

# てんかん易発性を有する Y284C マウスの 発達依存的シナプス形成と機能変化に関する研究

てんかんシナプス病態チーム（課題番号：117112）

研究期間：平成 23 年 7 月 22 日～平成 26 年 3 月 31 日

研究代表者：桂林秀太郎 研究員：日暮憲道（平成 25 年 3 月 31 日まで）、石井敦士

## 【緒言】

てんかんは、熱性けいれんを含めると国民の約 2% が罹患する頻度が高い神経疾患であり、多くは小児期に発症する。しかしながら、その分子生物学的本態はほとんど分かっておらず、根本的な治療法の開発や創薬が困難な疾病の一つである。加えて、難治性のてんかん患者は発達障害や精神遅滞などの合併症を来すこともあり、成人になっても社会生活に対する不安も伴う場合がある (Hirose et al. Epilepsy Res, 2000; Brain Dev, 2002 他)。

これまでに廣瀬らは、精神遅滞を来す難治性てんかん患者の遺伝子解析により 100 種以上のナトリウムチャネルの遺伝子異常を発見してきた (Hirose et al. Brain Dev 2003; Hirose et al. Epilepsia 46:38-43 2005 他)。そのナトリウムチャネルの遺伝子異常を有するキックインマウス作製に成功した代表例が Y284C マウスである。

正常な脳は、多数の神経細胞（ニューロン）と結合することでネットワークを形成し、情報をバランス良く伝導・伝達して中枢恒常性を維持している。ニューロンの架け橋である『シナプス』では、化学伝達物質を介して効率的に情報が伝達される。一方、てんかん発生時には、多細胞神経ネットワークの興奮性と抑制性のバランス (E/I バランス) が一過性もしくは持続的に破綻し、シナプス活動が過剰に興奮すると考えられる。すなわち、てんかんを「シナプス病態」として捉え、シナプス機能の回復機序を解明することは、根本的なてんかん治療および創薬への一助となる可能性がある。

本研究では小児発達期におけるてんかん易発性に着目し、培養環境におけるシナプス形成期からシナプス完成期までの時系列的シナプス伝達異常の有無を、廣瀬らが作出した Y284C マウスを用いて電気生理学的に解析した。

## 【方法】

### (1) 実験動物

284C 妊娠マウスは福岡大学医学部小児科／廣瀬伸一教授ならびに福岡大学理学部／弟子丸正伸准教授から譲渡を受け、ICR 妊娠マウスは九動株式会社から購入した。マウスは個別にプラスチックケージに収容し、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 2\%$ 、および 12 時間の明暗サイクル (7:00 AM 点灯) の条件の動物飼育室で飼育した。なお、水及び餌 (CE- 2、日本クレア) は自由に摂取できるようにした。

脳細胞の培養は、出産直後 (P0-1) の ICR マウスおよび Y284C マウスを用いた。Y284C マウスの遺伝子発現を確認するために尾を冷凍保存し、シナプス解析を行うまでに PCR 法にて Genotyping を完了した。

実験動物の取り扱いに関しては、福岡大学動物実験委員会 (Experimental animal care and use committee) による動物実験倫理規定に準じた。

### (2) 島状アストロサイト (Micro Island) 培養標本の作製

本研究はシナプス伝達の解析を目的としているので、その解析に最適な「オータプス培養標本」を利用した。オータプス培養標本とは、ドット状 (一辺の長さが  $300 \mu\text{m}$  程度の四角い島状) に培養したアストロサイト (グリア細胞の一種) と神経細胞 (ニューロン) 1 個を共培養した初代培養標本である。共培養した単一ニューロンは、細胞接着エリア (島状アストロサイトがある範囲内) でのみ成長し、シナプスを自身の樹状突起にランダムに多数形成する。この自己にシナプスを形成するオータプス培養標本のシナプス数は細胞接着エリアの面積によって変わる。そこで均一サイズの細胞接着エリアをカバーガラス上で均一化するため、東北大学電気通信研究所と

「コーティング液用スタンプ」を作製した (図 1)。これにより、コーティング液はドット状 (島状) にカバーガラス上に付着し、島状アストロサイト層の大きさのパラッキも最小限にして均等に培養した。

