

—— 研究助成報告 ——

ニューロサーキット異常に起因するてんかんモデルラットに 対する治療薬のスクリーニングと治療法の開発

田 谷 真一郎¹⁾, 早 瀬 ヨネ子¹⁾, 井 上 由紀子²⁾, 井 上 高 良²⁾,
宮 本 浩 行³⁾, 山 川 和 弘³⁾, 星 野 幹 雄¹⁾

要旨：イハラてんかんラット（IER）は、原因不明の自然発症ラット変異体である。我々は IER の原因遺伝子として接着分子 DSCAML1 を同定している。本研究では、DSCAML1 とてんかんの関連を明らかにするために、てんかん患者の DSCAML1 遺伝子配列を解析した。その結果、アミノ酸置換を伴う SNP を発見し、この変異体は局在異常を示すことを見出した。次に、患者型 DSCAML1 変異マウスを作製した。DSCAML1 変異マウスは IER と同様の異常が認められ、異常な脳波のスパイクが検出できた。以上の結果は、てんかんの原因が DSCAML1 の SNP 変異であることを示唆している。さらに、蛋白質のフォールディングを修正する薬理的シャペロンを DSCAML1 変異マウスに投与すると、改善効果が認められた。従って、DSCAML1 の異常に起因するてんかんの治療薬候補として、シャペロンが有効ではないかと考えている。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2019；30：45-50

Key Words：てんかんモデルラット、てんかん患者型モデルマウス、ニューロサーキット異常、局在異常、薬理的シャペロン

【序論】

てんかんの発症の原因は不明な点が多いが、「イオンチャンネル」や「ニューロサーキット」などの異常に起因すると考えられている。近年、複数の遺伝性てんかん原因遺伝子が同定されたが、その殆どは「イオンチャンネル関連分子」をコードしていた。その結果、モデル動物の開発も進み、病態の理解と治療法の開発なども順調に進んでいる。一方、ニューロサーキット異常に起因するてんかんは、殆ど原因遺伝子が同定されていないため、モデル動物はあまり存在せず、病態の理解や治療法の開発も遅れている。イハラてんかんラット（IER）は、生後3ヶ月から、てんかん症状を呈する原因不明の自然発症ラット変異体として報告されている¹⁾。

また、IER は発育の遅延が認められ、発達障害様の行動異常が認められる²⁾。これまでに我々は、IER では海馬・大脳皮質・扁桃体などのニューロサーキットに異常が生じていることを見出してきた³⁾。また、連鎖解析から IER の原因遺伝子として細胞接着分子 Down syndrome cell adhesion molecule-like 1 (DSCAML1)⁴⁾ の同定に成功した。DSCAML1 はショウジョウバエやマウスの網膜の神経細胞の配置やネットワーク形成に関与することが報告されているが⁵⁻⁷⁾、中枢神経系での機能はあまり理解されていない。IER では DSCAML1 の発現が著しく低下したため、ニューロサーキットに異常をきたしたと考えられる。また、所属機関の「発達障害を伴うてんかんリサーチソース」を用いて、アミノ酸置換を有する DSCAML1 の複数の

¹⁾ 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 病態生化学研究部

²⁾ 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第6部
〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1

³⁾ 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
〒351-0106 埼玉県和光市広沢2-1

SNPを発見した。本研究では、DSCAML1変異体マウスをニューロサーキット異常型てんかんのモデルとして利用することによって、このタイプのてんかんに有効な薬剤をスクリーニングし、将来的な治療法の開発に繋げる。

【方法】

(1) てんかん患者型DSCAML1変異体の機能解析

「発達障害のリサーチリソース」の中から、てんかんを併発している160名の患者をピックアップした。患者由来のリンパ芽球からmRNAを調整し、DNAに戻しシークエンスを行なった。その結果、アミノ酸置換を伴う15種類のSNPを見出した。次に、野生型DSCAML1をテンプレートにして全てのミューテーションを挿入した発現プラスミドを構築した。患者型変異を伴うDSCAML1を野生型ラット海馬初代培養神経細胞に発現させ、樹状突起伸長作用を計測した。また、突起伸長作用が認められなかったDSCAML1変異体は培養細胞に発現させ、細胞内局在とその接着能を調べた。

