

—— 研究助成報告 ——

妊娠期に特異的に発現する広範囲伝播脱分極波におけるGABA受容体の役割 －抗てんかん薬による胎児脳発生異常に関する新規メカニズムの提唱－

Contribution of GABA receptors on the depolarization wave expressed in the embryonic brain
－Effects of GABA_A receptor modulators and a new hypothesis on the developmental role of the depolarization wave－

佐 藤 容 子

要旨：発生期中枢神経系では、脊髄から前脳まで広範囲にわたって伝播する脱分極波という自発活動がみられる。GABAは興奮性伝達物質として脱分極波の出現に関与しているが、GABA_A受容体機能を促進するmuscimol, diazepam, valproateの投与によって、脱分極波に対する様々な促進作用、抑制作用のみられることが明らかとなった。神経回路網形成における脱分極波の役割を検証するために、*in ovo*で脱分極波を阻害し、それによって機能的シナプス形成にどのような影響があらわれるのかを解析した。脱分極波をブロックした標本では、迷走神経一次感覚核である孤束核での応答には差がないが、二次感覚核である傍腕核での応答は著明に減弱することがわかった。GABA受容体作動薬として働いてんかん治療薬の妊娠期における投与は、脱分極波を阻害ないし増強させることによって、神経回路網の発生に影響を及ぼすことが想定される。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2018；29：51-58

Key Words： 広範囲伝播脱分極波, GABA受容体, シナプス回路網形成, 胎生期, 光学的計測

【序論】

妊娠中の薬物摂取は、胎児に様々な悪影響を及ぼすことが知られているが、その中でももっとも重篤な障害の一つが神経系に対する障害である。われわれは、これまでにニューロン電位活動の光学的イメージング法を用いて、脊椎動物中枢神経系の機能発生・機能構築過程の解析を行ってきたが、その過程で、胎生期における中枢神経系の機能発生に重要な役割を果たすと考えられる広範囲伝播脱分極波 (depolarization wave) を発見した^{1, 2, 3)}。この脱分極波は、前脳から脊髄まで、中枢神経系の非常に広範囲にわたって伝播する興奮波で、発生の一時期に局限して発現するが、その

発現時期は、シナプス回路網の形成期と重なっており、脱分極波を介するニューロン群の秩序正しい同期的活動が、神経回路網の正常な発生に不可欠であることが示唆された^{2, 3)}。これに続く伝播ネットワークの解析で、GABA (γ -aminobutyric acid) 受容体が脱分極波の伝播に重要な役割を果たしていることが明らかとなった⁴⁾。この脱分極波は、当初鶏胚で見いだされたが、哺乳類にも発現していることが最近確認され、GABA受容体作動薬である抗てんかん薬の母体投与による胎児脳発達への影響という観点から、その解析が極めて重要であることが強く示唆された。本研究は、脱分極波を介した神経系の発生制御機構と、それに関連したGABA受容体の役割について解析を行い、てん

かん治療薬が及ぼす胎生期の神経系発生への影響について検討することを目的とする。

【方法】

1) 摘出脳幹—脊髄標本における自発性脱分極波の電気生理学的測定

鶏受精卵 (White Leghorn) を38.0℃, 湿度80%の孵卵器に入れ, 孵卵5~8日目 (E5~E8) に取り出して中脳上部を断頭し, 脳幹から脊髄までの摘出脳幹—脊髄標本を作成した。標本は, O₂ガスで飽和させたRinger液で灌流した (2 mL/分, 室温24~28℃)。Ringer液の組成は, NaCl 138 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 0.5 mM, Tris-HCl buffer (pH7.26~7.28) 10 mM, glucose 10 mMである。