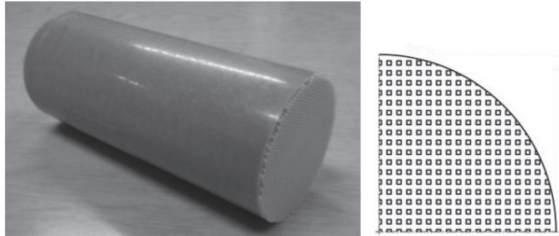


図 1 コーティング液用スタンプの外観とスタンプ表面の設計図

### (3) グリア細胞 (アストロサイト) の培養

生後 0-1 日齢 ICR マウス的大脑皮質を Trypsin/EDTA (0.05% / 0.02%) (Wako) で処理し、10% ウシ胎児血清 (Invitrogen) を含む D-MEM メディウム (Invitrogen) を用いて 37 度で 2 週間培養した。培養後、高密度のアストロサイトを得るために培養ボトルを振とうし、ミクログリアや細粒細胞を浮遊させてメディウムを除去した。続いて培養ボトル底面に接着しているアストロサイト層を Trypsin/EDTA (0.05% / 0.02%) で剥離し、予め準備しておいた島状アストロサイト培養用 6 ウェルプレート (BD Falcon) に撒いた。5-6 日後にアストロサイトが島状に培養されていることを確認し (図 2)、過度の細胞増殖を止めるために 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (Sigma) とウリジン (Sigma) の混合液を各ウェルに添加した。

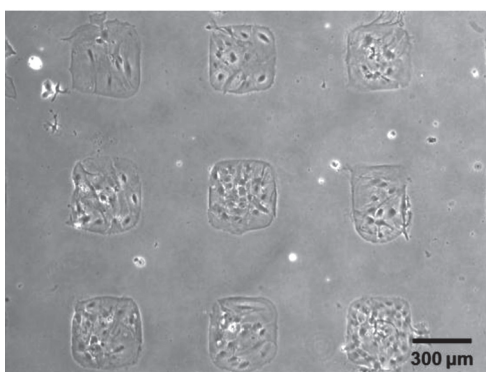


図 2 ドット状 (島状) アストロサイト培養の写真

### (4) 島状アストロサイトと単一ニューロンの共培養

パパイソ (Worthington) を用いて生後 0-1 日齢 Y284C マウス的大脑皮質からニューロンを酵素処理単離し、予め作製した島状アストロサイトを培養した 6 ウェルプレートに神経細胞を撒き、37 度で 8 日～16 日間培養した。培養液は 2% B27 (Invitrogen) を含む

Neurobasal-A メディウム (Invitrogen) を用い、培養期間中は液性因子を保持するためにメディウム交換は行わなかった。培養日数により 8～9 日間培養を幼若期、13～16 日間培養を成熟期として分類した。

### (5) 電気生理学的シナプス解析

シナプス解析はパッチクランプ法を用い、膜電位を  $-70\text{mV}$  に固定して興奮性シナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current, EPSC) を記録した (図 3)。また、自発性グルタミン酸放出 (Spontaneous miniature Excitatory postsynaptic current, mEPSC) はナトリウムチャネル阻害薬の  $0.5\ \mu\text{M}$  テトロドトキシン (Wako) を細胞外液中に投与して記録した。開口放出可能な全体のシナプス小胞のサイズ (Readily releasable pool, RRP) は、一過性高浸透圧刺激 ( $0.5\text{M}$  sucrose) で惹起される内向き電流の総面積を計算した。加えて、開口放出可能な全体のシナプス小胞数は、RRP 面積を単シナプス小胞の開口放出によって惹起される応答面積で除することで求めた。シナプス開口放出確率 (Vesicular release probability) は、EPSC 面積を RRP の面積で除することにより求めた。

細胞外液 (mM) は、NaCl 140, KCl 2.4, HEPES 10, glucose 10, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1; pH 7.4 とした。細胞内液 (mM) は、K-gluconate 146.3, MgCl<sub>2</sub> 0.6, ATP-Na<sub>2</sub> 4, GTP-Na<sub>2</sub> 0.3, creatine phosphokinase 50 U/ml, phosphocreatine 12, EGTA 1, HEPES 17.8; pH 7.4 とした。全ての実験は室温で行なった。

