

発達障害と重症てんかんを示すドラベ症候群モデルマウスの遺伝子治療 クリスパー応用技術による欠損遺伝子の発現修復－名古屋市立大学

ドラベ症候群は、生後1年以内に熱誘起性のけいれん発作で発症し、その後非熱誘起性のてんかん発作、自閉症や知的障害などに加えてしばしば突然死を引き起こす重症で難治な疾患であり、約8割の患者から電位依存性ナトリウムチャネル1Nav1.1をコードするSCN1A遺伝子の新生ヘテロ機能喪失変異が見いだされている。

今までに名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学研究所の山川和弘教授（神経発達症遺伝学分野）らの研究グループは、ドラベ症候群患者におけるSCN1A遺伝子の変異同定と機能解析について多くの報告を行うとともに、Nav1.1が主要な抑制性神経細胞であるパルブアルブミン（PV）陽性神経細胞2で高い発現を示すこと、ドラベ症候群モデルであるScn1aナンセンス変異ノックインマウスにおけるけいれん発作と突然死（Ogiwara et al., J Neurosci 27:5903-14, 2007）、同マウスの記憶学習障害と社会性行動異常（Ito et al., Neurobiol Dis 49:29-40, 2013）、同マウスPV陽性抑制性神経細胞でのNav1.1半減がまさしくてんかん発作、突然死、異常行動などの主要原因であり、興奮性神経細胞での半減は逆効果を持つこと（Ogiwara et al., Hum Mol Genet 22:4784-804, 2013; Tatsukawa et al., Neurobiol Dis 112:24-34, 2018）などを報告し、有効で副作用の少ないドラベ症候群の治療法開発にはPV陽性抑制性神経細胞のみでNav1.1の発現回復を目指すことが望ましいこと、興奮性神経細胞でのそれは症状を逆に悪化させる恐れがあることを示してきた。

この度、山川教授らの研究グループは、てんかん・自閉症・知的障害を合併するドラベ症候群のモデルマウスであるScn1aナンセンス変異3ノックインマウスにおいてクリスパーを応用した技術により抑制性神経細胞のみでScn1a遺伝子の発現を亢進させて半減しているNav1.1を補うことにより、同マウスで見られるてんかん発作、突然死、異常行動などを改善させうることを見出した。

クリスパー(CRISPR)技術はDNAの目的とする任意の部分に相補的なガイドRNA (gRNA) によりCas9と呼ばれるDNA切断酵素をその場所に誘導してDNAを切断し組み替える革新的なゲノム編集技術として知られており、最近ではDNA切断活性を失わせたdCas9酵素に転写因子を結合したdCas9-VPRなどの因子により任意の遺伝子の転写を効率よく促進させることができるようになっている(CRISPR-ON)。

山川教授らの研究グループは、ヒトおよびマウスのSCN1A遺伝子の2つ（上流および下流）のプロモーター4のうち上流プロモーターにおけるgRNAが効率よくSCN1A遺伝子の転写を促進しうること、更に複数の上流プロモーターgRNAを組み合わせて利用し、dCas9-VPRをScn1aナンセンス変異ノックインマウスの抑制性神経細胞のみでScn1a遺伝子の発現を亢進させてNav1.1の発現量を補うことにより、同マウスで見られるてんかん発作、突然死、異常行動などを改善させうることを見出した。