(2) てんかん患者型DSCAML1変異体のモデルマウスの作製と解析

機能欠損型であるDSCAML1^{A2105T}変異体(2105番目のアラニン (Ala) がスレオニン (Thr) に変異)に着目した。そこで、CRISPR-Cas9システムを用いてDSCAML1^{A2105T}を挿入したノックイン (KI) マウスを作出した。まず、DSCAML1^{A2105T}蛋白質の発現量と細胞内局在を調べた。さらに、抑制性神経細胞 (ソマトスタチン) の免疫染色や大脳皮質の5層の神経細胞を光らせるマウス (Thy1-YFP) と掛け合わせ、組織学的な解析を行なった。また、大脳皮質に電極を設置し、脳波測定を行なった。

(3) 新規抗てんかん薬のスクリーニングとモデル動物の治療

マウス繊維芽細胞 (L929) にDSCAML1^{A2105T}を安定発現できる株を樹立した。この細胞では、DSCAML1^{A2105T}蛋白質が細胞膜に局在できず、細胞質に蓄積している。まず、培養細胞レベルで、臨床治療薬である薬理学的シャペロンのスクリーニングを行なった。株化した細胞に

薬理学的シャペロンを加え、細胞外に局在したDSCAML1のみを免疫染色で観察し、薬の評価を行なう。次に、薬理学的シャペロンがDSCAML1^{A2105T} KIマウスに有効であるか検討する。投薬の評価は、神経細胞の形態と脳波測定で行なう。

【結果】

(1) てんかん患者型DSCAML1変異体の機能解析

160名の発達障害を伴うてんかん患者のDSCAML1遺伝子のOpen reading frameのシークエンスを行なった。その結果、多数のSingle Nucleotide Polymorphism (SNP)を見出した。中でも、アミノ酸置換を伴う15種類のSNPに着目した (Fig. 1)。患者型変異を伴うDSCAML1を野生型ラット海馬初代培養神経細胞に培養1日目に発現させ、培養5日目に樹状突起伸長作用を計測した (Fig. 2A)。まず、コントロールのEGFPに対して、野生型DSCAML1 (DSCAML1^{WT}) は樹状突起伸長作用が認められる。複数のDSCAML1変異体でも同様の突起伸長作用が認められた。しかし、DSCAML1^{R318H}やDSCAML1^{V833I}変異体は突起伸長作用が弱く、DSCAML1^{V415L}, DSCAML1^{E120K}, DSCAML1^{R1474Q}, DSCAML1^{R1783Q}変異体はコントロールに比べても有意差がなかった。従って、loss of functionである可能性が高い。さらに、DSCAML1^{A2105T}変異体はコントロールに比べ、突起伸長阻害が認められたことから、dominant negativeとして機能する可能性が考えられる。DSCAML1^{A2105T}変異体の細胞内局在を検討するために、マウス繊維芽細胞に野生型DSCAML1とDSCAML1^{A2105T}を発現させ解析を行なった。野生型DSCAML1は細胞膜上に局在が見られたが、DSCAML1^{A2105T}は細胞質に蓄積していた (Fig. 2B)。以上の結果から、発達障害を伴うてんかん患者由来のDSCAML1遺伝子にはloss of functionやdominant negativeに機能する変異が生じていることが確認できた。

