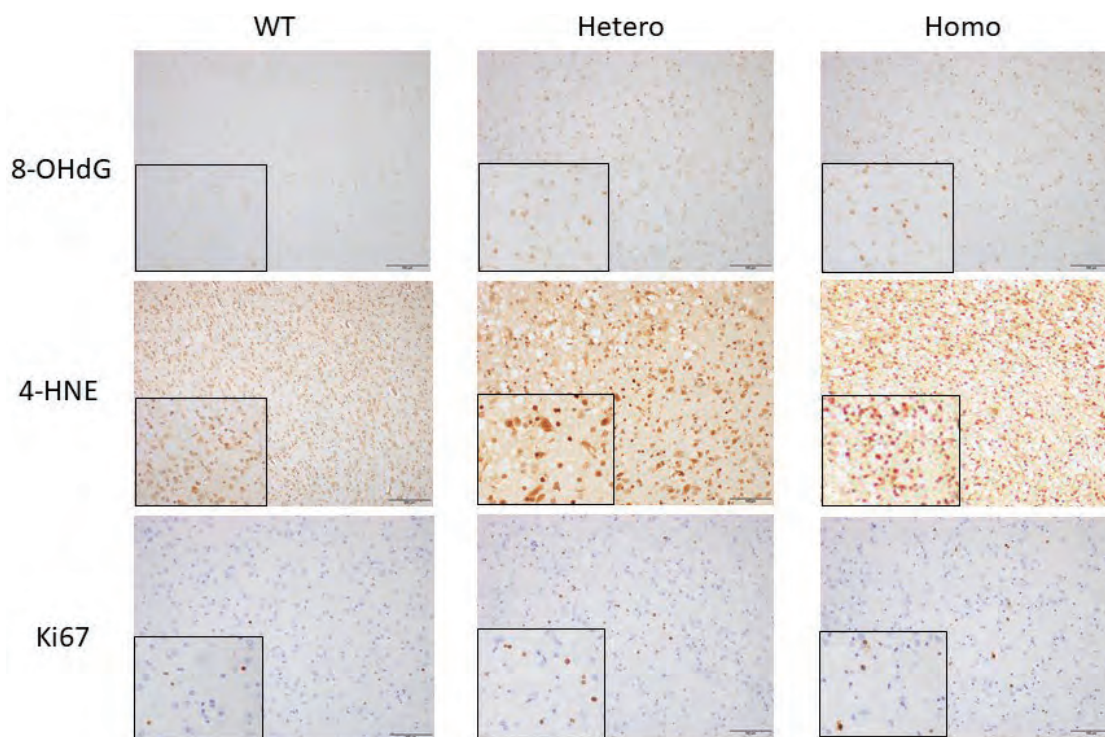


Fig. 6 DNAおよび脂肪における酸化損傷の検討

5週齢のWT, ヘテロ, ホモラットの視床における 8-OHdG抗体 (上段), 4-HNE抗体 (中段), 細胞増殖マーカーKi67抗体 (下段)。

2-3. 酸化ストレス障害解析

酸化ストレスマーカー抗体を用いて脳の病変部組織の免疫染色を行った。DNA酸化損傷マーカーである8-OHdGを認識する抗体, および, 脂質酸化損傷マーカーである4-HNEを認識する抗体で, 5週齢のWT, ヘテロ, ホモラットの脳のDNAと脂肪の酸化損傷を調べた。ヘテロ, ホモの脳が8-OHdG抗体, 4-HNE抗体でも強く染まっており, ヘテロとホモの脳は酸化ストレスによる損傷を受けていることが示された (Fig. 6)。

2-4. アポトーシスアッセイ

WTとホモラット胎児より作成した線維芽細胞の初代培養細胞を用いて, アポトーシスを解析した。過酸化水素処理3時間後に細胞を解析すると, ホモラットの細胞はアポトーシスを起こしやすいことが示された (Fig. 7)。ホモラットの細胞は未処理の状態でもアポトーシスを起こしやすい傾向が見られた。