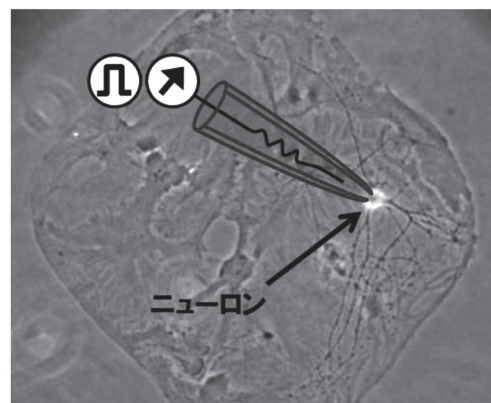


図 3 オータプス培養標本を用いたパッチクランプ法の概略図

### (6) 統計処理

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表記した。統計解析はノンパラメトリックにより行い、p 値が 0.05 以下を有意差有りとして検定した。

【結果】

(1) シナプス完成期におけるY284Cニューロンのシナプス伝達の解析

図4に示すように、活動電位によって惹起される興奮性シナプス伝達、すなわちEPSC (Excitatory postsynaptic current) の振幅は、野生型 (WT) とY284Cキックイン (Homo) ニューロンで有意な差は認められなかった (WT:  $30.1 \pm 4.9$  nA, n=19; Homa:  $29.0 \pm 3.4$  nA, n=14, 図4)。

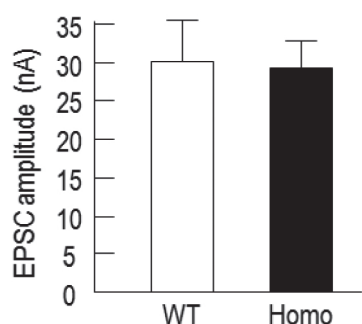


図4 野生型およびY284Cニューロンにおける活動電位によって惹起されるシナプス伝達の振幅

一方で、TTX存在下による活動電位阻害状態で観察できる自発的なシナプス小胞開口放出によって惹起されるminiature EPSC (mEPSC) の振幅も、野生型 (WT) とキックイン (Homa) ニューロンの間で有意な差はなかった (WT:  $29.6 \pm 2.7$  pA, n=17; Homa:  $29.2 \pm 1.6$  pA, n=12, 図5)。

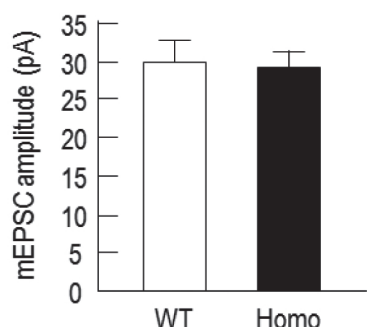


図5 野生型およびY284Cニューロンにおける自発的なシナプス伝達の振幅

次に、シナプス神経終末部に対する影響をみるため、高濃度 sucrose 投与により観察される即時放出可能シナプス小胞群に含まれるシナプス小胞数 (Readily releasable pool, RRP) を計測した。結果、図6に示すように両者に何らの違いは見られなかった (WT:  $27,954 \pm 5,665$  個, n=17; Homa:  $27,322 \pm 4,222$  個, n=12, 図6)。加えて、シナプス小胞の開口放出確率 (Vesicular

release probability, Pvr) にも差異はなく (WT:  $8.2 \pm 0.9\%$ , n=19; Homa:  $8.9 \pm 1.6\%$ , n=14, 図7)、自発的なシナプス開口放出すなわち mEPSC の頻度にも差は認められなかった (WT:  $13.0 \pm 2.0$  Hz, n=17; Homa:  $13.6 \pm 2.5$  Hz, n=12, 図8)。

