

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08254

研究課題名(和文) 難治性てんかん由来のGABA作動性神経細胞を用いた細胞間情報伝達機構の体系的な解析

研究課題名(英文) Analysis of GABAergic synaptic transmission in hippocampal CA3 neurons.

研究代表者

窪田 寿彦 (Kubota, Hisahiko)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80377746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ドラベ症候群は、難治性てんかんの1種でありGABA作動性神経系における電位依存性Naチャンネルの機能不全が発症原因と指摘されている。電位依存性Naチャンネルの構成に関するSCN1A遺伝子の変異がチャンネル機能不全を起こし、その結果GABA作動性神経が機能不全になる。しかしながら、本疾患において神経細胞間の情報伝達系に関する病態変化は明確ではない。本研究は、本疾患における神経細胞間情報伝達の変化を体系的に明らかにする目的で、マウス脳スライス標本や難治性てんかん患者由来の細胞を用い、電気生理学的解析を行った。その結果、中枢神経系の細胞間情報伝達は受容体反応が減弱している傾向が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳神経疾患に関する病態研究においては、薬物投与モデルや遺伝子改変動物などを使用したモデル動物を使用した研究が一般的である。加えて近年では、より明確かつ詳細な解析を目的として、培養細胞を使用した研究が盛んである。本研究では、従来の研究手法に基づく神経細胞間情報伝達機構の病態変化の解析に加え、実病態を有する患者より作成したiPS細胞を用い、より病態に近い形での研究解析を行った。これらを比較することにより、神経細胞間情報伝達機構に関してより詳細な解析が可能であり、病態解明に向けた基礎情報の提供が行えると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Dravet syndrome is a type of intractable epilepsy one of the refractory epilepsies. Mutations in sodium channels are responsible for Dravet syndrome, and the Nav1.1 channel encode by the SCN1A gene is the most frequent target of mutations. Nav1.1 channels are mainly driving GABAergic neurotransmission in the central nervous system. Thus, mutations in Nav1.1 channels have severely impaired sodium currents and action potential firing in hippocampal GABAergic inhibitory neurons. However, pathological changes in neurotransmission have not been clarified in Dravet syndrome. The aim of this study is to understand pathological changes in neurotransmission. In this study, we performed electrophysiological analysis using mouse brain slice preparations and iPS cells from Dravet syndrome in order to systematically clarify the changes in neurotransmission. Our results suggested that neurotransmission of the central nervous system is attenuated in Dravet syndrome.

研究分野：小児神経科学

キーワード：難治性てんかん GABA作動性神経 グルタミン酸作動性神経 発達

<1 . 研究開始当初の背景>

乳児期発症する難治性てんかんであるドラベ症候群は、既存のてんかん薬に対して抵抗性がある。本疾患では、SCN1A 遺伝子の変異を同定する遺伝診断は可能ではあるが、詳細な病態生理が不明確であることもあり、効果的な治療薬は未だ開発されていない。近年、本疾患が難病指定の対象疾患に本疾患が含まれたことから、早急な病態生理の全貌解明と治療薬の開発が待たれている。

本疾患は、電位依存性 Na^+ チャネル Nav1.1 のサブユニットをコードする SCN1A 遺伝子に変異が認められており (Alekov A et al., *J Physiol.*, 2000, Claes L et al., *Am J Hum Genet.*, 2001) 電位依存性 Na^+ チャネルの機能不全が指摘されている。加えて Nav1.1 は、GABA 作動性神経に主に発現していること (Ogiwara I et al., *J Neurosci.* 2007) GABA 作動性神経細胞では Nav1.1 タンパク質の半減が発現している Na^+ チャネルの機能不全の原因であること (Hun S et al., *Nature*, 2013) などが明らかにされている。GABA 作動性神経は、中枢神経系における主要な抑制性神経である。従って、 Na^+ チャネルの機能低下に起因する GABA 作動性神経の機能低下が、中枢神経の過剰な興奮を誘引する。その結果、重篤なてんかん発作を発現すると考えられている。しかしながら Na^+ チャネルに関する研究が先行し、神経細胞間情報伝達機構に関する病態生理変化の詳細な研究は行われていない。