マウス (ICR) は, 夕方に雌と雄を一緒に籠に入れ, 翌朝に精液の状態を検査し, その調べた日をE0 (妊娠0日) とした。妊娠11~14日 (E11~E14) のマウスにエーテルで麻酔をし, 頸椎脱臼の後, 胎仔を外科的に取り出し, 鶏胚と同様に摘出脳幹—脊髄標本を作製した。標本をチェンバーに固定後, 人工脳脊髄液 (ACSF) で灌流した (2 mL/分, 室温24~28℃)。ACSFの組成は, NaCl 124 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgSO₄ 1 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, NaHCO₃ 22 mM, glucose 10 mMである。ACSFは, 95% O₂/5% CO₂混合ガスで飽和し, pH 7.4に調整した。

摘出脳幹—脊髄標本における電気生理学的測定では, 自発性脱分極波に伴う運動神経細胞の集合活動電位を, ガラス吸引電極を用いて迷走神経の断端から記録した。電気信号は, 0.08 Hz~1 kHzの波長域を増幅し, 4 kHzの精度でデジタル化してコンピューターに記録した。

2) *in ovo*鶏胚における脱分極波の阻害

孵卵4日目の卵を孵卵器から取り出し, 卵殻と卵黄膜の一部を除去した。鶏胚にbicuculline (5 mM)/strychnine (5 mM) 混合液100 µLを添加した後, 卵殻に開けた穴をテープで密封し, 孵卵を継続した。試薬は, penicillin (100 unit/mL) とstreptomycin (0.1 mg/mL) を含むRinger液中に溶かし, 孵卵4~7日の間100 µL/日を卵内に投与した。

3) 脳幹迷走神経核におけるシナプス形成過程の光学的解析

光学的測定法は, 膜電位に感受性をもつ色素で細胞を染色し, 細胞の膜電位変化を, それに伴って生じる色素の吸光あるいは蛍光の変化として測定するものである。光学的測定法は, 細胞に対して低侵襲性であるため, 発生初期の未熟で微小な細胞にも適用が可能であり, また多領域からの同時測定により, 活動の時空間パターンを解析することができる^{5,6,7)}。

孵卵8日の鶏胚を取り出し, 断頭後, 迷走神経を付けた状態で脳幹を摘出した (*en bloc*標本)。slice標本では, 迷走神経をはさんで厚さ1,000~1,500 µmの脳幹のスライスを切り出した。標本は, 膜電位感受性色素NK2761 (0.2 mg/mL) を含むRinger液中に10~15分間浸して染色した。染色後, 標本を固定したチェンバーを正立型生物顕微鏡のステージに乗せ, 対物レンズ (×10), 写真用接眼レンズ (×2.5) を用いて25倍の実像を作り, 検光器が1020chの光学的測定装置^{5,6)}を用いて, 699±13 nmの透過光にて測定を行った。電気刺激は, 迷走神経にガラス吸引電極を取り付け, 8 µA/5 msecで1回刺激を行った。光学的シグナルは, 約1 kHz (1024 frame/sec) の精度でデジタル化し, コンピューターに記録した。

【結果】

(1) 脱分極波に対するGABA受容体作動薬の影響に関する解析

脱分極波が出現する孵卵4~8日の鶏胚, 胎生11~13日のマウス胚において, GABAは興奮性伝達物質として脱分極波の発現に関与している^{2,3,4)}。脱分極波に対するGABA受容体作動薬の影響を明らかにするために, 自発性脱分極波に伴う神経活動を迷走神経の断端から集合活動電位として記録した。

1) muscimolの効果

通常Ringer液中では, 脱分極波にともなうバースト (burst) と呼ばれる電氣的活動が連続したエピソード (episode) が, 数分に1回の頻度で出現した。Fig. 1Aは, 孵卵6日 (stage

