

平成 21年 5月 20日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 19700351
 研究課題名 (和文)
 視床-大脳皮質回路におけるてんかん発生メカニズム解明
 研究課題名 (英文)
 Clarification of epileptic mechanism in thalamocortical circuit
 研究代表者
 濱田 幸恵 (SACHIE HAMADA)
 京都大学・医学研究科・研究員
 研究者番号： 00399320

研究成果の概要：

本研究は神経疾患モデルマウスを用いて、てんかんの一種である欠伸発作（小発作てんかん）の発症機序を解析したものである。欠伸発作モデルマウスである **tottering** マウスにおいて視床刺激により誘発される AMPA 受容体電流および NMDA 受容体電流を大脳皮質第4層錐体細胞にて検討を行った。その結果、視床-大脳皮質投射シナプスにおける AMPA 受容体に対する NMDA 受容体の電流比において有意な増大が見られた。また、**tottering** マウスは野生型マウスと比較して NMDA 受容体電流の電位依存性が過分極側でわずかにシフトしていた。本研究により欠伸発作モデルマウスである **tottering** マウスにおいて NMDA 受容体電流がてんかん発作時に見られる過興奮に関与していることが示唆される。さらに、自発発火におけるシナプス入力を大脳皮質第4層抑制性細胞にて検討を行った。その結果、視床と大脳皮質の繋がった脳スライス標本では **tottering** マウスと野生型マウスで興奮性シナプス電流量および発生頻度に変化がなかった。しかし、視床と大脳皮質の繋がった脳スライス標本から視床を切り落としたスライス標本においては、**tottering** マウスは野生型マウスより興奮性シナプス電流量および発生頻度に優位な増大が認められた。この結果から **tottering** マウスは大脳皮質内のシナプス結合が多いことが示唆された。

よって、本研究から欠伸発作モデルマウスである **tottering** マウスにおける遺伝子変異は大脳皮質第4層 NMDA 受容体シナプス伝達および神経回路網形成の異常を引き起こしたと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療

1. 研究開始当初の背景
 てんかんは比較的罹患率の高い神経疾患で

ある。現在は大半が投薬により症状を抑えることが可能である。しかし、薬物によるコン

トロールが進んだ現在においても十分に症状を抑えられない患者が数多く存在する。また、眠気・ふらつきなどの薬剤による副作用に悩まされている患者も多い。これらの背景には、抗てんかん薬は経験的に使用されているが、それらの作用機序に関して不明な点が多いことが挙げられる。そのためてんかん薬の作用機序を特定することが必要である。抗てんかん薬の作用を特定する為には脳という回路の中でてんかんに見られる異常波がどのように発生されるか明らかにする必要がある。

これまで私は、てんかんの一種である欠伸発作(小発作てんかん)の発生メカニズム解明に取り組んできた。欠伸発作は発作時にみられる異常な脳波が大脳皮質全体で同期して観察されることから、原因として視床-大脳皮質ネットワークの異常であると考えてきた。しかし、詳細なシナプス伝達については明らかにされていなかった。そこで私は、欠伸発作のモデル動物である **tottering** マウスを用い、体性感覚野における視床-大脳皮質投射シナプスを検討した。その結果、視床刺激により大脳皮質 4 層錐体細胞に誘発される抑制性シナプス後電流 (IPSC) が顕著に減少していることを明らかにした (Sasaki et al., 2006)。

2. 研究の目的

本研究は欠伸発作の発症機序の解明を目的とし研究を行った。実験に用いた **tottering** マウスは、脳神経系の主要な電位依存性カルシウムチャネルの一つである $Ca_v2.1(P/Q)$ 型カルシウムチャネルの $\alpha_12.1$ サブユニット遺伝子に変異を持ち、小脳失調症に加え欠伸発作を示す。脳波的特長や抗てんかん薬に対する感受性の類似性から、**tottering** マウスの欠伸発作は、ヒトの欠伸発作のモデルとして研究に用いられてきた。これまで欠伸発作の病態メカニズムに関しては、視床と大脳皮質の連携の問題であると考えられている。しかし、シナプス伝達という観点から視床-大脳皮質連関の異常を積極的に探索した研究は報告されていない。そこで、本研究では以下の目的で実験を行った。

(1) 視床-大脳皮質投射シナプスにおいて興奮性シナプス電流として AMPA 受容体電流と NMDA 受容体電流が存在することが知られている。これまでの研究では **tottering** マウスにおいて視床刺激により大脳皮質 4 層錐体細胞に誘発され IPSC が顕著に減少していることを明らかにしたが、興奮性シナプス伝達について詳細な解析が出来ていない。そこで本研究では、視床を刺激して誘発される AMPA 受容体電流と NMDA 受容体電流につ

いて検討を行った。

(2) これまでは刺激により誘発されるシナプス電流について解析を行ってきた。しかし、自発発火状態で **tottering** マウスがどのようなシナプス入力を受けているのか疑問に残る。そこで、自発発火におけるシナプス電流を詳細に解析し、**tottering** マウスにおける神経回路網を明らかにしたい。

