

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460111

研究課題名(和文) シナプス分泌機構に着目したてんかん病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of epilepsy with focusing on the synaptic release mechanism

研究代表者

大野 行弘 (Yukihiro, Ohno)

大阪薬科大学・薬学部・教授(移行)

研究者番号：00432534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス小胞蛋白SV2Aのてんかん原性調節機構を明らかにするため、SV2A遺伝子にミスセンス変異(L174Q)を導入したラットを作成し、そのけいれん感受性を評価した。SV2A変異ラットはペンチレンテトラゾール(PTZ)けいれんに対して高い感受性を示した。また、PTZ反復投与あるいは扁桃核刺激によるキンドリング形成にも高い感受性を示した。さらに、SV2A変異ラットの大脳辺縁系において、GABAのシナプス遊離が特異的に障害されていること、シナプトタグミン1発現が低下していることが示された。本研究結果は、SV2A-GABA系がてんかん原性を制御する新たな治療ターゲットとして有用であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) mediates action potential-dependent neurotransmitter release. To investigate the role of SV2A in regulating epileptogenesis, we generated a novel rat model carrying a Sv2a-targeted missense mutation (L174Q) and analyzed its seizure susceptibilities. The Sv2a mutant rats are highly susceptible to pentylenetetrazole (PTZ) seizure. Kindling with repeated PTZ treatments or amygdala stimulation was also markedly facilitated by the Sv2aL174Q mutation. In vivo microdialysis studies revealed that the Sv2aL174Q mutation reduced depolarization-induced GABA, but not glutamate, release in the limbic regions. Furthermore, the Sv2aL174Q mutation reduced the synaptotagmin1 (Syt1) level. The present results demonstrate that dysfunction of SV2A due to the Sv2aL174Q mutation impairs the synaptic GABA release by reducing the Syt1 level and facilitates the kindling development, illustrating the crucial role of SV2A-GABA system in regulating epileptogenesis.

研究分野：薬理学

キーワード：てんかん シナプス分泌 シナプス小胞蛋白SV2A GABA遊離 シナプトタグミン1 てんかん原性 キンドリング

1. 研究開始当初の背景

てんかんは人口の約 1% に認められる重篤な神経疾患であり、薬物療法が無効な難治性てんかん患者は 20~30% にのぼる。さらに、現在臨床で使用されている抗てんかん薬は単に神経興奮を抑える対症療法薬であり、てんかんの発症過程であるてんかん原性を抑制できる治療薬は存在しない。

シナプス小胞蛋白質 2A (Synaptic vesicle protein 2A: SV2A) はシナプス小胞に局在する 12 回膜貫通型の膜蛋白質であり、神経伝達物質の開口分泌を促進的に調節している。これまでの研究から、SV2A をノックアウトした動物では生後初期から重度のけいれん発作を発現すること (Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 15268, 1999)、SV2A がラセタム系抗てんかん薬の脳内作用部位であること (Proc. Natl. Acad. Sci., 101, 9861, 2004)、SV2A の脳内発現がヒト側頭葉てんかんにおいて低下していること (J. Mol. Neurosci., 39, 354, 2009; Epilepsia, 50, 422-433, 2009) などが知られており、SV2A はてんかん治療の新たなターゲット分子として注目されてきた。しかし、世界的な研究展開にもかかわらず、てんかんの発症・進展 (てんかん原性) 過程における SV2A の機能とそのメカニズムに関しては、未だ不明な点が多い状況であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SV2A のてんかん原性調節機構を解明し、そのてんかん治療ターゲット分子としての有用性を明らかにすることである。具体的には、申請者が新たに作出した Sv2a 遺伝子変異ラットを用いて、てんかんの発症・進展過程における SV2A の役割を行動薬理的に解析する。また、Sv2a 変異によるシナプス遊離機構の変化を解析し、SV2A の機能メカニズムを解明する。さらに、本研究成果をもとに、シナプス分泌機構に着目した新たな概念のてんかん治療法を考案、提示する。

