

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430070

研究課題名(和文) てんかん発作に及ぼすエストロゲンのHCNチャネルとGluR2制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of 17beta-estradiol on pilocarpine-induced epilepsy and the downregulation of hippocampal membrane GluR2 and HCN1 channel protein levels in ovariectomized mice

研究代表者

関 健二郎 (SEKI, Kenjiro)

奥羽大学・薬学部・講師

研究者番号：50342803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：月経随伴性てんかんの発症機序解明を目的に、てんかん発作に及ぼすエストロゲン(E2)のHCNチャネルとAMPA受容体GluR2制御機構について検討した。その結果、ピロカルピン誘導てんかん発作では、海馬細胞膜上のHCN1チャネルとGluR2サブユニットのタンパク量が低下することが分かった。さらにE2は、ピロカルピン投与によるGluR2のSer880のリン酸化上昇を阻害し、ピロカルピンによるてんかん重責発作の閾値を上昇させ、死亡率を低下させることが分かった。ところが、E2は重責発作の頻度を上昇させる作用も有していた。これはE2による神経活動の増加とh電流の阻害効果に起因している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Estrogen is thought to be a risk factor for catamenial epilepsy. E2 significantly increased seizure severity. In this study, we found that the E2 prolonged the latency to status epilepticus (SE) and reduced mortality. Pilocarpine-induced epilepsy reduced the protein level of the AMPA receptor GluR2 subunit at the plasma membrane. However, E2 suppressed this reduction in GluR2 and inhibited Ser880 phosphorylation during epilepsy. Next, we attempted to block GluR2-lacking AMPA receptors via intraventricular administration of 1-Naphthylacetyl spermine (Naspm) to mimic the effects of E2 treatment in freely moving mice. Treatment of Naspm after pilocarpine injection at 3 min, the latency to SE was increased and mortality was reduced. This timing of the effects of Naspm is consistent with the onset of the GluR2 phosphorylation. These results suggest that E2 promotes survival by inhibiting the GluR2 internalization.

研究分野：興奮性神経と抑制性神経のバランスの変化及びシナプス可塑性の変化と脳神経疾患

キーワード：シナプス可塑性 脳神経疾患 興奮性 - 抑制性神経バランス 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

女性てんかん患者の70%以上が経験する月経随伴性てんかんは、月経前のエストロゲン濃度上昇と発作のタイミングが相関する事から、エストロゲンが月経てんかん発作の危険因子と考えられてきた。その作用は細胞実験などにおいても支持されている一方、エストロゲンがてんかん発作後の神経細胞保護作用を有するという相反する効果も多く報告されている。そのため、予防法や治療法がいまだに確立されていないというのが現状である。

エストロゲンがてんかん発作の危険因子であることは多くの研究者によって支持され、多数の解説論文も出版されている。またエストロゲン興奮性増強効果は、脳切片標本や培養神経細胞実験でも多く報告されている。ところが、月経てんかん発作の予防や治療法の確立はいまだ困難であり、その背景として、月経てんかん発作の動物モデルの再現が困難なこと、エストロゲンがてんかん発作後の神経細胞保護効果を示し、その作用があまりに複雑であることが考えられる。しかもエストロゲンの神経細胞保護効果が多く確認されているにも関わらず、細胞内機序は全く解明されていない。唯一、抑制性神経活動を高める Neuropeptide Y の関与を示唆した結果だけである。このように、エストロゲンの効果に統一した見解が得られていない理由には、卵巣摘出時の麻酔の影響と長期間のエストロゲン枯渇がその理解を複雑にしている可能性が示唆されている。事実、多くの研究は、卵巣摘出動物を用いており、てんかん発作の悪化モデルが再現されていない。ところが非卵巣摘出動物ではエストロゲンによっててんかん発作が悪化するなどの結果が確認され、今後の実験法の見直しが必要とされている。

