

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591372

研究課題名(和文)：てんかんの海馬興奮系増強効果を支えるレドックス制御分子群の網羅的発現・機能解析

研究課題名(英文)：Hippocampal Gene expression analysis related with redox regulation in excitatory synaptic circuit of epileptogenesis

研究代表者

植田 勇人(UEDA YUTO)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：70244192

研究成果の概要(和文)：PTZ キンドリング完成後には GTRAP3-18 発現低下が長期間にわたり持続し、GTRAP3-18 ノックダウン操作でも、けいれん閾値の低下とキンドリングの早期完成を見たことから、GTRAP3-18 の低下は proconvulsant として作用するものと考えられた。てんかんモデルである“キンドリング”完成とそのけいれん準備状態維持並びに、てんかんにおける発作間歇期の存在と自発けいれんの突発性出現を同時に説明するには、グルタミン酸神経の機能昂進に加えて、その同期発射を保証し発作停止を可能にする GABA 抑制系昂進を内包する均衡崩壊が不可欠であると考察した。

研究成果の概要(英文)：As well known the knockdown EAAC-1 by anti-sense induces epileptic convulsion in rats, EAAC-1 is important protein to connect glutamate re-uptake with GABA synthesis. It is important study to elucidate the role of glutamate transporter associated protein 3-18 (GTRAP3-18), because GTRAP3-18 inhibitory regulates the glutamate re-uptake through EAAC-1 into GABAergic neurons. Hippocampal glutamate and GABA basal release in GTRAP3-18 knockdown group higher rather than those of sense-injected group suggested knockdown of GTRAP3-18 promotes GABA synthesis. Sustenance of high seizure susceptibility in the PTZ kindled state and the existence of inter-paroxysmal period could be explained by synchronization of glutamatergic neuron caused by the enhanced GABAergic system.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：てんかん、グルタミン酸、GABA、トランスポーター、レドックス制御、チオレドキシ

1. 研究開始当初の背景

レドックスは、生体内で発生する活性酸素種やフリーラジカルなどの酸化ストレスと、

アスコルビン酸・トコフェロール・グルタチオンなどによる抗酸化能力との均衡バラン

すで規定されるシナプス環境である。酸化ストレスはこのレドックス状態に影響を及ぼし様々な神経疾患発症に関与している。てんかん性病態の基本的な病態特徴は興奮系シナプス伝達効率が增強され、かつその効果が長期に持続されていることである。とくに海馬においてその電気生理学的所見は顕著に観察される。この海馬興奮系シナプス伝達効率にはグルタミン酸トランスポーターや初期転写因子 AP-1 やアポトーシス関連蛋白 NFkB, ASK など細胞内シグナル伝達分子ファミリーが関与している。興味深いことに、これら分子群の構成アミノ酸の特徴として、いずれもシステイン残基を有したレドックス感受性を有していることが共通点として挙げられる。故にてんかん性病態における酸化ストレスの履歴やレドックス変化はこれらの分子ファミリーの機能を修飾し、海馬興奮系の長期維持や海馬組織変性に大きな影響力をもつ。従来、申請者はグルタミン酸受容体の活性化とその下流での細胞外レドックス状態の解析を行い、てんかんモデルの海馬レドックス状態は顕著な酸化状態へ崩壊していることを *in vivo* で明らかにしてきた。これら従来の研究成果を発展させるためには、細胞外のみならず細胞内レドックス感受性分子の解析をも付加して、海馬興奮系の長期維持機構の解明に取り組む必要性が出てきた。そこでキンドリングモデルでてんかん性病態が固定される過程の中で、細胞内・外レドックス感受性分子ファミリーの関与を明らかにし、かつ海馬興奮系シナプス伝達の増強・維持メカニズムを解明することが本申請の研究目的と全体構想として研究を進める。

2. 研究の目的

てんかん性病態の生化学的解釈としては興奮系を代表するグルタミン酸(Glu)作動

性神経の機能増強と抑制系を代表する GABA 作動性神経の機能崩壊に起因する不均衡仮説が現在も強く指示されている。この仮説では、グリア型グルタミン酸トランスポーター-GLAST, GLT-1 の機能低下によりグルタミン酸の細胞興奮毒性が亢進し興奮系の増強が生じる一方で、GABA 合成能の低下により抑制系の崩壊が生じ電気生理学的な均衡バランスが保持されず、てんかん発作が生じると説明されている (Meldrum, *Epilepsy Res.*, 2000)。

