

—— 研究助成報告 ——

遊走性焦点発作を伴う乳児てんかんの動物モデルを用いた 脳活動イメージング

重 光 玲於奈, 荻 野 一 豊, 平 田 普 三

要旨：K-Cl共輸送体2（KCC2）は神経細胞の成熟に必要とされるが、KCC2ノックアウトマウスは出生後すぐに死亡するので、生後の脳神経系におけるKCC2の役割は十分には解明されていなかった。本研究では熱帯魚ゼブラフィッシュを実験動物に採用し、遺伝子重複により2つあるKCC2（KCC2a, KCC2b）の変異体を作製し、解析した。KCC2b変異体成魚は光刺激に対して、てんかん様の異常応答を示した。家族性てんかん患者の遺伝子解析から、遊走性焦点発作を伴う乳児てんかんの家系でKCC2の変異が確認された。脳活動イメージングから、KCC2a-KCC2b二重変異体は光刺激後に脳活動が異常に高まり、また運動も亢進することが分かり、稚魚もてんかん様応答と示すと考えられた。以上のことから本研究ではKCC2変異体ゼブラフィッシュがてんかんの新しい動物モデルとなることを提唱し、創薬への基盤を構築したことを報告する。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2019 ; 30 : 51-56

Key Words：遊走性焦点発作を伴う乳児てんかん, KCC2, 抑制性シナプス伝達, カルシウムイメージング, ゼブラフィッシュ

【序論】

未成熟な神経細胞はNa-K-Cl共輸送体1（NKCC1）を高発現し、細胞内にCl⁻を多く取り込むことでCl⁻の平衡電位を静止膜電位よりも高く維持し、これによりGABAやグリシンによる抑制性シナプス伝達は脱分極性にはたらくとされている¹⁾。神経細胞は成熟過程においてCl⁻を細胞外に排出するK-Cl共輸送体2（KCC2）の発現を高め、細胞内Cl⁻濃度を下げることによってCl⁻の平衡電位を低下させることが重要であり、これにより抑制性シナプス伝達は過分極性にはたらくことになる（Fig. 1）。KCC2のノックアウトマウスは2001年に報告されたが、出生後すぐに呼吸不全で死亡するため、生後の脳神経系におけるKCC2の役割は十分には解明されていなかった²⁾。筆者らは抑制性シナプスの発達と機能を解析する中でKCC2に注目し、しかしマウスは致死で機能解析がしにくい

ことから、太古に起きた遺伝子重複により2つのKCC2（KCC2a, KCC2b）を有する熱帯魚ゼブラフィッシュを実験動物に採用して生後の個体におけるKCC2の機能を解析を進めてきた。

本研究でゼブラフィッシュのKCC2aとKCC2bの遺伝子破壊をTALEN法で行い、それぞれの変異体を得た。KCC2a変異体およびKCC2b変異体は成魚まで育ち、いずれも見た目には異常はなかったが、KCC2b変異体は音刺激や光刺激に対して、てんかん様の応答を示すことを見出した。家族性てんかん患者の遺伝子解析から、遊走性焦点発作を伴う乳児てんかんの家系でKCC2のアミノ酸置換変異が確認された。KCC2a-KCC2b二重変異体稚魚を用いたてんかん様の表現型解析やカルシウムイメージングによる脳活動のリアルタイム可視化から、KCC2a-KCC2b二重変異体で神経活動が亢進することも実証した。このように本研究ではKCC2変異体ゼブラフィッシュがてんかんの新

しい動物モデルになることを提唱し、創薬への応用の基礎を構築することを目的としている。

【方法】

実験動物：ゼブラフィッシュは明14時間、暗10時間の明暗サイクルの部屋で28.5℃の水温で一般的な飼育環境のもと飼育した³⁾。動物飼育および動物実験は青山学院大学ライフサイエンス委員会の認可のもとガイドラインに従って適正に行った。神経系でGAL4を発現する系統Tg (huC : GVP) およびUASプロモーターでGCaMPを発現する系統Tg (UAS : GCaMP6s) はいずれもナショナルバイオリソースプロジェクトから分与されたものを使用した。ゲノム編集によるKCC2aおよびKCC2bの遺伝子破壊はTALEN法で行い、いずれも膜貫通ドメイン1をコードするエキソンを標的とした。TALENのmRNAをin vitro転写で合成し、1~2細胞期のゼブラフィッシュ胚にインジェクションし、それを成魚まで成長させた後に交配して次世代個体を得て、その次世代個体のゲノムを解析することで、KCC2の遺伝子欠失をヘテロにもつ個体を確認した。遺伝子解析にはジェネティクス社のGENETYX-MAC Ver. 20を使用した。

