

# 博士學位申請論文

博士學位申請論文名

てんかん治療薬開発を目指した

*Scn1a* 変異マウスの病態解析

並びに新規シナプス薬効標本の確立

博士學位申請者氏名

内野 鉦也

Ⓔ

## 目次

緒言	1
第1章 <i>Scn1a</i> キックインマウスニューロンのシナプス機能解析	3
1 実験材料ならびに実験方法	
1-1 実験動物	
1-2 実験方法	
1-2-1 PCR法を用いた実験動物の genotyping	
1-2-2 オータプス培養標本作製手順	
1-2-3 ホールセルパッチクランプ法	
1-2-4 蛍光免疫染色法	
1-2-5 統計処理	
2 実験結果	
2-1 <i>Scn1a</i> キックインマウスニューロンの興奮性シナプス解析	
2-2 <i>Scn1a</i> キックインマウスニューロンの抑制性シナプス解析	
2-3 <i>Scn1a</i> キックインマウスニューロンの抑制性シナプス伝達のメカニズム	
2-4 <i>Scn1a</i> キックインマウスニューロンにおける抑制性シナプス開口放出低下のメカニズム	
2-5 高濃度細胞外 $Ca^{2+}$ における <i>Scn1a</i> キックインマウスニューロンの E/I バランス	
3 小括	
第2章 <i>Scn1a</i> キックインマウスアストロサイトの $Ca^{2+}$ 発火解析	24
1 実験材料ならびに実験方法	
1-1 実験動物	
1-2 実験方法	
1-2-1 PCR法を用いた実験動物の genotyping	
1-2-2 アストロサイト初代培養作製手順	
1-2-3 Oregon Green BAPTA-1, AM 蛍光染色法	
1-2-4 Fluo-4, AM 蛍光染色法	
1-2-5 統計処理	

## 2 実験結果

2-1 アストロサイトの自発的 Ca<sup>2+</sup>発火

2-2 アストロサイトの誘発的 Ca<sup>2+</sup>発火

## 3 小括

### 第3章 ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本の

確立・・ 32

#### 1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物

1-2 実験方法

1-2-1 アストロサイトの分化誘導方法

1-2-2 ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本の作成手順

1-2-3 PCR 法を用いたアストロサイトのマーカー遺伝子の定量

1-2-4 蛍光免疫染色法

1-2-5 ホールセルパッチクランプ法

1-2-7 統計解析

#### 2 実験結果

2-1 ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本 (HiAACs) の確立

2-2 HiAACs の神経機能解析

2-3 HiAACs の神経形態解析

2-4 HiAACs の培養期間検討

#### 3 小括

総括ならびに結論・・ 49

参考文献・・ 52

謝辞・・ 61

## 緒言

てんかんは、熱性けいれんを含めると全人口の1%に及ぶ非常に高頻度な脳神経疾患であり、多くは小児期に発症する。一般的には抗てんかん薬による治療が行われるが、約3割の患者では抗てんかん薬が無効なてんかんを有している。難治性てんかん発症の分子メカニズム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、難治性の小児てんかん患者は発達障害や精神遅滞などの合併症も生ずることがあり、成人になっても社会生活に対する不安を伴う場合もある (Hirose et al., 2000, Hirose et al., 2002)。

その中でも Dravet 症候群は、1.3 万人に 1 人の確率で乳児期に発症する疾患であり、頻回性のてんかん発作により重篤な脳症や発達障害を来す難治性てんかんである。発症の原因には、患者の約 80% 以上に脳内のナトリウムチャンネルをコードする *SCN1A* のヘテロ変異が認められる。*SCN1A* 遺伝子は、電位依存性ナトリウムチャンネル Nav1.1 の  $\alpha$  サブユニットをエンコードしている。しかしながら、この遺伝子変異がどのようにして難治性てんかんを発症するかは不明な点が多い。近年、*Scn1a* 遺伝子のヘテロ変異を有するマウスが、Dravet 症候群のモデルマウスとして報告された (Yu et al., 2006, iwara et al., 2007, Cheah et al., 2012, Han et al., 2012)。上記論文に共通するメカニズムは、*Scn1a* 遺伝子の変異により抑制性神経機能の低下が生じることである。このことは、中枢神経ネットワークにおける抑制性神経機能が抑制される結果、脳内では興奮性の神経機能が高まり、非常にてんかんが発症しやすい状態にあることを意味している。

正常な脳では、多数の神経細胞（ニューロン）がお互いに結合することで神経ネットワークを形成し、情報をバランスよく伝導・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。すなわち、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。

一方で、てんかん病態には神経細胞のみではなく、グリア細胞の関与が示唆されている (Patel et al., 2019)。特にグリア細胞の一種であるアストロサイトは神経伝達物質やイオン濃度を制御することで、てんかん病態に関与している (Coulter and Steinhäuser, 2015)。近年、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  発火がニューロンを介して、てんかん発作に関与していることが明らかとなった (Fellin et al., 2006, Tian et al., 2005)。よって Dravet 症候群において、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  発火を解析することは、新たな病態機序解明につながると考えられる。

このように、てんかんを含む多くの中枢神経疾患ではアストロサイトの機能異常がみられる (Cai et al., 2017, Booth et al., 2017, Petrelli et al., 2016, Patel et al., 2019)。そ

して、アストロサイトの機能異常は神経回路を取り巻く液性因子の異常へとつながり、結果的に神経回路の過活動や異常反応を引き起こす。よって、近年創薬の治療標的としてアストロサイトに注目が集まっている。しかしながら、ヒトの病態アストロサイトによるシナプス異常を同定できる神経回路モデルが存在しないことや、動物モデルではヒトの病態を忠実に再現できないため創薬に至っていない。

そこで本研究では、Dravet 症候群モデルマウスである *Scn1a* に変異を有するマウス (*Scn1a* キックインマウス) のシナプス機能及びアストロサイトの活性を評価した。第 1 章では *Scn1a* キックインマウスにおける興奮性および抑制性ニューロンのシナプス病態について検討した。第 2 章では *Scn1a* キックインマウスにおけるアストロサイトの活性を評価した。さらにヒトのアストロサイトに着目したシナプス薬効評価モデルの確立を目的として、第 3 章ではヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有した新規シナプス薬効標本を確立した。

## 第1章 *Scn1a* キックインマウスのニューロン及びアストロサイトの病態解析

### 1 実験材料ならびに実験方法

#### 1-1 実験動物

実験動物は、*Scn1a* キックイン (Het) マウスを用いた。このマウスは *Scn1a* 遺伝子をコードする領域のうち exon 8-12 がネオマイシン耐性遺伝子に置換されたキックインマウス (図 1a) であり、Nav1.1 がノックアウトされたマウスと同じ表現型を示す。*Scn1a* 変異を有する雄と *Scn1a* 変異を有さない雌 (野生型、WT) を交配させ、生まれた仔の脳を生後 0-1 日にニューロンの初代培養に用いた。Het マウスの遺伝子発現を確認するために尾を冷凍保存し、後日 PCR 法にて Genotyping を行った。

アストロサイト培養のための妊娠 ICR マウスは業者 (九動) から購入した。マウスは個別にプラスチックケージの中に収容し、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 (AM7:00 点灯、PM7:00 消灯) 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。

実験動物の取り扱いに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、動物実験実施の承認 (No.1712128 & 1812092) を得て行った。

#### 1-2 実験方法

##### 1-2-1 PCR 法を用いた実験動物の genotyping

- DNA 抽出

DNA の抽出にはアルカリ溶解法を用いた。以下に手順を示す。

- ① ハサミでマウスの尾を 5 mm 程切り、1.5 mL チューブに入れて冷凍保存した。
- ② 採取した尾の入ったチューブに 50 mM NaOH 180  $\mu\text{L}$  を添加・攪拌し、 $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間インキュベートした。
- ③ サンプルチューブに 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を 20  $\mu\text{L}$  を添加・攪拌し、その後 12,000 rpm で 10 分間遠心した。
- ④ 上清を DNA 抽出液とし、PCR に用いた。

- PCR 操作手順

Het マウスの sense primer は intron 7 の配列中に存在する 5'-ctgtgtgagcatacaacctactgg-3' とし、antisense primer は PGK promoter に連結し

ている FRT の配列中に存在する 5'-gtataggaactcagagcgcttttgaagc-3'とした。組成および反応プログラムは以下の通りである。

#### 【PCR 反応溶液の組成】

dH <sub>2</sub> O	5.9 $\mu$ L
GoTaq Green Master Mix (Promega)	9.0 $\mu$ L
10 $\mu$ M sense Primer	0.25 $\mu$ L
10 $\mu$ M antisense Primer	0.25 $\mu$ L
DNA	2.5 $\mu$ L

---

#### 【PCR 反応のプログラム】

Pre-denaturation	94°C	2 min
Denaturation	98°C	10 sec
Annealing	57°C	30 sec
Extension	68°C	45 sec

- DNA の同定

電気泳動液、アガロースゲルの溶媒には 10×TAE Buffer を用いた。手順の詳細は以下の通りである。

- ① 2%アガロースゲルを作製し、電気泳動機にセットしたゲルに Loading Quick 100 bp DNA Ladder (TOYOBO) 3  $\mu$  L、PCR で増幅させた DNA 溶液を各 5  $\mu$  L ずつ添加し、100 V で泳動した。
- ② 泳動後、FluorChem™8900 (Alpha Innotech) を用いて UV 照射し、DNA のバンドから Het マウスの genotyping を行った。増幅産物として、634 bp 付近にバンドが確認されたものを Het (\*) とみなした (図 1b)。

#### 1-2-2 オータプス細胞培養標本作成手順

オータプス培養標本とは、培養アストロサイトをドット状に区分培養し、続いてその上に単一ニューロンを共培養した標本である (Bekkers and Stevens, 1991)。このオータプスニューロンには他のニューロンからのシナプス入力がかく無く、オータプスニューロンの軸索は自身の細胞体や樹状突起に多数のシナプス (オータプス) を投射する。すなわち、一つのニューロンが有するシナプスのみに焦点を絞ることができる。

- ① ICR 系統から生まれた仔マウス（生後 0-1 日）をアルコール消毒したハサミで断頭した。
- ② アルコール消毒したピンセットを用いて頭皮および頭蓋骨を剥がし、露出した全脳をマイクロスパーテルですくうようにして取り出した。
- ③ 冷却した HBSS 溶液（Hank's Balanced Salt Solution, Fujifilm Wako）に脳を浸し、実体顕微鏡下でピンセットを用いて素早く大脳皮質を取り出し、表面の血管及び硬膜を除去した。
- ④ 取り出した大脳皮質を、1 mL の Trypsin/EDTA 溶液（0.05% / 0.02%, Fujifilm Wako）が入った 1.5 mL チューブに入れ、37°C、700 rpm で 20 分間攪拌した。
- ⑤ 攪拌後、Trypsin/EDTA 溶液を除去し、適量の 10% Fetal Bovine Serum 含有 D-MEM 溶液（10% FBS 溶液）でリンスした。

#### 【10% FBS 溶液の組成】

450 mL	DMEM, High Glucose, GlutaMAX™ (Invitrogen)
50 mL	Heat-inactivated FBS (Invitrogen)
1 mL	Penicillin-Streptomycin (Invitrogen)
0.5 mL	MITO + Serum Extender (BD Science)
	⇒MITO + Serum Extender (BD Science) 1 ボトルを超純水 5 mL で溶解し、1.5 mL チューブに 0.6 mL ずつ分注して冷凍保存したもの

- ⑥ リンス後に 10% FBS 溶液を除去し、新たに 10% FBS 溶液を 1 mL 加えてブルーチップで大脳皮質を攪拌単離した。
- ⑦ 30 秒ほど静置し、予め 10% FBS 溶液 10 mL を入れておいた 75 cm<sup>2</sup> の培養 flask に上清を 1 mL 入れ、37°C のインキュベーター内で 24 時間程度培養した。
- ⑧ 24 時間後、アストロサイト以外の混在するグリア細胞を除去するため、メディアウムを新しい 10% FBS 溶液と交換し、インキュベーター内で 2 週間培養した。（このとき、アストロサイトがボトル底面に付着していることを顕微鏡下で観察した。）
- ⑨ アストロサイトがボトル底面に付着していることを確認し、ボトルを平らな場所で数回打ち付けて、ミクログリアや細粒細胞などの不要な細胞を除去した。
- ⑩ 37°C に温めた Trypsin/EDTA 溶液 5 mL でボトル底面に接着したアストロサイト層を剥離し、細胞が単離されていることを顕微鏡下で確認した後、Trypsin/EDTA 溶液と同量以上の 10% FBS 溶液を加えて酵素活性を止めた。
- ⑪ アストロサイト混濁液を 50 mL チューブに移し、1000 rpm で 3 分間遠心分離した後、上清を吸引除去して新たに 10% FBS 溶液を 1 mL 加え、ブルーチップで細胞塊を攪拌単離した。



- ⑫ 細胞懸濁液を 10  $\mu$ L 採取し、Cell Counter でアストロサイトの数数を数た。
- ⑬ 予め準備しておいたドット状アストロサイト培養用 6 well プレーートの 1 well あたりの細胞数が 25,000 個となるようにプレートに播き、1 週間程度培養した。メディアウムはアストロサイト初代培養で用いた 10% FBS 溶液とし、各 well に 2 mL 入れた。

**【ドット状アストロサイト培養用プレートの作成】**

1. 質量分率 65%の硝酸を用いてカバーガラス (Matsunami, 22 mm 丸型 No.1) を数時間攪拌洗浄し、蒸留水で一晩攪拌洗浄し脱脂処理を施した。
  2. 0.2% Agarose (Sigma-Aldrich) を作成し、綿棒を用いてカバーガラスに塗布後、UV ランプを 20 分間照射し殺菌した。
  3. 約 2 mg / mL Collagen I, rat tail (BD Biosciences)、1 mg / mL Poly-D-Lysine hydrobromide (Sigma-Aldrich) 溶液を 1 : 1 で混合しコーティング液とした。
  4. スタンプを用いてドット状のパターンコーティングを施した。使用したスタンプは直径 26 mm、ドットサイズ 300 $\times$ 300  $\mu$ m、ドット間隔 400  $\mu$ m、ドット高 500  $\mu$ m のものを用いた。
- ⑭ 上の手順で作製したドット状アストロサイト培養標本に海馬ニューロンおよび線条体ニューロンを蒔く直前に well 内のメディアウムを吸引除去し、NBA 溶液 2 mL に置換した。

**【NBA 溶液の組成】**

245 mL	Neurobasal A-Medium (Invitrogen)
5 mL	B27-Supplement (Invitrogen)
2.5 mL	Glutamax-I (Invitrogen)
0.5 mL	Penicillin-Streptomycin (Invitrogen)

- ⑮ 1-2-2①-③と同様の手順でキックインマウスの全脳を取り出し、海馬または線条体を取り出した。Enzyme 溶液が 800  $\mu$ L 入った 1.5 mL チューブに取り出した組織を入れ、37 $^{\circ}$ C、750 rpm で 50-60 分間酵素処理を行った。

**【Enzyme 溶液の組成】**

50 mL	DMEM, High Glucose, GlutaMAX <sup>TM</sup> (Invitrogen)
10 mL	L-Cystein hydrochloride monohydrate (Sigma-Aldrich)
0.5 mL	100 mM CaCl <sub>2</sub> 溶液 (Fujifilm Wako)
50 $\mu$ L	0.5 M EDTA (Sigma-Aldrich)

上記 2.5 mL に対して Papain (Worthington) 50  $\mu$ L を加えて用事調整し、95 % O<sub>2</sub>、5 % CO<sub>2</sub> 混合ガスで 20 分間程度バブリングした後にフィルタリングを行い Enzyme 溶液とした。

- ⑩ Enzyme 溶液を除去し、Inactivation 溶液 500  $\mu$ L に置換し、37°C、750 rpm で 10-15 分間振盪し酵素反応を止めた。

#### 【Inactivation 溶液の組成】

125 mg	Trypsin inhibitor from chicken egg white (Sigma-Aldrich)
125 mg	Albumin bovine serum Initial fractionation by heat shock (Sigma-Aldrich)
50 mL	10% FBS 溶液

- ⑪ Inactivation 溶液を除去し、NBA 溶液で 1 度リンスした後、NBA 溶液を新たに 100  $\mu$ L 添加した。
- ⑫ NBA 溶液中でゆっくりと組織を攪拌単離し、1 分間ほど静置した後、上清 100  $\mu$ L を NBA 溶液が 800  $\mu$ L 入った 1.5 mL チューブに移した。
- ⑬ NBA 溶液 100  $\mu$ L を組織片が残っているチューブに再び添加し、⑤と同様の操作を行った。
- ⑭ Cell Counter でニューロンの数を数え、⑬で予め準備したプレートに 1 well 当たり海馬ニューロンは 6,000 個、線条体ニューロンは 7,000 個になるようにニューロンを播き、2 週間培養した。

#### 1-2-3 ホールセルパッチクランプ法

パッチクランプ法は細胞膜において単一または複数のイオンチャネル分子の活動を、それを通るイオン電流として記録する方法で、1976 年に Neher と Sakmann によって開発された (岡田泰伸：新パッチクランプ実験技術法)。

本法は、細胞膜にガラス管微小ピペット (パッチ電極) をギガ・オーム (G $\Omega$ ) 以上の高抵抗で密着 (ギガ・シール) させ、その先端開口部の微小膜領域を電氣的に他の領域と隔絶させた状態で電位固定し、そこに含まれるイオンチャネルを通るイオン電流を計測する方法である。パッチクランプには種々のモードがあるが、本研究ではパッチ膜以外の全細胞膜を流れるイオン電流を計測するホールセルモードで行った。

電流はパッチクランプアンプ (Multi Clamp700B, Molecular Device) を用いて測定し、DIGIDATA 1440A (Axon Instruments) を介して、pClamp 10 (Molecular Device)

を用いて記録した。記録は 20 kHz でサンプリングし、10 kHz のフィルターを介してコンピューターに取り込んだ。パッチ電極は BORO SILICA GLASS (SUTTER INSTRUMENT CO.) を用いて FLAMING/BROWN MICROPIPETTE PULLER (SUTTER INSTRUMENT CO.) で作製した。記録したデータは AxoGraph X 1.2 software (AxoGraph Scientific) を用いて解析を行った。

【チャンバー内を還流する細胞外液の組成】

1400 mM	NaCl
24 mM	KCl
100 mM	HEPES
100 mM	Glucose
20 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O