従来これら興奮系と抑制系の基礎研究は個別に進行しており、両機能間の相互作用に着目した研究は見られなかったが、近年ニューロン型のグルタミン酸トランスポーターである EAAC-1 は GABA 上にも分布していることが判明し、その結果 GABA ニューロンは EAAC-1 経路で細胞内に取り込んだグルタミン酸を基質として GABA を再合成していることが明らかにされ、EAAC-1 は興奮系機能ばかりではなく GABA 抑制系機能をも修飾する重要な輸送蛋白として注目されるにいたった。この EAAC-1 経路の GABA 合成系の存在は、今までに知られていなかった興奮系と抑制系間の機能的相互作用の介在を指摘するものであり、興奮系と抑制系が各々独立しててんかん性病態に関与していたとする従来の不均衡仮説を改めて見直す必要性を提示しているものであり、速やかに解明すべき課題である。EAAC-1 は、グルタミン酸トランスポーター発現調整因子である GTRAP3-18 によって抑制的に発現が制御されているため、EAAC-1 による GABA 合成能修飾機序の全貌を解明するためには、GTRAP3-18 に支点を置いた実験系を組み立てる必要がある。そこで本申請では GTRAP ノックダウンを行ったラットに対しキンドリング操作を行いけいれん準備状態の獲得

過程を観察することで、GTRAP3-18の興奮系と抑制系間に対する電気生理学的影響を考察する。またこの影響がどのような分子生物学的背景にて生じているのかを調べるために、GLAST, GLT-1, EAAC-1, Glu受容体などの海馬興奮系制御蛋白やGABAトランスポーター、GABA-A, B受容体、GABA分解酵素(GABA-T)、GABA合成酵素(GAD)など抑制系制御蛋白の発現変化を明らかにする。さらに、測定系全体をオンライン化したマイクロダイヤリース法と高時間分解能を誇る測定系をもちいてグルタミン酸並びにGABAトランスポーターとGABA合成能に関する機能的修飾性をも生化学的に検討する。これら一連のデータを基にして興奮系・抑制系の機能的相互関連とグルタミン酸輸送蛋白によるGABA合成能修飾機序を明らかにする。

興奮系と抑制系の基礎研究は従来、個別に進行したため、両機能の相互作用に着目した研究は見られなかった。当該申請研究の学術的特色はグルタミン酸神経伝達を終焉させるEAATsとGABA合成能の機能的相互関連性に着目した点にあり、Glu-GABA不均衡仮説を新たな視点から眺め直す斬新性を内包している。また従来の科研費で申請者らが明確化し国外雑誌に発表してきたEAATs発現低下とGluの過剰放出(J. Neurochem, 2001)などの考察に加えて、グルタミン酸トランスポーターとGABA抑制系の相互作用が明らかにされることで、てんかん性病態を包括的に考察していくことが可能になる。GTRAP3-18ノックダウン操作によって、EAAC-1発現が増加、その帰結としてGABA合成能が増大し抑制系が強化されるならば、キンドリング発展は抑制されると予測される。このような電気生理学的検証と分子生物学的検証が行われることで、興奮系と抑制系間に介在する機能的相互作

用がさらに明確にされ、基礎てんかん・臨床てんかん学に重要な情報を提供する。またてんかん性病態ばかりでなくGluの細胞興奮毒性に由来する脳虚血・低酸素脳症・筋萎縮性側索硬化症などにも新たな研究視点を提供する。

上記にも指摘したように、Glu作動性の興奮系とGABA作動性の抑制系の機能的相互作用を検討した研究は少なかったが、ニューロン型EAAC-1のノックダウンがGABA合成能を減弱させ、けいれんを誘発するという現象がRothstein, J. らによってScienceなど権威ある雑誌に発表されて以来、EAATsによって再取り込みされたGluから再合成されるGABAに注目が集まるようになった。さらにEAAC-1は、GTRAP3-18により抑制的に制御されている(Lin, C., Nature, 2001)ことから、グルタミン酸-GABA系間には存在する強力な機能的相互作用の介在が予測されているが、GABA合成能やてんかん性病態に対するGTRAP3-18の直接的な実験検証は未だ存在しない。

我々は、GTRAP3-18に修飾されるEAAC1制御性GABA機能について遡ること2年間〔平成18年・19年〕研究を行ってきた。

これらの蛋白はレドックス感受性であり、続いててんかんにおけるレドックス感受性蛋白に関する機能を評価する必要性が出てきた。

3. 研究の方法

【3-1】てんかん性病態における細胞外レドックス状態の検証(分担-植田)：てんかん性病態は本申請ではベンチレンテトラゾール(PTZ)35mg/kgをラットに週3回投与することで完成するキンドリングモデルを用いる。申請者は既に同キンドリングモデルの海馬内に長期持続性の興奮性シナプス伝達が固定されることを報告している(Ueda, Y. Epilepsia 2007)。酸化ストレスによってて