感覚刺激実験：動物への音刺激はMSAファクトリー社のソレノイドハンマーを用いて水槽(21.3 × 7.2 × 5.8 cm)を5Hzで叩くことで与えた。成魚個体への光刺激はハッピージョイント社の簡易LEDストロボを20 Hzで使用した。カルシウムイメージングの実験では青色光でGCaMPを励起して緑色蛍光を検出するが、ハッピージョイント社の簡易LEDストロボは白色光であり、蛍光検出の際にシグナルを飽和させるほど写り込んでしまうという問題があり、カルシウムイメージングの実験では日進電子社の赤色LEDリング照明をファンクションジェネレーターで20 Hzに制御して使用した。カルシウムイメージングでは5日齢の稚魚を2%低融点アガロースゲルに包埋して動きを封じ込め、オリンパス社の正立顕微鏡BX53下で浜松ホトニクス社のORCA-FlashデジタルCMOSカメラで蛍光画像を取得した。動画解析にはNIHのImageJを使用した⁴⁾。

定量的RT-PCR：定量的RT-PCRではKCC2aおよびKCC2bのエキソンをまたぎ、PCR産物が200 bpとなるようなプライマーをデザインした。逆転写にはサーモフィッシャー社のSuperScript IV逆転写酵素を使用し、定量的PCRには日本ジェネティクス社のKAPA SYBR FAST qPCRキットをサーモフィッシャー社のQuantStudio 5リアルタイムPCRシステムで使用した。内部標準としてbeta-actinを使用した。全胚in situ hybridizationには5日齢個体を使用した⁴⁾。

【結果】

KCC2は脊椎動物で高度に保存されており、ゼブラフィッシュのKCC2aとKCC2bはいずれもヒトのKCC2とアミノ酸レベルで83%の類似性があった。KCC2は12個の膜貫通ドメインをもつが、1つ目の膜貫通ドメインをコードする遺伝子領域を標的としたゲノム編集をTALEN法で行い、KCC2aをコードするSLC12A5a遺伝子では8塩基欠失、KCC2bをコードするSLC12A5b遺伝子では5塩基欠失の変異アリルを得た。いずれも1つ目の膜貫通ドメイン内でフレームシフト変異を引き起こすことになるので、KCC2aおよびKCC2bの機能喪失アリルを得たと言え、またPCRによるジェノタイピングも可能になった。変異をヘテロにもつ成魚を交配してKCC2aのホモ変異体やKCC2bのホモ変異体（以下、ホモを省略して変異体とする）を得たが、いずれも発生には異常はなかった。しかし、KCC2b変異体は音刺激や光刺激に対して、激しく動き回った後にけいれんするという特異な応答を示した。このてんかん様の応答はKCC2b (-/-) の個体でのみ見られ、KCC2aのジェノタイプに関しても (+/+) よりも (+/-) の方がてんかん様応答が起りやすい傾向があった (Tab. 1)。これはKCC2aがKCC2bを量的に相補する可能性を示唆している。脳でのKCC2aとKCC2bの発現量を検討するため、ゼブラフィッシュ成魚の脳を解剖して終脳、間脳・視蓋・中脳、脳幹・延髄、小脳に分け、それぞれの領域からRNAを抽出して定量的RT-PCRを行うと、間脳・視蓋・中脳で