超純水で 1 L にメスアップし、これを 10×ストックとして用事希釈して用いた。pH は Tris-base を用いて 7.4 に調節した。

【細胞内を還流するパッチ内液の組成】

興奮性ニューロンの記録には 1.0 mL の ATP-GTP-stock 溶液 (10×) と 0.1 mL の 100 mM K-EGTA 溶液と 8.9 mL の K-Gluconate-HEPES 溶液の混合液を使用した。抑制性ニューロンの記録には K-Gluconate-HEPES 溶液を KCl-HEPES 溶液に置換した。溶媒は超純水を用いた。

<ATP-GTP-stock-stock 溶液 (10×) の組成>

120 mM	Phosphocreatine disodium salt hydrate (Sigma-Aldrich)
3 mM	Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrat (Sigma-Aldrich)
40 mM	Adenosine 5'-triphosphate magnesium salt (Sigma-Aldrich)
500 units	Creatine-phosphokinase (Sigma-Aldrich)
6 mM	MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O

超純水で 10 mL にメスアップし、1.2 mL ずつ分注し冷凍保存した。pH は 7.48 に調節した。

<100mM K-EGTA-stock 溶液の組成>

100 mM Ethylene glycol-bis ( 2-aminoethylether ) -N,N,N ' ,N ' -tetraacetic acid (Sigma-Aldrich)

EGTA を上記濃度に調整し、冷凍保存した。pH は KOH を用いて 7.4 に調節した。

<K-Gluconate-HEPES 溶液の組成>

164.4 mM K-Gluconate (Sigma-Aldrich)

20 mM HEPES

超純水で 100mL にメスアップし、9mL ずつ分注し冷凍保存した。pH は 7.4 に調節した。

<KCl-HEPES 溶液の組成>

153 mM K-Gluconate (Sigma-Aldrich)

20 mM HEPES

• シナプス電流計測の操作手順

- ① 作製したオータプス培養標本カバーガラスをダイヤモンドペンで分割し、倒立顕微鏡の記録チャンバーに設置した。
- ② 内液を充填したパッチ電極をヘッドステージに設置し、マニピュレーターを用いて顕微鏡下でガラス電極を操作し、陽圧下でニューロンの細胞体表面に電極先端を近づけた。
- ③ 5 mV, 10 ms の矩形波を連続的に加え、矩形波の振幅が減少する（抵抗値が上がる）ことを確認後に陽圧を解除し、三方活栓につないだシリンジを吸引してパッチ電極内圧を陰圧にしながらパッチ電極と細胞表面にギガオームシールを形成した。
- ④ 膜電位を-70 mV に固定し、ギガ・シールになったことを確認後、シリンジを吸引して高陰圧を与え、パッチ電極下の細胞膜を破った。
- ⑤ 十分に細胞膜が破られたことを確認後、膜容量 (pF)、直列全抵抗値 (Rs) を補正した。
- ⑥ パッチ電極から次に示す条件刺激を与え、シナプス応答を基礎検討項目として計測した。

• 興奮性シナプス後電流 (Excitatory Postsynaptic current, EPSC)

保持電位-70 mV から 0 mV への脱分極パルス を 2 ms 与えると、発生した活動電位が軸索を伝導し、シナプス前末端部に達するとシナプス小胞からグルタミン酸が放出される。グルタミン酸がシナプス間隙に放出され、シナプス後膜上の AMPA 受容体に結合し活性化させると Na<sup>+</sup>イオン透過性が増加する。内向きに観察される

EPSC の振幅 (nA)、面積 (nC) は Na<sup>+</sup>イオン透過量を表し、グルタミン酸の放出量と正の相関を示す。

- 抑制性シナプス後電流 (Inhibitory Postsynaptic current, IPSC)  
保持電位 -70 mV から 0 mV への脱分極パルスを 2 ms 与えると、発生した活動電位が軸索を伝導し、シナプス前末端部に達するとシナプス小胞から GABA が放出される。GABA がシナプス間隙に放出され、シナプス後膜上の GABA<sub>A</sub> 受容体に結合し活性化させると Cl<sup>-</sup>イオン透過性が増加する。内向きに観察される IPSC の振幅 (nA)、面積 (nC) は Cl<sup>-</sup>イオン透過量を表し、GABA の放出量と正の相関を示す。
- 自発性興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC, mEPSC)  
薬液投与チューブを用いて、ニューロンにナトリウムチャンネル阻害薬である 0.5 μM のテトロドトキシン (TTX, Fujifilm Wako) を投与し、自発性の EPSC (mEPSC) の振幅 (pA)、頻度 (Hz) を測定した。尚、内向きに観察できる mEPSC 1 つはシナプス小胞 1 つが開口放出したことを意味する。
- 自発性抑制性シナプス後電流 (miniature IPSC, mIPSC)  
薬液投与チューブを用いて、ニューロンに 0.5 mM の TTX を投与し、自発性の IPSC (mIPSC) の振幅 (pA)、頻度 (Hz) を測定した。尚、内向きに観察できる mIPSC 1 つはシナプス小胞 1 つが開口放出したことを意味する。
- Readily Releasable Pool (RRP) size  
RRP とは、シナプス小胞が膜融合を受けて、いつでも開口放出ができる状態になったシナプス小胞群を意味する。薬液投与チューブを用いてニューロンに 0.5 M の高浸透圧 sucrose 溶液を 5 秒間投与し、内向きに観察される一過性のスクロース応答の面積を RRP サイズとした。
- シナプス小胞放出確率 (Vesicular release probability, [%])  
IPSC の面積を RRP の面積で除し、シナプス小胞の開口放出確率の指標とした。つまり、P<sub>vr</sub> は 1 回の刺激 (活動電位) によって開口放出されるシナプス小胞の比率を意味する。

#### 1-2-4 蛍光免疫染色法

蛍光免疫染色法を用いて抑制性プレシナプス及び樹状突起の形態解析を行った。オータプス培養標本を用いることによって 1 ニューロンあたりのシナプス形成数や突起伸

長、分岐数を解析することが可能となる。撮影した画像は、imageJ software (1.48v, Wayne Rasband, NIH, available at 230 <http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて解析を行った。使用した試薬の組成、一次抗体および二次抗体は以下に示す。

#### 【細胞固定液の組成】

4% -Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (NACALAI TESQUE) に対して 2% 濃度となるよう Sucrose を添加し使用した。

#### 【抗体溶液の組成】

0.1 M	Tris-base (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)
0.15 M	NaCl (Sodium Chloride)
0.1%	Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich)
2%	Normal Goat Serum (Abcam)

上記を混合し抗体溶液とした。溶媒には超純水を使用し、pH は HCl を用いて 7.4 に調整した。

#### 【細胞洗浄用 PBS 溶液】

Phosphate Bufferd Saline Powder (0.01 mol / L, pH7.2-7.4) (Fujifilm Wako) を超純水に溶解し、オートクレーブで滅菌し使用した。

#### 【一次抗体】

Anti-VGAT (Polyclonal rabbit antiserum) (Synaptic Systems)	1:500
Anti-MAP2 (Polyclonal Guinea pig antiserum) (Synaptic Systems)	1:1000

#### 【二次抗体】

Alexa Fluor 594 anti-rabbit (Invitrogen)	1:400
Alexa Fluor 488 anti-guinea pig (Invitrogen)	1:400

#### ・免疫染色の手順

- ① プレート内の培養標本カバーガラスを 1×PBS 溶液の入った 6 well プレートに移し 1 回洗浄した (2 mL / well)。

- ② 各 well に 4% PFA 溶液を入れて 20-30 分間静置し、固定した (2 mL / well)。
- ③ 各 well を 1×PBS 溶液で 3 回洗浄した (2 mL / well)。
- ④ ガラスをプレートからピンセットで取り出し、培養面ではない面に付着している液体を水に濡らしたクレシアで軽く拭き、乾いたクレシアで拭いた。
- ⑤ 一次抗体を抗体反応溶液で希釈し (VGAT = 1:500, MAP2 = 1:1000)、パラフィルムの上に 150  $\mu$ L 置き、培養面が接するようにピンセットでガラス標本を置いた。空気が混入していないことを確認し、一次抗体は 4°Cで一晩静置した。この時、標本が乾燥しないように水で濡らしたキムタオルを容器内に敷いた。
- ⑥ 1×PBS 溶液で 3 回洗浄した (2 mL / well)。
- ⑦ 二次抗体を抗体反応溶液で希釈し (Alexa Fluor 488, 594 共に 1:400)、⑤と同様の操作を行った。二次抗体反応は室温で 40 分間遮光静置した。
- ⑧ 1×PBS 溶液で 4 回洗浄した (2 mL / well)。
- ⑨ ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (life technologies) をスライドガラスに少量置き、その上に染色面が下になるようにガラスをゆっくり置いた。ガラスからはみ出した試薬はクレシアで軽く拭きとった。
- ⑩ 共焦点顕微鏡 LSM 710 ZEN (Carl Zeiss) を用いて蛍光観察を行った。Alexa Fluor 488 は 488 nm、Alexa Fluor 594 は 594 nm の励起を照射し、それぞれの蛍光波長を観察した。

#### 1-2-5 統計処理

2 群間の統計処理には、対応のない Student's t-test を使用した。結果は全て平均 $\pm$ 標準誤差で表記し、p 値が 0.05 以下である場合を有意差ありとした (\* p < 0.05, \* \* p < 0.01, \* \* \* p < 0.001)。

## 2 実験結果

### 2-1 *Scn1a* キックインマウスニューロンの興奮性シナプス解析

てんかん発作が発生する際、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、相対的にシナプス活動が過剰に興奮すると考えられる。すなわち、興奮性シナプス伝達の促進 and/or 抑制性シナプス伝達の低下である。そこでまず、WT と Het ニューロンにおける興奮性シナプス伝達をパッチクランプ法により測定した。興味深いことに、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 evoked EPSC の振幅は、WT と Het ニューロンで有意な差は認められなかった (WT,  $9.65 \pm 0.62$  nA,  $n = 104$ ; Het,  $10.25 \pm 0.69$  nA,  $n = 102$ , 図 2a, b)。

一方で、ナトリウムチャンネル阻害薬の  $0.5 \mu\text{M}$  TTX 投与による活動電位阻害状態で観察できる自発的な mEPSC の振幅も、WT と Het ニューロンで有意な差は認められなかった (WT,  $39.47 \pm 0.87$  pA,  $n = 104$ ; Het,  $38.15 \pm 0.71$  pA,  $n = 102$ , 図 2c, d)。加えて、興奮性シナプス神経終末部の機能に対する影響をみるために mEPSC の頻度を解析したが、両者に有意な差は認められなかった (WT,  $4.82 \pm 0.52$  Hz,  $n = 104$ ; Het,  $4.70 \pm 0.56$  Hz,  $n = 102$ , 図 2c, e)。

以上より、Het ニューロンの興奮性シナプス伝達において、神経終末部およびシナプス後膜の機能を含めて何らの変異はないことが分かった。

### 2-2 *Scn1a* キックインマウスニューロンの抑制性シナプス解析

Het ニューロンの興奮性シナプス伝達に変異がないことは (図 2)、てんかん発生時の興奮性と抑制性の E/I バランスの観点から、Het ニューロンの抑制性シナプス伝達が低下している可能性を彷彿させる。次の実験では、Het ニューロンの抑制性シナプス伝達を詳細に解析することにした。実験は、線条体から得られた抑制性ニューロンを用いて、抑制性シナプス伝達をパッチクランプ法にて測定した。

予測した通り、活動電位によって惹起される抑制性シナプス伝達、すなわち evoked IPSC の振幅は、WT と比べて Het ニューロンで有意な減少が認められた (WT,  $7.94 \pm 0.55$  nA,  $n = 96$ ; Het,  $6.18 \pm 0.42$  nA,  $n = 98$ , 図 3a, b)。一方で、TTX 投与による活動電位阻害状態で観察できる自発的な mIPSC の振幅は、WT と Het ニューロンの間で有意な差はなかった (WT,  $26.94 \pm 0.80$  pA,  $n = 95$ ; Het,  $26.70 \pm 0.86$  pA,  $n = 96$ , 図 3c, d)。

活動電位によって惹起される IPSC の振幅が縮小したにもかかわらず自発的な mIPSC の振幅は変わらなかったことから、抑制性シナプス伝達においてシナプス後膜



ではなくシナプス前神経終末部の機能に何らかの影響があったと考えられる。この原因の一つの可能性として、シナプス小胞開口放出の減少が挙げられる。そこでシナプス前神経終末部に対する影響をみるため、ナトリウムチャンネル阻害薬の  $0.5 \mu\text{M}$  TTX 存在下にて自発的な mIPSC の頻度を解析した。結果、WT と比べて Het ニューロンで減少傾向はあったものの、有意な低下ではなかった (WT,  $1.85 \pm 0.25$  Hz,  $n = 95$ ; Het,  $1.50 \pm 0.21$  Hz,  $n = 96$ , 図 3c, e)。

以上より、Het ニューロンの抑制性シナプス伝達は、シナプス前神経終末部の機能低下によって減少する可能性が示唆された。

### 2-3 *Scn1a* キックインマウスニューロンの抑制性シナプス伝達のメカニズム

Het ニューロンの mIPSC の頻度が有意な低下を示さなかったことから、シナプス前神経終末部の機能が低下したかどうかは明確ではない。そこで、開口放出可能なシナプス小胞のサイズ (Readily releasable pool, RRP) を測定した。実験は、一過性高浸透圧刺激 ( $0.5 \text{ M}$  sucrose) を用いた。結果、RRP サイズには有意な差は認められなかった (WT,  $1.91 \pm 0.12$  nC,  $n = 91$ ; Het,  $1.92 \pm 0.12$  nC,  $n = 92$ , 図 4a, b)。一方で、シナプス小胞の開口放出確率 (Vesicular release probability, Pvr) は、WT と比べて Het ニューロンで有意な減少が認められた (WT,  $29.99 \pm 2.31\%$ ,  $n = 91$ ; Het,  $24.01 \pm 1.66\%$ ,  $n = 92$ , 図 4c)。

さらに、抑制性シナプス伝達が低下していたことから、1つのニューロンが保有する抑制性シナプス数が減少している可能性がある。そこで WT、Het ニューロンの抑制性シナプス数を免疫染色法にて測定した。線条体ニューロンには少量ながら興奮性ニューロンが混在しているため、実験には抑制性ニューロンに特異的である VGAT 抗体を使用した。VGAT 抗体によって染色された puncta を抑制性シナプスとして計測した。結果、WT のニューロンに比べ、Het ニューロンでは GABA シナプス数が有意に減少していた (WT,  $152.23 \pm 7.91$ ,  $n = 70$ ; Het,  $117 \pm 10.61$ ,  $n = 74$ , 図 4d, e)。

以上より、Het ニューロンの抑制性シナプス伝達の減少は、開口放出確率の低下が及び抑制性シナプス数の低下が原因であることが明らかとなった。

### 2-4 *Scn1a* キックインマウスニューロンにおける抑制性シナプス開口放出低下のメカニズム

活動電位の発生によって神経終末部は脱分極し、それに伴って細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  が神経終末部に流入することによって神経伝達物質は開口放出される。すなわち、Het ニューロンの抑制性シナプス伝達における開口放出確率が低下した原因として、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  に対する感受性の低下が考えられる。そこで、実験的に細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ) を

0.5 mM、1 mM、2 mM、4 mM、8 mM と変化させ、その時に惹起させた evoked IPSC の振幅の相対的变化を 8 mM を基準とし、Hill の式に当てはめて解析した (Rhee et al., 2005)。結果、Het ニューロンでは、グラフが左にシフトしたことから (図 5a, b)、Het ニューロンは予想に反して  $\text{Ca}^{2+}$  に対する感受性が高いことが明らかとなった。また、Hill の式によって算出した Kd 値は解離定数であり、その逆数は結合定数となるため、今回はイオンの透過性と近似できる。一方で、Hill 係数はイオンとの協調性を示す。WT ニューロンと比較して Het ニューロンでは Kd 値は約 1/3 に低下しており (WT,  $0.60 \pm 0.05$  mM,  $n = 35$ ; Het,  $0.18 \pm 0.10$  mM,  $n = 36$ )、Hill 係数は増加していた (WT,  $1.34 \pm 0.15$ ,  $n = 35$ ; Het,  $2.03 \pm 0.89$ ,  $n = 36$ )。よって、Het ニューロンは WT よりも  $\text{Ca}^{2+}$  との親和性、協調性共に高い性質であることが明らかとなった。

以上より、Het ニューロンにおける抑制性シナプス開口放出低下のメカニズムとして、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する感受性の低下が原因でなく、むしろ細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する感受性が高いことが明らかとなった。

## 2-5 高濃度細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ における *Scn1a* キックインマウスニューロンの E/I バランス

Het ニューロンの抑制性シナプスにおいて  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が高いことを踏まえ、*Scn1a* 変異によってニューロンの  $\text{Ca}^{2+}$  応答に何らかの変化が生じたと予測できる。てんかん発作は、神経終末部に  $\text{Ca}^{2+}$  が過剰に流入し神経過活動となることで生じることから、 $[\text{Ca}^{2+}]_o$  を高くすることで、疑似的にてんかん発作状態となり、通常時にもまして E/I バランスの崩壊がみられると予想した。そこで、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を 2 mM から 8 mM へと変化させた時の、興奮性、抑制性シナプス伝達の倍率を求めた (興奮性ニューロン;  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  8 mM EPSC /  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  2 mM EPSC, 抑制性ニューロン;  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  8 mM IPSC /  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  2 mM IPSC)。結果、興奮性ニューロンにおいて、EPSC の倍率は、WT と Het ニューロンで有意な差は認められなかった (WT,  $1.45 \pm 0.07$ ,  $n = 62$ ; Het,  $1.48 \pm 0.07$ ,  $n = 64$ , 図 5c, d)。一方、抑制性ニューロンにおいて、IPSC の倍率は、WT と比べて Het ニューロンで有意な低下が認められた (WT,  $1.36 \pm 0.09$ ,  $n = 35$ ; Het,  $1.02 \pm 0.04$ ,  $n = 36$ , 図 5e, f)。

