

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	脳神経科学領域 神経生理分野 柴 祐子
<p>(論文題目)</p> <p>Spontaneous epileptic seizures in transgenic rats harboring a human ADNFLE missense mutation in the β2-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor</p> <p>(ヒト常染色体優性夜間前頭葉てんかん由来ニコチン性アセチルコリン受容体β2サブユニット変異ラットの自発性発作)</p>	
<p>【背景と目的】</p> <p>常染色体優性夜間前頭葉てんかん(ADNFLE)はニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)のサブユニットをコードする遺伝子(<i>CHRNA2</i>, <i>CHRNA4</i>, <i>CHRNA2</i>)の変異が同定されている。本研究では nAChR β2 サブユニットに変異を持つトランスジェニックラットを作出し、ADNFLE のモデル動物としての妥当性を検証することを目的として研究を進めた。</p> <p>【方法】</p> <p>遺伝子組換えラットの作出</p> <p>ラット nAChR のβ2サブユニットをコードする遺伝子 <i>Chrn2</i> の cDNA を cDNA panel から PCR によってクローニング単離し、pCRII-TOPO vector を用いてサブクローニングしたのち V286L の相同変異を導入した。この変異 cDNA を皮質、海馬発現用 PDGF プロモーターを持つ哺乳動物ベクターに移入した後 SD ラット受精卵に注入して組換え体を作成した。作出された動物は弘前大学動物実験施設で繁殖飼育、系統維持されている。実験にはすべてオスのヘテロ接合の遺伝子組換え体(V286L-TG)と同胞非組換え体(non-TG)を使用した。</p> <p>組織学的解析</p> <p>8 週齢と 24 週齢のラットから摘出した脳を 4%パラホルムアルデヒド 24 時間固定後パラフィン包埋し、矢状断切片を Klüver-Barrera 法により組織染色した。また 1 次抗体として anti-ssDNA を使用したアビジン・ビオチン-ペルオキシダーゼ (ABC 法) による免疫組織染色を行った。2) 8 週齢のラットを麻酔下で灌流固定して脳を取り出し 4°C 3 時間固定。7.5% ショ糖入りバッファで一晩保存後、前頭葉/線条体、海馬/視床、後頭葉/中脳の各領域から切片を切り出し anti-nAChR α4 抗体または anti-nAChR β2 抗体を用いた免疫組織化学的手法で nAChR タンパク質発現を可視化した。3) 2 週、4 週、6 週、8 週、12 週齢のラットから断頭摘出した脳を -80°C で凍結保存。クリオスタットで 20μm に薄切したのちスライドガラス上にとる。³³P でラベリングされたオリゴヌクレオチドプローブを用いた <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法で変異型、野生型の mRNA の発現を検出した。結果はフラットベッドスキャナーでデジタル化し、フォトショップ CS3 でグレイレベルを半定量的に評価した。</p> <p>脳波解析</p> <p>8 週、10 週、12 週齢のラットで各 1 週間ずつ脳波とビデオの同時記録を行った。麻酔下でラットの頭骨に脳波用電極を埋め込み、回復期間を経たのちテレメータによる脳波データを取得した。</p>	

ニコチン投与による発作誘発実験

13 週齢のラットに 2 濃度 (0.5mg/kg、1.0mg/kg) のニコチンを別々に投与し各々の発作活性を 6 段階で評価した。ニコチン投与前後は脳波/ビデオ同時記録を行い脳への影響を評価した。

【結果】

V286L-TG はメンデルの法則に従って出生し正常な発育成長をした。生殖能力や寿命も non-TG と違いはなかった。

組織染色の結果 V286L-TG の脳には構造的な異常はみられなかった。ss-DNA 抗体陽性のアポトーシス細胞の顕著な増加も見られなかった。*in situ* ハイブリダイゼーション法により $\beta 2$ サブユニットをコードする遺伝子の脳内分布をみたところ V286L-TG と non-TG で違いは認められなかったが、変異型遺伝子選択的プローブでは V286L-TG で有意に V286L mRNA の高発現が認められ ($P < 0.01$) これは主に大脳皮質、海馬、小脳において顕著であった。nAChR $\beta 2$ サブユニットの免疫組織染色の結果、感覚運動野において V286L-TG と non-TG の間に違いは認められなかった。

脳波解析の結果、11 匹中 5 匹 (45%) の V286L-TG において脳波異常を伴う行動の異常を確認した。その頻度は 1 週間に 0.73 回の割合であった。

ニコチン投与実験では 0.5mg/kg、1.0mg/kg の両濃度において最初の異常行動発現までの潜時が V286L-TG で有意に短縮していることが確認された。発作活性は比較的濃度の高い 1.0mg/kg では有意差が出なかったものの、低濃度の 0.5mg/kg では V286L-TG で発作スコアが高く、V286L-TG ではニコチンに対する感受性が高いことが示唆された。

【考察】

脳波を測定した V286L-TG の約半数に振幅の高い棘波状の脳波とともに驚いたように飛び上がったり、またはジャンプしてから走るなどの異常な行動がみられた。ADNFLE 患者では特徴的な 3 種類の発作、“paroxysmal arousals”, “paroxysmal dystonia”, “episodic wandering”、をおこすことが知られている。V286L-TG の異常行動はその中の“paroxysmal arousals”に酷似しており、今回確認した異常行動は脳波の異常も伴っており“paroxysmal arousals”様の自発性発作をおこしたものと思われる。

V286L-TG は脳の構造的な異常もなく、nAChR $\beta 2$ サブユニットの免疫染色性にも non-TG との違いはみられなかった。しかし脳内における変異型遺伝子が高レベルで検出され、行動上もニコチンに対する高い感受性を示した。

以上の結果から V286L-TG はヒト ADNFLE と相同する遺伝子変異を有し、ADNFLE と酷似した表現型を示すというモデルラットとしての妥当性を有していることが明らかとなった。モデル動物の作出についてはマウスがよく用いられるが、本研究で使用したトランスジェニックラットは、ヘテロ接合体を使用しておりヒト ADNFLE 患者の実態に近い。ラットはマウスより生理機能がヒトに近いこと、頭骨内投与など微細な実験手技がしやすいことからより有用性が高いものと思われる。

今後このモデルを使って ADNFLE の病因とてんかん発生のメカニズムが解明され、そのメカニズムを利用した抗てんかん薬の開発や予防、根本治療開発が進むことが期待される。