2. 研究の目的

申請者はこれまでの予備的実験から、マウス脳切片標本を用いた電気生理学的により海馬歯状回顆粒細胞のスパイク発火頻度がエストロゲンにより増大すること、さらに過分極通電によるh電流が、エストロゲンの投与により抑制されることを見出してきた。これはエストロゲンがHCN1チャンネルの効果を低下させ、てんかん発作を誘導する可能性が考えられる。またピロカルピン誘発性てんかん発作マウスの海馬では、細胞膜上のAMPA受容体GluR2サブユニットを減少させること、さらにエストロゲンがこのピロカルピンてんかんによるAMPA受容体GluR2サブユニットの減少を阻害する可能性を見出してきた。本研究はエストロゲンを利用して、てんかん発作閾値低下に関わる細胞内機序の解明と、てんかん発作後の神経保護効果の細胞内機序の解明を目標とし、月経てんかん発作を

め、全般性てんかんにも有効な予防法と治療法の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) ピロカルピン投与によるてんかん発作の誘導とその解析

4週齢のCD-1マウスを用い、卵巣非摘出および摘出マウスのピロカルピン(350 mg/kg, i.p.)によりてんかん発作を誘導した。

てんかん発作の症状をRacine scaleにしたがってステージ5に相当するけいれん発作を評価し、ステージ5発作が生じた回数及び持続時間で評価した。

(2) マウス海馬を搾取し、Plasma Membrane Extraction kit (BioVision, Inc., Mountain View, CA, USA)を用いて細胞膜画分を画分し、細胞膜上のタンパク量をウエスタンブロット法で測定した。

(3) 覚醒下マウスへの脳内薬物局所投与(脳室内投与を含む)

麻酔したマウスを脳定位固定装置に装着し、Paxinos mouse brain atlasを参考に目的の場所にガイドカニューレ(AG-4, Eicom, Kyoto, Japan)を歯科用セメント(GC UNIFAST II, Tokyo, Japan)で装着し、実験開始まではダミーカニューレ及びキャップナットを装着して保護した。

(4) マウス海馬採取と初代培養細胞と免疫染色

生後1~2日目の仔マウスから氷冷したHBSS内で海馬を搾取し、軟膜を取り除いた後にミンチし、PAPAINで分散し、Neurobasalを加えて懸濁した後にNeurobasal/2% B-27/5% Horse Serum/Glutamax-1/Penicillin+Streptomycinで培養した。1-2日後にHorse Serumを含まないNB(2% B-27, Glutamax-1, P/S)に培地を全量交換し、3日に1度培地の半量を交換した。

細胞外ドメインを認識するGluR2抗体を37℃で20分間処置し、続けてAlexa488で標識した二次抗体を処置した。その後、ピロカルピン投与した。その後、細胞をメタノールで固定し、4% PFAで固定再度固定し、Triton-X100で1分間処置した後、別のGluR2抗体を処置し、Alexa546で標識した二次抗体を処置した。

4. 研究成果

(1) 電気生理実験による予備的結果

マウス海馬切片標本を用い、海馬歯状回顆粒細胞から-60mVでカレントクランプし、スパイク発火を誘導した。膜抵抗及びスパイク発火頻度が安定したのち、20分間測定し、その後エストロゲン(17 β -Estradiol; E2, 10 μ M)を5分間処置すると、顕著にスパイク発火頻度が上昇した(図1)。さらに別の標本で、duration 500msの過分極通電を-50mVから-110mVになるように段階的に通電し、そ

の際に観察される h 電流を測定したところ、10 μ M E2 により h 電流が顕著に抑制されることを見出した。海馬歯状回顆粒細胞由来の h 電流は、HCN1 チャンネルを介して生じることが分かっており、E2 は HCN1 チャンネルの機能を抑制することが分かった (図 2)。