以上より、Het ニューロンにおいて、 $[\text{Ca}^{2+}]_o$  を高濃度にすると、通常時にもまして E/I バランスの崩壊がみられた。

### 3 小括

脳の神経細胞はネットワークを形成しており、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一因である。よって、興奮性伝達が上昇するか、もしくは抑制性シナプス伝達が低下して E/I バランスが変化することを予測していた。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。しかしながら、抑制性シナプス伝達は有意に低下していた。興奮性シナプス伝達に差が見られなかった原因として、Nav1.1 の分布が影響していると考えられる。Nav1.1 は中枢におけるニューロンの細胞体に多く発現していると報告されている (Westenbroek et al., 1989, Ong et al., 1999)。Nav1.1 は生後 10 日目 (P10) から徐々に発現するようになり、P18 以降では顕著に発現する (Ogiwara et al., 2007)。しかし、海馬の興奮性ニューロンでは Nav1.1 の発現は極めて低い (Ogiwara et al., 2007)。これらの研究背景から、Nav1.1 変異マウスでは P14 から P20 の脳スライス標本が実験に使用されてきた (Hedrich et al., 2014)。さらに、Dravet 症候群モデルマウスの P13-14 では、抑制性ニューロンにおいて Na<sup>+</sup>電流の脆弱性が確認された (Yu et al., 2006)。一方、in vitro では、培養 14 日 (Kim et al., 2011)、さらには培養 7-9 日で Nav1.1 の発現が確認されている (Chen et al., 2020)。Nav1.1 の発現時期が in vivo と in vitro で大きな差がないことを考慮すると、本研究で用いた標本では 13-16 日で Nav1.1 が発現していると推測される。本研究では Nav1.1 の発現を確認していないが、今回の電気生理学的結果は海馬の興奮性ニューロンに Nav1.1 が発現しないという報告を支持するものであった。また、*Scn1a* 欠損マウスでは抑制性ニューロンの機能に異常が見られることも報告されており (Yu et al., 2006)、本研究結果と一致する。しかしながら、in vivo において、*Scn1a* 遺伝子の変異により、抑制性ニューロンのみならず興奮性ニューロンにも異常をきたすことがある (Gu et al., 2014)。

一方で、*Scn1a* 変異マウスの脳スライス標本を用いた実験では、抑制性ニューロンのシナプス伝達が増大することが報告されている (DeStasi et al., 2016)。本研究では線条体から単離した抑制性ニューロンを用いてオートプス培養標本を作製し実験に使用した。したがって、Dravet 症候群の抑制性シナプス伝達の特徴は脳の領域によって異なる可能性がある。特に、De Stasi らの報告にあるように、複数の細胞が存在することで何らかの恒常性が生じている可能性がある (DeStasi et al., 2016)。生体内では、興奮性、抑制性ニューロンのみならず、カテコールアミン作動性、コリン作動性など様々なニューロンでネットワークが構成されている。そのため、脳スライス標本では周囲のニューロンからシナプス入力をうけている。一方、本研究で用いたオートプス培養標本は、他のニューロンからのシナプス入力がなく、mass culture のニューロンとは特性

が異なることがある (Mennerick et al., 1995; Liu et al., 2009; Liu et al., 2013)。このことを踏まえ、今後の研究では興奮性入力と抑制性入力混在する神経ネットワークにおいてどうなるか調べる必要がある。

Het ニューロンの抑制性シナプス伝達の減少は、開口放出確率の低下、及び抑制性シナプス数の減少が原因であった。全てのシナプスが持つシナプス小胞の合計数は WT ニューロンと Het ニューロンで差はないが、GABA シナプス数は Het ニューロンにおいて有意に減少していたことから、シナプス 1 つあたりの小胞数は WT に比べ Het ニューロンの方が多いと考えられる。

一方で、Het ニューロンの開口放出確率が低下したのは、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  に対する感受性の低下が原因と考えた。しかし結果は予想に反していた (図 5a)。よって他のメカニズムの関与として、神経終末部に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  の tethering system に何らかの影響があったのかもしれない。例えば、Synaptotagmin はシナプス開口放出における  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとして知られている (Fernández et al., 2001)。故に Het ニューロンの神経終末部において、Synaptotagmin の機能に何らかの影響があった可能性も考えられる。

一般的に、てんかん発作は細胞外から多量の  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、神経が過剰興奮することで発生する。近年、ドラベ症候群モデル動物においても同様に、てんかん発作時に多量の  $\text{Ca}^{2+}$  が流入することが解っている (Brenet et al., 2019)。本研究では細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を増大させることで、疑似的にてんかん発作を再現した。Het ニューロンにおいて、疑似てんかん発作時には通常時にもまして E/I バランスの崩壊がみられた。本研究で使用したモデルマウスは Nav1.1 をエンコードする *Scn1a* のみに変異を与えているにもかかわらず Het ニューロンの  $\text{Ca}^{2+}$  応答に変化があった。その理由の一つとして、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの発現が関与している可能性がある。SCN1A 変異によって  $\text{Na}^{+}$  チャネルのみならず他のイオンチャネルの発現が変化することが知られている (Shi et al., 2018)。したがって *Scn1a* 変異によって  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに何らかの変化が起き、Het ニューロンにおける  $\text{Ca}^{2+}$  応答の変化につながったのではないかと予想する。

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を誘導し、活動電位が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)を実験的に負荷すれば、Het マウスの興奮性ニューロンでも何らかの変異が見えるかもしれない。

一方、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。細胞レベルにおいて、細胞内  $\text{Cl}^{-}$  濃度は幼若期において高く、成熟すると

低くなる (Luhmann et al., 1991, hen et al., 1996, akazu et al., 1999)。つまり、幼若期においては、GABA 作動性入力起きると GABA<sub>A</sub> 受容体を介して Cl<sup>-</sup>は細胞外に流出することから、細胞は脱分極する。このこともけいれん易発性を助長するメカニズムの一つに挙げられるであろう。