3. 研究の方法

実験には ENU mutagenesis/MuT-Power 法により Sv2a 遺伝子に点変異 (L174Q) を導入した Sv2a 変異ラットおよび F344 ラット (対照群) を使用した。まず、Sv2a 変異ラットのけいれん感受性を調べる目的で、ペンチレンテトラゾール (PTZ) の急性けいれん実験、PTZ 反復投与によるキンドリング実験および扁桃核電気刺激によるキンドリング実験を行った。また、in vivo microdialysis 法を用い、海馬および扁桃核における GABA およびグルタミン酸のシナプス遊離の変化を評価した。さらに、シナプトタグミンを含む開口分泌調節タンパク質の発現変動をウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

Sv2a 変異ラットの発育は正常であり、自発性けいれんなどの異常行動は認められなかった。一方、PTZ 誘発けいれんに対して Sv2a 変異ラットは明らかな感受性の亢進を示した。さらに、低用量の PTZ を 9 日間連続投与することにより PTZ キンドリングを誘導した場合、Sv2a 変異ラットは投与初期から対照群に比べ有意に高いけいれんスコアおよびけいれん発現率を示した。また、扁桃核の反復刺激による扁桃核キンドリング実験においても、Sv2a 変異ラットは高い感受性を示し、キンドリング形成は有意に増強、加速した。次に、in vivo microdialysis 法により、海馬および扁桃核における GABA およびグルタミン酸のシナプス遊離機能を検討した。その結果、Sv2a 変異ラットでは、高カリウム (脱分極) 刺激による GABA の遊離が有意に低下していた。一方、グルタミン酸の遊離には、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。また、これら両部位において SV2A が GABA 神経に特異的に発現していることを確認した。さらに、開口分泌調節タンパク質の発現変動をウエスタンブロット法により解析した結果、Sv2a 変異ラットではシナプトタグミン 1 の脳内発現が選択的に低下していた。

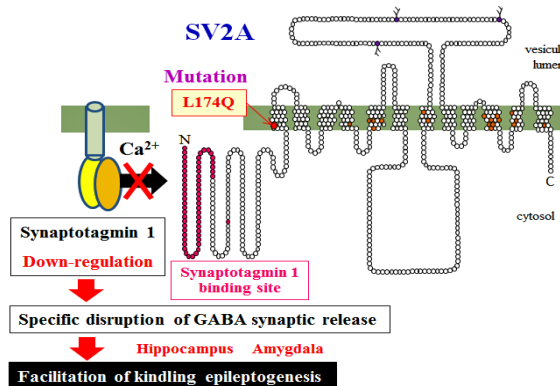


図 Sv2a 変異 (L174Q) によるてんかん原性の促進メカニズム

以上の結果から、SV2A の L174Q 変異 (第一膜貫通領域) が、GABA 神経遮断によるけいれん発現の感受性を亢進し、てんかん原性モデルであるキンドリング形成を顕著に促進することを見出した。さらに、この変化にはシナプトタグミン 1 の発現低下を伴う GABA のシナプス遊離機能の障害が関与していると考えられた。本研究結果は、SV2A がてんかん原性の制御に重要な役割を果たすことを示すとともに、SV2A-GABA 系を促進する薬物が新たなてんかん原性治療薬となりうることを示唆する。これらの成果は、第 50 回日本てんかん学会 (2016/10/7-8、静岡)、第 90 回日本薬理学会総会 (2017/3/15-17、長崎)、第 5 回アジア神経精神薬理学会 (5th AsCNP2017、