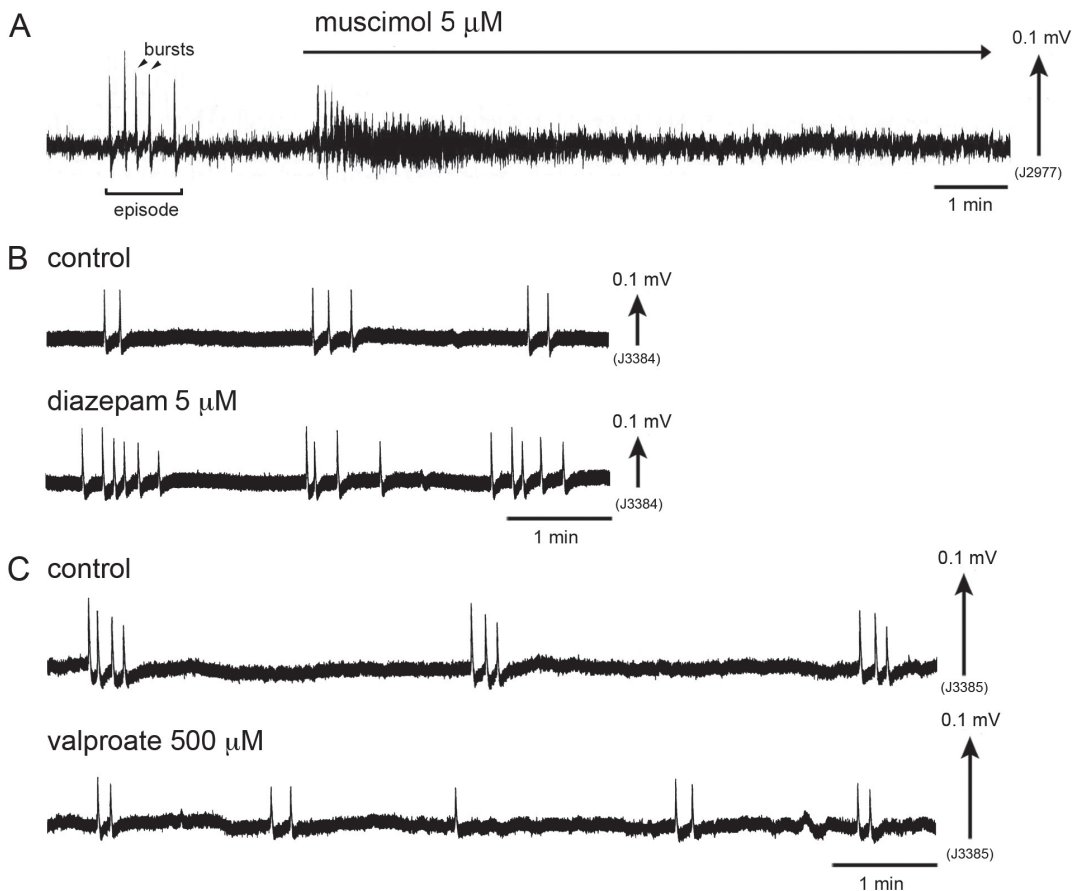


Fig. 1 脱分極波に対するGABA受容体作動薬の影響

A, 孵卵6日 (stage 28) の鶏胚脳幹-脊髄標本におけるmuscimolの効果。灌流液をmuscimol (5 μ M) を含むRinger液に置換する前後の迷走神経活動を記録した (文献4より改変)。B, 孵卵5日 (stage 26) の鶏胚脳幹-脊髄標本におけるdiazepamの効果。上段: control, 下段: diazepam (5 μ M) 投与後10分後における迷走神経活動。C, 孵卵5日 (stage 26) の鶏胚脳幹-脊髄標本におけるvalproateの効果。上段: control, 下段: valproate (500 μ M) 投与後20分後における迷走神経活動。

28) の鶏胚脳幹—脊髄標本で, GABA_A受容体のagonistであるmuscimol (5 μ M) を投与した時に得られた記録である。muscimolの投与直後, ランダムな活動を反映したAC成分が増加したが, 脱分極波を反映したburstは消失した (n=4)。マウス胚での測定においても, E12-E14の発生段階で同様の結果が得られた (n=6)。このことから, muscimolは興奮作用 (非同期性活動の増大) と抑制作用 (同期性の脱分極波のブロック) の二重作用を持ち, 脱分極波に対しては抑制的に作用することが示された。