以上のことから、*Scn1a* キックインマウスでは抑制性シナプス機能低下によって E/I バランスが破綻していることが明らかとなった。

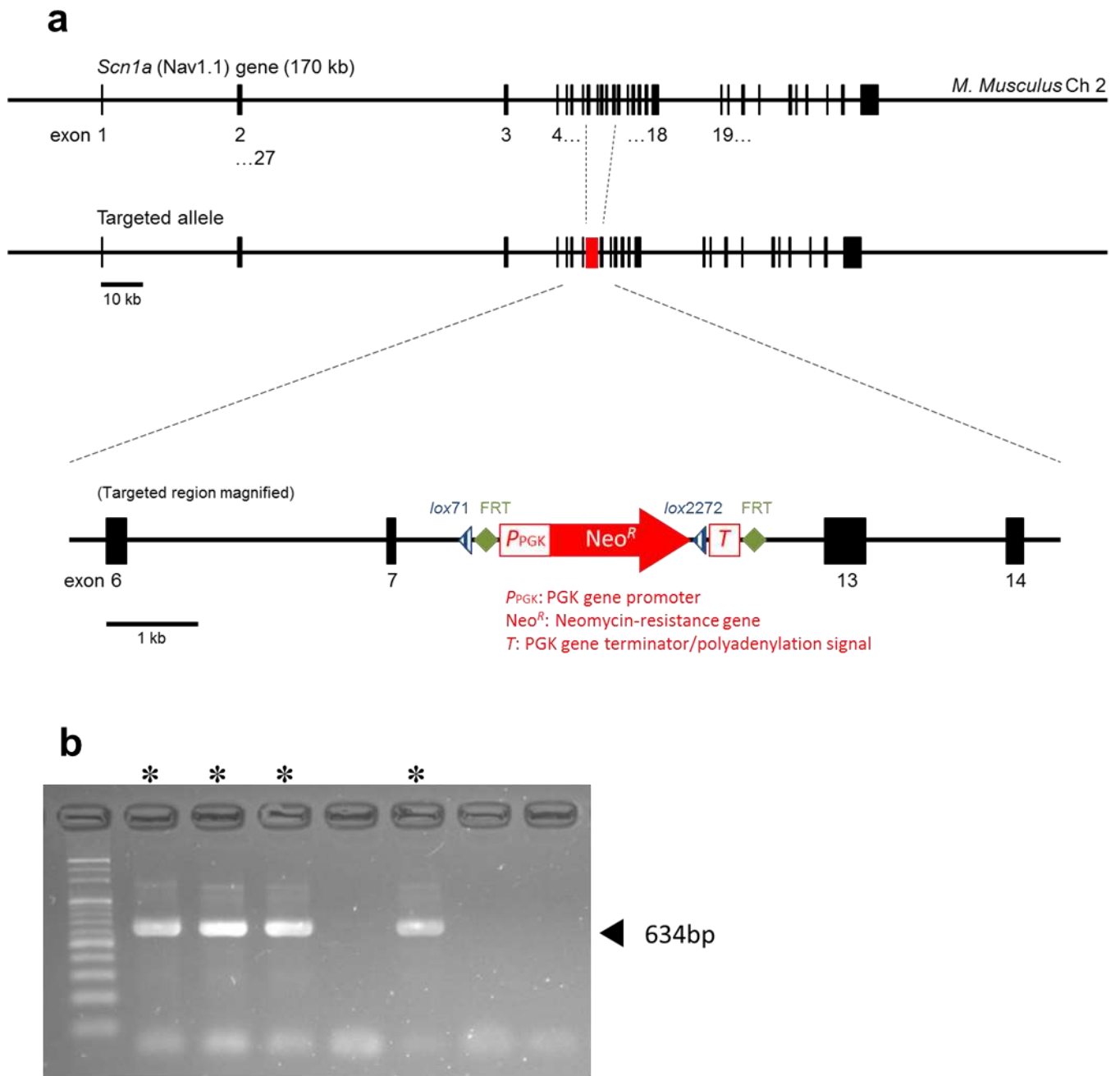


図1 *Scn1a*キックインマウスのターゲティング

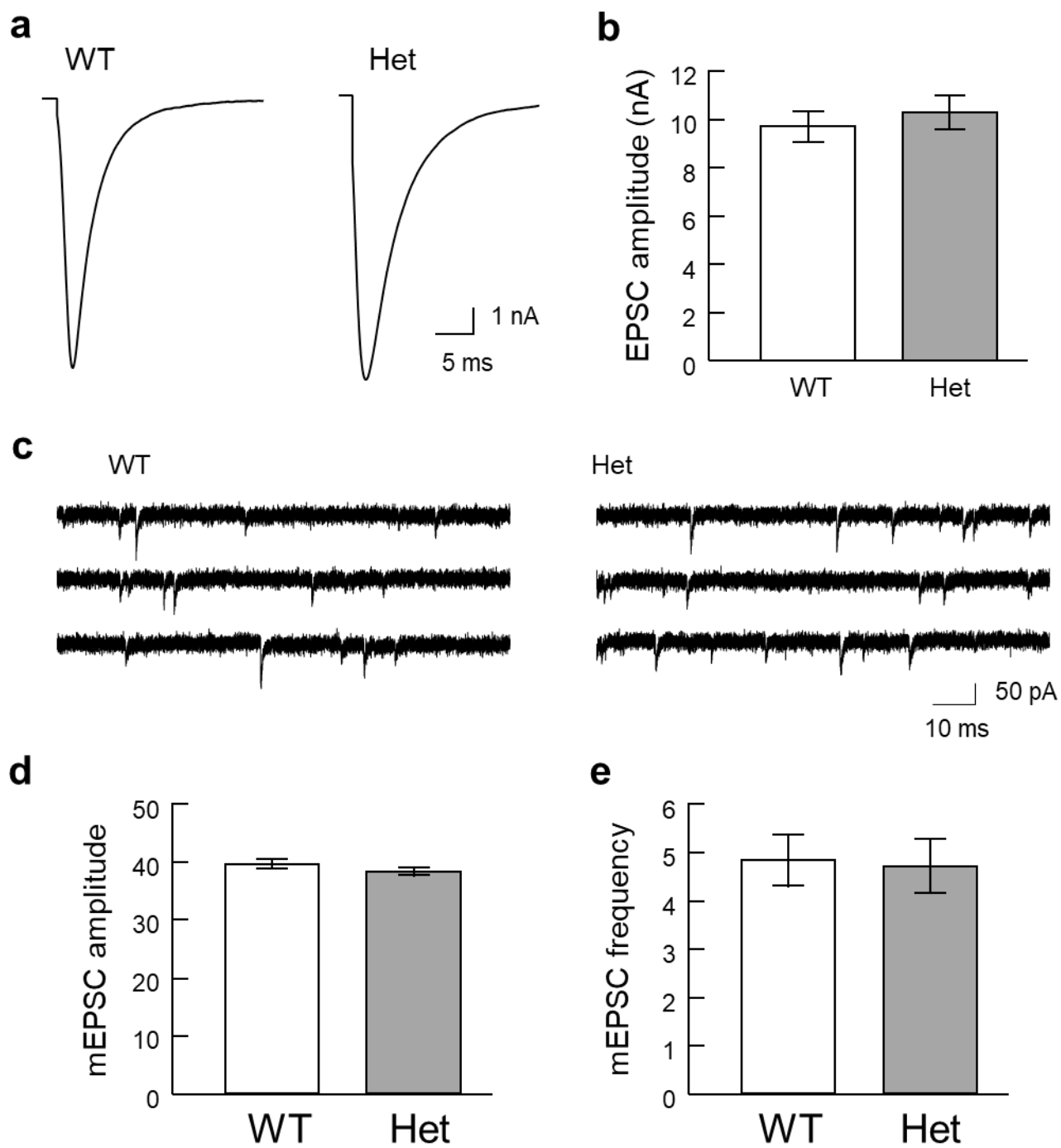


図2 *Scn1a*キックインマウスの興奮性シナプス解析

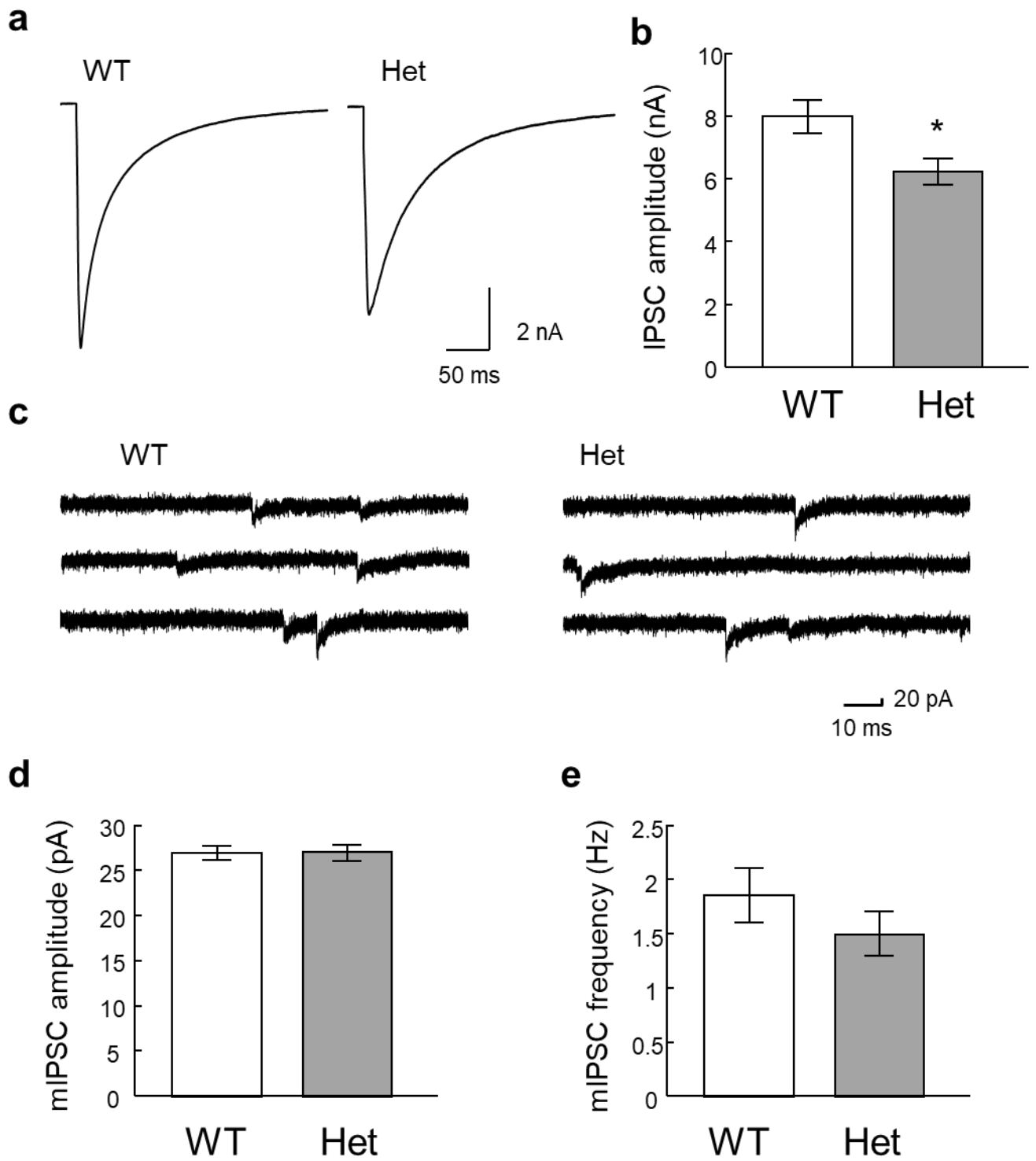


図3 *Scn1a*キックインマウスの抑制性シナプス解析



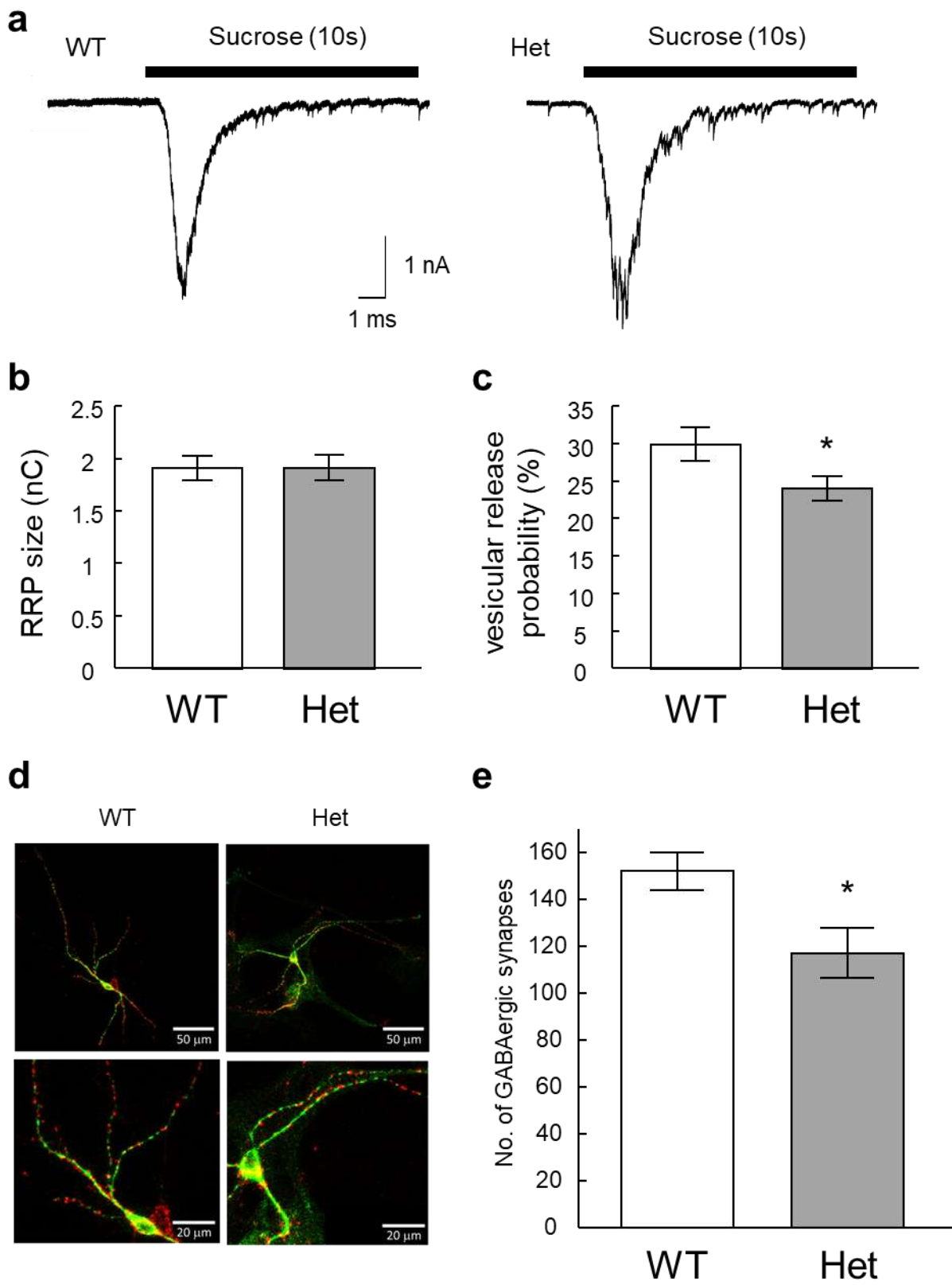


図4 *Scn1a*キックインマウスニューロンの抑制性シナプス伝達のメカニズム

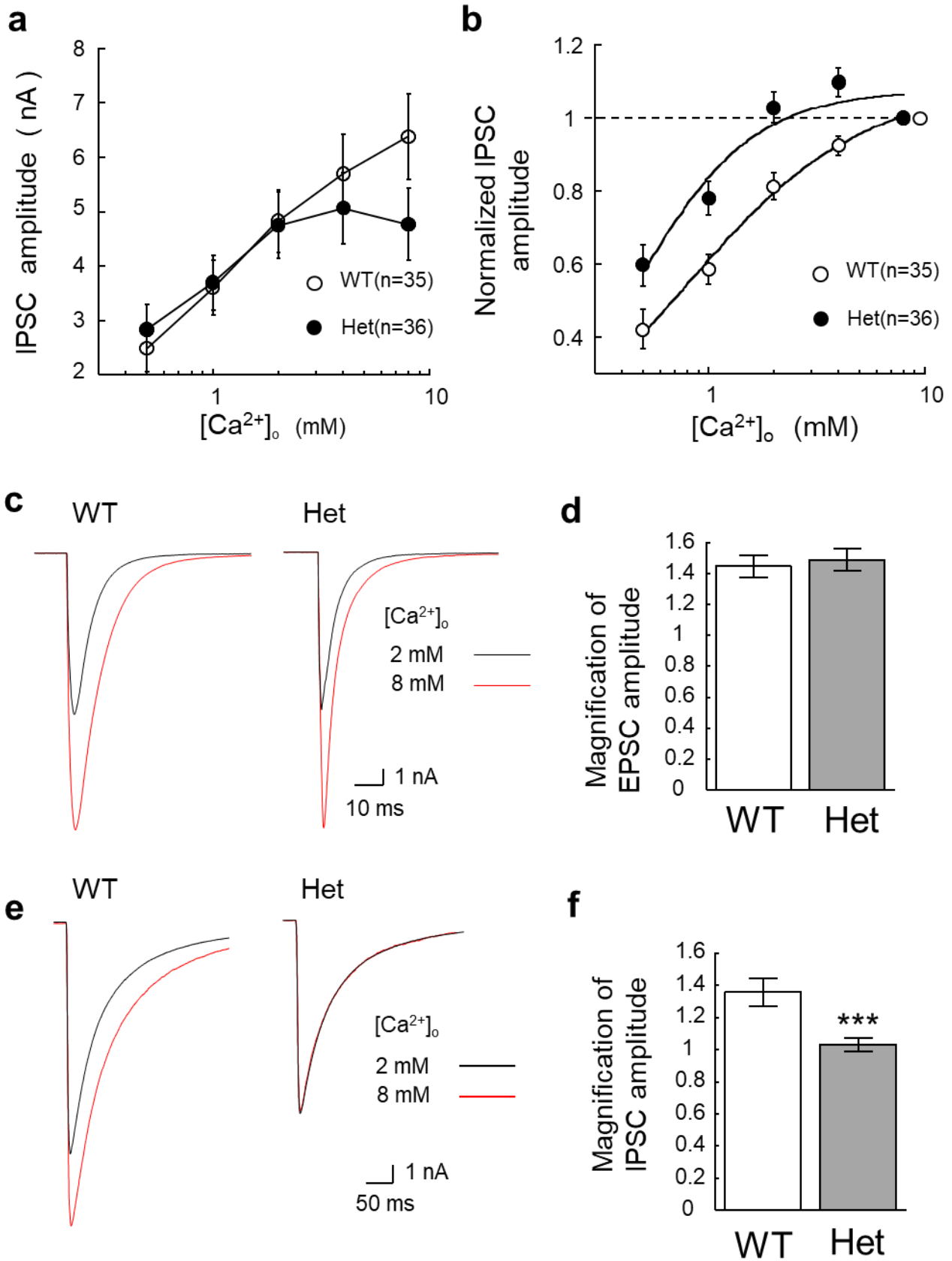


図5 *Scn1a*キックインマウスニューロンにおける $Ca^{2+}$ 応答

## 第2章 *Scn1a* キックインマウスアストロサイトの $\text{Ca}^{2+}$ 発火解析

### 1 実験材料ならびに実験方法

#### 1-1 実験動物

本章に用いた実験動物は第1章 1-1 と同様の *Scn1a* キックインマウスである。

#### 1-2 実験方法

##### 1-2-1 PCR 法を用いた実験動物の genotyping

第1章 1-2-1 と同様の手順で *Scn1a* キックインマウスの genotyping を行った。

##### 1-2-2 アストロサイト初代培養作製手順

- ① 第1章 1-2-2①-⑧と同様の手順でアストロサイトを作製した。ただし Het マウスから生まれた仔（生後 0-1 日中）を用いた。
- ② 第1章 1-2-2⑨-⑫と同様の手順でアストロサイトを単離し、細胞数を数えた。
- ③ カウント数をもとに、あらかじめコーティングを施したカバーガラスを置いた 6 well プレートに 1 well あたり細胞数が 75000 個となるように、培養アストロサイトを播種し 7-8 日培養した。メディウムはアストロサイト初代培養に用いた 10% FBS 溶液とし、1 well あたり 2 mL 入れた。

##### 【カバーガラスのコーティング】

1. 質量分率 65%の硝酸を用いてカバーガラス (Matsunami, 22 mm 丸型 No.1) を数時間攪拌洗浄し、蒸留水で一晩攪拌洗浄し脱脂処理を施した。
2. 上記により脱脂処理したカバーガラスをピンセットで 1 枚ずつ 6 well プレートに置き、UV ランプを 20 分照射し殺菌した。殺菌後は室温にて一晩乾燥させた。
3. 2 mg / mL Collagen I, rat tail (BD Biosciences)、1 mg / mL Poly-D-Lysine hydrobromide (Sigma-Aldrich) 溶液を 1:1 で混合しコーティング液とし、6 well プレート内のカバーガラス表面に塗布した。
- ④ アストロサイト 6 well プレート培養開始後 7-8 日目に、Oregon Green BAPTA-1, AM 蛍光染色法、Fluo4-AM 蛍光染色法にてアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  活性の解析を行った。

### 1-2-3 Oregon Green BAPTA-1, AM 蛍光染色法

#### 【Oregon Green BAPTA-1, AM のストック調整】

Oregon Green BAPTA-1, AM (Thermo Fisher) は 1 mM ストックを作製するため Pluronic F-127 (50  $\mu\text{g}$  / 39.7  $\mu\text{L}$ ) で用時溶解した。

#### • Oregon Green BAPTA-1, AM 染色の手順

- ① Oregon Green BAPTA-1, AM のストックから 20  $\mu\text{L}$  をとり最終濃度が 10  $\mu\text{M}$  となるように 2 mL の OPTI-MEM に添加した。well 内のカバーガラスをチャンバーに移しかえ、10  $\mu\text{M}$  の Oregon Green BAPTA-1, AM を添加した。
- ② 60 分間インキュベーター内で Oregon Green BAPTA-1, AM を取り込ませた。また、インキュベーター内に設置 40 分後に Nuc-Blue (2 drops / 1 mL) を滴下し 20 分取り込ませた。
- ③ チャンバー内の液を吸引し、1×BASE<sup>+</sup>溶液 2 mL を添加し再度吸引した。これを数回繰り返す、過剰な Oregon Green BAPTA-1, AM を washout した。

#### • 撮影時のプロトコール

LED 光源と CCD camera を同期させ撮影を行った。Oregon Green BAPTA-1, AM は 494 nm の励起光を照射し、523 nm の蛍光波長を観察した（露光時間 500 ms、撮影間隔 1000 ms、撮影枚数 600 枚）。

#### • 画像解析のプロトコール

- ① ImageJ を用いて 画像の背景ノイズを削除した。
- ② 閾値により核と背景を分割した。閾値で分けられた注目部分は黒色で、背景は白で表した。
- ③ 閾値設定された画像で、対照物の数値を変え計測した。このとき、対象物のサイズとして 100 pixel 以上のユニットを 1 つの核とみなし、核の情報を ROI Manager に登録した。
- ④ 作成した核の ROI をスタック画像に当てはめ、Intensity 変化を測定した。
- ⑤ それぞれの核におけるスタック画像内の Intensity の最大値を Axograph に移しグラフ化した。
- ⑥ Axograph にてグラフを相対化し、その最大値を求めた（最大相対強度）。相対化したグラフを微分したグラフを作成し、その最大値を求めた（微分強度）。

### 1-2-4 Fluo-4, AM 蛍光染色法

- Fluo4-AM のストック調整

Fluo4-AM (Thermo Fisher) は DMSO で溶解し 1 M となるようにストックを作製し、5.62  $\mu\text{L}$  ずつ分注した。分注したものに Pluronic F-127 (Invitrogen) 2.56  $\mu\text{L}$  を加えて用時溶解した。

【チャンバー内を還流する細胞外液の組成】

1400 mM	NaCl
24 mM	KCl
100 mM	HEPES
100 mM	0.5 M EDTA
20 mM	CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O
10 mM	MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O

pH は Tris-base を用いて 7.5 - 7.6 に調節した。

- Fluo4-AM 染色の手順

- ① well 内のカバーガラスをチャンバーに移しかえた。そのチャンバーに、Fluo4-AM を用時溶解したものと OPTI-MEM を 2 mL 添加し最終濃度が 2.55  $\mu\text{M}$  となるように添加した。
- ② 60 分間インキュベーター内で Fluo4-AM を取り込ませた。また、インキュベーター内に設置 40 分後に Nuc-Blue (2 drops / 1 mL) を滴下し 20 分取り込ませた。
- ③ チャンバー内の液を吸引し、1 × BASE+ 溶液 2 mL を添加し再度吸引した。これを数回繰り返し、過剰な Fluo4-AM を washout した。

- 撮影時のプロトコール

LED 光源と CCD camera を同期させ撮影を行った。Fluo4-AM は 495 nm の励起光を照射し、518 nm の蛍光波長を観察した（露光時間 100 ms、撮影間隔 1000 ms、撮影枚数 360 枚）。約 40-70 枚目の 30 秒間 1  $\mu\text{M}$  の ATP をバルブコントローラーにて還流した。

【1  $\mu\text{M}$  ATP の調整】

ATP (SIGMA-ALDRICH) を超純水で溶解し 100 mM となるようにストックを作製した。そのストックを 1 × Base+ にて 1  $\mu\text{M}$  となるように用時溶解した。

- 画像解析のプロトコール

- ① 1-2-3 画像解析のプロトコールの①-⑤と同様の手順で Intensity の最大値を Axograph に移しグラフ化した。
- ② それぞれの核の intensity (F) を ATP 添加前の intensity ( $F_0$ ) で割り相対化した ( $F/F_0$  graph)。F/F<sub>0</sub> graph で ATP 添加時における最大値 (最大相対強度)、及びグラフの面積 (AUC) を求めた。さらに、F/F<sub>0</sub> graph を微分したグラフを作成し、その最大値を求めた (微分強度)。

#### 1-2-5 統計処理

2 群間の統計処理には、対応のない Student's t-test を使用した。結果 は全て平均±標準誤差で表記し、p 値が 0.05 以下である場合を有意差ありとした (\*  $p < 0.05$ , \* \*  $p < 0.01$ , \* \* \*  $p < 0.001$ )。

## 2 実験結果

### 2-1 アストロサイトの自発的 Ca<sup>2+</sup>発火

アストロサイトは Ca<sup>2+</sup>発火を伴いながら神経細胞や他のグリア細胞同士で神経伝達物質やイオン濃度を制御している。てんかんでは多くの神経伝達物質やイオン濃度に異常が起きていることから、Het アストロサイトでは Ca<sup>2+</sup>発火に変化が生じると予想した。そこで先ず、大脳皮質から得られた培養アストロサイトを用いて、自発的 Ca<sup>2+</sup>発火の相対強度について解析した。興味深いことに、アストロサイトの自発的 Ca<sup>2+</sup>発火において、最大相対強度は WT と Het アストロサイトで有意な差は認められなかった (WT, 19.87±1.83%, n = 123; Het, 22.76±1.25%, n = 214, 図 6a, b, c)。Ca<sup>2+</sup>発火における波形をより詳細に解析するために、自発的 Ca<sup>2+</sup>発火の波形を微分し、波の傾きについて解析を行った。結果、最大微分強度は Het アストロサイトにおいて有意に増加した (WT, 797.51±143.14  $\Delta$ Int /  $\Delta$ t, n = 98; Het, 2795.96±481.29  $\Delta$ Int /  $\Delta$ t, n = 179, 図 6d, e)。

以上のことから、Het アストロサイトにおいて自発的に流入する Ca<sup>2+</sup>の流入量に変化はないが、Ca<sup>2+</sup>の流入速度は増加したことが解った。

### 2-2 アストロサイトの誘発的 Ca<sup>2+</sup>発火

てんかん病態では外部刺激が引き金となり、神経細胞が過剰興奮することで、てんかん発作を起こすことがある。そこで、ATP (1 mM) にてアストロサイトを刺激し、誘発的 Ca<sup>2+</sup>発火の記録を行った。

F/F<sub>0</sub> graph において、波形の面積である AUC はアストロサイトの核内に入出入りする Ca<sup>2+</sup>量を表している。誘発的 Ca<sup>2+</sup>発火の AUC は WT と Het アストロサイトで有意な差は認められなかった (WT, 49.54±9.81 a.u., n = 74; Het, 47.32±4.89 a.u., n = 125, 図 7a, b, c)。一方で、最大相対強度は Het アストロサイトにおいて有意に増加した (WT, 46.51±7.76%, n = 64; Het, 86.39±6.49%, n = 114, 図 7a, b, d)。このことから、アストロサイトにおける誘発的 Ca<sup>2+</sup>発火の波形の面積は両者とも同じだが、Het アストロサイトでは波の高さが高いため、鋭い波形になることが考えられる。そこで、波形を微分することで、波の傾きについて解析を行った。その結果、最大微分強度は Het アストロサイトにおいて有意に増加した (WT, 601.06±190.19  $\Delta$ Int /  $\Delta$ t, n = 64; Het, 1154.51±140.67  $\Delta$ Int /  $\Delta$ t, n = 114, 図 7e, f)。

以上のことから、Het アストロサイトにおいて誘発的的刺激により出入りする Ca<sup>2+</sup>の総量に変化はないが、一時的な Ca<sup>2+</sup>流入量、及び流入速度は増加したことが解った。

### 3 小括

アストロサイトは  $\text{Ca}^{2+}$  発火を伴いながら神経細胞や他のグリア細胞同士で神経伝達物質やイオン濃度を制御している。てんかんでは多くの神経伝達物質やイオン濃度に異常が起きていることから、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  発火に差異が生じると予想した。結果、自発的に流入する  $\text{Ca}^{2+}$  の一時的流入量に変化はないが、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入速度は増加した。一方で、誘発的的刺激により出入りする  $\text{Ca}^{2+}$  の総量に変化はないが、一時的な  $\text{Ca}^{2+}$  流入量、及び流入速度は増加した。このことから、Het アストロサイトでは、 $\text{Ca}^{2+}$  発火が亢進することが明らかとなった。アストロサイトの自発的  $\text{Ca}^{2+}$  発火は細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みによるものと考えられており、誘発的  $\text{Ca}^{2+}$  発火は Gq protein coupled receptors の活性化を経由した小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$  の遊離によるものと考えられている (Agulhon et al., 2008)。本研究において、Het アストロサイトでは自発的及び誘発的  $\text{Ca}^{2+}$  発火の両方が亢進していたことから、両カスケードの機能が亢進している可能性が考えられる。

一方で、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  発火によって放出される主要な興奮性の神経伝達物質の一つにグルタミン酸がある。アストロサイトは metabotropic glutamate receptors (mGluRs) を介してグルタミン酸を放出することで、脳内のグルタミン酸の量を調節している。近年の報告で、てんかんモデルマウスのアストロサイトにおいて mGluRs の発現が増加しており (Aronica et al., 2000)、脳内に過剰なグルタミン酸を放出することで、てんかん発作を助長していることが示唆されている (Carmignoto et al., 2012)。一方で、 $\text{Ca}^{2+}$  発火に伴って放出される ATP は、アデノシンへと分解されシナプス前神経終末部に存在する A1 受容体を介して、神経細胞に抑制的作用を与えることで、てんかん発作を抑制することが示唆されている (Nikolic et al., 2020)。以上のことから、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  発火の増強がてんかん発作を増悪させているのか、それとも発作を抑制しているのか現時点では分からない。しかしながら、本研究によって Dravet 症候群の病態にはニューロンだけでなくアストロサイトも関与している可能性が示唆された。