Tab. 1 音刺激によりゼブラフィッシュ成魚のてんかん様応答

KCC2a, KCC2b	音刺激 5 Hz	光刺激 20 Hz
+/+, +/+	なし (0/11 個体)	なし (0/6 個体)
-/-, +/+	なし (0/10 個体)	なし (0/5 個体)
-/-, +/-	なし (0/13 個体)	なし (0/7 個体)
+/+, -/-	あり (4/11 個体)	異常 (2/11 個体)
+/-, -/-	あり (14/20 個体)	異常 (6/20 個体)
-/-, -/-	稚魚 10 日齢で死亡	稚魚 10 日齢で死亡

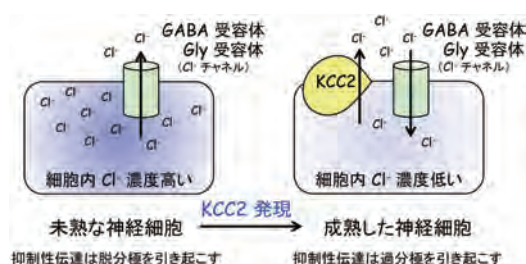


Fig. 1 KCCの発現による神経細胞の成熟
未熟な神経細胞にはKCC2は少なく、細胞内Cl⁻濃度が高いため、抑制性シナプス伝達はCl⁻の流出、つまり脱分極を引き起こす。神経細胞は成熟の過程でKCC2の発現を高め、これにより細胞内Cl⁻濃度は低下する。成熟した神経細胞では抑制性シナプス伝達はCl⁻の流入、つまり過分極を引き起こす。

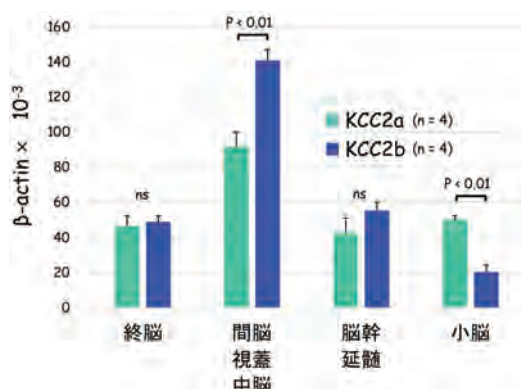


Fig. 2 成魚の脳におけるKCC2aとKCC2bの発現
成魚の脳の領域ごとに切り分け、各領域におけるKCC2a, KCC2bの発現を定量的RT-PCRで解析すると、間脳・視蓋・中脳の領域でKCC2bの発現が有意に高かった。

KCC2bの発現がKCC2aの発現に比べて高かった (Fig. 2)。これはKCC2b変異体のみでてん

かん様の応答が見られることに関連しうるが、さらに細かく脳領域を切り分けるなど、もっと詳細な発現領域の解析が必要であろう。

KCC2とてんかんの関連は以前から示されてきた^{5, 6)}。筆者らも英国のグループとの共同研究で家族性てんかんの患者家系のエキソーム解析を行い、パキスタンの家系でL311Hのアミノ酸置換変異を、コーカサスの家系でL426PおよびG651Dのトランスヘテロのアミノ酸置換変異を見出した⁷⁾。これらの変異をもつKCC2タンパク質を培養細胞に発現させると、正常なKCC2タンパク質と比べて細胞膜への表出が顕著に低下していたことから、アミノ酸置換変異により細胞内輸送に障害があらわれたと推察される。KCC2の減少した個体では神経細胞内のCl⁻濃度が高く、抑制性シナプス伝達が興奮性に作用し、神経細胞を過剰興奮させているのだろう。今回KCC2変異が見つかった家族性てんかんの2家系はいずれも「遊走性焦点発作を伴う乳児てんかん」であり、このてんかんの原因遺伝子として従来から知られていたKCNT1, SCN1A, PLCB1, TBC1D24, SLC25A22に加えてKCC2をコードするSLC12A5も「遊走性焦点発作を伴う乳児てんかん」の原因遺伝子として同定されたことになる。遊走性焦点発作を伴う乳児てんかんは発作中に脳波焦点が反対側に、あるいは同側の離れた部位に移動する特徴とする治療抵抗性のてんかんで、多くの症例で発作予後、発達予後ともに悪く、重度の精神運動発達遅滞を残すことから難病に指定にされている (指定難病148)。本研究で得られたKCC2b変異体成魚はこのてんかんの新しい動物モデルになりうる。