以上の結果は、SCN1Aの発現を抑制性神経細胞のみで亢進させることがドラベ症候群の治療法となりうることを示す。

発達障害と重症てんかんを示すドラベ症候群モデルマウスの遺伝子治療 クリスパー応用技術による欠損遺伝子の発現修復－名古屋市立大学

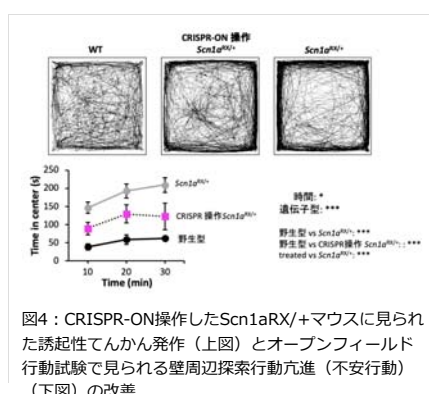
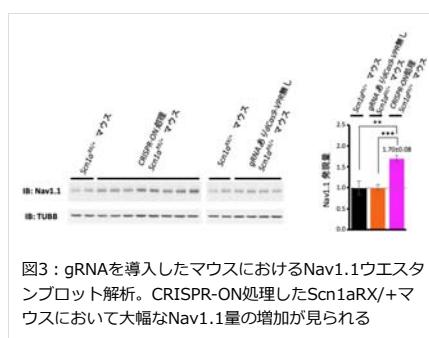
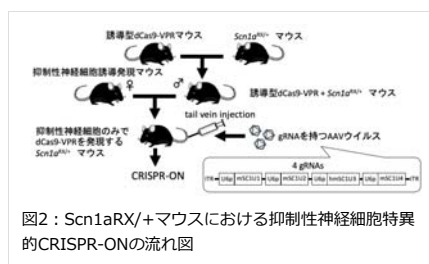
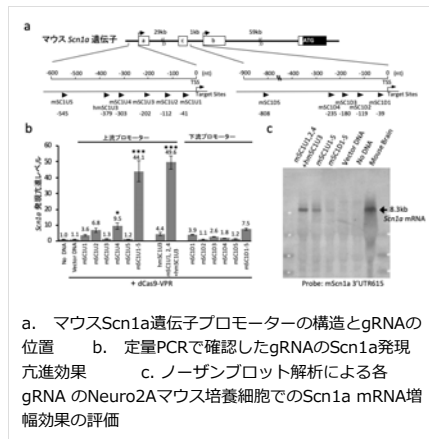
【研究成果の概要】

名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学研究所の山川和弘教授（神経発達症遺伝学分野）らの研究グループは、てんかん・自閉症・知的障害を合併するドラベ症候群モデルマウスであるScn1aナンセンス変異ノックインマウスにおいてクリスパーを応用した技術により抑制性神経細胞のみでScn1a遺伝子の発現を亢進させて半減しているNav1.1を補うことにより、同マウスで見られるてんかん発作、突然死、異常行動などを改善させることを見出した。

山川教授らの研究グループは、マウスのScn1a遺伝子の2つ（上流および下流）のプロモーターのうち、下流よりも上流のプロモーターにおけるgRNAが効率よくScn1a遺伝子の転写を促進することを明らかにした（図1）。また、ヒト SCN1A遺伝子でも同様の結果（上流プロモーターgRNAの高い増幅効率）が得られた。

続いて、特定の細胞でdCas9-VPRを発現できるマウス（誘導型dCas9-VPRマウス）とScn1aナンセンス変異ノックインマウス（Scn1aRX/+）を掛け合わせて得られる誘導型dCas9-VPR + Scn1aRX/+マウスを更に誘導型因子を抑制性細胞のみで発現させる抑制性神経細胞誘導発現マウス6と掛け合わせることで、抑制性神経細胞のみでdCas9-VPRを発現するScn1aRX/+マウスを得た。更にこのマウスにgRNAを発現する遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス（AAV）を尾静脈注入することにより、Scn1aRX/+マウスの抑制性神経細胞のみでCRISPR-ONを誘導しScn1a発現の亢進、Nav1.1発現量の増加を目指した（図2）。

当該マウスの脳のNav1.1タンパク量を測定したところ、実際に大幅な増加が確認された（図3）。更に、抑制性神経細胞のみでdCas9-VPRを発現するScn1aRX/+マウスにgRNAを導入したマウスでは、gRNAを導入しなかったマウスおよびScn1aRX/+マウスに比べて有意に熱誘起性てんかん発作（てんかん発作を引き起こす体温域値低下）（図4上）や不安行動（図4下）などの改善がみられた。