2) diazepamの効果

diazepamは, GABA_A受容体のpositive allosteric modulatorである。孵卵5日の鶏胚脳幹—脊髄標本でdiazepamを投与したところ, 脱分極波の出現リズムに変化が見られた (Fig. 1B)。episodeの頻度 (frequency) とburstの数を測り比較したところ, diazepam (3.5 μ M) では, frequencyにはあまり変化がないが (101.5%, n=5), burstの数が増大していることがわかった (137.7%, n=5)。diazepam (5 μ M) では, frequencyにも変化が見られ (123.7%, n=9), またburstの数 (145.3%,

n=9)は著明に増大した。

3) valproateの効果

valproateは、GABA transaminaseのblockerであり、GABAの効果を持続させてGABA受容体に対するpositive modulatorとして作用する。孵卵5日の鶏胚脳幹—脊髓標本でvalproate (50 μ M)を投与したところ、自発性脱分極波のepisodeの頻度(frequency)は増大したが(114.4%, n=2), burstの数は減少した(82.8%, n=2)。valproate (500 μ M)でも同様に、frequencyは増大し(122.7%, n=5), burstの数は減少した(76.0%, n=5)(Fig. 1C)。

1) ~3)の結果から、興奮性伝達物質として働いているGABAの受容体機能を促進するような薬物の投与によって、様々な促進作用、抑制作用がみられることが明らかとなった。

(2) GABA受容体を介する脱分極波の機能的意義に関する解析

脱分極波は、シナプス回路網が形成される時期に一致して一時的に出現することから、発生過程における神経回路網形成に重要な役割を果たしていると考えられる。この仮説を検証するために、脱分極波を*in ovo*で阻害し、それによって機能的シナプス形成にどのような影響があらわれるのかを、膜電位の光学的計測法を用いて解析した。

孵卵4~7日の間に*in ovo*で脱分極波をブロックし、孵卵8日目に摘出した脳幹slice標本で、迷走神経刺激によって得られた光学的シグナルをコントロール標本と比較した。一次感覚核である孤束核におけるシグナルの出方には、コントロールと脱分極波を阻害した標本との間で、明らかな違いは見られなかった。脱分極波の阻害効果について定量的に調べるために、コントロール標本と脱分極波をブロックした標本の孤束核において、最も大きいシナプス後電位の大きさ(maximum signal size)と、シナプス後電位の大きさがmaximum signal sizeの70%以上の領域(70% area)を測り比較した。maximum signal sizeは、コントロールでは 32.9 ± 2.2 ($\Delta I/I : \times 10^{-4}$) (n=16), 脱分極波をブロックした標本では 27.9 ± 1.9 ($\Delta I/I : \times 10^{-4}$) (n=13)であり、70% areaは、コント

ロールでは 18.1 ± 2.1 (画素数) (n=16), 脱分極波をブロックした標本では 16.4 ± 0.8 (画素数) (n=13)であった。maximum signal size, 70% areaとも、コントロールと脱分極波をブロックした標本の間に有意差は認められなかった(*t*-test, $P > 0.05$)。

