

PRESS RELEASE

文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、
名古屋教育医療記者会、名古屋市政記者クラブと同時発表

2020年5月25日

名古屋市立大学事務局企画広報課広報係
〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1
TEL:052-853-8328 FAX:052-853-0551
MAIL: ncu_public@sec.nagoya-cu.ac.jp
URL : <https://www.nagoya-cu.ac.jp/>

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

(一クリスパー応用技術による欠損遺伝子の発現修復一)

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・ディゼイズ)」に2020年5月21日(米国東部時間)掲載

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ンネル¹ Nav1.1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を、更に複数の上流プロモーター-gRNA を組み合わせることで、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。

ポイント

- ドラベ症候群の有効な治療法の確立が望まれている。
- 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しうることを明らかにした。
- *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。

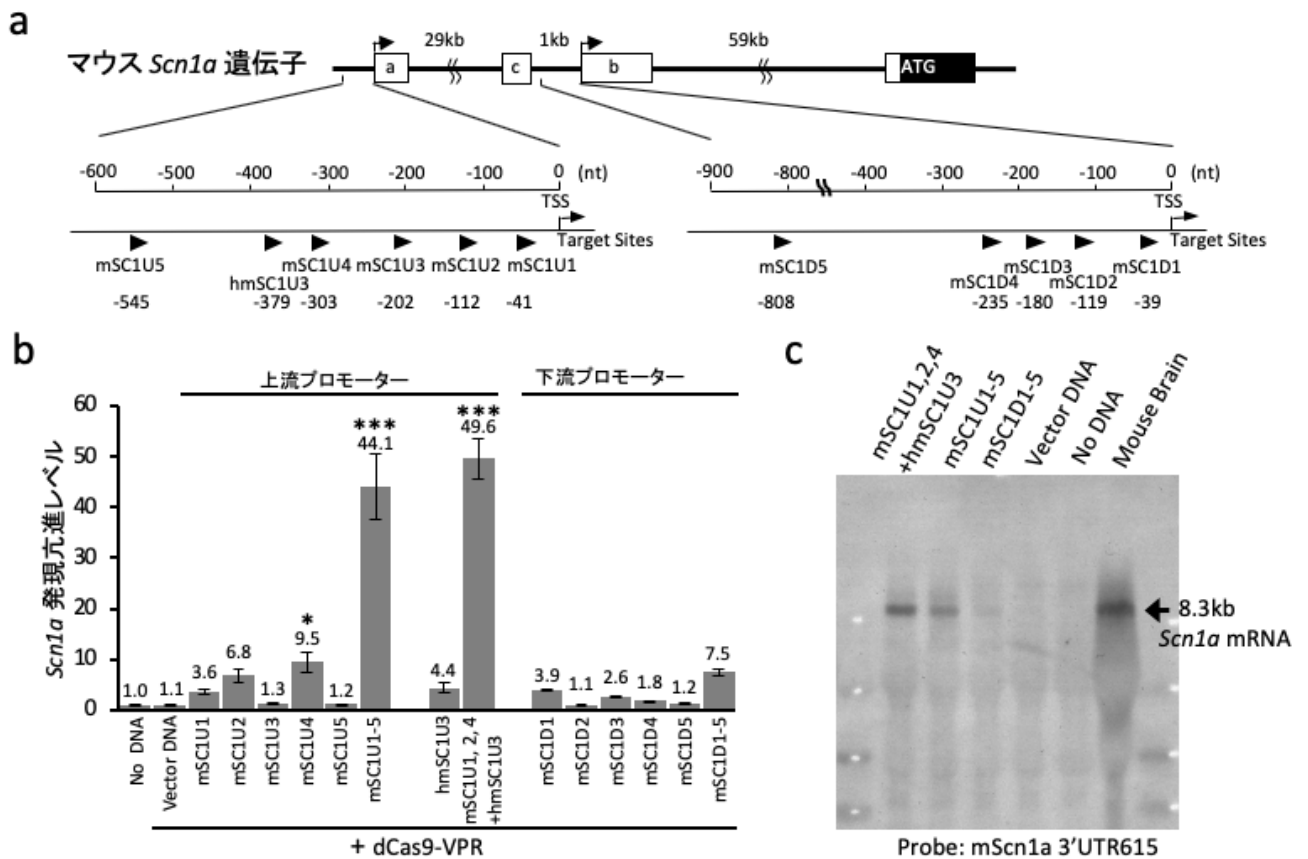
今後の発展性

- *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る可能性がある。
- 自閉症や知的障害などを含む重症の神経発達障害やてんかんは、原因遺伝子のハプロ不全 (2 つあるアレル遺伝子の一方が分断変異などにより失活している状態) で引き起こされることが多い。本技術はこれら疾患の治療法として広く応用できる可能性がある。

【研究成果の概要】

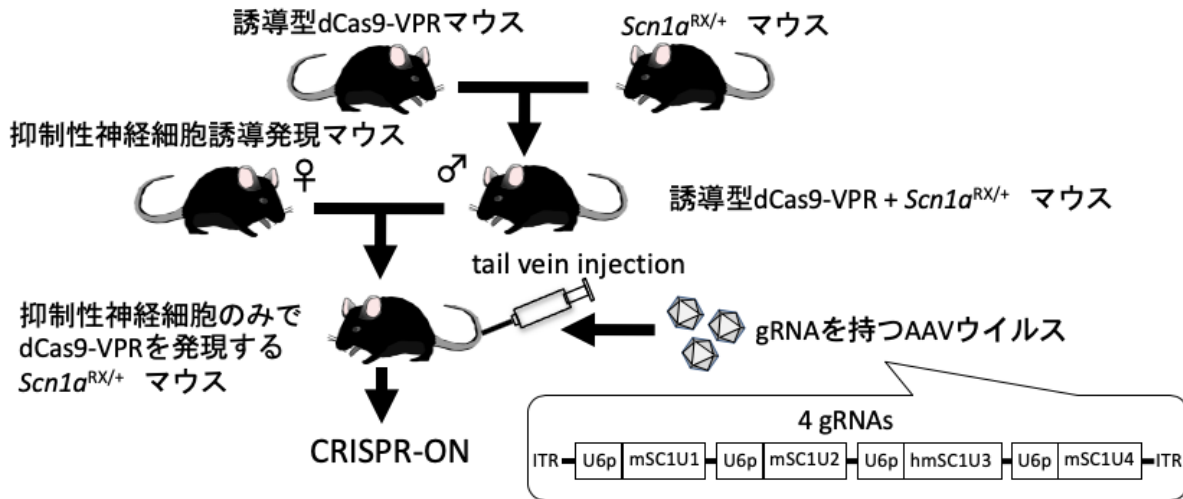
名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学研究所の山川和弘教授（神経発達症遺伝学分野）らの研究グループは、てんかん・自閉症・知的障害を合併するドラベ症候群モデルマウスである *Scn1a* ナンセンス変異ノックインマウスにおいてクリスパーを応用した技術により抑制性神経細胞のみで *Scn1a* 遺伝子の発現を亢進させて半減している Nav1.1 を補うことにより、同マウスで見られるてんかん発作、突然死、異常行動などを改善させることを見出した。