KCC2a変異体とKCC2b変異体はいずれも稚魚期において発生異常も、音刺激や光刺激に対する異常応答は見られなかった。一方でKCC2a-KCC2b二重変異体は5日齢稚魚期に光刺激を与えると運動が亢進し、光刺激を与えている間中動き続けるという、野生型個体には見られない特徴的な異常応答を示した。稚魚期におけるKCC2a, KCC2bの発現をin situ hybridization法で調べると、いずれも脳と脊髄全体で発現が見られた。両者は機能的に他方を相補すると考え

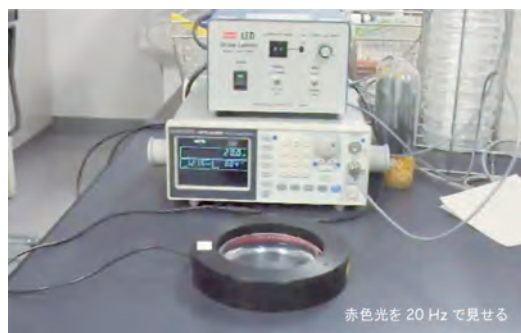


Fig. 3 稚魚のてんかん誘導実験の装置
稚魚をシャーレ内で低融点アガロースに包埋してリング状に配置した赤色LEDで光刺激を与えた。ファンクションジェネレーターで20 Hzのパルス光を作った。

られ、これはKCC2aあるいはKCC2bの単独の変異体では稚魚期に表現型が見られないのに対して、KCC2a-KCC2b二重変異体で運動亢進の表現型が見られることと合致する。ゼブラフィッシュを研究に用いる利点の1つはサンプルが小さく、特に稚魚期は体が透明なのでライブイメージングを行えることにあり、KCC2を欠損するゼブラフィッシュがてんかんの動物モデルとなることを検証するためにも、脳活動を直接観察するカルシウムイメージングを行った。神経系全体で遺伝子発現をドライブするhuCプロモーターで転写因子GAL4-VP16を発現するトランスジェニックとUASプロモーターでGCaMPを発現するトランスジェニックを入手し、これらを交配することで神経系全体でGCaMPを発現する稚魚を得た。GCaMPはカルシウムと結合すると緑色蛍光を発するカルシウム指示タンパク質であり、神経細胞が活動電位を発する際には必ずカルシウムイオンの流入が起こることから、GCaMPの緑色蛍光で神経活動をリアルタイムに可視化することができる。神経系でGCaMPを発現する系統をKCC2a-KCC2b二重変異体に交配し、得られた個体同士を交配させることで、GCaMPを神経系で発現するKCC2a-KCC2b二重変異体を得て、これをカルシウムイメージングに用いた。具体的には青色励起光を照射してGCaMPの緑色蛍光発光を画像取得しつつ、赤色LEDを点滅させて

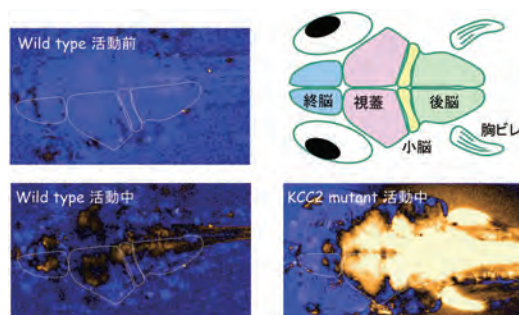


Fig. 4 脳活動カルシウムイメージング
野生型 (Wild-type) の脳で神経活動が高まった領域は蛍光シグナルが見られた。KCC2a-KCC2b二重変異体 (KCC2 mutant) ではきわめて明るい蛍光シグナルが見られた。