2017/4/27-29, Bali, Indonesia)のシンポジウムにおいて発表するとともに、国際誌に総説として掲載した(CNS Neurol Disord Drug Targets, 16, 463-471, 2017)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Y. Ohno, K. Tokudome: Therapeutic role of synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) in modulating epileptogenesis., CNS Neurol Disord Drug Targets, 16, 463-471 (2017)
2. H.A. Iha, N. Kunisawa, S. Shimizu, K. Tokudome, T. Mukai, M. Kinboshi, A. Ikeda, H. Ito, T. Serikawa, Y. Ohno: Nicotine Elicits Convulsive Seizures by Activating Amygdalar Neurons., Front Pharmacol., 8:57 (2017)
3. N. Kunisawa, H. A. Iha, S. Shimizu, K. Tokudome, T. Mukai, M. Kinboshi, T. Serikawa, Y. Ohno: Nicotine evokes kinetic tremor by activating the inferior olive via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors., Behav. Brain Res., 314, 173-180 (2016)
4. K. Tokudome, T. Okumura, R. Terada, S. Shimizu, N. Kunisawa, T. Mashimo, T. Serikawa, M. Sasa, Y. Ohno: A missense mutation of the gene encoding synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) confers seizure susceptibility by disrupting amygdalar synaptic GABA release., Front. Pharmacol., 7, 210 (2016)
5. K. Tokudome, T. Okumura, S. Shimizu, T. Mashimo, A. Takizawa, T. Serikawa, R. Terada, S. Ishihara, N. Kunisawa, M. Sasa, Y. Ohno: Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) regulates kindling epileptogenesis via GABAergic neurotransmission., Sci. Rep., 6, 27420 (2016)
6. 徳留健太郎、奥村貴裕、真下知士、國澤直史、清水佐紀、寺田 亮、芹川忠夫、笹征史、大野行弘: JSNP Excellent Presentation Award for AsCNP2015: シナプス小胞蛋白 SV2A の遺伝子変異を有するラットは顕著なキンドリング形成の促進を示す., 日本神経精神薬理学雑誌, 36, 109-110 (2016)
7. Y. Ohno, S. Shimizu, K. Tokudome, N. Kunisawa, M. Sasa: New insight into the therapeutic role of the serotonergic system in Parkinson's disease. Prog. Neurobiol., 134, 104-121 (2015)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Yukihiko Ohno: Role of synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) in modulating epileptogenesis., Symposium (Innovation of antiepileptic drugs in possession of

novel mechanism: especially related to epileptogenesis, including modern and traditional medicines), AsCNP 2017, 2017/4/27-29 (Bali, Indonesia) (招待講演)

2. Yukihiko Ohno: Function of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A as a Novel Therapeutic Target for Epilepsy., シンポジウム(てんかん研究の最前線 - 新たな治療薬を求めて)第 90 回日本薬理学会総会 2017/3/15-17 (長崎) (オーガナイザー、招待講演)
3. 徳留健太郎、奥村貴裕、國澤直史、清水佐紀、金星匡人、玉田真弓、藤原汐里、三宅梨沙、芹川忠夫、真下知士、笹征史、大野行弘: シナプス小胞蛋白 SV2A 遺伝子変異ラットにおける扁桃核の興奮メカニズム解析., 第 130 回日本薬理学会近畿部会, 2016/11/19 (京都)
4. 三宅梨沙、玉田真弓、藤原汐里、徳留健太郎、芹川忠夫、清水佐紀、大野行弘: シナプス小胞蛋白 SV2A の遺伝子変異による扁桃核の興奮メカニズム., 第 66 回日本薬学会近畿支部総会, 2016/10/15 (大阪)
5. 大野行弘: シナプス分泌機構に着目したてんかん病態解析: シナプス小胞蛋白 SV2A とてんかん原性., シンポジウム(てんかん原性についての基礎研究: 臨床に役立つ知見)第 50 回日本てんかん学会, 2016/10/7-8 (静岡) (招待講演)
6. Kentaro Tokudome, Takahiro Okumura, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Masato Kinboshi, Mayu Tamada, Shiori Fujiwara, Risa Miyake, Tadao Serikawa, Tomoji Mashimo, Masashi Sasa, Yukihiko Ohno: A missense mutation of the synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) gene confers seizure susceptibility by disrupting amygdala GABA release., 第 50 回日本てんかん学会, 2016/10/7-8 (静岡)
7. Kentaro Tokudome, Saki Shimizu, Naofumi Kunisawa, Ayako Ikari, Yumiko Iguchi, Takafumi Sugahara., Mayu Tamada, Shiori Fujiwara, Risa Miyake, Masato Kinboshi, Tadao Serikawa, Yukihiko Ohno: Synaptic vesicle protein 2A regulates dopamine release in the nucleus accumbens via GABAergic transmission., 第 39 回日本神経科学大会, 2016/07/20-22 (横浜)
8. Kentaro Tokudome, Takahiro Okumura, Tomoji Mashimo, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Ryo Terada¹, Masato Kinboshi, Tadao Serikawa, Masashi Sasa, Yukihiko Ohno: Facilitation of kindling development by the gene mutation of synaptic vesicle protein 2A., 第 46 回日本神経精神薬理学会年会, 2016/7/2-3 (韓