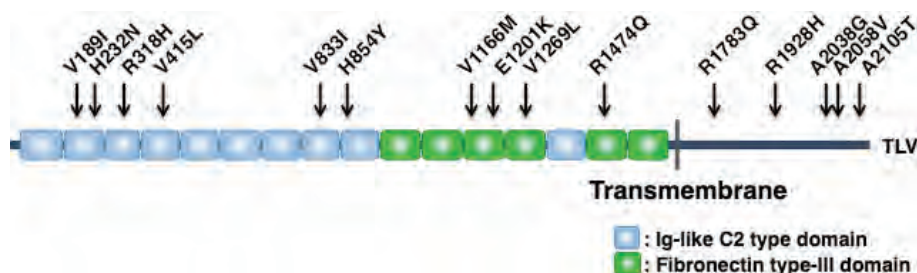


Fig. 1 てんかん患者におけるDSCAML1遺伝子の変異部位

国立精神・神経医療研究センターの発達障害を伴うてんかん患者に対して、DSCAML1のSNP解析を行なった。アミノ酸置換を伴うSNP部位を示す。

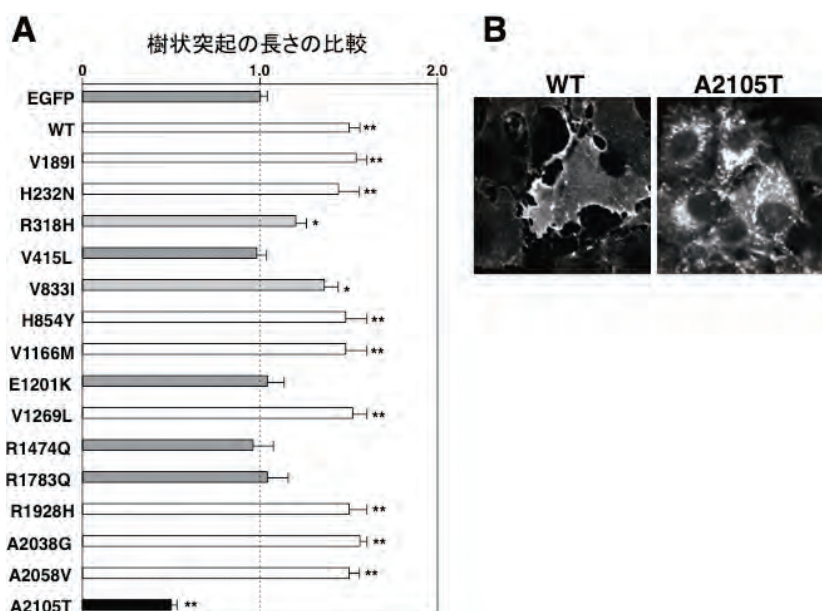


Fig. 2 てんかん患者型DSCAML1の機能解析

A: 海馬初代神経細胞にてんかん患者型DSCAML1を発現させ、樹状突起の長さを測定した。コントロール (EGFP) に対しての比較を示す。B: 繊維芽細胞に野生型DSCAML1とDSCAML1^{A2105T}を発現させ、細胞内局在を検討した。

(2) てんかん患者型DSCAML1変異体のモデルマウスの作製と解析

DSCAML1の2105番目のアラニンが、種を超えて高度に保存されている (Fig. 3)。そこで、てんかん患者型DSCAML1^{A2105T}変異体を挿入したノックイン (KI) マウスを作製した。野生型マウス由来のDSCAML1に比べて、DSCAML1^{A2105T}の発現蛋白質総量に変化は認められなかった。次にDSCAML1^{A2105T}変異体の細胞内局在を検討した結果、培養細胞で見られた様な細胞質に蓄積する局在異常が認められた

(Fig. 2B参照)。さらに、DSCAML1^{A2105T} KIマウスの大脳皮質の錐体細胞の樹状突起伸展異常が認められた。これらの表現型は、IERやDSCAML1 KOマウスと非常に似ていることから、個体レベルでもDSCAML1^{A2105T}変異体は機能欠損型であると考えている。また、DSCAML1^{A2105T} KIマウスはヘテロ型でもホモ型でも異常なスパイクが観察された。以上の結果から、患者型DSCAML1変異体マウスが、てんかん発作を惹起しやすい状態であることが示唆された。