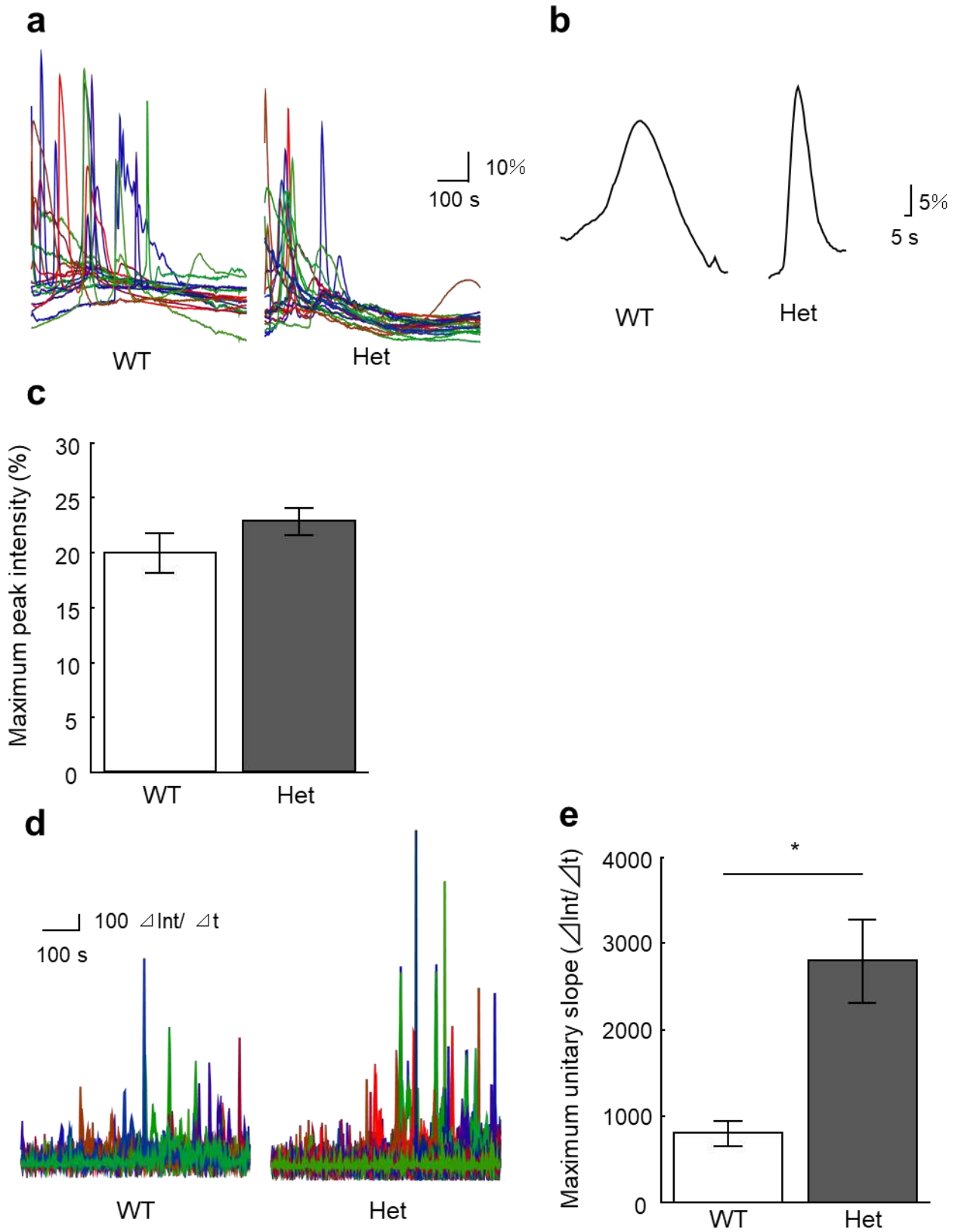


図6 *Scn1a*キックインマウスアストロサイトにおける自発的Ca<sup>2+</sup>発火

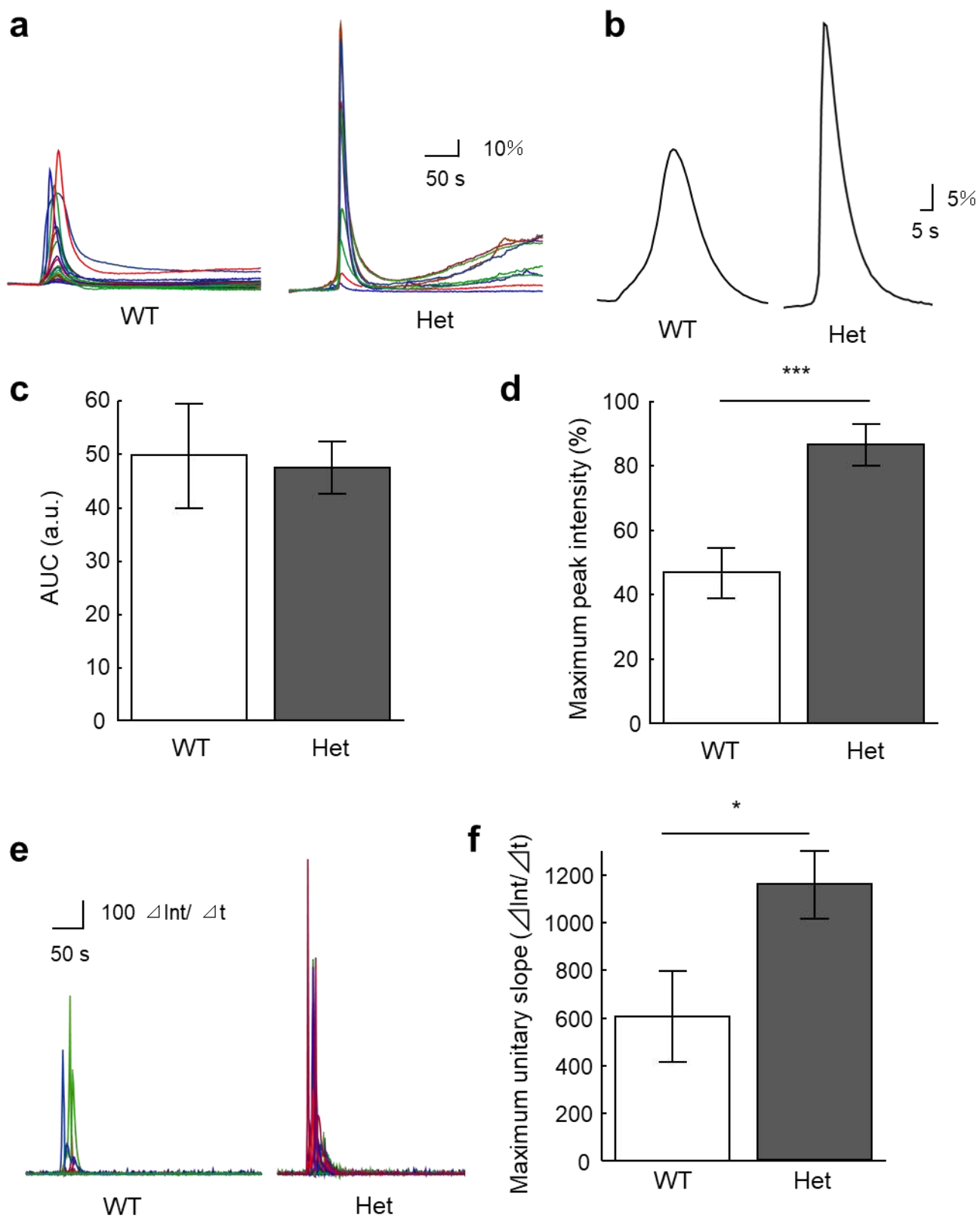


図7 *Scn1a*キックインマウスアストロサイトにおける誘発的Ca<sup>2+</sup>発火

### 第3章 ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本の確立

#### 1 実験材料ならびに実験方法

##### 1-1 実験動物

本章に用いた実験動物は第1章 1-1 と同様の ICR マウスである。実験動物の取り扱いに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、動物実験実施の承認 (No. 1912103) を得て行った。

##### 1-2 実験方法

###### 1-2-1 アストロサイトの分化誘導方法

ヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞である long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells (Lt-NES) からヒトアストロサイトへと分化誘導した。以下にその手順を示す。尚、Lt-NES は福岡大学医学部てんかん分子研究所より分与されたものを用いた。

- ① 25 cm flask にセミコンフルエントの Lt-NES を準備する。
- ② flask 内の Lt-NES 培地を除去し、37°C に温めた Trypsin/EDTA 溶液を 3 mL 加え、インキュベーター内で 3 分間反応させた。
- ③ flask 底面に接着した Lt-NES をピペッティングで剥離させ、細胞が単離されていることを顕微鏡下で確認した後、50 mL チューブに全量移した。
- ④ 50 mL チューブに Trypsin Inhibiter を 3 ml 加え、Trypsin/EDTA 溶液の酵素活性を止めた。
- ⑤ 細胞懸濁液を 1000 rpm で 3 分間遠心分離した後、上清を吸引除去して Astrocyte Induction Medium を 1 mL 加え、ブルーチップで細胞塊を攪拌単離した。Astrocyte Induction Medium の組成は以下の通りである。

500 mL	DMEM/F12 (Sigma-Aldrich)
5 mL	GlutaMax (Invitrogen)
5 mL	N2 supplement (Invitrogen)
10 mL	B27 minus vitamin A (Invitrogen)
10 ng / ml	LIF (Sigma-Aldrich)
10 ng / ml	EGF (PeproTech)

- ⑥ 細胞懸濁液を 10  $\mu$ L 採取し、Cell Counter で細胞の数を数え、予め準備しておいた Matrigel でコーティングした 25 cm flask に  $5 \times 10^5$  cells の細胞を播種した。メディアウムは Astrocyte Induction Medium を 5 mL 入れ、14 日間培養した。その間、培地は 3 日に 1 回全量交換した。

#### 【Matrigel コーティング】

1. Matrigel 基底膜マトリックス (Matrigel, Corning) を冷蔵庫内 (4°C) で解凍した。
  2. 無結成培地で Matrigel を 50 倍に希釈した。
  3. 希釈した Matrigel をコートするプレートやフラスコの培養表面を覆うのに十分な量添加し、インキュベーター内で 1 時間以上インキュベートした。
  4. 結合しなかった溶液を吸引し、無結成培地で 1-2 度洗浄した。
- ⑦ Astrocyte Induction Medium で 14 日間培養した細胞を②-⑥と同様の手法で回収した。ただし、遠心分離後の細胞塊の攪拌には Astrocyte Maturation Medium を使用した。Astrocyte Maturation Medium の組成は以下の通りである。

500 mL	DMEM/F12 (Sigma-Aldrich)
5 mL	GlutaMax (Invitrogen)
10 mL	B27 minus vitamin A (Invitrogen)
20 ng / ml	CNTF (PeproTech)

- ⑧ 細胞懸濁液の半量を予め準備しておいた Matrigel でコーティングした 25 cm flask に播種した。培地は Astrocyte Maturation Medium を 5 mL 入れ、28 日間培養した。その間、培地は 3 日に 1 回全量交換した。
- ⑨ Astrocyte Maturation Medium で 28 日間培養した細胞を②-⑥と同様の手法で回収した。ただし、遠心分離後の細胞塊の攪拌には 10% FBS 溶液を使用した。
- ⑩ 細胞懸濁液を予め準備しておいた Matrigel でコーティングした 75cm flask に全量播種した。培地は 10% FBS 溶液を 10 mL 入れ、7 日間培養した。この間、培地の交換は行わなかった。
- ⑪ 10% FBS 溶液で 7 日間培養した細胞にマイトマイシン C (Nacalai Tesque) を 10  $\mu$ g / mL 加え、インキュベーター内で 2 時間反応させた。
- ⑫ 2 時間後、flask 内の培地を除去し HBSS 溶液で 1-2 度リンスした。37°C に温めた Trypsin/EDTA 溶液を 5 mL 加え、インキュベーター内で 3 分間反応させた。
- ⑬ flask 底面に接着した細胞をピペッティングで剥離させ、細胞が単離されていることを顕微鏡下で確認した後、50 mL チューブに全量移した。

- ⑭ 50 mL チューブに 10% FBS 溶液を 10 mL 加え、Trypsin/EDTA 溶液の酵素活性を止めた。
- ⑮ 細胞懸濁液を 1000 rpm で 3 分間遠心分離した後、上清を吸引除去して 10% FBS を 1 mL 加え、ブルーチップで細胞塊を撈拌単離した。
- ⑯ 細胞懸濁液を 10  $\mu$ L 採取し、Cell Counter で細胞の数を数え、再度 1000 rpm で 3 分間遠心分離した。
- ⑰ 上清を吸引除去し、CELLBANKER 2 を加え、 $1 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$  cells / ml の濃度で細胞を凍結保存した ( $-80^\circ\text{C}$ )。

#### 1-2-2 ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本の作成手順

ヒト iPS 細胞由来アストロサイト (HiAs) をマウス海馬由来ニューロンと共培養し、ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本 (HiAACs) を作製した。以下にその手順を示す。

- ① 1-2-1 で凍結保存したヒト iPS 細胞由来アストロサイト (HiAs) を  $37^\circ\text{C}$  に温めた恒温槽で融解し、あらかじめ 10% FBS 溶液を 5 mL 加えておいた 15 mL チューブに細胞懸濁液を全量移した。
- ② 細胞懸濁液を 1000 rpm で 3 分間遠心分離した後、上清を吸引除去して 10% FBS 溶液を 1 mL 加え、ブルーチップで細胞塊を撈拌単離した。
- ③ 細胞懸濁液を 10  $\mu$ L 採取し、Cell Counter で細胞の数を数え、予め準備しておいたドット状アストロサイト培養用 6 well プレートの 1 well あたりの細胞数が 25,000 個となるようにプレートに播き、1 週間程度培養した。メディウムは 10% FBS 溶液とし、各 well に 2 mL 入れた。
- ④ 1 週間後アストロサイトがドット状に育っていることを確認し、well 内の培地を吸引除去し、NBA 溶液 2 mL に置換した。
- ⑤ 第 1 章の 1-2-2⑮から⑰と同様に生後 1-0 日の ICR マウスから海馬由来ニューロンを作製し 6000 cells / well で播種した。

#### 1-2-3 RT-PCR 法を用いたアストロサイトのマーカー遺伝子の定量

RT-PCR 法を用いて、アストロサイトに関与する因子の遺伝子発現解析を行った。RT-PCR 法は逆転写によって RNA から cDNA を合成し、その cDNA を用いて PCR を行う方法である。本手法により、タンパク質をコードする遺伝子を選択的に増幅し、少量しか存在しない mRNA を増幅して解析に使用することが可能となる。

- mRNA 抽出手順
  - ① 6 well プレートにセミコンフルエントの HiAs を準備する。
  - ② 6 well プレート内の 培地を吸引除去し、PBS 溶液で 2 回洗浄した (2 mL / 1 well)。
  - ③ RLT lysis buffer (Qiagen) を使用し、添付のマニュアルに従い mRNA 抽出を行った。
  - ④ 濃度測定を行い mRNA の抽出を確認した。

- 逆転写反応手順  
抽出した mRNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を使用し、添付のマニュアルに従い逆転写反応させた。

- RT-PCR 法手順  
逆転写反応で合成した cDNA は FastStart Essential DNA Green Master (Roche) および各プライマーと混合し、LightCycler® Nano System (Roche) を使用して cDNA の増幅を行った。サンプルは比較 Ct 法により相対定量し、 $\beta$ -actin 遺伝子を内部標準として用いた。以下に使用したプライマーを示す。

$\beta$ -actin primer forward	GATCAAGATCATTTGCTCCTCCT
$\beta$ -actin primer reverse	GGGTGTAACGCAACTAAGTCA
Gfap primer forward	ACATCGAGATCGCCACCTAC
Gfap primer reverse	CGGAGCAACTATCCTGCTTC
CD44 primer forward	CTGCCGCTTTGCAGGTGTA
CD44 primer reverse	CATTGTGGGCAAGGTGCTATT
SOX1 primer forward	GAAATAGCCAATGCCAGGTG
SOX1 primer reverse	CCGTGAATACGATGAGTGTTACC

#### 1-2-4 蛍光免疫染色法

第 1 章 1-2-4 と同様の方法により蛍光免疫染色法を行った。

##### 【細胞固定液の組成】

第一章 1-2-4 と同様の組成で実験を行った。

##### 【抗体溶液の組成】

第1章 1-2-4 と同様の組成で実験を行った。

**【細胞洗浄用 PBS 溶液】**

第1章 1-2-4 と同様の組成で実験を行った。以下に使用した一次抗体と二次抗体を示す。

**【一次抗体】**

Anti-VGLUT-1 (Polyclonal rabbit antiserum) (Synaptic Systems)	1:1000
Anti-MAP2 (Polyclonal Guinea pig antiserum) (Synaptic Systems)	1:1000
Anti-GFAP (Polyclonal rabbit antiserum) (Synaptic Systems)	1:1000
Anti-GFAP (Monoclonal mouse antiserum) (Synaptic Systems)	1:400
Anti-S100β (Monoclonal rabbit antiserum) (Abcam)	1:200

**【二次抗体】**

Alexa Fluor 594 anti-rabbit	1:400
Alexa Fluor 488 anti-guinea pig	1:400
Alexa Fluor 555 anti-mouse	1:1000
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	1:1000

**1-2-5 ホールセルパッチクランプ法**

第1章 1-2-5 と同様の方法によりホールセルパッチクランプ法を用いたシナプス伝達解析を解析した。

**【チャンバー内を灌流する細胞外液の組成】**

第1章 1-2-5 と同様の組成で実験を行った。ただし一部の実験では細胞外液を以下の組成のものに置換した。

1400 mM	NaCl
24 mM	KCl
100 mM	HEPES
100 mM	Glucose
20 mM	CaCl <sub>2</sub>
100 μM	glycine

超純水で1 Lにメスアップし、これを10×ストックとして用事希釈して用いた。pHはTris-baseを用いて7.4に調節した。

#### 【細胞内を灌流する電極内液の組成】

第1章 1-2-5と同様の組成で実験を行った。

#### 【電流計測の操作手順】

- 活動電位刺激によって生じるNa<sup>+</sup>電流 (Na<sup>+</sup> current)  
保持電位-70 mV から 0 mV への脱分極パルスを 2 ms 与えると、活動電位が発生し、細胞外からNa<sup>+</sup>が流入することで内向きの応答が観測される。観測された内向きの応答の振幅を活動電位刺激によって生じるNa<sup>+</sup>電流 (Na<sup>+</sup> current) として解析した。
- 興奮性シナプス後電流 (Excitatory Postsynaptic current, EPSC)  
第1章 1-2-5と同様の方法で記録した。
- 自発性興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC, mEPSC)  
第1章 1-2-5と同様の方法で記録した。

