

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15278

研究課題名（和文）Phf24に着目した新規てんかん病態メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of a novel pathological mechanism of epilepsy focusing on Phf24

研究代表者

國澤 直史（Kunisawa, Naofumi）

大阪医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10858096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：Phf24（G_i-interacting protein, GINIP）の中樞神経系における機能とてんかんの発症における役割を明らかにする目的で、Phf24欠損ラットを用いて、行動薬理的評価、神経化学的評価、発作時脳波解析を行った。その結果、Phf24の欠損により、けいれん発作閾値が低下すること、大脳皮質、海馬、扁桃核、視床領域における神経興奮が亢進すること、神経伝達物質（グルタミン酸、GABA）の遊離機能が亢進することなどが明らかとなった。本研究結果より、Phf24はてんかん発作の発症を抑制的に制御していると推察され、てんかん治療の新たな標的分子として有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Phf24が神経興奮制御や神経伝達物質の遊離調節機能を有していることが明らかとなり、また、Phf24の欠損によってけいれん感受性が高まることから、Phf24の機能異常がてんかんの発症に深く関与していることが示唆された。てんかんは、患者の約30%が難治性であることや、根本的治療法が未だ存在しないことなどから、新たな作用機序を有する治療薬の開発が切望されている。本研究結果は、てんかん治療の新規標的分子としてPhf24が有用である可能性を示すものであり、その社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To clarify the function of Phf24 (G_i-interacting protein, GINIP) in the central nervous system and its role in the development of epilepsy, we performed behavioral evaluation, neurochemical studies, and wide-band EEG analysis using Phf24-knockout (KO) rats. As a result, Phf24-KO rats showed a lower seizure threshold, increased neuronal excitability in the cerebral cortex, hippocampus, amygdala, and thalamus, and enhanced release of neurotransmitters (glutamate and GABA). These results suggest that Phf24 negatively regulates the development of epileptic seizures, and are useful as a new target molecule for epilepsy treatment.

研究分野：薬理学

キーワード：てんかん Phf24 Gタンパク質共役型受容体 GABAB受容体 代謝型グルタミン酸受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Phf24 (Gai-interacting protein, GINIP) は、G タンパク共役型受容体 (GPCR) と共役する 3 量体 Gi タンパク質の α サブユニットと特異的に相互作用する機能タンパク質であり、 $G_{i/o}$ 共役型 GPCR の機能制御に寄与している。Phf24 の中枢神経系における役割は不明であったが、近年、てんかんモデル動物 Noda epileptic rat (NER) のけいれん発作発現に Phf24 の脳内発現低下が深く関与していることが報告された (Behav. Genet., 47, 609-619, 2017)。このことから、てんかんの発症に Phf24 が重要な役割を果たしていると考えられたが、その詳細な機能メカニズムについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では Phf24 欠損ラットのけいれん感受性や神経興奮性、神経伝達物質の遊離機能を行動薬理学的手法や神経化学的手法を用いて解析することにより、てんかん発症における Phf24 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1) Phf24 欠損ラットのけいれん感受性評価および脳内過剰興奮部位の探索

Phf24 欠損ラットと F344 (対照) ラットの耳介から電撃刺激 (Current : 27-35 mA、Frequency : 200 pulses/sec、Pulse width : 0.5 msec、Shock duration : 1 sec) を行い、誘発されるけいれん発作の感受性をした。また、電撃刺激から 2 時間後に摘出した脳を用いて神経興奮マーカーである Fos タンパク質の発現を免疫組織染色法により解析し、けいれん発作時の脳内興奮部位を両動物で比較した。

2) 発作性脳波形成における Phf24 の機能解析

Phf24 欠損ラットおよび F344 ラットの大脳皮質 (前頭葉硬膜下) 海馬、扁桃体に白金電極を慢性的に留置し、ペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発けいれん発現時の広域周波数脳波 (Wide-band EEG) 解析を行った。Wide-band EEG 解析では、PTZ により誘発される発作波持続時間の計測と、てんかん原性領域のマーカーとして注目されている高周波数成分 (80 ~ 500 Hz) の発現解析を行った。

3) Phf24 欠損による神経伝達物質遊離機能変化の解析

In vivo microdialysis 法を用いて、脱分極刺激による興奮性神経伝達物質グルタミン酸および抑制性神経伝達物質 GABA の遊離量を Phf24 欠損ラットと F344 ラットで比較した。さらに、 $G_{i/o}$ タンパク質共役型受容体であり、シナプス前終末において神経伝達物質の遊離を制御している $GABA_B$ 受容体、グループ II 型代謝型グルタミン酸 (mGlu) 受容体に着目し、それらの作動薬 ($GABA_B$ 受容体作動薬: バクロフェン、グループ II 型 mGlu 受容体作動薬: LY-379268) が Phf24 欠損ラットのグルタミン酸遊離および GABA 遊離に及ぼす影響を評価した。

4) PTZ 誘発けいれんに対する $G_{i/o}$ 共役型 GPCR 作動薬の作用評価

Phf24 欠損ラットと F344 ラットを用い、PTZ により誘発されるけいれん発作の強度および持続時間に対する $GABA_B$ 受容体作動薬バクロフェン (1, 3 mg/kg, i.p.) グループ II 型 mGlu 受容体作動薬 LY-379268 (0.3, 1 mg/kg, i.p.) の影響を評価した。