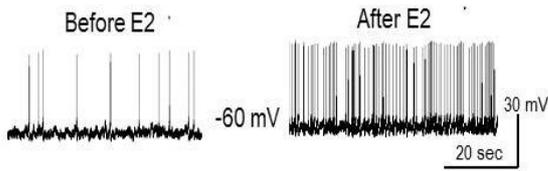


図 1 . E2 は、脳切片標本の興奮性神経のスパイク発火頻度を上昇させる

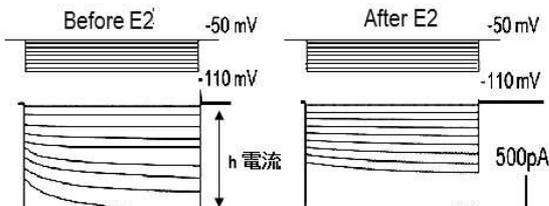


図 2 . E2 は、脳切片標本の過分極過電による h 電流を阻害する。

(2) ピロカルピン誘導てんかん発作後の海馬 HCN1 チャンネルのタンパク量測定

350mg/kg の E2 を腹腔投与し、卵巣摘出したマウスの HCN1 チャンネルの細胞膜上の発現量に及ぼす E2 の効果を検討した。その結果、ピロカルピン誘導てんかんにより総 HCN1 チャンネルタンパク量に影響を与えずに細胞膜上の HCN1 チャンネルタンパク量のみが顕著に減少した。また E2 を処置した卵巣摘出マウスの海馬細胞膜上の HCN1 チャンネルのタンパク量は、E2 非処置群と比べさらに減少することが分かった。

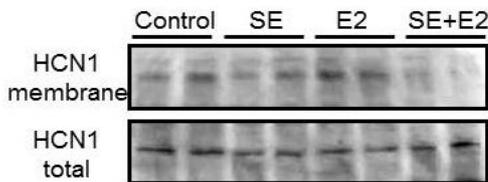


図 3 . ピロカルピンは、海馬細胞膜上の HCN1 チャンネルのタンパク量を減少させ、E2 は、さらに減少させる。

(3) ピロカルピン誘導てんかん発作後の海馬 GluR2 サブユニットのタンパク量測定

350mg/kg の E2 を腹腔投与し、卵巣摘出したマウスの GluR2 サブユニットの細胞膜上の発現量に及ぼすピロカルピン誘導てんかん発作の影響とそれに及ぼす E2 の効果を検討したところ、ピロカルピン誘導てんかん発作により GluR2 サブユニットの総タンパク量に影響を及ぼさずに細胞膜上の GluR2 サブユ

ットのタンパク量のみ減少させることが分かった (図 4 A, B)。これに対し、E2 処置群ではピロカルピン誘導てんかん発作による細胞膜上の GluR2 サブユニットのタンパク量減少を顕著に阻害した。一方、GluR1 サブユニットはピロカルピン誘導てんかん発作及び E2 処置の影響を受けなかった (図 4 A, C)。

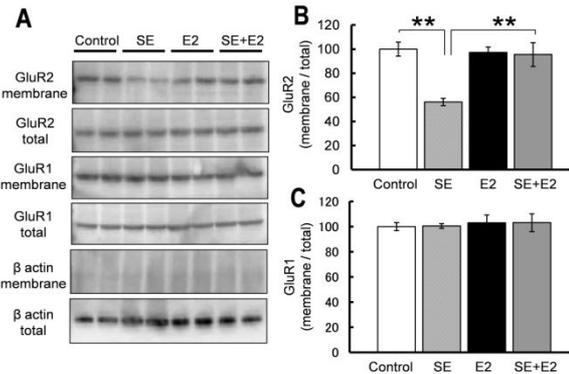


図 4 . ピロカルピンは海馬細胞膜上の GluR2 レベルを低下させるが、E2 はこれを阻害する。

(4) ピロカルピン誘導てんかん発作に及ぼす E2 の効果

350mg/kg の E2 を腹腔投与し、卵巣摘出したマウスのてんかん発作の閾値及びステージ 5 の発症頻度と持続時間を調べたところ、最初の異常 (涎や首振り動作など、図 5 A) やのステージ 5 のけいれん発症時間に影響を及ぼさなかった (図 5 B) が、ステージ 5 のけいれん重責発作が生じるまでの時間が顕著に延長し (図 5 C) さらに持続時間も延長した (図 5 D)。また重責発作による死亡率も顕著に減少した (図 5 F)。ところが、ステージ 5 の発作回数はむしろ E2 処置により増加することが分かった (図 5 E)。

