

—— 研究助成報告 ——

新規てんかん原性因子G_{ai}-interacting protein (GINIP) の機能解析研究

大野 行 弘¹⁾, 國 澤 直 史¹⁾, 清 水 佐 紀¹⁾, 芹 川 忠 夫^{1,2)}

要旨 : G_{ai}-interacting protein (GINIP) は3量体G_iタンパク質の α サブユニット (G_{ai}) と相互作用し, GABA_B受容体の機能を調節することが示唆されている。我々は, けいれん発作を自然発症するNoda Epileptic Rat (NER) のてんかん原性因子を探索する過程で, NER ではGINIPの発現が著しく低下していることを見出した。そこで今回, GINIP-ノックアウト (KO) ラットを用い, GINIPの欠損がけいれん発現感受性, 情動機能および認知機能に及ぼす影響について検討した。その結果, GINIP-KOラットでは, けいれん発現の閾値が低下すること, てんかん原性 (キンドリング) 形成が促進すること, さらに, 動物の衝動性, 情動反応性が亢進し, 認知機能が低下することが明らかとなった。これらの変化には, GINIP欠損によるGABA_B受容体機能の低下が関わると考えられ, GINIPが新たなてんかん原性調節因子として機能することが明らかとなった。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2020 ; 31 : 1-8

Key Words : G_{ai}-interacting protein (GINIP), PHD finger protein 24 (Phf24), てんかん原性, 情動障害, 認知機能障害

【序論】

てんかんは脳の異常興奮に起因する反復発作を呈する慢性神経疾患であり, その患者数は人口の約1%に達するといわれている。てんかんの治療には古くから第1世代抗てんかん薬 (バルプロ酸, カルバマゼピン, フェニトイン, フェノバルビタールなど) が汎用されてきたが, 副作用 (重篤な皮膚症状, 催奇形性など) や薬物相互作用 (薬物代謝酵素の誘導など) の面で多くの問題があった。その後, 第2世代の抗てんかん薬 (ガバペンチン, ラモトリギン, レベチラセタム, トピラマートなど) が開発されてきたが, これら治療薬においても副作用の低減は十分とはいえず, かつ, 約30%の患者は依然として治療抵抗性を示すことから, 新たな

抗てんかん薬の開発が切望されている^{1,2)}。このような背景から, 我々は, てんかんの発症と進展を制御できる新規てんかん原性因子を見出すことを目的に, 種々のてんかんモデル動物を用いた病態解析研究を進めてきた³⁾。

G_{ai}-interacting protein (GINIP) はPHD finger protein 24 (Phf24) ともよばれ, G protein-coupled receptor (GPCR) と共役する3量体G_iタンパク質の α サブユニット (G_{ai}) と特異的に相互作用する機能タンパク質であり, GABA_B受容体とG_{ai}サブユニットとの共役反応を調節する (Fig. 1)。これまでの報告⁴⁾ から, GINIPがGABA_B受容体を介する鎮痛作用の発現を調節することが示されているが, 痛覚制御以外のGINIPの機能については不明である。

我々は, 強直間代けいれん発作を自然発症

¹⁾大阪薬科大学・薬品作用解析学研究室
〒569-1094 高槻市奈佐原4-20-1]

²⁾京都疾患モデル研究所
〒606-8305 京都市左京区吉田河原町14]