4. 研究成果

1) Phf24 欠損ラットのけいれん感受性評価および脳内原因部位の探索

Phf24 欠損ラットと F344 ラットの電撃けいれんに対する感受性を評価した。その結果、Phf24 欠損ラットでは 31 mA の電撃刺激によって 25%、35 mA の電撃刺激によって 75% の動物でけいれん発作が認められたが、F344 ラットでは 27-35 mA のいずれの電撃刺激によってもけいれん発作を呈した動物はいなかった。このことから、Phf24 の欠損により電撃けいれん感受性が亢進することが明らかになった。

また、35 mA の電撃刺激を与えた動物から摘出した脳を用いて、神経興奮マーカーである Fos タンパク質の発現を解析した結果、Phf24 欠損ラットでは、F344 ラットと比較して、大脳皮質、海馬、扁桃体、視床領域の Fos 陽性細胞数が有意に増加していた。

以上の結果から、Phf24 は大脳皮質、海馬、扁桃体、視床領域において神経興奮制御を担っており、けいれん発現を調節していると考えられた。

2) 発作性脳波形成における Phf24 の機能解析

PTZ 誘発けいれん発現時の大脳皮質、海馬、扁桃体における発作時脳波を解析した結果、F344 ラットと比較して Phf24 欠損ラットでは、いずれの部位においても発作持続時間が有意に長かった。また、高周波数成分の解析から、Phf24 欠損ラットでは fast ripple (200-500 Hz) が発作初期に集中して発現することが明らかとなった。

このことから、上記 1) の結果と一致して、Phf24 欠損ラットのけいれん感受性亢進には、大脳皮質、海馬、扁桃体の神経過剰興奮が関与していることが示唆された。

3) Phf24 欠損による神経伝達物質遊離機能変化の解析

Phf24 欠損ラットと F344 ラットの扁桃体における興奮性神経伝達物質グルタミン酸、抑制性神経伝達物質 GABA の遊離機能を評価した結果、F344 ラットと比較して、Phf24 欠損ラットでは脱分極刺激によるグルタミン酸および GABA 遊離が有意に亢進していた。また、脱分極刺激時のグルタミン酸遊離に対する GABA 遊離 (GABA/グルタミン酸) は、Phf24 欠損ラットで有意に低下しており、興奮/抑制バランスが興奮性に傾くことが示唆された。

さらに、Phf24 欠損ラットのグルタミン酸および GABA 遊離機能亢進に対する GABA_B 受容体作動薬バクロフェン、グループ II 型 mGlu 受容体作動薬 LY-379268 の影響を評価した結果、いずれの作動薬も、Phf24 欠損ラットにおける脱分極刺激時のグルタミン酸遊離および GABA 遊離を F344 ラットと同程度まで抑制した。

したがって、Phf24 欠損ラットにおけるグルタミン酸および GABA 遊離亢進には、シナプス終末の GABA_B 受容体やグループ II 型 mGlu 受容体の機能低下が関与していることが示唆された。

4) PTZ 誘発けいれんに対する G_{i/o} 共役型 GPCR 作動薬の作用評価

PTZ 誘発けいれんに対する GABA_B 受容体作動薬バクロフェン、グループ II 型 mGlu 受容体作動薬 LY-379268 の影響を評価した。LY-379268 は、0.3 mg/kg (i.p.) 投与によって F344 ラットの PTZ 誘発けいれん発作を抑制し、また、より高用量の 1 mg/kg (i.p.) 投与によって Phf24 欠損ラットのけいれん発現を有意に抑制した。一方、バクロフェンは、Phf24 欠損ラット、F344 ラットのどちらにおいても PTZ 誘発けいれんに対する影響を示さなかった。

以上の結果より、Phf24 欠損ラットのけいれん感受性亢進には主にグループ II 型 mGlu 受容体の機能低下が関与していることが示唆された。

本研究成果より、Phf24 が神経興奮制御や神経伝達機能の遊離調節を担っていることが明らかになり、Phf24 ならびにグループ II 型 mGlu 受容体をはじめとする各種 G_{i/o} 共役型 GPCR がてんかん治療の新たな標的分子として有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Kato Masaki, Kunisawa Naofumi, Shimizu Saki, Iha Higor A., Ohno Yukihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanisms Underlying Dopaminergic Regulation of Nicotine-Induced Kinetic Tremor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 938175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2022.938175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Yukihiro, Kunisawa Naofumi, Shimizu Saki	4. 巻 22
2. 論文標題 Emerging Roles of Astrocyte Kir4.1 Channels in the Pathogenesis and Treatment of Brain Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10236 ~ 10236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 國澤 直史, 芹川 忠夫, 清水 佐紀, 大野 行弘	4. 巻 36
2. 論文標題 新規てんかん関連因子Phf24の機能解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 55 ~ 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤将貴、國澤直史、清水佐紀、芹川忠夫、大野行弘
2. 発表標題 けいれん発現調節因子Phf24欠損による扁桃核グルタミン酸およびGABA遊離の変化
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤将貴、國澤直史、清水佐紀、中尾宏有介、松村光紗、山下窓、山田裕己、 芹川忠夫、大野行弘
2. 発表標題 Phf24欠損ラットの扁桃核における神経伝達物質遊離機能の変化
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤将貴、國澤直史、清水佐紀、松村光紗、徳山尚吾、池田昭夫、大野行弘
2. 発表標題 抗てんかん薬の反復的投与によるけいれん発作の予防効果および神経興奮性に及ぼす影響
3. 学会等名 第143回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國澤直史、清水佐紀、大野行弘
2. 発表標題 フルオロクエン酸によるアストロサイトの不活性化がベンチレントラゾール誘発けいれんに及ぼす影響
3. 学会等名 第144回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2024年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------