#### 1-2-6 統計解析

2群間の統計処理には、対応のない Student's t-test を使用した。多群間の統計処理には、Tukey's test を用いた。結果は全て平均±標準誤差で表記し、p 値が 0.05 以下である場合を有意差ありとした (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)。

## 2 実験結果

### 2-1 ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本 (HiAACs) の確立



本研究では Perriot et al が確立した方法をもとに、ヒト iPS 細胞からアストロサイトへと分化誘導した (Perriot et al., 2018)。始めにヒト iPS 細胞から神経幹細胞である long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells (Lt-NES) へと分化誘導し、その後、6 週間かけてアストロサイトへと分化誘導する (図 8a)。6 週間後、10% FBS 溶液で 1 週間培養し、マイトマイシン C と 2 時間反応させ細胞の増殖を止めた。分化した細胞がアストロサイトになっていることを確認するために mRNA を採取し、RT-PCR 法にてアストロサイトのマーカー遺伝子である *Gfap* と *CD44* 及び、神経幹細胞のマーカー遺伝子である *SOX1* の発現レベルを調べた。結果、分化した細胞は Lt-NES と比較して、*Gfap*、*CD44* の発現量は優位に増加し、*SOX1* は消失していた (*Gfap*; Lt-NES,  $1.07 \pm 0.16$ , HiAs,  $9.73 \pm 2.92$ ; *CD44*; Lt-NES,  $1.03 \pm 0.07$ , HiAs,  $13.27 \pm 4.92$ ; *SOX1*; Lt-NES,  $1.23 \pm 0.26$ , HiAs,  $0.0078 \pm 0.0035$ , n = 8, 図 8b)。さらに、免疫染色法にて、分化した細胞はアストロサイトのマーカーである GFAP 及び S100  $\beta$  ともに陽性であり、細胞の 90% 以上が GFAP 陽性であった (図 8c, d)。以上のことから、分化した細胞はアストロサイトに分化しており、その純度は極めて高いことが解った。

次に、従来のマウスオータプス培養標本の作製手順に従って human iPS cell derived astrocytes (HiAs) を使用したオータプス培養標本 (HiAs Autaptic Cultures, HiAACs) を作製した。始めに、あらかじめドット状にコーティングしたカバーガラスに HiAs を培養した。1 週間後アストロサイトがドット状になっていることを確認し、その上に ICR マウスの海馬ニューロンを共培養した (図 8e)。ニューロン培養 3 週間後に MAP2 と GFAP で免疫染色を行い、アストロサイト上に単一ニューロンが育っていることを確認した (図 8f)。

## 2-2 HiAACs の神経機能解析

アストロサイトは自身が放出する液性因子や接着因子などにより、ニューロンの発達を助けることが知られている (Hama et al., 2004, Allen and Barres., 2009)。そこで、HiAs がニューロンの発達に関与していることを調べるため、HiAACs とニューロン単独培養 (Neuron mono cultures, NMCs) における神経機能をパッチクランプ法にて測定した。

はじめに、HiAACs と NMCs における、活動電位刺激によって流入する  $\text{Na}^+$  電流 ( $\text{Na}^+$  current) を voltage clamp 下で測定した。結果、NMCs と比較して HiAACs では  $\text{Na}^+$  current amplitude は有意に増大した (NMCs,  $4.88 \pm 0.90$  nA, n = 23; HiAACs,  $9.75 \pm 1.17$  nA, n = 21, 図 9a, b)。次に、HiAACs と NMCs における、membrane capacitance を調べた。membrane capacitance は細胞体の大きさに比例して大きくな

る。結果、NMCs と比較して HiAACs では membrane capacitance は有意に増大した (NMCs,  $16.24 \pm 1.82$  pF,  $n = 23$ ; HiAACs,  $28.55 \pm 2.69$  pF,  $n = 24$ , 図 9c)。一方で、 $\text{Na}^+$  current amplitude を membrane capacitance で割った値である  $\text{Na}^+$  current density ( $\text{nA} / \text{pF}$ ) は両者で変化はなかった (NMCs,  $0.28 \pm 0.024$   $\text{nA} / \text{pF}$ ,  $n = 23$ ; HiAACs,  $0.39 \pm 0.056$   $\text{nA} / \text{pF}$ ,  $n = 21$ , 図 9d)。

次に、HiAACs において、HiAs がシナプスの形成、成熟に関わっていることを調べるため、HiAACs 及び NMCs におけ EPSC を測定した。記録された EPSC は AMPA サブタイプの競合的アンタゴニストである CNQX ( $5 \mu\text{M}$ ) によって殆どがブロックされ、グルタミン酸受容体の NMDA サブタイプの競合的アンタゴニストである AP5 ( $15 \mu\text{M}$ ) ではブロックされなかった (図 10a, b)。このことから、記録された EPSC は AMPA receptor-mediated EPSC であることが解った。NMDA 受容体は通常  $\text{Mg}^{2+}$  によりブロックされているが、 $\text{Mg}^{2+}$  Free かつ  $10 \mu\text{M}$  のグリシンを含む細胞外溶液を適用することで最大に活性化することができる (Rosenmund et al., 1993, Hessler et al., 1993)。そこで、HiAACs において EPSC が AMPA 受容体成分および NMDA 受容体成分を示すかどうかを確認した。その結果、EPSC は AMPA 受容体を介した速い成分と NMDA 受容体を介した遅い成分の両方を有していた (図 10c, d)。これらの結果は従来のオータプス標本でみられる興奮性シナプス伝達の特性と一致している (Kawano et al., 2012)。

HiAACs と NMCs における EPSC を比較すると、NMCs では EPSC が極めて小さく測定が困難だったのに対し、HiAACs では十分な大きさの EPSC が測定できた (NMCs,  $0.026 \pm 0.0057$  nA,  $n = 23$ ; HiAs,  $1.26 \pm 0.26$  nA,  $n = 24$ , 図 11a, b)。さらに、TTX を用いて mEPSC を測定した結果、NMCs では mEPSC がほとんど観察できなかったのに対して、HiAACs では、mEPSC が観察された (NMCs,  $0.035 \pm 0.016$  Hz,  $n = 15$ ; HiAACs,  $2.04 \pm 0.81$  Hz,  $n = 21$ , 図 11c, d)。

さらに、 $\text{Na}^+$  current amplitude と EPSC amplitude の相関関係を調べると、NMCs では、相関を示さないのに対し、HiAACs では  $\text{Na}^+$  current amplitude の増大に伴って EPSC amplitude が増加していた (図 11e)。このことから、HiAACs ではニューロンの発達に伴いシナプス伝達が増加していることが解った。

以上のことから、HiAACs において、ニューロンは HiA との共培養によって発達し、EPSC や mEPSC を示す機能的なシナプスを形成していることが解った。

### 2-3 HiAACs の神経形態解析

これまでの結果から、作製した標本は HiAs との共培養により、シナプス機能が発達していることが電気生理学的に証明された。よって、HiAACs は NMCs と比較して樹状突起が成長しており、シナプス数は増大していると考えられる。

そこで、ニューロン培養2週間後に、HiAACs 及び NMCs におけるニューロンの樹状突起を MAP2、シナプスを VGLUT1 にて免疫染色し、単一ニューロンが有する興奮性シナプス数を定量した。結果、NMCs ではほとんど興奮性シナプスを形成していないのに対し、HiAACs では 100 個以上の興奮性シナプスを形成していた (NMCs,  $15.78 \pm 2.49$ ,  $n = 37$ ; HiAACs,  $114.5 \pm 16.41$ ,  $n = 34$ , 図 12a, b)。次に、HiAACs と NMCs における樹状突起の形態を調べた結果、樹状突起の全長と分岐数は HiAACs で有意に増加していた (全長; NMCs,  $164.91 \pm 17.20 \mu\text{m}$ ,  $n = 37$ ; HiAACs,  $333.6 \pm 32.57 \mu\text{m}$ ,  $n = 34$ ; 分岐数; NMC,  $4.76 \pm 0.42$ ,  $n = 37$ ; HiAACs,  $6.38 \pm 0.47$ ,  $n = 34$ , 図 12a, c, d)。さらに、樹状突起の長さとしナプス数の相関関係を調べると、NMCs では相関を示さないのに対し、HiAACs では樹状突起の成長に伴って興奮性シナプス数が増加していた (図 12e)。

以上より、HiAACs において単一ニューロンは HiAs が存在することによってシナプスを形成し、形態学的に発達していることが解った。

#### 2-4 HiAACs の培養期間検討

標本の最適培養期間を検討するため、ニューロン培養後、2週間 (WIV2)、4週間 (WIV4)、6週間 (WIV6) におけるシナプス伝達機能をパッチクランプ法にて解析した。EPSC の amplitude は WIV2 から WIV4 にかけて有意に増大し、WIV4 から WIV6 にかけては変化しなかった (WIV2,  $3.11 \pm 0.30 \text{ nA}$ ,  $n = 35$ ; WIV4,  $9.57 \pm 1.26 \text{ nA}$ ,  $n = 33$ ; WIV6,  $8.29 \pm 1.22 \text{ nA}$ ,  $n = 29$ , 図 13a, b)。WIV2 から WIV4 では、mEPSC の amplitude は有意に増加し、WIV4 から WIV6 では変化しなかった (WIV2,  $32.72 \pm 1.27 \text{ pA}$ ,  $n = 32$ ; WIV4,  $38.60 \pm 1.88 \text{ pA}$ ,  $n = 33$ ; WIV6,  $39.51 \pm 2.02 \text{ pA}$ ,  $n = 28$ , 図 13c, d)。一方で、mEPSC の頻度は WIV2 から WIV4 にかけて増加傾向ではあったものの有意な変化ではなかった (WIV2,  $1.62 \pm 0.28 \text{ Hz}$ ,  $n = 32$ ; WIV4,  $3.24 \pm 0.59 \text{ Hz}$ ,  $n = 33$ ; WIV6,  $3.31 \pm 0.81 \text{ Hz}$ ,  $n = 28$ , 図 13c, e)。最後に WIV2、WIV4、WIV6 における、単一ニューロンあたりのシナプス数を調べた。結果、シナプス数は WIV2 から WIV4 にかけて有意に増加し、WIV4 から WIV6 にかけては変化しなかった (WIV2,  $114.5 \pm 16.41$ ,  $n = 34$ ; WIV4,  $244.18 \pm 26.97$ ,  $n = 28$ ; WIV6,  $232.88 \pm 36.60$ ,  $n = 24$ , 図 13f, g)。

### 3 小括

本研究で作製したアストロサイトは遺伝子、タンパク質ともにアストロサイトの特異的マーカーを発現しており、純度の高いアストロサイトであった。本研究では HiAs をドット状に培養する際、血清入りの培地を使用した。血清はマウスやラットのアストロサイト初代培養に用いられており (McCarthy and de Vellis, 1980)、他の HiAs の作製においても血清を使用している場合が多い (Roybon et al., 2013, Santos et al., 2017, Tcw et al., 2017)。しかしながら、血清培地を使用してアストロサイトを培養すると反応性アストロサイトを誘導することが報告されており、患者由来アストロサイトを用いて病態解析をする際、血清を用いて培養したアストロサイトを使用するとデータにバイアスが生じる可能性がある (Zamanian et al., 2012, Zhang et al., 2016, Perriot et al., 2018)。一方で、いくつかの神経系の病態ではアストロサイトの活性化がみられることから、そのような疾患の病態解析には反応性アストロサイトを用いる方がよいという意見もある (Roybon et al., 2013, Santos et al., 2017)。

上記のようにアストロサイトの分化誘導方法は数多く存在する。ゆえに、目的に応じて、使用するアストロサイトを選択する必要があるかもしれない。

アストロサイトの病態生理機能についての研究の多くは、げっ歯類の研究から得られている (Kawano et al., 2017, Takeda et al., 2021, Cai et al., 2017, Booth et al., 2017, Petrelli et al., 2016, Patel et al., 2019)。しかし、ヒトのアストロサイトはマウスのアストロサイトよりも大きく複雑な形態であることや (Oberheim et al., 2006, Berheim et al., 2009)、細胞外のグルタミン酸に対してマウスのアストロサイトとは異なる反応を示すことから (Zhang et al., 2016)、シナプス活動においてヒトのアストロサイトはマウスのアストロサイトとは異なる役割を持っている可能性がある。実際、動物モデルにて有望な結果を示した薬剤がヒトでの臨床試験で失敗していることもある (Cavanaugh, 2014, Cummings et al., 2014, Rothstein, 2003, Waldmeier et al., 2006)。そのため、アストロサイトを標的とした病態解析や創薬研究はヒト由来細胞を用いることが重要である。本研究ではヒト由来のアストロサイトを使って、オータプス培養標本作製した。今後はヒト iPS 細胞由来のニューロンとアストロサイトを使用した、完全ヒト由来のオータプス培養標本を開発することを目指している。

HiAACs は NMCs と比較して EPSC や mEPSC を示す成熟したシナプスを形成していた。単一ニューロン培養標本作製するためには、ニューロンを低密度で培養する必要がある。しかしながら、プライマリーニューロンは低密度での培養では十分に成長できず成熟したシナプスを形成できない (Banker and Cowan, 1977, Brewer et al.,

1994)。一方で、アストロサイトは様々な液性因子や接着因子を出すことで、シナプスの形成と成熟、及びニューロンの成長に関与している (Clarke and Barres, 2013, Allen and Eroglu, 2017)。本研究では、ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを feeder cell として活用することでニューロンの成熟及びシナプス形成を促進した。すなわち、本標本において、単一ニューロンは HiAs による液性因子や接着因子などにより成長、発達したと考えられる (Huettner and Baughman, 1986, Banker., 1980)。

本研究では世界で初めて、ヒト iPS 細胞由来アストロサイトと単一ニューロンの共培養に成功した。本標本は培養 2 週から 4 週にかけて成熟し、培養 6 週間後においても実験に使用できた。本研究において、ヒト iPS 細胞由来アストロサイトと共培養したニューロンのシナプス数やニューロンの樹状突起形態の解析が単一ニューロンレベルで可能となり、誘発刺激によるシナプス伝達の記録も可能となった。誘発刺激によるシナプス伝達の記録は従来の培養方法でも可能だが、これまでの多くの研究では、自発的なシナプス伝達に依存したシナプス伝達機能の評価が行われてきた (Williams et al., 2014, Lischka et al., 2018, Canals et al., 2018 Tchieu et al., 2019 Hedegaard et al., 2020, VanderWall et al., 2019)。しかしながら、本研究において、培養 2 週から 4 週にかけて EPSC が増大していたにもかかわらず、mEPSC frequency に変化がなかったように、自発的なシナプス伝達のみではシナプス機能を十分に評価できない可能性がある。したがって、シナプス機能を評価するときは、自発的なシナプス伝達だけでなく誘発刺激によるシナプス伝達を評価することが重要だと考えられる。また、本研究では記録していないが、本標本を用いることで、開口放出可能なシナプス小胞のサイズやシナプス小胞放出確率などのさらに詳細なシナプス評価が可能である。よって、本研究で確立した標本は アストロサイトに着目した 3 者間シナプスの研究を促進するものであると確信している。

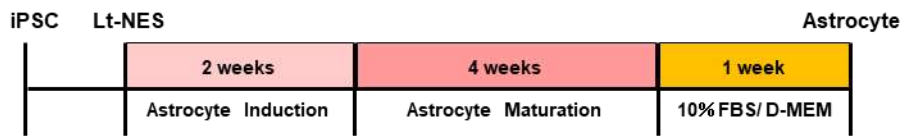
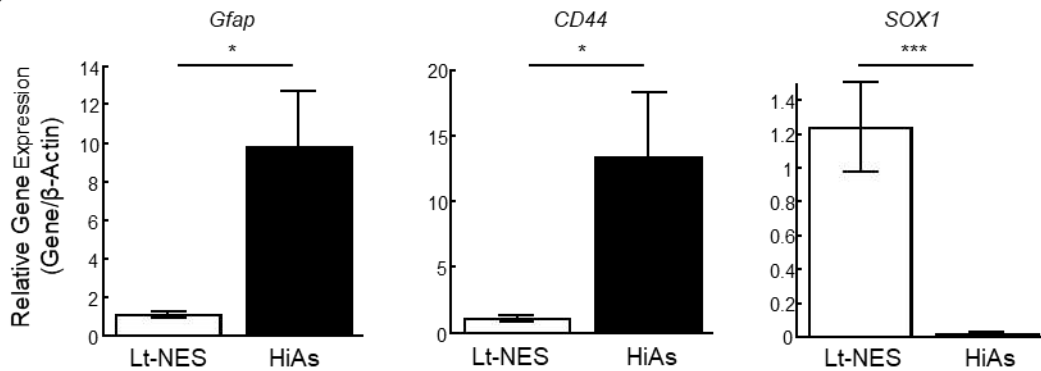
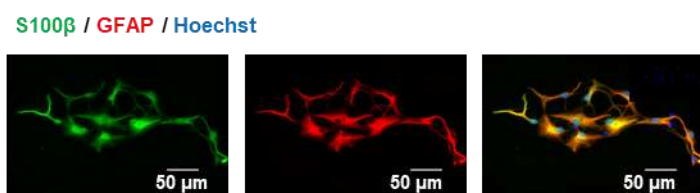
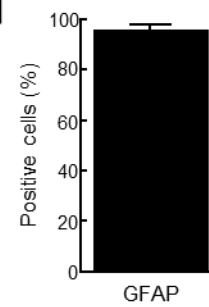
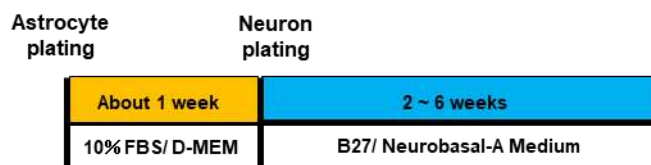
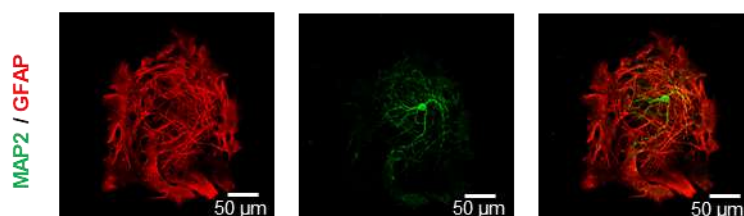
**a****b****c****d****e****f**