【考察】

本研究により, 当疾患ラットはてんかん発作が4-6週齢の限られた期間にのみ出現するという特徴を持ち, てんかん発作型は, 部分発作と全般発作を併せ持ち多彩であった。当疾患ラットの変異型チオレドキシンTxn1の還元活性が低下しており, 線維芽細胞の初代培養細胞では, 過酸化水素の負荷でアポトーシスを来しやすいことが分かった。脳での8-OHdG抗体と4-HNE抗体の染色が強いことを考え合わせると, 脳では酸化ストレスによる障害を受けていると推測される。おそらく, ラットの発達過程において, 脳局所領域で抗酸化機能の需要が特に高まる時期があり, 当疾患ラットはTxn1活性が低下しているため, 発生する酸化ストレスを適切に処理できず, 細胞の障害がおきているのではないかと推測される。

ヒトの年齢依存性てんかん性脳症は, 小児の

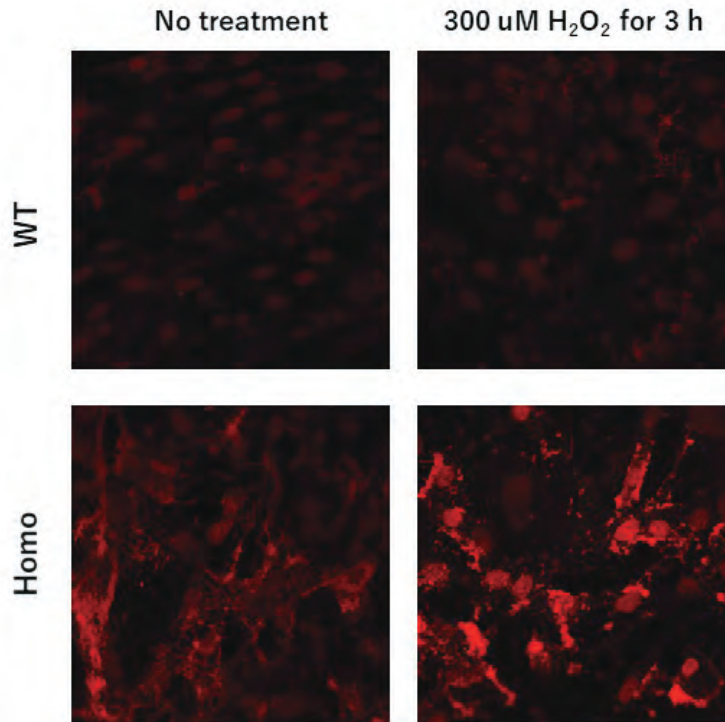


Fig. 7 アポトーシスの検出

WT, および, Homoラットの線維芽細胞（初代培養細胞）をTUNEL法kitを用いて解析し, OLYMPUS IX71蛍光顕微鏡で観察した (X10)。

脳の発達の側面が反映されて病状が変化する疾患概念であるが、脳のどのような発達の側面が病状を修飾するのか、その病態基盤についてはほとんど解明されていない。本疾患ラットは、脳の発達変化の要因として、年齢依存性の脳局所の酸化ストレスが影響している可能性を示している。更なる解析・検証を継続し、ヒトの年齢依存性てんかん性脳症の病態基盤の解明、発症予防や治療への応用に繋げたい。

rats. Nature Genetics 2008 ; **40** : 514-515.

- 4) Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. Annu. Rev. Immunol. 1997 ; **15** : 351-369.
- 5) Booze ML, Hansen JM, Vitiello PF. A novel mouse model for the identification of thioredoxin-1 protein interactions. Free Radical Biology and Medicine 2016 ; **99** : 533-543.

【参考文献】

- 1) 大田原俊輔. 年齢依存性てんかん性脳症に関する研究. 脳と発達 1977 ; **9** : 2-21.
- 2) Wang J, Lin ZJ, Liu L, Xu HQ, Shi YW, Yi YH, et al. Epilepsy-associated genes. Seizure 2017 ; **44** : 11-20.
- 3) Mashimo T, Yanagihara K, Tokuda S, Voigt B, Takizawa A, Nakajima R, et al. An ENU-induced mutant archive for gene targeting in