<2 . 研究の目的>

Na^+ チャネル機能不全に起因する GABA 作動性神経の機能低下が示唆されている本疾患において、中枢神経系の神経細胞間情報伝達機構が正常に機能しているかを体系的に明確にすることが本研究の目的である。本疾患に関する基礎的研究では、中枢神経細胞間情報伝達機構について体系的に解析している具体的な研究は少ない。そこで本研究では、これら神経細胞間情報伝達機構を興奮性神経ならびに抑制性神経において体系的な解析を行い、本疾患に対する基礎研究の礎を構築することを目指す。具体的には以下を計画する。興奮性神経ならびに抑制性神経の神経細胞間情報伝達機構は、病態変化でどのように影響を受けているのか、神経細胞間情報伝達機構自体が Na^+ チャネルの機能低下によりどのような影響を受けているのかを体系的に解析していく。

<3 . 研究の方法>

実験には、マウスの脳スライス標本を用いた電気生理学的解析を主体に、加えてドラベ患者由来の iPS 細胞を用いた電気生理学的解析を行う。マウスの脳スライス標本を用いた解析では、生後 3, 7, 14, 21, 28-35 歳の異なる週齢のマウスから取り出した脳より、厚さ 300 μm の海馬 CA3 領域を含む脳スライス標本を作製する。作成後、パッチクランプ法にて CA3 錐体細胞からシナプス後電流を記録する。記録する電流は、興奮性ならびに抑制性の自発的なシナプス後電流に加え、海馬 CA3 領域に情報伝達を行う海馬歯状回の細胞を電気刺激して惹起される電流を CA3 錐体細胞より記録する。興奮性神経細胞ならびに抑制性神経細胞の情報伝達は、各受容体に対する阻害薬を細胞外液に用いて薬理的に区別する。加えてドラベ症候群患者由来の iPS 細胞を用い、興奮性神経細胞ならびに GABA 作動性神経細胞へ分化させた培養細胞を用い (協力者提供) シナプス後電流を異なる培養日数で記録

して比較検討する。解析には、記録されるシナプス後電流の頻度、電流の大きさ、電気刺激により惹起されるシナプス後電流の大きさ、薬物投与により記録できる受容体を介した電流反応などを解析対象として用いる。

< 4 . 研究成果 >

海馬 CA3 錐体細胞では、興奮性情報伝達を抑制性神経の GABA 作動性神経が制御している。前述した各週齢のマウス脳スライス標本を用い、興奮性シナプス後電流ならびに抑制性シナプス後電流を記録した。シナプス後電流は、各週齢で記録可能であり、加齢と共にシナプス後電流の頻度と大きさは、増加傾向であることが確認できた。また、海馬歯状回細胞を電気刺激することにより、海馬 CA3 錐体細胞で記録される電流の大きさも、週齢が進むとともに大きくなることが確認できた。ただし、生後 3 日目の幼若期を使用した実験では、これらの電流を安定的に記録することはできなかった。これは、中枢神経回路網の形成が十分でないためと考えられる。幼若期の安定的なシナプス後細胞電流の記録には、さらに細かな実験条件の設定が必要であり、発達における神経回路形成のターニングポイントを見出すことが必要である。

海馬 CA3 錐体細胞に神経投射する海馬歯状回細胞に高頻度電気刺激を与え、海馬 CA3 錐体細胞よりシナプス後電流を記録した。生後 3 日目の幼若期マウスでは、テタヌス刺激に応じたシナプス後電流を、興奮性情報伝達ならびに抑制性情報伝達において安定的な記録ができなかった。これは前述と同じく、中枢神経の興奮性ならびに抑制性神経回路網が未だ十分に発達していないと考えられる。海馬 CA3 錐体細胞は、GABA 作動性神経系によりシナプス活性の制御を受けている。シナプス周辺部の環境変化が、細胞の興奮性を就職することは、我々も報告している (Il Jang et al., *J Neurophysiol.*, 2020)。GABA_A 受容体阻害薬存在下で海馬歯状回を電気刺激して惹起される電流は、阻害薬が無い状態と比較して大きくなった。この結果は、週齢が進むにつれて増大する傾向が認められている。一方、GABA_A 受容体阻害薬存在下における自発的な興奮性シナプス後電流は、その発生頻度ならびに電流の大きさ共に変化が認められなかった。これらに関しては、実験条件を変更して現在解析中である。