光刺激を与えた。赤色光は長波長なので励起や蛍光発光に干渉せず視覚刺激を与えることができる (Fig. 3)。野生型個体は光刺激がなくても時々自発的に発火するが、光刺激を与えると神経活動の頻度が増えた。一方、KCC2a-KCC2b二重変異体は刺激前には神経活動は低調だが、光刺激を与えると神経活動が顕著に誘発され、カルシウムイオンの流入量からその振幅がきわめて高いことが分かった (Fig. 4)。さらに脳を終脳、視蓋、小脳、後脳に領域分けしてそれぞれの領域の神経活動を解析すると、いずれの領域でも野生型個体と比較してKCC2a-KCC2b二重変異体で高い神経活動が見られ、活動の持続時間も有意に長かった (Fig. 5)。これらのカルシウムイメージングの結果は脳活動をダイレクトに観察したものであり、KCC2a-KCC2b二重変異体では感覚刺激により脳活動が異常亢進することが実証された。したがって、KCC2a-KCC2b二重変異体はてんかんの表現型を示していると示唆される。KCC2b変異体成魚が音刺激や光刺激に対しててんかん様の応答を示すことと合わせ、KCC2変異体ゼブラフィッシュはてんかんの動物モデルと言えるだろう。

[考察]

本研究でKCC2a-KCC2b二重変異体の稚魚で神経活動が高まることが確認されたが、これは

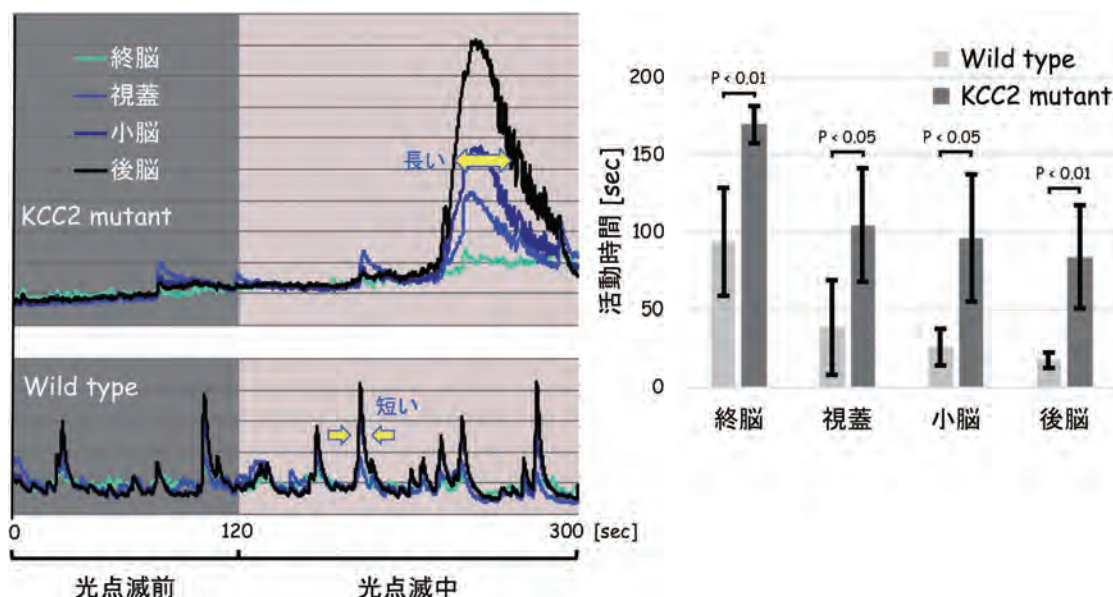


Fig. 5 KCC2a-KCC2b二重変異体における脳活動の亢進

野生型 (Wild-type) の脳で神経活動が高まる時にはその持続時間が短い, KCC2a-KCC2b二重変異体 (KCC2 mutant) の脳で神経活動が高まる時にはその振幅は大きく, 持続時間も有意に長かった。