んかん性病態が悪化、トコフェロールやメラトニンなどの還元剤投与によって軽快することはある程度解明されているが、in vivo 状態でのてんかん性病態におけるレドックス状態の解明は遅れている。そこで従来我々が独自に開発したマイクロダイアリーシス—電子スピン共鳴法 (Dialysis-ESR 法: 計画欄の図 1 参照) により無麻酔・自由行動条件下で PTZ 投与時期 (発作時期) と発作間歇期に分けて海馬レドックス解析を行う。血液脳関門 (BBB) 通過性ニトロキシドラジカル (0.2M PCAM, 0.677mmol/kg) をラットに腹腔内投与し、ESR シグナル減衰を追跡、その半減期を個々のラットで算出していく。半減期は脳内抗酸化能を反映しており、半減期の延長は抗酸化能の減弱を示唆する (Ueda, et al.: Mag. Res. Med. 1998)。この原理を利用して脳内レドックス状態を評価する。

【3-2】脳内レドックス状態の変化に伴う PTZ キンドリングの変化と細胞外アミノ酸の定量

細胞内外におけるレドックス感受性分子はシステイン残基によって周囲のレドックス状態を感知、その構造がジスルフィド結合を呈することで機能修飾が行われる。そこでシステイン残基に対する特異的な酸化剤 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) と還元剤 dithiothreitol (DTT) の脳室内投与を浸透圧ミニポンプで行い PTZ キンドリングを行う。

【3-3】脳内レドックス状態の変化に伴う分子群の発現変化

興奮系シナプス伝達の終焉に関与するグルタミン酸トランスポーター (GLAST, GLT-1, EAAC-1) や初期転写因子 AP-1 やアポトーシス関連蛋白である NFκB と ASK 並びに細胞保護や転写修飾を有するチオレドキシシン (TRX) はいずれもシステイン残基を有したレ

ドックス感受性分子で、てんかん性病態の固定や維持、組織変性や生理学的なけいれん発作の開始・拡張・終焉に大きな影響力をもつ分子群である。H20 年度にひきつづき脳内レドックス状態の変化に伴うこれら 7 個の分子の発現変化について解析する。

【3-4】PTZ キンドリング完成後におけるレドックス感受性分子の発現変化

てんかん性病態獲得に伴う mRNA と蛋白変化を検証する。そこでキンドリングモデルが完成したラット海馬を摘出、GLAST, GLT-1, EAAC-1, AP-1, NFκB, ASK, TRX の 7 分子の発現につき【2-】と同じ方法にて解析を行う。

【3-5】キンドリングモデル完成後の DNA array 法による網羅的な解析

キンドリング完成モデルを用いて細胞内外のレドックス感受性分子ファミリーの海馬での発現状況を DNA array 法 (AFFYMETRIX 社製の Rat Genome 230 2.0 Array) により GLAST, GLT-1, EAAC-1, AP-1, NFκB, ASK, TRX の 7 分子以外の分子についても網羅的な発現解析を行う。【3-6】レドックス感受性分子ファミリーのノックダウン (分担-植田): グリア分布 GLAST, GLT1, ニューロン分布 EAAC-1、グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体)、AP-1, NFκB, ASK, TRX は既報のレドックス感受性分子でてんかん性病態を大きく左右する分子群である。まずこれらの脳室内へのアンチセンス注入でのノックダウンを行ってキンドリング進展を観察し、個々のレドックス感受性分子のてんかん性病態獲得に対する役割を明確にしていく。

【3-7】DNA array 法と後続するリアルタイム PCR 法によって新規に発見されるてんかん性病態で発現が変化するレドックス感受性分子のノックダウンを行い、キンドリング進展を観察する。

4. 研究成果

PTZキンドリング完成後のけいれん準備性長期維持には、グルタミン酸作動性神経を主体とするてんかん性回路の強化とその同期発射システムが必要である。グルタミン酸代謝昂進を示唆するNMDA型グルタミン酸受容体やグルタミン酸トランスポーターの発現昂進などが、海馬を中心とした神経細胞死と再生・再構築を同時に促進し、てんかん性回路形成の基本的な分子基盤を形成すると考察した。一方GABA抑制系に関しては、キンドリングモデルやてんかん患者死後脳を用いた研究で、GABA神経の脱落が極めて少ないことを示唆する報告から[1][2,3]、てんかん原性獲得後のGABA抑制系は比較的温存されたと考えられている。またPTZキンドリングに伴うマイクロダイアリースによるアミノ酸研究でも、本研究同様にグルタミン酸・GABAともに上昇する傾向が報告されている[4]。本研究結果であるキンドリング慢性期のGTRAP3-18発現低下はEAAC1経由のGABA合成亢進を通じ、発作形成に向けて強化されたグルタミン酸神経系ネットワークの同期発射を促す分子機構であると推測した。