図8 ヒトiPS細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本 (HiAACs) の確立

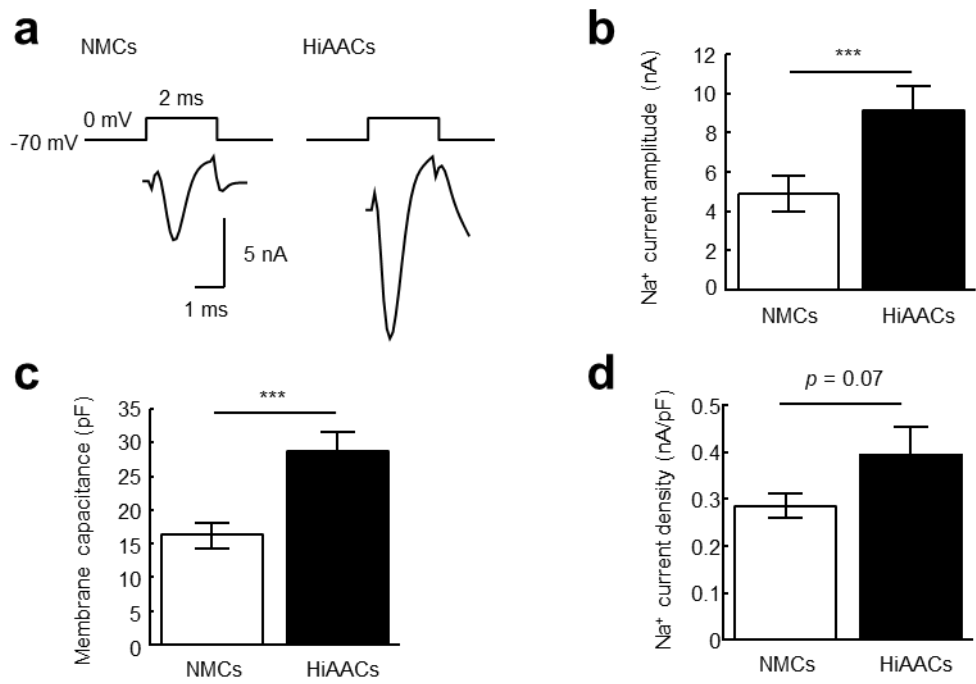


図9 HiAACsの神経機能解析

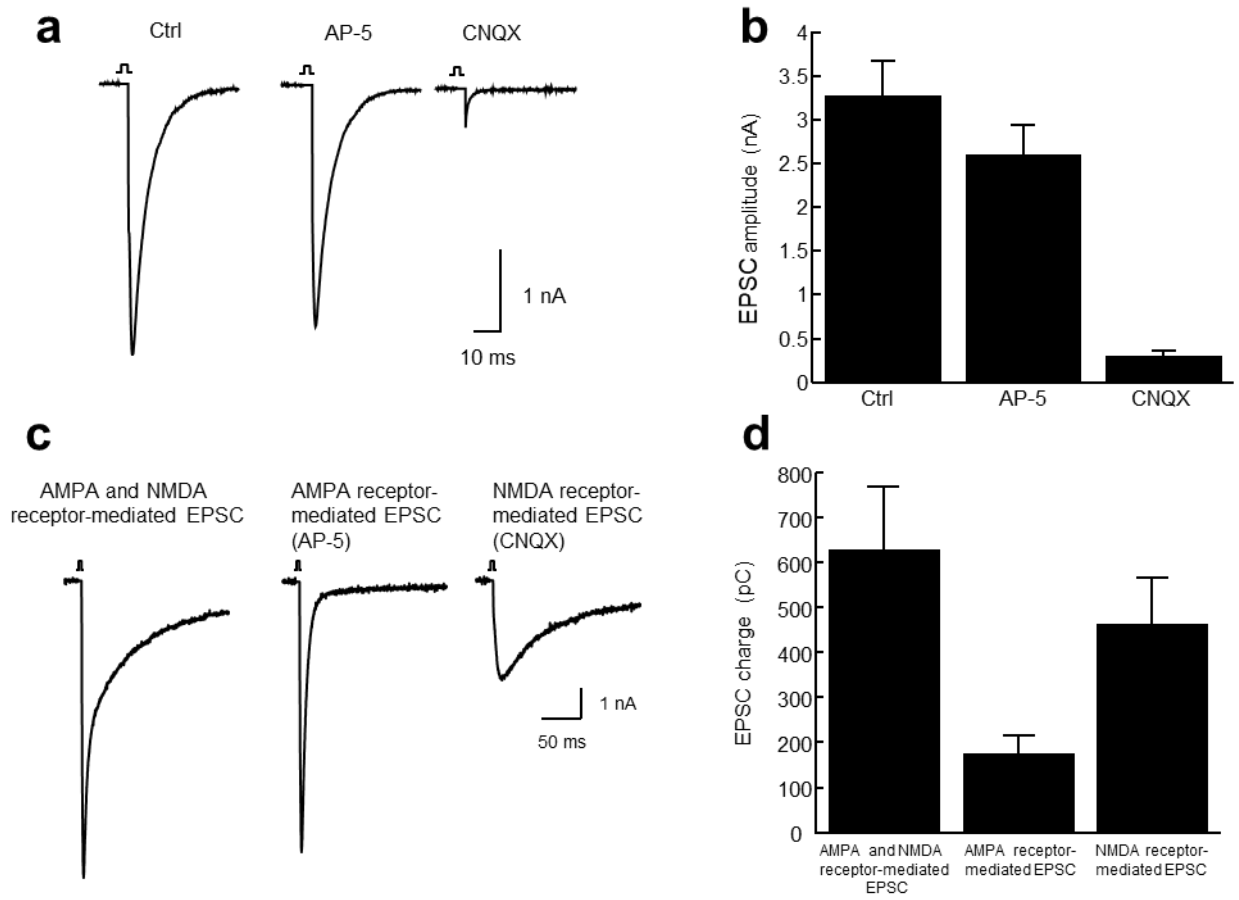


図10 HiAACsのグルタミン酸受容体



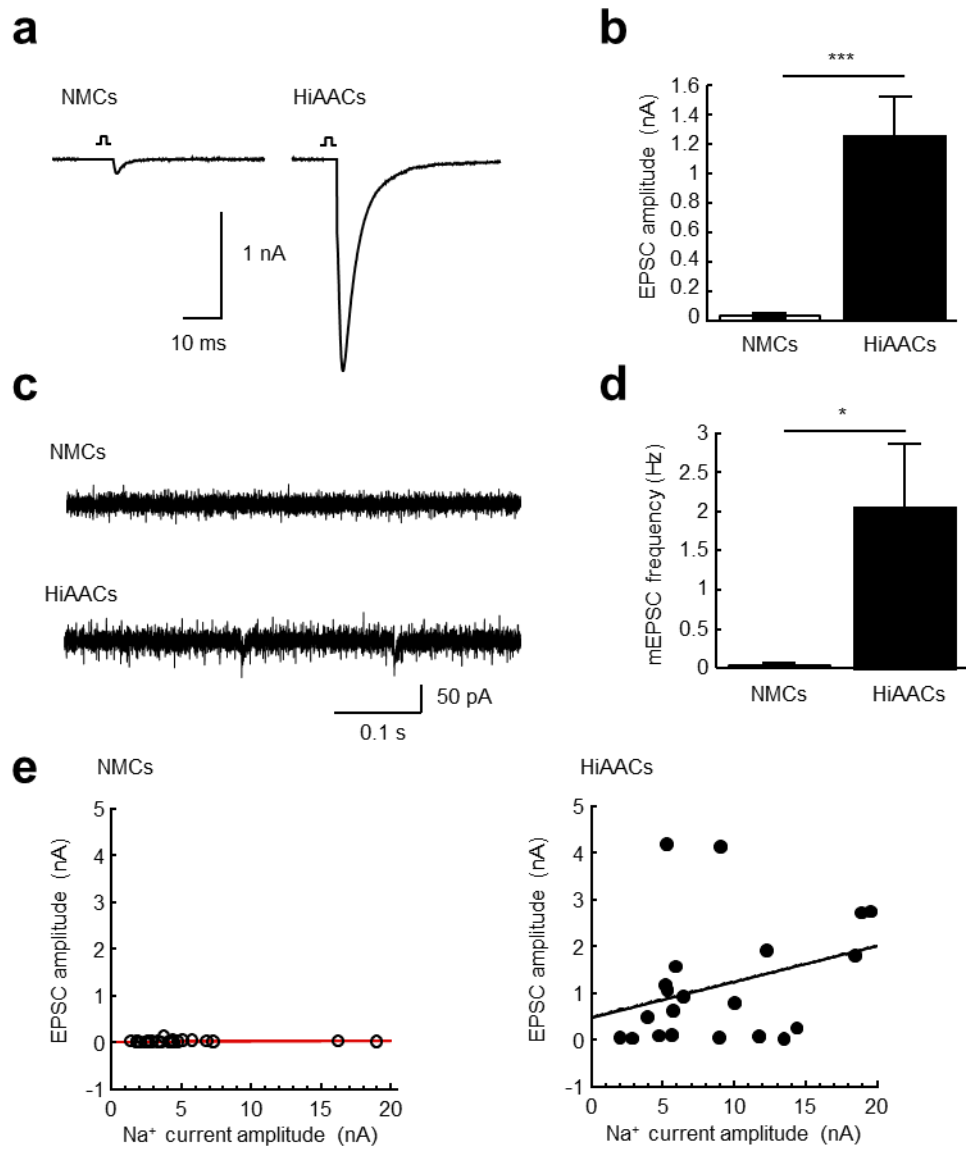


図11 HiAACsのシナプス機能解析

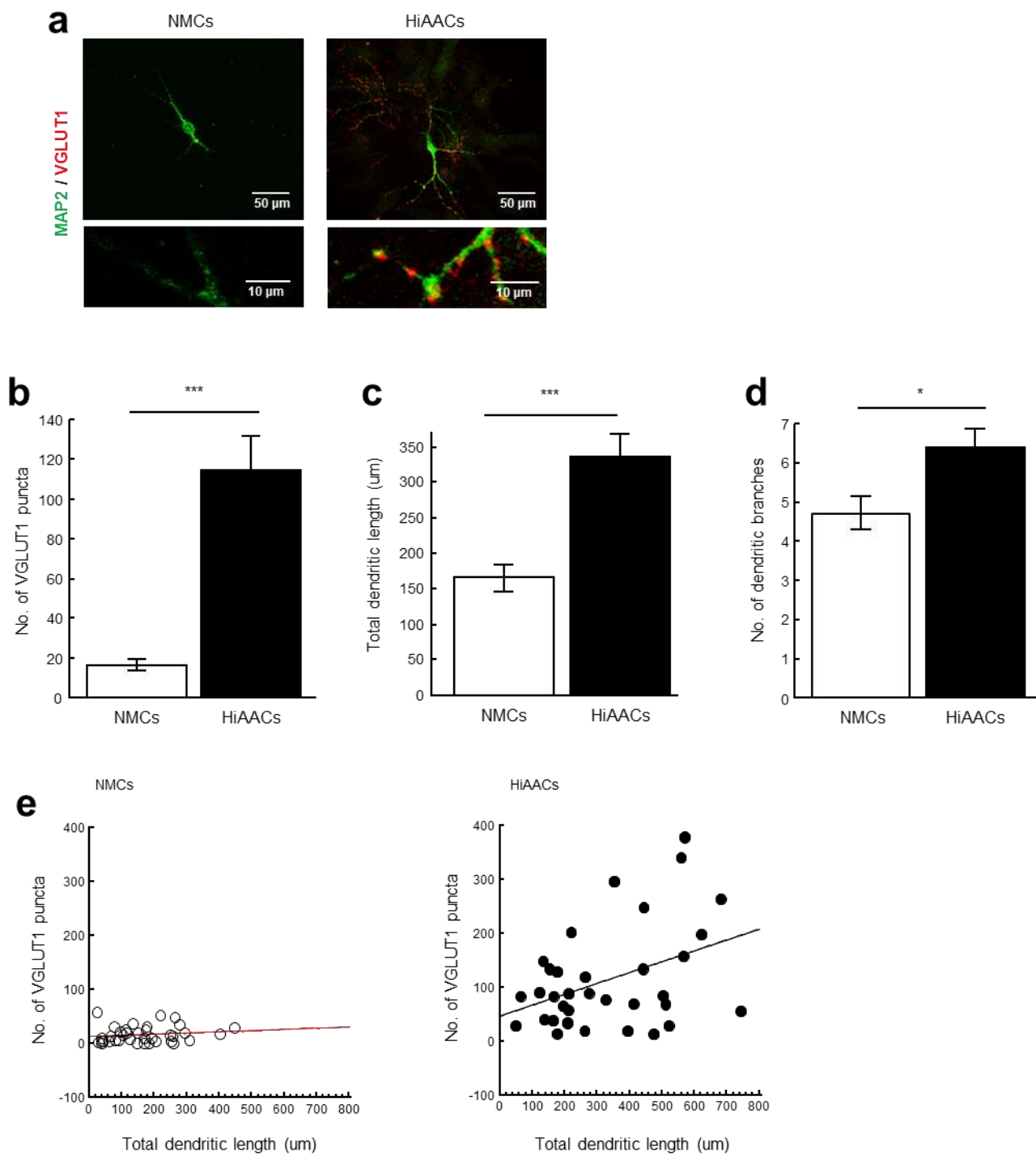


図12 HiAACsの神経形態解析

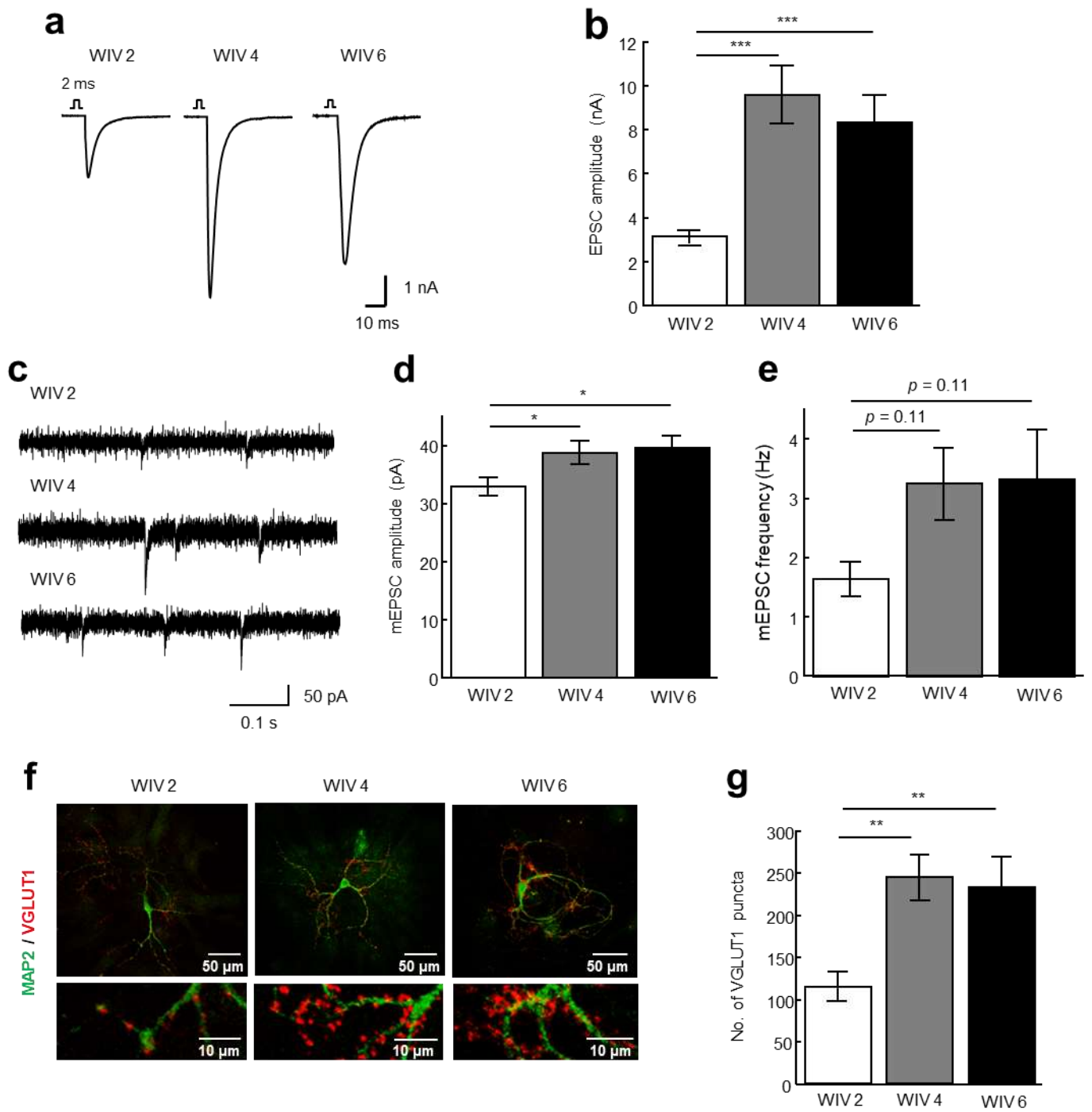


図13 HiAACsの培養期間検討

## 総括ならびに結論

本研究では、てんかんの新規治療薬開発を目指し、難治性てんかんである Dravet 症候群の病態メカニズムの解明、並びに、新規シナプス薬効標本の確立を行った。本研究は 3 章で構成されており、第 1、2 章では *Scn1a* キックインマウスにおけるシナプス及びアストロサイトの病態を解明した。第 3 章ではヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本を確立した。

第 1 章では *Scn1a* キックイン (Het) マウスニューロンの興奮性及び抑制性シナプス伝達について解析し、以下のことが明らかとなった。

1. Het ニューロンにおいて、興奮性シナプス伝達機能は変化しなかったが、抑制性シナプス伝達機能は低下した。
2. Het ニューロンにおいて、抑制性シナプス伝達機能が低下した一因はシナプス前神経終末部におけるシナプス小胞開口放出確率の減少であることが分かった。しかし、開口放出可能なシナプス小胞のプールサイズは WT ニューロンと同程度であった。
3. 抑制性シナプスの染色では、WT ニューロンに比べ Het ニューロンでシナプス数が有意に減少していることが明らかとなった。
4. Het ニューロンにおける抑制性シナプス開口放出低下のメカニズムとして、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する感受性の低下が原因でなく、むしろ細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する感受性が高いことが明らかとなった。
5. Het ニューロンにおいて、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を高濃度にすると、通常時にもまして E/I バランスの崩壊がみられた。

これらの結果から、Het マウスの抑制性ニューロンではシナプス小胞開口放出確率の減少及び抑制性シナプス数の減少により、抑制性シナプス伝達が低下することが明らかとなった。さらに細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  高濃度時には通常時にもまして E/I バランスの崩壊が起きることが明らかとなった。

第 2 章では *Scn1a* キックイン (Het) マウスアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  発火を解析し、以下のことが明らかとなった。

1. Het アストロサイトにおいて自発的に流入する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入速度は増加した。
2. Het アストロサイトにおいて誘発的刺激により流入する一時的な  $\text{Ca}^{2+}$  流入量、及び流入速度は増加した。

これらの結果から Het マウスのアストロサイトでは  $\text{Ca}^{2+}$  発火に異常が発生しており、神経伝達物質やグリア伝達物質のクリアランスに変異が生じていることが示唆される。しかしながら、これらの異常がてんかん病態にどの様に寄与するかは更なる検討が必要である。

第 3 章ではアストロサイトに特化したシナプス薬効標本作製のため、ヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本作製した。

1. ヒト iPS 細胞由来アストロサイト (HiAs) を有したオータプス培養標本 (HiAACs) を作製した。
2. HiAACs のニューロンはニューロン単独培養 (NMC) と比較して発達しており EPSC や mEPSC を示す機能的なシナプスを有していた。
3. HiAACs はニューロン培養後 2 週から 4 週にかけて成熟し、培養 6 週においても実験に使用できた。

これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来アストロサイトと共培養した単一ニューロンのシナプス数やニューロンの樹状突起形態の解析が可能となり、誘発刺激によるシナプス伝達の記録も可能となった。

第 1 章及び第 2 章では *Scn1a* に変異を有するマウスのシナプス機能とアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  発火を解析し、Dravet 症候群の新たな病態メカニズムを解析した。第 3 章ではヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本を確立した。

てんかんの治療は主に薬物療法であり、これまで、原因因子であるニューロンのみを治療標的とする既存の抗てんかん薬を頼りに薬物治療が行われている。しかしながら、てんかん患者の約 30% が発作を十分にコントロールできていないのが現状である。近年、てんかんの原因にアストロサイトに依存した神経機能崩壊が加わったことから (Coulter and Steinhäuser, 2015)、てんかんの根本的治療のために、病態アストロサイトに作用する“グリア創薬”が求められている。本研究で作製したヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本は、患者由来の iPS 細胞を用いることで様々

な病態を反映できる。よって、てんかんを含む多くの中枢神経疾患の病態解析、並びに新薬開発への一助となると確信している。

## 参考文献

Hirose S, Okada M, Kaneko S, Mitsudome A. Are some idiopathic epilepsies disorders of ion channels?: A working hypothesis. *Epilepsy Res.* 2000 Oct;41 (3) :191-204. doi: 10.1016/s0920-1211 (00) 00141-8.