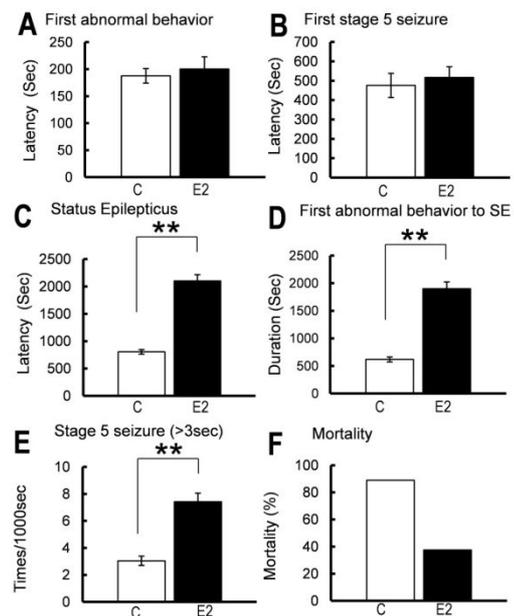


図 5 . E2 の前処置は、ピロカルピンによるてんかん重責発作までの時間を延長し、死亡率を低下させるが、重責発作の頻度を上昇させる。

(5) ピロカルピン誘導てんかん発作後の海馬 GABA-A 受容体のタンパク量測定

350mg/kg の E2 を腹腔投与し、卵巣摘出したマウスの GABA-A 受容体の細胞膜上の発現量に及ぼす E2 の効果を検討した。その結果、ピロカルピン誘導てんかんにより総 GABA-A 受容体タンパク量に影響を与えずに細胞膜上の GABA-A 受容体のタンパク量のみが顕著に減少した(図 6 A, B)。しかし E2 の処置は、卵巣摘出マウスの海馬細胞膜上の GABA-A 受容体のタンパク量やピロカルピン誘導てんかん発作に及ぼす細胞膜上の GABA-A 受容体発現量影響を及ぼさないことが分かった。この結果から、E2 は GABA-A 受容体の発現量を変化させて発作の閾値や発作の持続時間に影響を与えているわけではないことが示唆された。

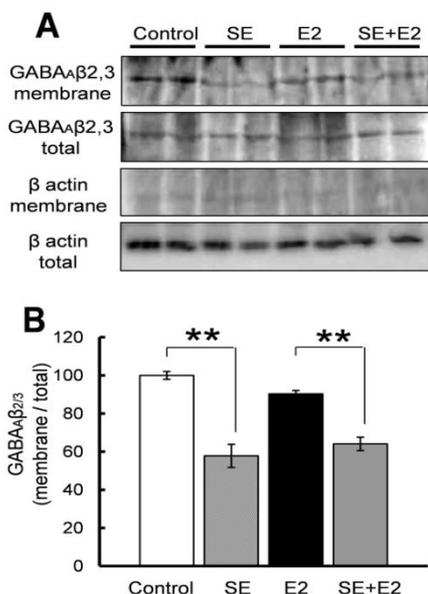


図 6 . E2 の前処置は、GABA-A 受容体の発現量に影響を及ぼさない。

(6) ピロカルピン処置による海馬初代神経細胞の細胞膜上および細胞内の GluR2 サブユニット発現量の変化と E2 処置による効果の検討

ピロカルピンてんかん発作による GluR2 サブユニット発現量の変化が、神経細胞に由来するものかどうかを検討するために、生後 1~2 日の仔マウス海馬初代神経細胞にピロカルピンを処置し、細胞膜上および細胞内の GluR2 サブユニット発現量の変化を測定し、それに E2 が影響を及ぼすかどうかを検討したところ、神経細胞膜上の GluR2 サブユニットの発現量がピロカルピンによって顕著に低下し、細胞内発現量が増加することが分かった(図 7 中段)。またあらかじめ E2 を処置した細胞では、ピロカルピンによる細胞膜上の GluR2 発現量の低下と細胞内 GluR2 発現量の増加が顕著に抑制された(図 7 下段)。こ