DSCAML1 ^{A2105T}		
Homo_s.	PSTEPPRAGGPHTK---MGGSRDSLLEMSTPGVGRSQKQGAGAYSKSYTLV	2111
Mus_m.	PSTEPPRAGGPHTK---MGGSRDSLLEMSTPGVGRSQKQGAGAYSKSYTLV	2111
Rattus_n.	PSTEPPRAGGPHTK---MGGSRDSLLEMSTSGVGRSQKQGAGAYSKSYTLV	2113
Gallus_g.	TTTTTTTHSK-----VGGSRDSLLEMSTSGAGRAQKQGAGAYSKSYTLV	2040
Xenopus_s.t.	ENRLPTQHISK-----MGGSRDSLLEMSSSGSRAQKQGAGAYSKSYTLV	2043
Danio_r.	ASASSTGGSGPTPGSSKVGGSRDSLLESSSSGLGRLQKQAGAYSKSYTLV	2144
***** * * * * *		

Fig. 3 DSCAML1のアミノ酸比較
2105番目のアラニンの周辺部位のアミノ酸を種間で比較した。

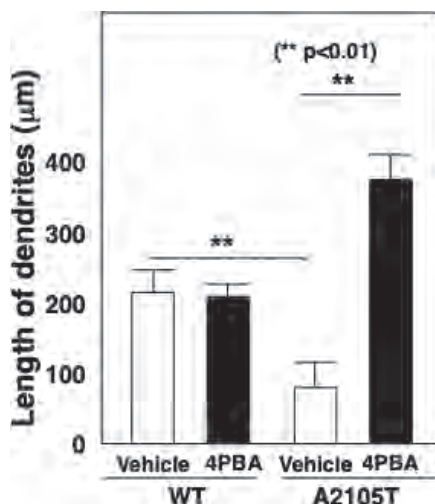


Fig. 4 薬理的シャペロンの効果（初代培養神経細胞）
野生型マウス由来またはDSCAML1^{A2105T} KIマウス由来の海馬初代培養神経細胞にVehicle (PBS) または4PBAを加え培養した。培養5日目で樹状突起の長さを測定した。

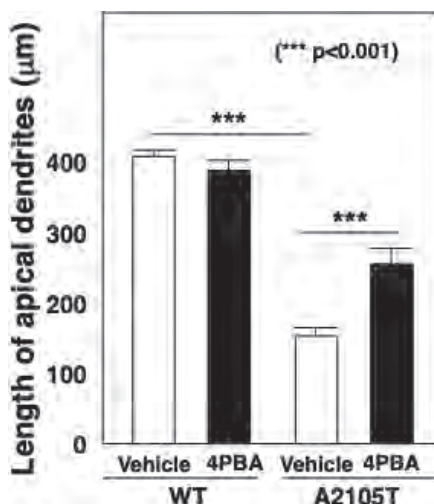


Fig. 5 薬理的シャペロンの効果（マウス成体）
野生型マウスまたはDSCAML1^{A2105T} KIマウスにVehicle (PBS) または4PBAを引水投与した。Thy1-YFPマウスを掛け合わせているので、大脳皮質の5層の神経細胞のapical dendritesの長さを測定した。

(3) 新規抗てんかん薬のスクリーニングとモデル動物の治療

様々な精神・神経疾患が蛋白質のmisfoldingに起因していることが報告されている⁸⁾。薬理的シャペロンのSuberoylanilide hydroxamic Acid (SAHA), Sodium 4-phenylbutyrate (4PBA), Trimethylamine N-oxide (TMAO)などは、蛋白質のmisfoldingを改善することが報告されている⁹⁾。まず、DSCAML1^{A2105T}安定発現株を用いてスクリーニングを行ったところ、SAHAと4PBAが細胞質に蓄積しているDSCAML1^{A2105T}蛋白質を細胞膜上へ局在するこ

とができた。次に、野生型マウスまたはDSCAML1^{A2105T} KIマウス由来の海馬初代培養神経細胞に対して検討した。薬理的シャペロン非投与の状態では、DSCAML1^{A2105T} KIマウス由来の神経細胞は樹状突起の伸長阻害が認められる (Fig. 4)。4PBAを投与すると、樹状突起の伸長阻害が改善された (Fig. 4)。以上の結果は、細胞質に蓄積しているDSCAML1^{A2105T}蛋白質は、細胞膜上に局在することができれば機能することを示唆している。最後に、成体に4PBAを引水投与し、解析を行った。DSCAML1^{A2105T} KIマウスにThy1-YFPマウスを掛け合わせ、大脳皮質