以上より、Y284Cニューロンのシナプス完成期におけるシナプス伝達には何らの変異は見い出せなかった。

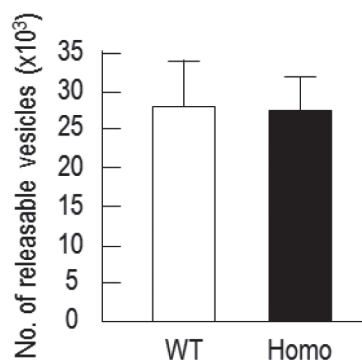


図6 野生型およびY284Cニューロンにおける即時開口放出可能なシナプス小胞の数

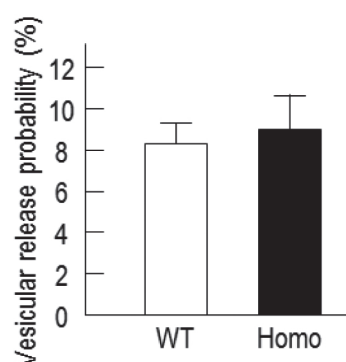


図7 野生型およびY284Cニューロンにおけるシナプス伝達確率

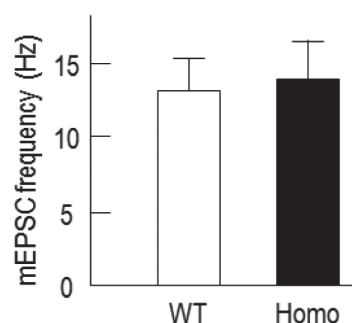


図8 野生型およびY284Cニューロンにおける自発的なシナプス伝達の頻度

## (2) シナプス形成期における Y284C ニューロンのシナプス伝達の解析

てんかんの多くは小児期に発症する。そこで、*in vitro* における小児期すなわちシナプス形成期に何らかのシナプス伝達変異があるのではと仮定し、実験を行った。実験はニューロン培養 8～9 日目に前述と同じ各種パラメータをパッチクランプ法にて解析した。

活動電位によって惹起される興奮性シナプス伝達、すなわち EPSC (Excitatory postsynaptic current) の振幅は、野生型 (WT) と Y284C キックイン (Homo) ニューロンで有意な差は認められなかった (WT:  $1.5 \pm 0.3$  nA,  $n=10$ ; Hmo:  $1.8 \pm 0.5$  nA,  $n=10$ , 図 9)。

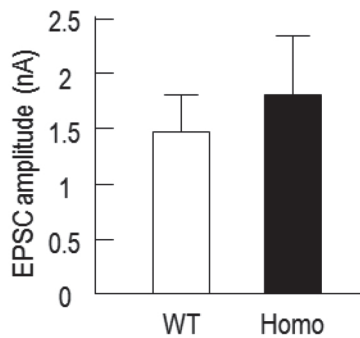


図 9 野生型および Y284C ニューロンにおける活動電位によって惹起されるシナプス伝達の振幅

一方、自発的なシナプス開口放出によって惹起される miniature EPSC (mEPSC) の振幅も、野生型 (WT) とキックイン (Homo) ニューロンの間で有意な差はなかった (WT:  $15.0 \pm 1.4$  pA,  $n=10$ ; Hmo:  $13.7 \pm 1.6$  pA,  $n=9$ , 図 10)。

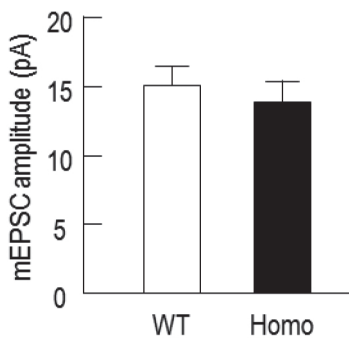


図 10 野生型および Y284C ニューロンにおける自発的なシナプス伝達の振幅

また、高濃度 sucrose 投与により観察される即時放出可能シナプス小胞群に含まれるシナプス小胞数 (Readily releasable pool, RRP) にも違いはなかった (WT:  $2,392 \pm 601$  個,  $n=10$ ; Hmo:  $2,241 \pm 385$  個,  $n=9$ , 図 11)。