発達障害と重症てんかんを示すドラベ症候群モデルマウスの遺伝子治療 クリスパー応用技術による欠損遺伝子の発現修復－名古屋市立大学

【用語解説】

- 1) 電位依存性ナトリウムチャネル: 細胞の中にナトリウムイオンを入れるために細胞膜上に形成される穴。ナトリウムイオンが通る穴を形成するタンパク質である9種の α サブユニット (Nav1.1~Nav1.9) と、その開閉などを制御する4種の β サブユニット ($\beta 1 \sim \beta 4$) で構成される。SCN1AはNav1.1を作る遺伝子として知られている。
- 2) パルブアルブミン (PV) 陽性神経細胞: 神経細胞は、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞に大きく2つに分けられ、双方が制御し合うことによって脳全体で適切な情報伝達が行われている。神経細胞のうちおよそ8割が興奮性、2割が抑制性の細胞であり、抑制性神経細胞はさらに多様な種類の細胞で構成されている。パルブアルブミン陽性抑制性神経細胞は、パルブアルブミン (PV) というカルシウム結合タンパクを発現する、抑制性神経細胞の約4割を占める細胞で、多くがバスケット細胞、一部シャンデリア細胞などで構成される。PV陽性バスケット細胞は高頻度で発火する細胞で、軸索を興奮性神経細胞の細胞体に投射し、その興奮を強力に抑制している。
- 3) ナンセンス変異: 遺伝子の塩基配列中のアミノ酸に対応するコドンをストックコドン (対応するアミノ酸が無いコドン) に変化させる突然変異。タンパク質の合成はそこで停止するため、不完全なタンパク質が合成される。もしくは、mRNAが不安定となって分解される結果、タンパク質は合成されない。
- 4) プロモーター: ゲノムDNAにおいて遺伝子の転写開始を制御する塩基配列の領域。その領域のDNA配列に転写基本因子群とRNAポリメラーゼが転写開始複合体を形成し、mRNAの転写が開始される。
- 5) 誘導型dCas9-VPRマウス: Creリコンビナーゼによって発現が誘導されるdCas9-VPR遺伝子を人工的に導入したマウス。
- 6) 抑制性神経細胞誘導発現マウス: 抑制性神経細胞で発現するVgat遺伝子の発現配列の下流にDNA組み替え酵素のCreリコンビナーゼ遺伝子を人工的に導入したマウス。このマウスを誘導型dCas9-VPRマウスと交配することで抑制性神経細胞だけにdCas9-VPR遺伝子を発現するマウスが得られる。

【研究助成】

本研究は、日本医療研究開発機構(AMED) 脳科学研究戦略推進プログラム(融合脳)「Rare variantから迫る発達障害・統合失調 症の診断法・治療法の開発」の分担研究課題「発達障害・てんかんモデルの作成とそれらを用いた治療法の開発(分担研究者:山川和弘)」の助成などにより行われました。

研究成果は、米国科学誌「Neurobiology of Disease (ニューロバイオロジー・オブ・ディジーズ)」に2020年5月21日(米国東部時間)掲載

【掲載された論文の詳細】

【論文タイトル】

CRISPR/dCas9-based Scn1a gene activation in inhibitory neurons ameliorates epileptic and behavioral phenotypes of Dravet syndrome model mice

「抑制性神経細胞でのCRISPR/dCas9によるScn1a遺伝子の発現上昇はドラベ症候群モデルマウスのてんかんと異常行動を改善する」

【掲載学術誌】

「Neurobiology of Disease (ニューロバイオロジー・オブ・ディジーズ)」

DOI番号: 10.1016/j.nbd.2020.104954

【著者】

山形哲司 1) 2), Raveau Matthieu 2), 小林憲太 3), 宮本浩行 2) 5), 立川哲也 2), 荻原郁夫 2), 糸原重美 4), Takao K. Hensch 5) 6), 山川和弘 1) 2) * (*Corresponding author)

名古屋市立大学医学研究科脳神経科学研究所神経発達症遺伝学分野1, 理化学研究所脳神経科学研究センター神経遺伝研究チーム2, 生理学研究所行動・代謝分子解析センターウイルスベク

ター開発室3, 理化学研究所脳神経科学研究センター行動遺伝学研究チーム4, 東京大学
ニューロインテリジェンス国際研究機構5, 米国ハーバード大学脳科学センター・分子細胞生物
学科6

【お問い合わせ先】

《研究全般に関するお問い合わせ先》

山川 和弘（やまかわ かずひろ）

名古屋市立大学大学院医学研究科・脳神経科学研究所・神経発達症遺伝学分野 教授

〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

(2020/05/26 18:57)