の結果から、ピロカルピンてんかんによる細胞膜上の GluR2 発現量の低下は神経細胞由来である可能性が示唆された。

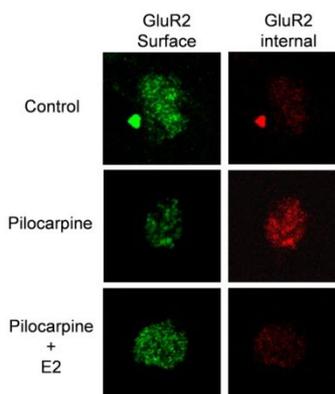


図 7 . E2 の前処置は、ピロカルピンによる初代海馬培養神経細胞上の GluR2 発現量低下を阻害する。

(7) ピロカルピン投与後のマウス海馬 GluR2 リン酸化レベルの経時変化の測定

てんかん発作を誘導する 350mg/kg の E2 を腹腔投与と 3 分、5 分、15 分、30 分後の海馬を摘出し、GluR2 サブユニットの細胞内ドメイン 880 番目のセリン (Ser880) のリン酸化レベルをウエスタンブロット法により検出を試みたところ、ピロカルピン投与により 3 分後には GluR2 の Ser880 のリン酸化レベルが上昇し、15 分後にはピークに到達し、30 分以上に渡り持続した(図 8 A, B)。一方、E2 処置群における GluR2 の Ser880 のリン酸化レベルは、ピロカルピン投与によりわずかに上昇する様子が観察されたが、E2 非処置群と比べると顕著に低かった(図 8 A, B)。GluR2 の Ser880 のリン酸化レベルの上昇は、GluR2 の細胞内トラフィッキングを誘導することが報告されていることから、ピロカルピンによる細胞膜上の GluR2 サブユニットの発現量の低下と E2 による発現量低下の抑制は、GluR2 サブユニットの細胞内トラフィッキングの誘導と抑制による可能性が示唆された。

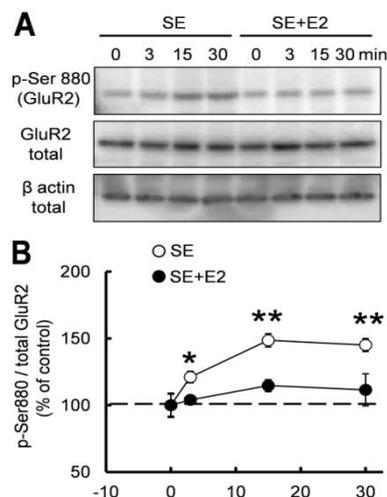


図 8 . E2 の前処置は、ピロカルピンによる GluR2 の Ser880 のリン酸化を顕著に阻害する。

(8) ピロカルピンてんかん発作に及ぼす GluR2 を有さない AMPA 受容体阻害薬 Naspm の脳室内投与の効果

ピロカルピンにより細胞膜上の GluR2 サブユニット発現量の低下は、ピロカルピン投与3分後に生じること、また E2 の前処置群では、ピロカルピン投与3分後のリン酸化レベルが既に抑制されていることから、GluR2 を有さない AMPA 受容体がピロカルピン誘導てんかんの重責発作の閾値や持続時間、さらにはステージ5の発作頻度や死亡率を高めている可能性が考えられる。一方、GluR2 を有さない AMPA 受容体の活性化の阻害が、E2 前処置と同様の効果を生導できるのではないかと考え、ピロカルピン投与3分後に GluR2 を有さない AMPA 受容体阻害薬 Naspm を脳室内に投与し、重責発作の頻度や持続時間、さらには死亡率に対する効果を検討した。