一方、ドラベ患者由来の iPS 細胞を用いた実験でもいくつかの結果が得られている。興奮性神経細胞に分化させた神経細胞では、コントロール細胞と比較して記録できるシナプス後電流は、その頻度と大きさが増加傾向にあった。一方、GABA 作動性神経細胞へ分化させた iPS 細胞は、記録できるシナプス後電流はコントロール細胞と比較してその頻度と大きさが減少傾向にあった。記録細胞の周辺部に存在する他の細胞を刺激して惹起される電流もまた減少傾向にあった。加えて周辺細胞を高頻度刺激することにより、放出される GABA の大きさを記録した。一方、GABA 作動性神経に分化させた細胞に GABA を外部より作用させることで得られる受容体電流は、コントロール細胞と比較して減少傾向にあった。これらを総合して考えると、GABA 作動性神経細胞へ分化させた細胞では、GABA 作動性神経終末部の変化より受容体の変化している可能性が考えられる。これらの解析には、異なる培養日数の細胞を用いた解析も幾つか行っているが、データ取得数が未だ少ない。これらは、iPS 細胞を使用した実験であり、実験の遂行には協力者の協力を得る事が不可欠である。昨今のコロナ禍の影響より、これらのデータ取得は十分に行えていない。今後も継続して解析を続けていき、本疾患における神経細胞間情報伝達の病態生理を明らかにしていく。

<参考文献>

1. A Alekov, M Rahman, N Mitrovic, F Lehmann-Horn, H Lerche. A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. *J Physiol.*, **529**, 533-539, 2000.
2. L Claes, J Del-Favero, B Ceulemans, L Lagae, C Van Broeckhoven, P De Jonghe. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet*, **68(6)**:1327-32, 2001.
3. I Ogiwara, H Miyamoto, N Morita, N Atapour, E Mazaki, I Inoue, T Takeuchi, S Itoharu, Y Yanagawa, K Obata, T Furuichi, T Hensch, K Yamakawa. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci.*, **27(22)**:5903-14, 2000.
4. S Han, C Tai, R Westenbroek, F Yu, C Cheah, G Potter, J Rubenstein, T Scheuer, H Iglesia, W Catterall. Autistic-like behaviour in Scn1a^{+/-} mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature*, **489(7416)**:385-90, 2012.
5. Il Jang, M Nakamura, H Kubota, M Noda, N Akaike. Extracellular pH modulation of excitatory synaptic transmission in hippocampal CA3 neurons. *J Neurophysiol.*, **123(6)**:2426-2436, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hisahiko Kubota, Hironori Akaike, Nobuharu Okamitsu, Il-Sung Jang, Kiku Nonaka, Naoki Kotani, Norio Akaike	4. 巻 157
2. 論文標題 Xenon Modulates the GABA and Glutamate Responses at Genuine Synaptic Levels in Rat Spinal Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research Bulletin	6. 最初と最後の頁 51-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainresbull.2020.01.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Il-Sung Jang, Michiko Nakamura, Hisahiko Kubota, Mami Noda, Norio Akaike	4. 巻 123
2. 論文標題 Extracellular pH modulation of excitatory synaptic transmission in hippocampal CA3 neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 2426-2436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jn.00013.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田中 泰圭 (Tanaka Yasuyoshi) (50714466)	福岡大学・医学部小児科・研究員 (37111)	
研究協力者	廣瀬 伸一 (Hirose Shinichi) (60248515)	福岡大学・医学部小児科・教授 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------