迷走神経回路網では、孤束核からの出力が傍腕核に投射していることが知られている⁸⁾。Fig. 2は、脳幹*en bloc*標本で、迷走神経刺激に対する孤束核(nucleus of the tractus solitarius: NTS)と傍腕核(parabrachial nucleus: PBN)の応答をみたものである。コントロール標本では、迷走神経刺激によって、まず同側の迷走神経根レベルに孤束核の応答が出現し、それにやや遅れて、対側の橋レベルに傍腕核の応答が検出された(Fig. 2A-a, 2B-a)。孵卵4~7日に*in ovo*で脱分極波をブロックした標本で同様の測定を行ったところ、孤束核における応答には変化がないが、傍腕核における応答は著明に減弱することがわかった(Fig. 2A-b, 2B-b)。孤束核と傍腕核における応答を定量的に比較したところ(maximum signal size, $\Delta I/I : \times 10^{-4}$)、脱分極波の阻害によって、孤束核におけるシナプス後電位の大きさには差がないが(コントロール 13.1 ± 0.9 , n=19; 脱分極波をブロックした標本 12.9 ± 1.3 , n=15), 傍腕核の応答は明らかに減弱することが示された(コントロール 2.9 ± 0.3 , n=21; 脱分極波をブロックした標本 1.6 ± 0.2 , n=20) (*t*-test, $P < 0.05$) (Fig. 2C)。これらの結果から、脱分極波は、脳幹内におけるシナプス回路網の機能的発生、特に高次感覚核におけるシナプス伝達機能の発生に、重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

【考察】

GABAは、成体では抑制性の神経伝達物質として働いており、GABA_A受容体のpositive modulatorは、GABAの抑制効果を増強するてんかん治療薬として用いられている。発生初期には、細胞内[Cl⁻]が高いためにGABAの平衡電位は脱分極側にあり、GABAはdepolarizing inhibitionをおこす。実際、孵卵5~8日の鶏胚、