この実験で問題になるのは、海馬における GABA 作動性神経のうち、パルプアルブミン陽性細胞の AMPA 受容体には GluR2 を含まないため、GluR2 を有さない AMPA 受容体阻害薬 Naspm の投与は、パルプアルブミン陽性 GABA 神経細胞の活動を抑制し、興奮性を増加させる効果を生導することになる。そこで、ピロカルピン投与3分後の Naspm の効果と比較するために、ピロカルピン投与5分前に Naspm を脳室内投与し、パルプアルブミン陽性 GABA 神経細胞の活動を抑制した場合のピロカルピン誘導てんかん発作との違いを同時に検討した。その結果、事前に Naspm を投与したマウス群では、ピロカルピン投与後およそ2分で異常行動が生じることが分かった(図9A)。さらに事前に Naspm を投与したマウス群では、重責発作の頻度を有意に増加させ、死亡率は100%に達することが分かった(図9E, F)。この結果から、事前に Naspm を脳室内に投与すると、パルプアルブミン陽性 GABA 神経細胞の活動を抑制し、興奮性を増大したために、単にピロカルピンの効果を増大したものと考えられる。これに対し、ピロカルピン投与3分後に Naspm を投与したマウス群では、最初の重責発作までの時間を有に延長し、重責発作の持続時間も延長し、死亡率は顕著に低下した(図9C, F)。これは、ピロカルピン投与による重責発作の重症度を低下させ、死亡率が低下したためと考えられる。またピロカルピン投与3分後の Naspm の脳室内投与は、最初の異常行動から重責発作までの時間を延長していることが分かった(図9D)。これは E2 処置マウスのピロカルピンてんかん発作の結果と相関しており、ピロカルピン投与3分後の AMPA 受容体 Ser880 のリン酸化の時間とも相関することが分かった。以上の結果から、E2 による細胞膜上の AMPA 受容体 GluR2 サブユニットのタンパク量の減少は、ピロカルピンによる GluR2 細胞内トラフィッキングを阻害し、GluR2 を有さない AMPA 受容体の量を減少させ

てピロカルピンによる発作の重症度を軽減している可能性が示唆された。しかし、ピロカルピン投与3分後に投与した場合にもパルプアルブミン陽性 GABA 神経細胞の活動を抑制し、興奮性を増加させている可能性は十分考えられ、今後は興奮性神経細胞のみで GluR2 を有さない AMPA 受容体の関与を抽出して E2 の効果と比較する必要がある、これは今後の課題である。

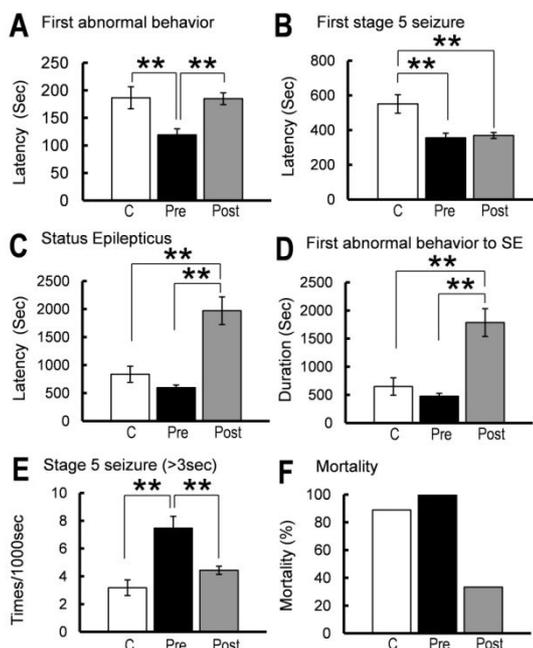


図9 GluR2 を持たない AMPA 受容体阻害剤である Naspm をピロカルピン投与3分後に投与すると、E2 前処置と同様に重責発作までの時間を延長し、死亡率を低下させる。しかし E2 と同様に重責発作の頻度を増加させる。

(9) 追試中の実験

エストロゲン投与群でてんかん発作を誘導したマウスでは、カルパイン(Calpain 1)のタンパク量が顕著に増加していることを見出した。この Calpain 1 は、PKA シグナル伝達系の下流に位置するタンパク質で、これが STEP のユビキチン化を誘導してその活性を阻害する事が報告されている。STEP は、GluR2 のチロシン残基の脱リン酸化を阻害し、GluR2 の細胞内トラフィッキングを阻害する可能性が報告されているため、エストロゲンによる GluR2 の細胞内トラフィッキング阻害効果とてんかん発作後の保護効果に關与している可能性が高い。そこで覚醒下のマウスの脳室内にカルパインを直接微量注入し、17- estradiol 処置後のピロカルピンてんかん発作の重責発作軽減作用や脳保護効果に及ぼカルパインの効果について検討した。またこのカルパイン投与群の STEP61 および STEP46 の発現量との関係を調べ、17- estradiol による GluR2 細胞内トラフィッキング阻害効果と重積発作軽減による保護効果に Calpain 1 や STEP61 および STEP46 が關