KCC2の発現が高まることで神経細胞が成熟するという考えと合致するものである¹⁾。KCC2a-KCC2b二重変異体では神経細胞内のCl⁻濃度が高く, GABAやグリシンによる抑制性伝達が脱分極性の応答を引き起こし, これが神経回路の過剰興奮を引き起こしていると考えられる。実際, 電位依存性ナトリウムチャネルの阻害剤を低濃度で作用させると, 稚魚のてんかん様の応答を軽減させられるという予備データを得つつあり, 抗てんかん薬でKCC2a-KCC2b二重変異体のてんかん病態を改善できることを示唆している。KCC2b変異体は成魚で音刺激や光刺激に対しててんかん様の異常応答を示すが, これが本当にてんかんであるなら, KCC2b変異体ははじめての成魚のてんかんモデルとなる。KCC2b変異体についても, 電位依存性ナトリウムチャネルの阻害剤を少量インジェクションで導入して音刺激や光刺激を与えても, てんかん様応答を誘導できないという知見を得つつあり, サンプル数を増やしてこれを検証したい。

てんかんかどうかを判断する方法として, ヒトやげっ歯類では脳波測定が行われる。

魚でも脳波を測定することでてんかんを証明する必要があるが, これまでのトライでは技術的な問題から成功には至っていないが, 引き続き脳波記録に挑戦したい。本研究では脳波測定の代わりとして, 神経活動をリアルタイムかつダイレクトに観察するカルシウムイメージングを採用し, 野生型に比べてKCC2a-KCC2b二重変異体の稚魚では神経活動が振幅の点でも持続時間の点でも亢進することを見出すことができた。このKCC2a-KCC2b二重変異体の稚魚で神経活動が亢進しているという結果から, KCC2a-KCC2b二重変異体がてんかんモデルになることを肯定的にとらえてもらえるとありがたい。

ゼブラフィッシュを研究に用いる利点としてイメージング以外にも薬理学スクリーニングがあげられる。ゼブラフィッシュは水生動物なので, 飼育水に薬剤を加えておけば, その薬剤を個体に作用させることが可能で, これを化合物ライブラリーを用いてハイスループットで行えば, 創薬を視野に入れた化合物スクリーニングを行える。本研究で得られたKCC2a-KCC2b二

重変異体は光刺激に応答し続けるという表現型を示すが、これを定量化し、それを抑制する化合物を探索すれば、抗てんかん薬の創出も期待される。本研究のこれから先の展望として、新しい抗てんかん薬の候補となるリード化合物の探索を明示したい。

[謝辞]

本研究の遂行にあたり、トランスジェニックゼブラフィッシュTg (huC : GVP) を作製された基礎生物学研究所の東島眞一教授、Tg (UAS : GCaMP6s) を作製された国立遺伝学研究所の武藤彩助教、その分与を行なってくださいましたナショナルバイオリソースプロジェクトに御礼申し上げます。さらに、カルシウムイメージングの実施にご協力くださいました国立遺伝学研究所の川上浩一教授、武藤彩助教に心より感謝申し上げます。エクソーム解析をしてくださいましたユニバーシティ・カレッジ・ロンドンのマンジュ・クリアン教授とトミー・ステッドバーク博士にもこの場を借りて御礼申し上げます。結びに、本研究に多大なご支援をくださいました公益財団法人てんかん治療研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

[文献]

- 1) Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development : the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 2002 ; **3** : 728-739.
- 2) Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 2001 ; **30** : 515-524.
- 3) Hirata H, Saint-Amant L, Downes GB, Cui WW, Zhou W, Granato M et al. Zebrafish bandoneon mutants display behavioral defects due to a mutation in the glycine receptor beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; **102** : 8345-8350.
- 4) Ogino K, Low SE, Yamada K, Saint-Amant L, Zhou W, Muto A et al. RING finger protein 121 facilitates the degradation and membrane localization of voltage-gated sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015 ; **112** : 2859-2864.
- 5) Munakata M, Watanabe M, Otsuki T, Nakama H, Arima K, Itoh M et al. Altered distribution of KCC2 in cortical dysplasia in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia* 2007 ; **48** : 837-844.
- 6) Reid KH, Guo SZ, Iyer VG. Agents which block potassium-chloride cotransport prevent sound-triggered seizures in post-ischemic audiogenic seizure-prone rats. *Brain Res* 2000 ; **864** : 134-137.
- 7) Stöddberg T, McTague A, Ruiz AJ, Hirata H, Zhen J, Long P et al. Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nat Commun* 2015 ; **6** : 8038.