の5層の神経細胞を光らせるマウスを準備して、4週齢から3週間引水投与した。野生型マウスに比べて、DSCAML1^{A2105T} KIマウスは5層錐体細胞のapical dendritesの伸長が阻害されている (Fig. 5)。4PBAの投与によって、野生型レベルまでは回復できないが、有意に神経突起伸長作用が認められた (Fig. 5)。さらに、4PBAがDSCAML1^{A2105T} KIマウスで見られる異常なスパイクを改善できるか検討している。以上の結果は、蛋白質のmisfoldingを改善する薬理的シャペロンは、DSCAML1^{A2105T} 蛋白質の様な正規な局在をしていない蛋白質を正常化しすることで、様々な異常な状態を改善しうる可能性を有していることを示唆する。

【考察】

私共は、所属機関の「発達障害を伴うてんかん症例デポジトリ」を利用し、てんかん患者由来のリンパ芽球でDSCAML1 mRNAの発現量が健常者よりも低いことを見出している。従って、DSCAML1 mRNAの発現量の測定、DSCAML1のSNP探索が、新たなバイオマーカーになるのではないかと考えている。以上のことから、「DSCAML1異常に起因するニューロサーキット異常型てんかん」という新しいてんかんのタイプを提唱できるのではないかと考えている。

近年、てんかんが、アルツハイマーやパーキンソン病のようにコンフォメーション病に属する可能性が報告されている⁹⁾。私共が見出したDSCAML1^{A2105T}変異体は、DSCAML1のコンフォメーション異常が原因で、正規の局在ができないと考えている。DSCAML1のコンフォメーション異常が、てんかん発症に関与しているのであれば、“蛋白質のコンフォメーション異常に起因するてんかん”という新たな分類ができ、治療薬の早期選択にも繋がるのではないかと考えている。

最後に、現在投稿中の結果であるため詳細な内容や生データは本報告書に記載できませんでした。大変申し訳ございませんでした。

【参考文献】

1) Amano S, Ikeda M, Uemura S, Fukuoka J, Tsuji

- A, Sasahara M., et al. Mossy fiber sprouting in the dentate gyrus in a newly developed epileptic mutant, Ihara epileptic rat. *Brain research* 1999 ; **834** : 214-218.
- 2) Okaichi Y, Amano S, Ihara N, Hayase Y, Tazumi T, and Okaichi H. Open-field behaviors and water-maze learning in the F substrain of Ihara epileptic rats. *Epilepsia* 2006 ; **47** : 55-63.
- 3) Tsuji A, Amano S, Yokoyama M, Fukuoka J, Hayase Y, and Matsuda M. Neuronal microdysgenesis and acquired lesions of the hippocampal formation connected with seizure activities in Ihara epileptic rat. *Brain research* 2001 ; **901** : 1-11.
- 4) Agarwala KL, Ganesh S, Tsutsumi Y, Suzuki T, Amano K, and Yamakawa K. Cloning and functional characterization of DSCAML1, a novel DSCAM-like cell adhesion molecule that mediates homophilic intercellular adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001 ; **285** : 760-772.
- 5) Fuerst PG, Koizumi A, Masland RH, and Burgess RW. Neurite arborization and mosaic spacing in the mouse retina require DSCAM. *Nature* 2008 ; **451** : 470-474.
- 6) Fuerst PG, Bruce F, Tian M, Wei W, Elstrott J, Feller MB, et al. DSCAM and DSCAML1 function in self-avoidance in multiple cell types in the developing mouse retina. *Neuron* 2009 ; **64** : 484-497.
- 7) Zipursky SL, and Sanes JR. Chemoaffinity revisited : dscams, protocadherins, and neural circuit assembly. *Cell* 2010 ; **143** : 343-353.
- 8) Soto C, and Pritzkow S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience* 2018 ; **21** : 1332-1340.
- 9) Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Ohkawa T, et al. Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. *Nature Medicine* 2015 ; **21** : 19-26.