加えて、シナプス小胞の開口放出確率 (Vesicular release probability, Pvr) にも差異はなく (WT:  $8.0 \pm 1.9\%$ ,  $n=10$ ; Hmo:  $8.4 \pm 2.0\%$ ,  $n=10$ , 図 12)、mEPSC の頻度にも差は認められなかった (WT:  $5.7 \pm 2.2$  Hz,  $n=10$ ; Hmo:  $4.7 \pm 0.9$  Hz,  $n=9$ , 図 13)。

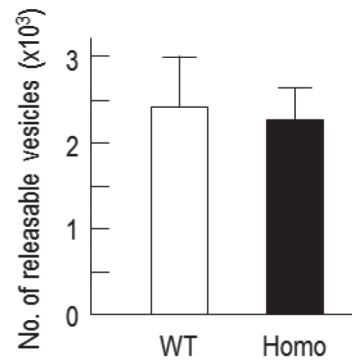


図 11 野生型および Y284C ニューロンにおける即時開口放出可能なシナプス小胞の数

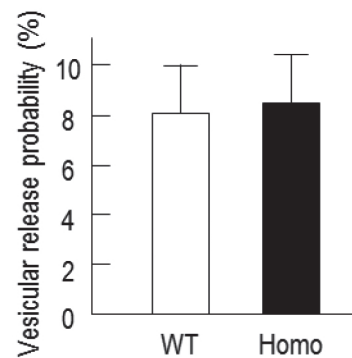


図 12 野生型および Y284C ニューロンにおけるシナプス伝達確率

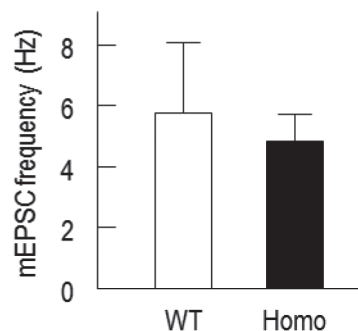


図 13 野生型および Y284C ニューロンにおける自発的なシナプス伝達の頻度

## 【考察】

脳の神経細胞はネットワークを形成しており、その興奮性伝達と抑制性伝達の相互バランス (E/I バランス) を維持しながら機能している。てんかんが発症する際、一般的には E/I バランスが一時的もしくは持続的に破綻することが発症の原因であるといわれている。Y284C マウスはてんかん易発性であることから、てんかん発症時には興奮性伝達が亢進もしくは抑制性伝達が低下して E/I バランスが変化することを予測していた。しかし本研究において、単一ニューロンレベルでは興奮性シナプス伝達の亢進作用は観察できなかった。したがって、Y284C マウス脳における E/I バランスの崩壊が起こりうることを前提とするならば、抑制性シナプス伝達が低下している可能性が挙げられる。本研究期間中には抑制性シナプス伝達の観察を行っていないので、今後は抑制性シナプス伝達に着目し、詳細に調べる必要がある。

一方、てんかんが誘起される場合、僅かな外部刺激が引き金 (トリガー) となる場合がある。例えば、通常であれば何らの生理的影響のない自発的な活動電位発火でも、てんかん易発性細胞では、それが刺激となってバースト状の活動電位発火へと変化し、脳神経細胞ネットワークを伝播する可能性がある。本研究では興奮性シナプス伝達に有意な異常は見られなかったが、僅かな外部刺激 (頻回刺激や薬物刺激) を負荷すれば、Y284C ニューロンで何らかの変異が発見できたかもしれない。特にてんかんは幼若期に発生しやすいことに鑑みると、*in vitro* における幼若シナプスにおいて外部刺激を付加的に与えることが、僅かな変異を見出す有効手段となる可能性がある。すなわち、てんかん易発性モデルマウスを用いた *in vitro* モデルの作製および変異表現系を実験モデル的に再現するには、工夫を要することが分かった。以上より、シナプス形成期における Y284C ニューロンのシナプス伝達にも何らの変異は見い出せなかった。

## 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、てんかん易発性マウス Y284C を提供して下さった福岡大学医学部小児科 廣瀬伸一教授ならびに福岡大学理学部 弟子丸正伸准教授に感謝申し上げます。また、本研究の一部は、福岡大学研究推進部の研究経費によるものである (課題番号: 117112)。