与しているかを中心に検討を行った。その結果、STEP61およびSTEP46の発現量は減少し、さらに脳室内にカルバインを投与したマウスでは 17- estradiol による重責発作の軽減作用や脳保護効果が阻害されことを見出した。この結果から、17- estradiol による GluR2 の internalization 阻害効果および重責発作軽減作用さらには脳保護効果は、カルバインの活性化と STEP61 による脱リン酸化の阻害が GluR2 の internalization を阻害している可能性が示唆された。しかし、このカルバインの効果や STEP61 による脱リン酸化の阻害効果が、E2 によるものかどうか明らかとなっていない上、十分な再現性の確認に至っていないのが現状である。また HCN1 チャネルに対する効果を検討しようと試みたが、カルバイン脳室内投与でも 17- estradiol による HCN1 チャネルの internalization 促進効果や発作閾値上昇効果に変化は認められなかった。17- estradiol による HCN1 チャネルの internalization 促進効果と発作閾値の低下がどのような機序を介して生じているかは期間内に同定するまでに至らなかった。

(10) 予想通りの結果が得られなかった実験

17- estradiol が PKC を介し、mTOR のリン酸化及び 70S6K のリン酸化を起こすこと、さらに同一サンプルで HCN1 チャネルの発現量が低下することが報告されている。そのため、本研究では E2 処置後のピロカルピンてんかん発作に mTOR のリン酸化及び 70S6K のリン酸化が関与しているかどうかを検討した。その結果、17- estradiol 投与群でも mTOR のリン酸化レベルに顕著な相違は認められなかった。また mTOR の阻害剤であるラパマイシンを脳質内に投与し、E2 処置したマウスのピロカルピンてんかん発作に対する影響を検討したところ、ラパマイシン脳室内投与による顕著な効果は確認できなかった。

(11) 予定していた実験が予想通りに進まなかった研究

慶應義塾大学医学部の神吉浩明助教(現佐賀県立好生館病院研究員)の協力を得て、マウス海馬由来の cDNA から HCN1 チャネルをクローニングした。これを pGW1 発現ベクターにサブクローニングして pGW1-cHCN1 を作成した。さらに HA オリゴを HCN1 チャネルの細胞外ループ(S3 と S4 の間; 231 と 232 アミノ酸の間)にサブクローニングし、HA-pGW1-cHCN1 の作成を試みた。このようにして作成したプラスミドを Calphos(リン酸カルシウム法)を用いて、初代海馬神経細胞にトランスフェクションし、HCN1 チャネルの過剰発現を試みたが、発現効率が異常に低く、ピロカルピンまたは E2 による細胞膜上の

HCN1 チャネル発現量の低下が神経細胞上で誘導されているか否かを検討するまでに至らなかった。今後は、発現ベクターを他社のものに切り替え、さらに HEK293 細胞などで発現するかを検討し、デザインしたコンストラクトに間違いが無いかどうかを検討する予定でいる。

抗 STEP61 抗体の脳室内投与による E2 前処置マウスのピロカルピンてんかん発作の誘導

STEP61 による脱リン酸化阻害による GluR2 の internalization 阻害効果が、E2 処置マウスのピロカルピンてんかん発作に及ぼす効果を検討するため、抗 STEP61 抗体を脳質内に投与し、ピロカルピン誘導てんかん発作に及ぼす E2 の効果を検討した。その結果、抗 STEP61 抗体の脳室内投与による顕著な効果は認められなかった。用いた抗 STEP61 抗体は、グリセロールによって溶解されているため、微量の脳室内投与に障害があった可能性もある。しかし、現在までのところでは抗 STEP61 抗体は購入した CST 社のものしか市販されていないため、再検討が難しいところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

Kenjiro Seki, Nobuaki Ohtake, Yuki Iitsuka, 17-estradiol promotes survival by inhibiting hippocampal GluR2 internalization following pilocarpine-induced epilepsy in mice. 第 87 回日本薬理学会、2014 年 3 月 21 日、仙台国際会議場(宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 健二郎(SEKI, Kenjiro)
奥羽大学・薬学部・薬理学分野・講師
研究者番号: 50342803