GTRAP3-18 アンチセンス実験によるキンドリング形成の促進はEAAC1の機能上昇によりGABA合成が促された結果、同期発射しやすいシナプス環境がキンドリング形成に促進的に関与したと考察した。キンドリング慢性期のGlu-R1発現上昇やCa⁺⁺流入を抑制制御するGlu-R2の発現低下なども、キンドリング完成後のグルタミン酸作動性神経回路の易刺激性や興奮状態に係わる背景分子機構と考えられた。鉄塩外傷性てんかんモデルやカイン酸てんかんモデルの慢性期でグルタミン酸トランスポーター低下が見いだされ(従来の研究成果)、キンドリングでは観察されないことから、グルタミン酸トランスポー

ーの低下に伴うグルタミン酸の細胞興奮毒性の亢進やGTRAP3-18・GABAトランスポーター発現低下などの膜蛋白発現変化が、自発性けいれんに結びつくと推測された。

PTZキンドリング完成後にはGTRAP3-18発現低下が長期間にわたり持続し、GTRAP3-18ノックダウン操作でも、けいれん閾値の低下とキンドリングの早期完成を見たことから、GTRAP3-18の低下はproconvulsantとして作用するものと考えられた。ノックダウン群では、海馬グルタミン酸・GABA濃度の基礎値上昇がマイクロダイアリースによって観察された。これらの結果は、EAAC-1経由のグルタミン酸再取り込みが昂進され、GABA合成能が促進された帰結である。てんかんモデルである“キンドリング”完成とそのけいれん準備状態維持並びに、てんかんにおける発作間歇期の存在と自発けいれんの突発性出現を同時に説明するには、グルタミン酸神経の機能昂進に加えて、その同期発射を保証し発作停止を可能にするGABA抑制系昂進を内包する均衡崩壊が不可欠であると考察した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Ueda, Y., 2007. Redox regulation and anti-convulsive effect of zonisamide. Redox and ZNS. 1, 1-3.
2. Ueda, Y., 2008. Redox and neuroprotection. J Brain Science. 34, 1-5.
3. Ueda, Y., Doi, T., Takaki, M., Nagatomo, K., Nakajima, A., Willmore, L.J., 2009. Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: in vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. Brain Res. 1266, 1-7.

[学会発表](計7件)

国際学会

1. Chihara, Y., Ueda, Y., Doi, T., Willmore, L.J., 2009. Differential latency between glutamate and GABA release with seizures induced by NMDA.

- In: 63th American Epilepsy Society's Annual Meeting.
Boston.December.4-8.2009.
2. Doi, T., Ueda, Y., Chihara, Y., Willmore, L.J., 2009. Differential molecular regulation of glutamate in kindling resistant rats. In: 63th American Epilepsy Society's Annual Meeting. Boston.December.4-8.2009.
 3. Nakajima, A., Masuda, Y., Matsuda, E., Ueda, Y., Sameshima, H., Ikenoue, T., 2010a. Affect of dissolved oxygen on the reduction of nitroxide by vitamin C :In vitro model for acute ischemia. In: APES2010. Jeju, Korea.October.10-14.2010.
 4. Nakajima, N., Masuda, Y., Matsuda, E., Ueda, Y., Samejima, H., Ikenoue, T., 2010b. Affect of dissolved oxygen on the reduction of nitroxide by vitamin C :In vitro model for acute ischemia. In: APES2010. Jeju.October.10-14.2010.
 5. Ueda, Y., Doi, T., Chihara, Y., Nakajima, A., Willmore, L.J., 2009. Down-regulated anti-oxidant ability and seizure sensitivity of mature rats after neonatal hypoxic-ischemic brain injury In: 63th American Epilepsy Society's Annual Meeting. Boston.December.4-8.2009.
 6. Ueda, Y., Kojima, T., Oikawa, T., 2010a. Gene network analysis the effects of coral calcium hydride treatment to senescence accelerated mice. In: The 14th International Congress of Immunology Kobe.August.22-27.2010
 7. Ueda, Y., Sato, A., Kitamoto, A., Adati, N., Oikawa, T., Kojima, T., 2010b. Hippocampal gene network analysis to determine the effects of antioxidant treatment in an experimental model of accelerated senescence In: Inflammation 2010. Luxembourg.November.18.2010

[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 :
国内技の別 :

[その他]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

植田 勇人 (UEDA YUTO)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号 : 70244192

(2)研究分担者

土井 拓 (DOI TAKU)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号 : 70274793

中島 暉 (NAKAJIMA AKIRA)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号 : 10041857

(3)連携研究者