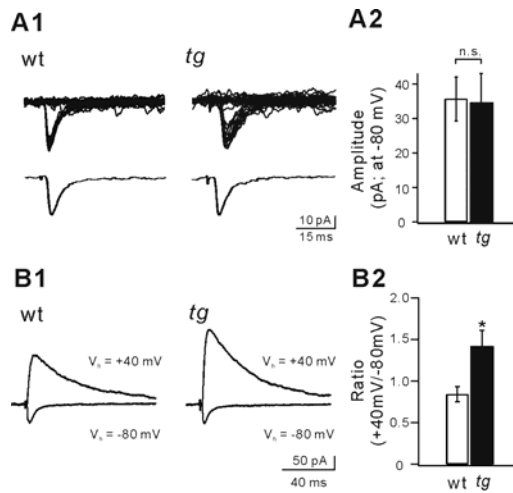
3. 研究の方法

(1) 本研究は視床と大脳皮質の結合が含まれる脳スライス標本を用いてスライスパッチクランプ法を用い実験を行った。欠伸発作モデルマウスである **tottering** マウスと野生型マウスを用い、視床刺激により誘発される AMPA 受容体電流および NMDA 受容体電流を大脳皮質第 4 層錐体細胞にて検討を行った。使用した **tottering** マウスが $Ca_v2.1(P/Q)$ 型カルシウムチャネルの $\alpha_12.1$ サブユニット遺伝子に変異をもつことを確認する為、ジェノタイプングを行い遺伝子チェックした。

(2) これまでは刺激により誘発されるシナプス電流について検討してきた。さらに、自発発火におけるシナプス入力を大脳皮質第 4 層抑制性細胞にて検討をいった。本実験では視床による自発発火電流の関与を調べるため、視床と大脳皮質の結合が含まれる脳スライス標本を作成後、視床を切り離したスライス標本を用いた研究を行った。

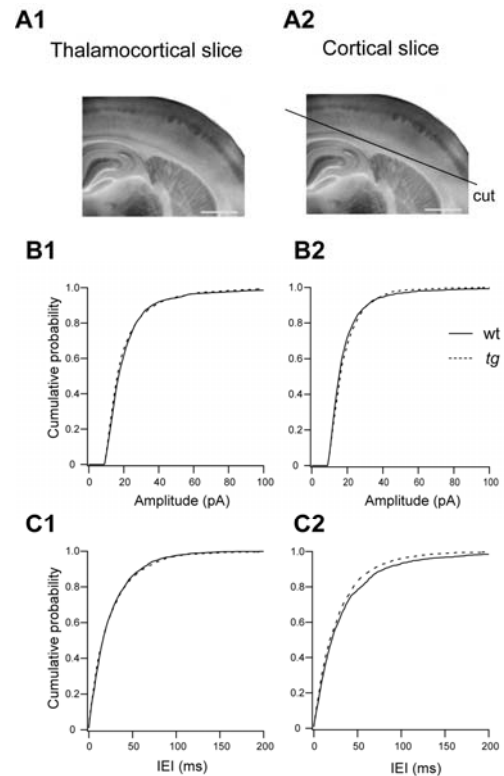
4. 研究成果

(1) 視床刺激して誘発される AMPA 受容体電流を大脳皮質 4 層錐体細胞で記録した。その結果、**tottering** マウスは野生型マウスと比較して AMPA 受容体電流に変化は認められなかった (図 1; A1,A2)。しかし、視床-大脳皮質投射シナプスにおける AMPA 受容体に対する NMDA 受容体の電流比において有意な増大が見られた (図 1; B1,B2)。さらに、**tottering** マウスは野生型マウスと比較して NMDA 受容体電流の電位依存性が過分極側でわずかにシフトしていた。本研究により欠伸発作モデルマウスである **tottering** マウスにおいて NMDA 受容体電流がてんかん発作時に見られる過興奮に関与していることが示唆される。



(図1) **A1,A2**; AMPA 電流の比較。 **A1**; すべてのトレース(上段)。平均したトレース(下段)。 **A2**;電流値の比較。 n.s.= not significant **B1**; $V_h = +40\text{mV}$; NMDA 電流。 $V_h = -80\text{mV}$; AMPA 電流。 **B2**; AMPA 電流に対する NMDA 電流の比較。 * $p < 0.05$
野生型マウス (wt) , tottering マウス (tg)

(2) 自発発火における興奮性シナプス入力を大脳皮質第4層抑制性細胞において検討を行った。その結果、視床と大脳皮質の繋がった脳スライス標本では tottering マウスと野生型マウスで興奮性シナプス電流量および発生頻度に変化がなかった(図2; B1,C1)。しかし、視床と大脳皮質の繋がった脳スライス標本から視床を切り落としたスライス標本においては、tottering マウスは野生型マウスより興奮性シナプス電流量および発生頻度に優位な増大が認められた (図2; B2,C2)。本研究から tottering マウスでは大脳皮質4層抑制性細胞へのシナプス結合が多いことが示唆された。抑制性細胞は情報の同期に関与すると考えられている。tottering マウスのような遺伝的変異により脳が同期的に動く回路が形成され、欠伸発作時に脳波で見られる全般性の異常波が引き起こされるのではないかと考えられる。



(図2) **A1~C1**; 視床と大脳皮質の繋がった脳スライス標本における電流量 (**B1**) と発生頻度 (**C1**)。 **A2~C2**; 視床を切り落としたスライス標本における電流量 (**B2**) と発生頻度 (**C2**)。

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)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 1件)

① 佐々木・濱田幸恵、井上剛、井本敬二、Ca チャネルミュータントマウスにおける経路依存的NMDA受容体電流の増加、神経科学学会、2007年9月12日(横浜)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 幸恵（ SACHIE HAMADA ）
京都大学・医学研究科・研究員
研究者番号：00399320

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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)

[雑誌論文] (計10件)

- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

[学会発表] (計5件)

- ①
- ②
- ③

[図書] (計2件)

- ①
- ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：