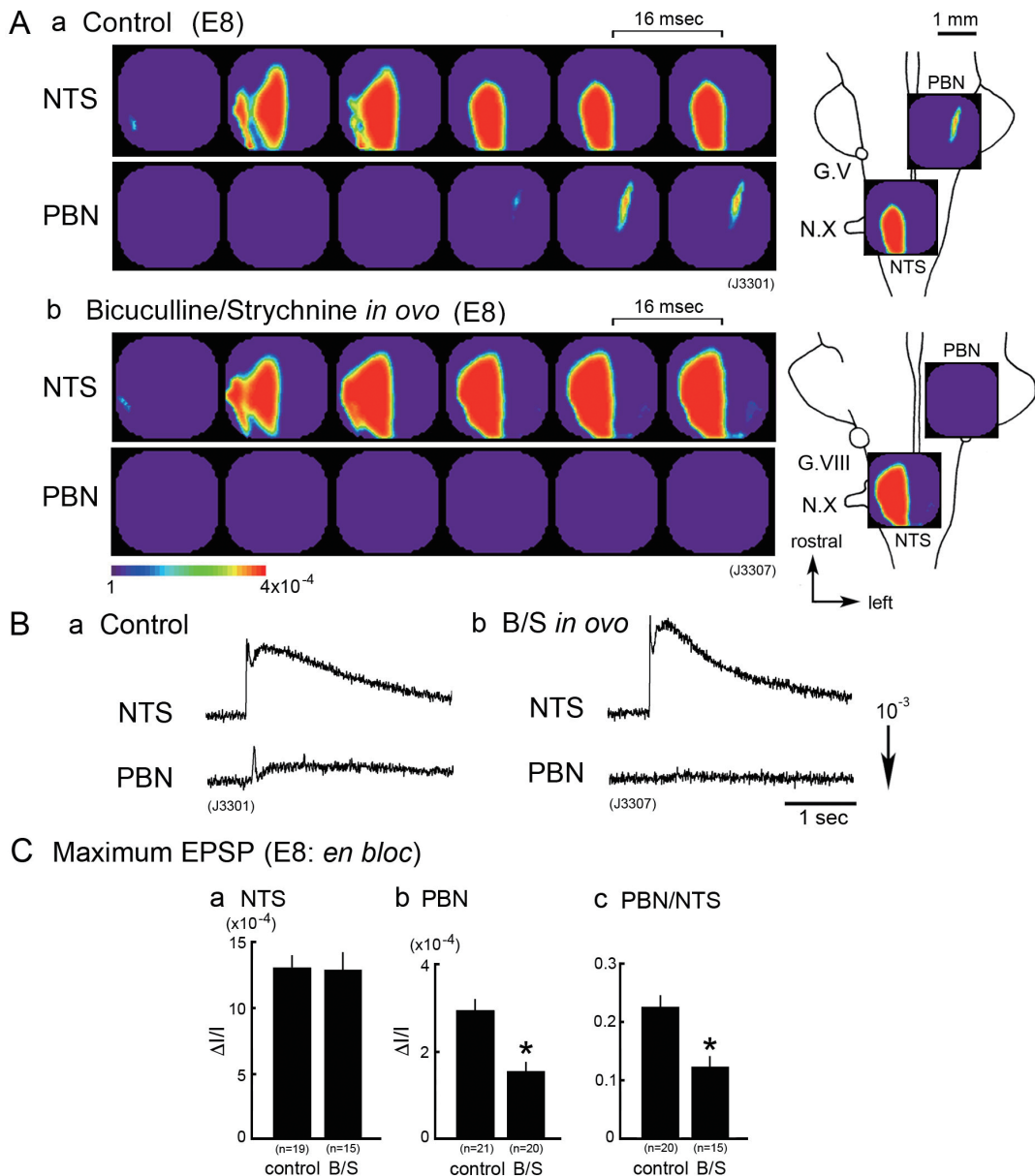


Fig. 2 脱分極波の阻害による機能的シナプス形成への影響

A, B, 孵卵8日の脳幹*en bloc*標本で、迷走神経 (N.X) 刺激に応じて得られた光学的シグナルのイメージング (A) とシグナルの拡大図 (B)。a, control, b, 孵卵4~7日の間bicuculline (5 mM)/strychnine (5 mM) を100 μ L/日卵内に投与した標本。それぞれ、上段が孤束核 (NTS), 下段が傍腕核 (PBN) における記録。C, 孤束核 (a), 傍腕核 (b) におけるシナプス後電位の最大値と、その比 (c)。*は、有意差があることを示す (*t*-test, $P < 0.05$)。 (文献9より改変)

胎生11~13日のマウス胚において、GABAは興奮性伝達物質として脱分極波の発現に関与していることが明らかにされた^{2,3,4)}。GABA_A受容体機能を促進するagonistやpositive modulator

を投与したところ、様々な促進作用、抑制作用がみられ、その作用は複雑であることが示された。例えば、agonistであるmuscimolの投与では、ランダムな活動を反映したAC成分が増

加したが、脱分極波を反映したburstは消失した。また、valproateの投与では、episodeの頻度（frequency）は増大したが、episodeを構成するburstの数は減少した。これらのことから、胎生期にGABA受容体作動薬を投与した場合、その効果は複雑で、様々な影響が生じうることが示唆された。

脱分極波の機能的意義については、長らく不明であったが、今回の解析の結果、中枢神経系内におけるシナプス回路網の機能的発生、特に脳幹の高次感覚核におけるシナプス伝達機能の発生に、重要な役割を果たしていることが明らかとなった。シナプス形成と神経活動の関係については、シナプス形成後のrefinementやdetailed patterningがactivity-dependentであることが知られている一方、シナプス回路網の初期形成過程に神経活動が必要かどうかは今なお議論が多いところである。今回の解析の結果は、脱分極波を介した神経活動がシナプス回路網の初期形成過程に不可欠であることを示すもので、中枢神経系の機能的形成過程のメカニズムを解明する上で、重要な知見と考えられる。