国、ソウル)

9. Kentaro Tokudome, Saki Shimizu, Naofumi Kunisawa, Azuki Hashimoto, Yuki Hiraoka, Kazuki Fukuda, Ayako Ikari, Yumiko Iguchi, Takafumi Sugahara, Tadao Serikawa, Yukihiro Ohno: Enhancement of the accumbal dopamine release by the gene mutation of synaptic vesicle protein 2A (*Sv2a^{L174Q}*), 30th CINP World congress of Neuropsychopharmacology, 2016/7/3-5 (Korea, Seoul)
10. Kentaro Tokudome, Takahiro Okumura, Naofumi Kunisawa, Kinboshi Masato, Saki Shimizu, Tomoji Mashimo, Tadao Serikawa, Masashi Sasa, Yukihiro Ohno: Mechanisms underlying the kindling facilitation by the gene mutation of synaptic vesicle protein 2A (SV2A). 第49回日本てんかん学会、2015/10/30-31 (長崎)
11. Kentaro Tokudome, Takahiro Okumura, Tomoji Mashimo, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Ryo Terada, Tadao Serikawa, Masashi Sasa, Yukihiro Ohno: Mutation of the gene encoding synaptic vesicle protein 2A (SV2A) markedly facilitates the kindling epileptogenesis in rats. The 4th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2015/11/18-22 (Taipei)
12. Kentaro Tokudome, Takahiro Okumura, Tomoji Mashimo, Tadao Serikawa, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Masashi Sasa, Yukihiro Ohno: Evaluation of seizure susceptibility in the synaptic vesicle protein 2A (SV2A)-mutant rats., 第48回日本てんかん学会学術集会、2014/10/2-3 (東京)
13. Kentaro Tokudome, Takahiro Okumura, Tomoji Mashimo, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Ryo Terada, Tadao Serikawa, Masashi Sasa, Yukihiro Ohno: Enhanced kindling development in synaptic vesicle protein 2A-mutant (*Sv2a^{L174Q}*) rats., 第37回日本神経科学大会、2014/9/11-13 (横浜)

〔図書〕(計 1 件)

1. H.A. Iha, N. Kunisawa, K. Tokudome, T. Mukai, M. Kinboshi, S. Shimizu, Y. Ohno: Immunohistochemical analysis of Fos protein expression for exploring brain regions related to central nervous system disorders and drug actions., In "In Vivo Neuropharmacology and Neurophysiology" edited by A. Philippou, Springer, New York, Neuromethods, 121, 389-408 (2017)

〔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

下記の大学研究室のホームページに研究成果の一部ならびに成果論文のリストを掲載している。

<http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/yakuhinsayou.html#01>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 行弘 (OHNO YUKIHIRO)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00432534

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

河合 悦子 (KAWAI YOSHIKO)
大阪薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：50268299

清水 佐紀 (SHIMIZU SAKI)
大阪薬科大学・薬学部・助手
研究者番号：00630815

(4) 研究協力者

()