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。



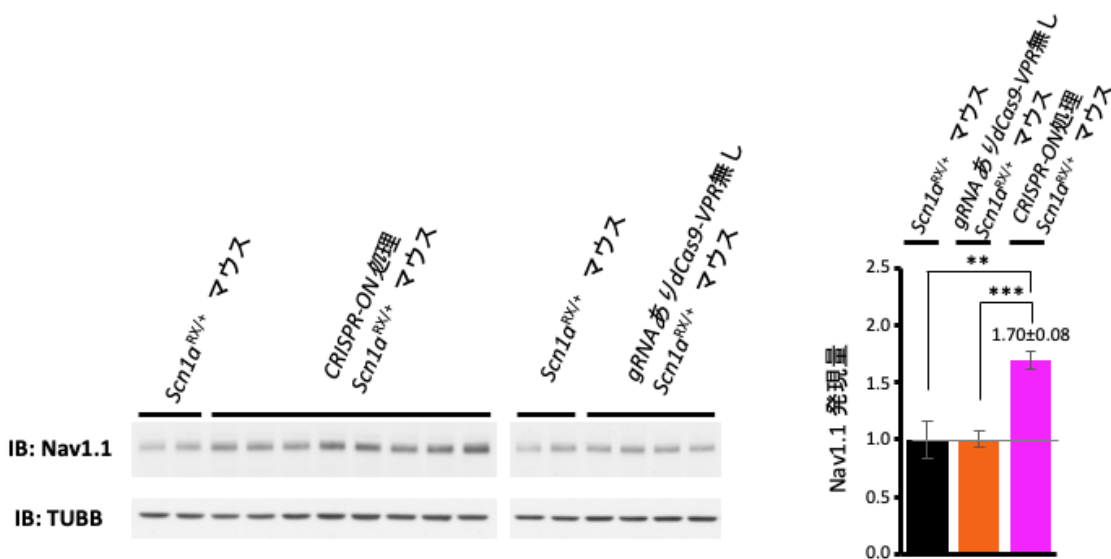
【図1】 a. マウス *Scn1a* 遺伝子プロモーターの構造と gRNA の位置。 b. 定量 PCR で確認したそれぞれの単独および混合 gRNA の *Scn1a* 発現亢進効果。上流のプロモーターに位置する gRNA を混合したもので高い効果が見られることがわかる。 c. ノーザンブロット解析による各 gRNA の Neuro2A マウス培養細胞での *Scn1a* mRNA 増幅効果の評価。第1レーンの混合 gRNA において *Scn1a* mRNA の高い転写亢進が見られる。コントロール：マウス脳組織。

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)⁵と *Scn1a* ナンセンス変異ノックインマウス (*Scn1a*^{RX/+}) を掛け合わせて得られる誘導型 dCas9-VPR + *Scn1a*^{RX/+}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と掛け合わせるにより、抑制性神経細胞のみで dCas9-VPR を発現する *Scn1a*^{RX/+}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、*Scn1a*^{RX/+}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)。