胎生期におけるてんかん治療薬の影響を解明するために、現在*in ovo*でGABA受容体作動薬を投与し、その結果シナプス回路網形成にどのような影響が出るのかについて検討を行っている。もし脱分極波に対する抑制効果が勝るのであれば、てんかん治療薬の投与が、GABA受容体阻害剤の*in ovo*投与と同様、シナプス形成の阻害・機能不全を引き起こす可能性が考えられる。一方、神経活動への増強作用（episode frequencyの増大など）を考えれば、てんかん治療薬の投与がシナプス形成の過剰・機能促進を引き起こす可能性も考えられる。あるいは、抑制作用と増強作用が相殺され、シナプス形成には影響がでないと予想することもできる。今後は、これらの解析を進めるとともに、迷走神経以外の回路網も対象に含め、さらなる研究をすすめていく必要がある。

【文献】

1) Momose-Sato Y, Sato K, Mochida H, Yazawa I,

Sasaki S, Kamino K. Spreading depolarization waves triggered by vagal stimulation in the embryonic chick brain: optical evidence for intercellular communication in the developing central nervous system. *Neuroscience* 2001 ; **102** : 245-262.

2) Momose-Sato Y, Sato K. Large-scale synchronized activity in the embryonic brainstem and spinal cord. *Front Cell Neurosci* 2013 ; **7**, Article 36 : 1-15.

3) Momose-Sato Y, Sato K. Development of spontaneous activity in the avian hindbrain. *Front Neural Circuits* 2016 ; **10**, Article 63 : 1-8.

4) Mochida H, Sato K, Momose-Sato Y. Switching of the transmitters that mediate hindbrain correlated activity in the chick embryo. *Eur J Neurosci* 2009 ; **29** : 14-30.

5) Momose-Sato Y, Sato K, Kamino K. Optical approaches to embryonic development of neural functions in the brainstem. *Prog Neurobiol* 2001 ; **63** : 151-197.

6) Momose-Sato Y, Sato K, Kamino K. Monitoring population membrane potential signals during development of the vertebrate nervous system. In: Canepari M, Zecevic D, Bernus O, eds. *Membrane Potential Imaging in the Nervous System and in the Heart*. New York: Springer, 2015 : 213-242.

7) Momose-Sato Y, Sato K. Voltage-sensitive dye imaging during functional development of the embryonic nervous system: a brief review with special thanks to Professor Larry Cohen. *Neurophotonics* 2015 ; **2**, 021009 : 1-5.

8) Momose-Sato Y, Sato K. Development of synaptic networks in the mouse vagal pathway revealed by optical mapping with a voltage-sensitive dye. *Eur J Neurosci* 2016 ; **44** : 1906-1918.

9) Momose-Sato Y, Sato K. Developmental roles of the spontaneous depolarization wave in synaptic network formation in the embryonic brainstem. *Neuroscience* 2017 ; **365** : 33-47.

Summary

Contribution of GABA receptors on the depolarization wave expressed in the embryonic brain – Effects of GABA_A receptor modulators and a new hypothesis on the developmental role of the depolarization wave –

Yoko Momose-Sato

Widely propagating wave-like activity, referred to as the depolarization wave, transiently occurs in the developing central nervous system. It is inhibited by a GABA_A receptor antagonist, bicuculline, demonstrating that GABA acts as an excitatory mediator of this wave. Therefore, we examined the effects of a GABA_A receptor agonist, muscimol, and positive modulators of GABA transmission, diazepam and valproate. Muscimol induced an increase in non-episodic activity, which was followed by cessation of spontaneous episodes and bursts related to the depolarization wave. In the presence of diazepam, the episode frequency and the number of bursts increased, whereas with valproate, the episode frequency increased, but the number of bursts decreased. We next examined the functional significance of the depolarization wave by blocking the wave *in ovo*. Chronic inhibition of the wave had no significant effect on the development of monosynaptic EPSPs in the first-order nucleus of the vagal sensory pathway, but markedly reduced polysynaptic responses in the higher-order nucleus. These results suggest that the depolarization wave plays an indispensable role in the initial process of functional synaptic network formation, especially in the higher-order nucleus of the cranial sensory pathway.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2018 ; 29 : 51–58