Hirose S, Okada M, Yamakawa K, Sugawara T, Fukuma G, Ito M, Kaneko S, Mitsudome A. Genetic abnormalities underlying familial epilepsy syndromes. *Brain Dev.* 2002 Jun;24 (4) :211-22. doi: 10.1016/s0387-7604 (02) 00056-6.

Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci.* 2006 Sep;9 (9) :1142-9. doi: 10.1038/nn1754. Epub 2006 Aug 20.

Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, Takeuchi T, Itohara S, Yanagawa Y, Obata K, Furuichi T, Hensch TK, Yamakawa K. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *J Neurosci.* 2007 May 30;27 (22) :5903-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5270-06.2007.

Cheah CS, Yu FH, Westenbroek RE, Kalume FK, Oakley JC, Potter GB, Rubenstein JL, Catterall WA. Specific deletion of Nav1.1 sodium channels in inhibitory interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 4;109 (36) :14646-51. doi: 10.1073/pnas.1211591109.

Han S, Tai C, Westenbroek RE, Yu FH, Cheah CS, Potter GB, Rubenstein JL, Scheuer T, de la Iglesia HO, Catterall WA. Autistic-like behaviour in *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature.* 2012 Sep 20;489 (7416) :385-90. doi: 10.1038/nature11356. Epub 2012 Aug 22.

Patel DC, Tewari BP, Chaunsali L, Sontheimer H. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nat Rev Neurosci.* 2019 May;20 (5) :282-297. doi: 10.1038/s41583-019-0126-4.

Bekkers JM, Stevens CF. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 1;88(17):7834-8. doi: 10.1073/pnas.88.17.7834.

Coulter DA, Steinhäuser C. Role of astrocytes in epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Mar 2;5 (3) :a022434. doi: 10.1101/cshperspect.a022434.

Fellin T, Gomez-Gonzalo M, Gobbo S, Carmignoto G, Haydon PG. Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. *J Neurosci*. 2006 Sep 6;26 ( 36 ) :9312-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2836-06.2006.

Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med*. 2005 Sep;11 (9) :973-81. doi: 10.1038/nm1277.

Cai Z, Wan CQ, Liu Z. Astrocyte and Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2017 Oct;264 (10) :2068-2074. doi: 10.1007/s00415-017-8593-x.

Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci*. 2017 Jun;40 (6) :358-370. doi: 10.1016/j.tins.2017.04.001. Epub 2017 May 17.

Petrelli F, Pucci L, Bezzi P. Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci*. 2016 Feb 12;10:21. doi: 10.3389/fncel.2016.00021.

Patel DC, Tewari BP, Chaunsali L, Sontheimer H. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nat Rev Neurosci*. 2019 May;20 (5) :282-297. doi: 10.1038/s41583-019-0126-4.

Rhee JS, Li LY, Shin OH, Rah JC, Rizo J, Südhof TC, Rosenmund C. Augmenting neurotransmitter release by enhancing the apparent Ca<sup>2+</sup> affinity of synaptotagmin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20;102 (51) :18664-9. doi: 10.1073/pnas.0509153102.



Westenbroek RE, Merrick DK, Catterall WA. Differential subcellular localization of the RI and RII Na<sup>+</sup> channel subtypes in central neurons. *Neuron*. 1989 Dec;3 (6) :695-704. doi: 10.1016/0896-6273 (89) 90238-9.

Gong B, Rhodes KJ, Bekele-Arcuri Z, Trimmer JS. Type I and type II Na<sup>+</sup> channel alpha-subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain. *J Comp Neurol*. 1999 Sep 20;412 (2) :342-52.

Hedrich UB, Liautard C, Kirschenbaum D, Pofahl M, Lavigne J, Liu Y, Theiss S, Slotta J, Escayg A, Dihné M, Beck H, Mantegazza M, Lerche H. Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na<sup>v</sup> 1.1 mutation. *J Neurosci*. 2014 Nov 5;34 (45) :14874-89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0721-14.2014.

Kim DY, Gersbacher MT, Inquimbert P, Kovacs DM. Reduced sodium channel Na<sup>v</sup> 1.1 levels in BACE1-null mice. *J Biol Chem*. 2011 Mar 11;286 (10) :8106-8116. doi: 10.1074/jbc.M110.134692. Epub 2010 Dec 29.

Chen X, Zhang J, Song Y, Yang P, Yang Y, Huang Z, Wang K. Deficiency of anti-inflammatory cytokine IL-4 leads to neural hyperexcitability and aggravates cerebral ischemia-reperfusion injury. *Acta Pharm Sin B*. 2020 Sep;10 (9) :1634-1645. doi: 10.1016/j.apsb.2020.05.002.

Gu F, Hazra A, Aulakh A, Žiburkus J. Purinergic control of hippocampal circuit hyperexcitability in Dravet syndrome. *Epilepsia*. 2014 Feb;55 (2) :245-55. doi: 10.1111/epi.12487.

De Stasi AM, Farisello P, Marcon I, Cavallari S, Forli A, Vecchia D, Losi G, Mantegazza M, Panzeri S, Carmignoto G, Bacci A, Fellin T. Unaltered Network Activity and Interneuronal Firing During Spontaneous Cortical Dynamics In Vivo in a Mouse Model of Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Cereb Cortex*. 2016 Apr;26 (4) :1778-94. doi: 10.1093/cercor/bhw002.

Mennerick S, Que J, Benz A, Zorumski CF. Passive and synaptic properties of hippocampal neurons grown in microcultures and in mass cultures. *J Neurophysiol.* 1995 Jan;73 (1) :320-32. doi: 10.1152/jn.1995.73.1.320.

Liu H, Dean C, Arthur CP, Dong M, Chapman ER. Autapses and networks of hippocampal neurons exhibit distinct synaptic transmission phenotypes in the absence of synaptotagmin I. *J Neurosci.* 2009 Jun 10;29 (23) :7395-403. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1341-09.2009.

Liu H, Chapman ER, Dean C. "Self" versus "non-self" connectivity dictates properties of synaptic transmission and plasticity. *PLoS One.* 2013 Apr 29;8 (4) :e62414. doi: 10.1371/journal.pone.0062414.

Fernández-Chacón R, Königstorfer A, Gerber SH, García J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature.* 2001 Mar 1;410 (6824) :41-9. doi: 10.1038/35065004.

Brenet A, Hassan-Abdi R, Somkhit J, Yanicostas C, Soussi-Yanicostas N. Defective Excitatory/Inhibitory Synaptic Balance and Increased Neuron Apoptosis in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome. *Cells.* 2019 Oct 4;8 (10) :1199. doi: 10.3390/cells8101199.

Shi X, He W, Guo S, Zhang B, Ren S, Liu K, Sun T, Cui J. RNA-seq Analysis of the SCN1A-KO Model based on CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology. *Neuroscience.* 2019 Feb 1;398:1-11. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.052.

Luhmann HJ, Prince DA. Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol.* 1991 Feb;65 (2) :247-63. doi: 10.1152/jn.1991.65.2.247.

Chen G, Trombley PQ, van den Pol AN. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J Physiol.* 1996 Jul 15;494 ( Pt 2) (Pt 2) :451-64. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021505.

Kakazu Y, Akaike N, Komiyama S, Nabekura J. Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci*. 1999 Apr 15;19 (8) :2843-51. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-08-02843.1999.

Agulhon C, Petracicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiocco TA, McCarthy KD. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*. 2008 Sep 25;59 ( 6 ) :932-46. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.004.

Aronica E, van Vliet EA, Mayboroda OA, Troost D, da Silva FH, Gorter JA. Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2000 Jul;12 (7) :2333-44. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00131.x.

Carmignoto G, Haydon PG. Astrocyte calcium signaling and epilepsy. *Glia*. 2012 Aug;60 (8) :1227-33. doi: 10.1002/glia.22318. Epub 2012 Mar 2.

Nikolic L, Nobili P, Shen W, Audinat E. Role of astrocyte purinergic signaling in epilepsy. *Glia*. 2020 Sep;68 (9) :1677-1691. doi: 10.1002/glia.23747.

Perriot S, Mathias A, Perriard G, Canales M, Jonkmans N, Merienne N, Meunier C, El Kassar L, Perrier AL, Laplaud DA, Schluep M, Déglon N, Du Pasquier R. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Astrocytes Are Differentially Activated by Multiple Sclerosis-Associated Cytokines. *Stem Cell Reports*. 2018 Nov 13;11 (5) :1199-1210. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.09.015.

Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A. PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*. 2004 Feb 5;41 (3) :405-15. doi: 10.1016/s0896-6273 (04) 00007-8.

Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009 Feb 5;457 (7230) :675-7. doi: 10.1038/457675a.

Rosenmund C, Clements JD, Westbrook GL. Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science*. 1993 Oct 29;262 (5134) :754-7. doi: 10.1126/science.7901909.

Hessler NA, Shirke AM, Malinow R. The probability of transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature*. 1993 Dec 9;366 (6455) :569-72. doi: 10.1038/366569a0.

Kawano H, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Yamashita Y, Kubo N, Kubo M, Okuda H, Takasaki K, Kubota K, Mishima K, Fujiwara M, Harata NC, Iwasaki K. Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. *PLoS One*. 2012;7 (10) :e48034. doi: 10.1371/journal.pone.0048034.

McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980 Jun;85 (3) :890-902. doi: 10.1083/jcb.85.3.890.

Roybon L, Lamas NJ, Garcia AD, Yang EJ, Sattler R, Lewis VJ, Kim YA, Kachel CA, Rothstein JD, Przedborski S, Wichterle H, Henderson CE. Human stem cell-derived spinal cord astrocytes with defined mature or reactive phenotypes. *Cell Rep*. 2013 Sep 12;4 (5) :1035-1048. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.021.

Santos R, Vadodaria KC, Jaeger BN, Mei A, Lefcochilos-Fogelquist S, Mendes APD, Erikson G, Shokhirev M, Randolph-Moore L, Fredlender C, Dave S, Oefner R, Fitzpatrick C, Pena M, Barron JJ, Ku M, Denli AM, Kerman BE, Charnay P, Kelsoe JR, Marchetto MC, Gage FH. Differentiation of Inflammation-Responsive Astrocytes from Glial Progenitors Generated from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 Jun 6;8 (6) :1757-1769. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.05.011.

Tew J, Wang M, Pimenova AA, Bowles KR, Hartley BJ, Lacin E, Machlovi SI, Abdelaal R, Karch CM, Phatnani H, Slesinger PA, Zhang B, Goate AM, Brennand KJ. An Efficient Platform for Astrocyte Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 Aug 8;9 (2) :600-614. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.06.018.

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*. 2012 May 2;32 (18) :6391-410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.

Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Vogel H, Steinberg GK, Edwards MS, Li G, Duncan JA 3rd, Cheshier SH, Shuer LM, Chang EF, Grant GA, Gephart MG, Barres BA. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*. 2016 Jan 6;89 ( 1 ) :37-53. doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.013.

Kawano H, Oyabu K, Yamamoto H, Eto K, Adaniya Y, Kubota K, Watanabe T, Hirano-Iwata A, Nabekura J, Katsurabayashi S, Iwasaki K. Astrocytes with previous chronic exposure to amyloid  $\beta$ -peptide fragment 1-40 suppress excitatory synaptic transmission. *J Neurochem*. 2017 Dec;143 ( 6 ) :624-634. doi: 10.1111/jnc.14247.

Takeda K, Watanabe T, Oyabu K, Tsukamoto S, Oba Y, Nakano T, Kubota K, Katsurabayashi S, Iwasaki K. Valproic acid-exposed astrocytes impair inhibitory synapse formation and function. *Sci Rep*. 2021 Jan 8;11 ( 1 ) :23. doi: 10.1038/s41598-020-79520-7.

Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*. 2006 Oct;29 (10) :547-53. doi: 10.1016/j.tins.2006.08.004.

Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*. 2009 Mar 11;29 (10) :3276-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009.

Cavanaugh SE, Pippin JJ, Barnard ND. Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward. *ALTEX*. 2014;31 ( 3 ) :279-302. doi: 10.14573/altex.1310071.

Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther.* 2014 Jul 3;6 (4) :37. doi: 10.1186/alzrt269.

Rothstein JD. Of mice and men: reconciling preclinical ALS mouse studies and human clinical trials. *Ann Neurol.* 2003 Apr;53 (4) :423-6. doi: 10.1002/ana.10561.

Waldmeier P, Bozyczko-Coyne D, Williams M, Vaught JL. Recent clinical failures in Parkinson's disease with apoptosis inhibitors underline the need for a paradigm shift in drug discovery for neurodegenerative diseases. *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 15;72 (10) :1197-206. doi: 10.1016/j.bcp.2006.06.031.

Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 1977 May 13;126 (3) :397-42. doi: 10.1016/0006-8993 (77) 90594-7.

Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res.* 1993 Aug 1;35 (5) :567-76. doi: 10.1002/jnr.490350513.

Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci.* 2013 May;14 (5) :311-21. doi: 10.1038/nrn3484. Epub 2013 Apr 18. Erratum in: *Nat Rev Neurosci.* 2013 Jun;14 (6) :451.

Allen NJ, Eroglu C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron.* 2017 Nov 1;96 (3) :697-708. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.056.

Huettner JE, Baughman RW. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J Neurosci.* 1986 Oct;6 ( 10 ) :3044-60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.06-10-03044.1986.

Banker GA. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science.* 1980 Aug 15;209 (4458) :809-10. doi: 10.1126/science.7403847.

Williams EC, Zhong X, Mohamed A, Li R, Liu Y, Dong Q, Ananiev GE, Mok JC, Lin BR, Lu J, Chiao C, Cherney R, Li H, Zhang SC, Chang Q. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on

wild-type neurons. *Hum Mol Genet.* 2014 Jun 1;23 ( 11 ) :2968-80. doi: 10.1093/hmg/ddu008.

Lischka FW, Efthymiou A, Zhou Q, Nieves MD, McCormack NM, Wilkerson MD, Sukumar G, Dalgard CL, Doughty ML. Neonatal mouse cortical but not isogenic human astrocyte feeder layers enhance the functional maturation of induced pluripotent stem cell-derived neurons in culture. *Glia.* 2018 Apr;66(4):725-748. doi: 10.1002/glia.23278.

Canals I, Ginisty A, Quist E, Timmerman R, Fritze J, Miskinyte G, Monni E, Hansen MG, Hidalgo I, Bryder D, Bengzon J, Ahlenius H. Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Methods.* 2018 Sep;15 (9) :693-696. doi: 10.1038/s41592-018-0103-2.

Tchieu J, Calder EL, Guttikonda SR, Gutzwiller EM, Aromolaran KA, Steinbeck JA, Goldstein PA, Studer L. NFIA is a gliogenic switch enabling rapid derivation of functional human astrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2019 Mar;37 (3) :267-275. doi: 10.1038/s41587-019-0035-0.

Hedegaard A, Monzón-Sandoval J, Newey SE, Whiteley ES, Webber C, Akerman CJ. Pro-maturational Effects of Human iPSC-Derived Cortical Astrocytes upon iPSC-Derived Cortical Neurons. *Stem Cell Reports.* 2020 Jul 14;15 (1) :38-51. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.05.003.

VanderWall KB, Vij R, Ohlemacher SK, Sridhar A, Fligor CM, Feder EM, Edler MC, Baucum AJ 2nd, Cummins TR, Meyer JS. Astrocytes Regulate the Development and Maturation of Retinal Ganglion Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2019 Feb 12;12 ( 2 ) :201-212. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.12.010.

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に終始熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました福岡大学薬学部薬学科臨床疾患薬理学教室の岩崎克典教授、渡辺拓也助教、窪田香織講師に感謝の意を表します。本研究の遂行にあたり多大なご指導とご助言を賜り、終始実験を援助して頂いた桂林秀太郎教授に深く感謝申し上げます。

実験手技の面でご指導賜りました大藪康平博士、武田琴水博士、ご助言を賜りました福岡大学医学部総合医学研究センターの廣瀬伸一教授、福岡大学てんかん分子病態研究所の田中泰圭博士に感謝の意を表します。また、本研究の先駆者である河野洋幸博士、終始苦楽を共にした同期の平田茉莉花女史に厚く御礼申し上げます。そして、学生生活を通じて終始精神的、経済的支援を賜りました家族や私を支えてくださった友人に心より感謝いたします。最後に、本研究に尊い生命を提供していただきました実験動物諸霊に深く感謝いたします。