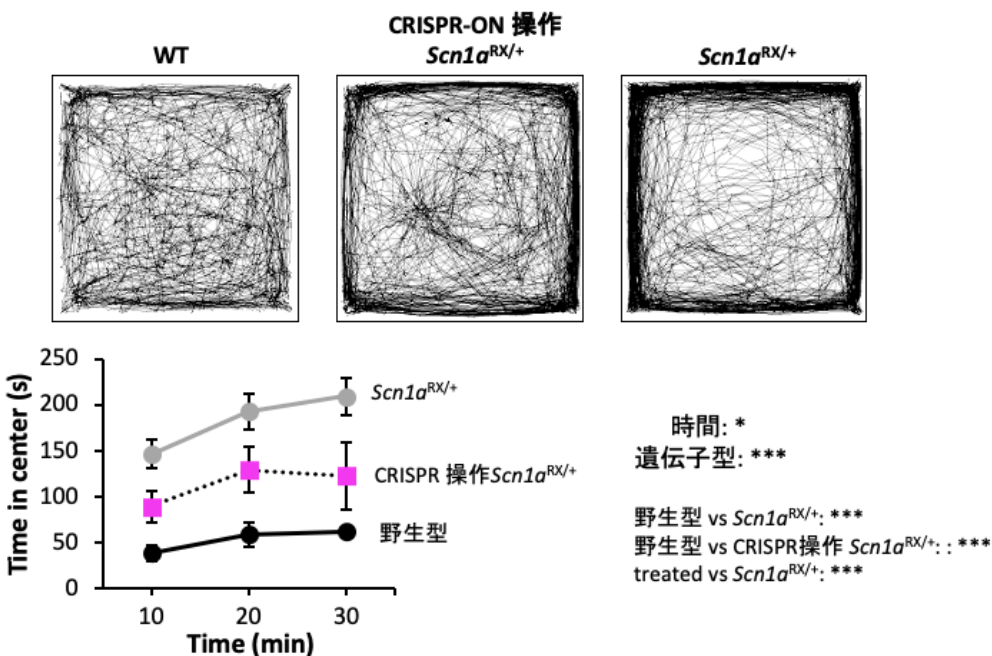
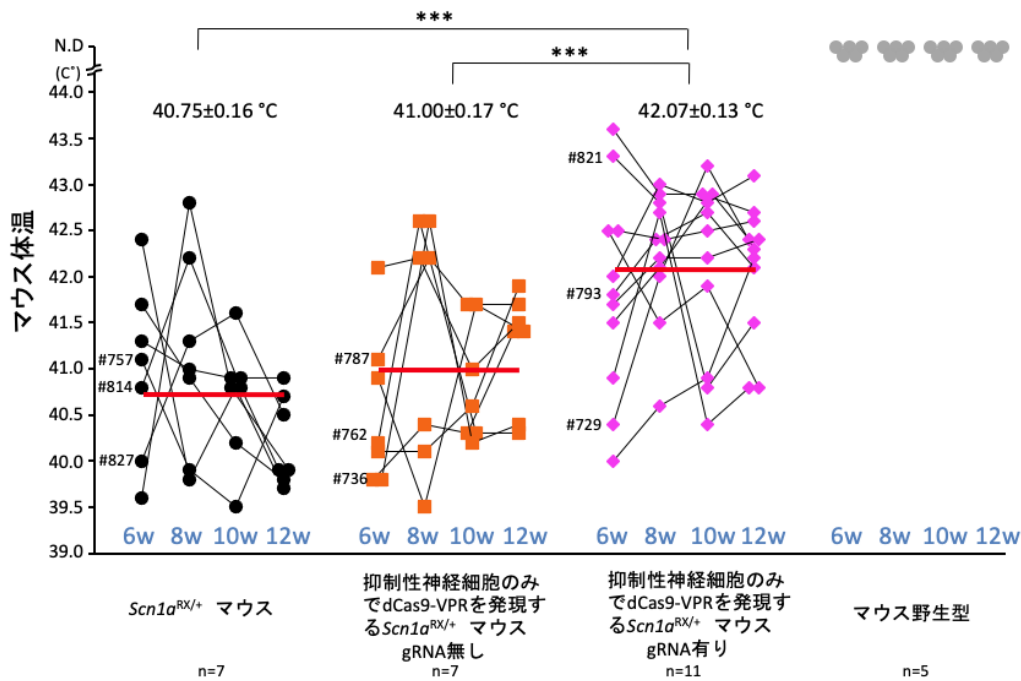
[図 2] *Scn1a*^{RX/+}マウスにおける抑制性神経細胞特異的 CRISPR-ON の流れ図。

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)。



[図 3] gRNA を導入したマウスにおける Nav1.1 ウェスタンブロット解析。CRISPR-ON 処理した *Scn1a*^{RX/+} マウスにおいて大幅な Nav1.1 量の増加が見られる。

更に、抑制性神経細胞のみで dCas9-VPR を発現する *Scn1a*^{RX/+} 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 *Scn1a*^{RX/+} 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。



【図 4】 CRISPR-ON 操作した *Scn1a*^{RX/+} マウスに見られた誘起性てんかん発作（上図）とオープンフィールド行動試験で見られる壁周辺探索行動亢進（不安行動）（下図）の改善。

【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 (β 1~ β 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に発火する細胞で、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。

【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」

【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

【掲載学術誌】

「Neurobiology of Disease (ニューロバイオロジー・オブ・ディゼイズ)」

DOI 番号 : 10.1016/j.nbd.2020.104954

【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

E-mail : yamakawa@med.nagoya-cu.ac.jp