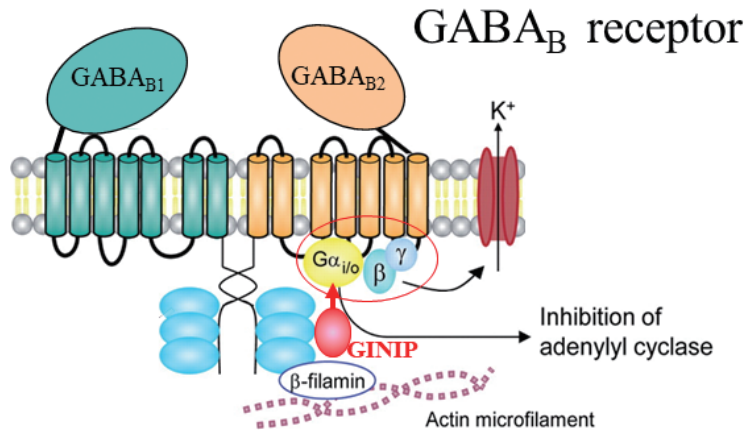
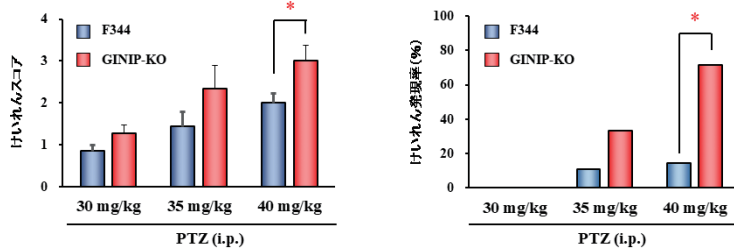
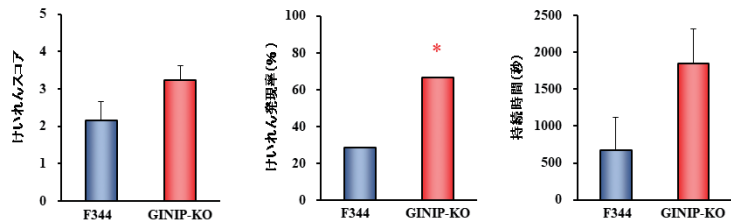
Fig. 1 G_{ai}-interacting protein (GINIP) の機能模式図**A** ペンチレンテトラゾール (PTZ) けいれん**B** ピロカルピンけいれん

Fig. 2 GINIP-KOラットのけいれん感受性評価

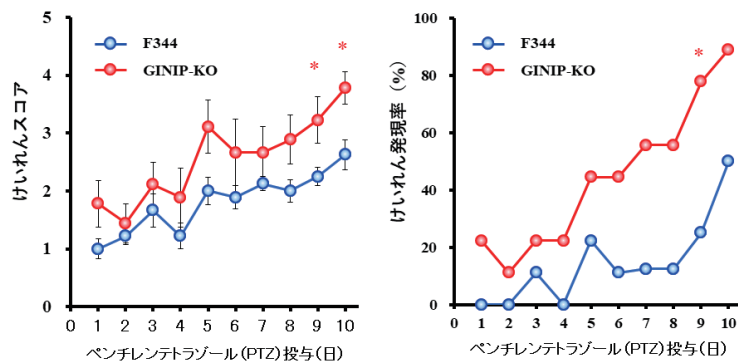


Fig. 3 ペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発キンドリングに対するGINIP欠損の影響

するNoda Epileptic Rat (NER)³⁾を用いて新規てんかん原性調節因子の探索を行い、GINIPがNERのけいれん発作を発現制御している可能性を見出した⁵⁾。すなわち、NERとけいれん発作を発症しないF344ラットを交配し、これら動物の遺伝子連鎖解析から発作抑制に関与する2つの遺伝子座（第1染色体*Ner1*および第5染色体*Ner3*）を同定した。さらに、これら部位の遺伝子発現を解析した結果、*Ner3*領域に存在する*Ginip*遺伝子の発現が著しく低下していることを見出した⁵⁾。これらの結果は、GINIPが強直間代けいれんの発症制御因子である可能性を示唆する。そこで本研究では、けいれん発症制御を含むGINIPの中樞機能を探るため、TALEN法により新たに作出したGINIP-ノックアウト (KO) ラットを用い、てんかん原性感受性、情動機能、認知機能などの中枢神経系機能に及ぼすGINIP欠損の影響を検討した⁶⁾。

【方法】

(1) 使用動物

GINIP-KOラットは、National BioResource Project-Rat (NBRP-Rat, <http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/NBR/>) より入手した。GINIP-KOラットでは、TALENを用いたゲノム編集により exon3の392塩基が欠失しており、正常なPhf24発現が消失している。Wild type (対照) 動物としては同週齢のF344ラットを使用した。

(2) けいれん発現の感受性評価

ベンチレンテトラゾール (PTZ) およびピロカルピンを用いて、GINIP-KOラットの薬物誘発けいれんに対する感受性を評価した。

(i) PTZ誘発けいれん感受性評価

11週齢のGINIP-KOラットおよびF344ラットに30, 35, または40 mg/kgのPTZを腹腔内投与し、けいれん強度とけいれん発現率を20分間評価した。けいれん強度の評価には、6段階けいれんスコア [スコア0: 変化なし, 1: 顔や耳、ひげのひきつき, 2: より強い顔のひきつき, 前肢のひきつき, 3: 反復性のミオクローヌス, 4: 間代性けいれん, 5: 強直間代性けいれん, 致死性のけいれん] を用い、スコア3以上をけ

いれん発現陽性とした。

(ii) ピロカルピン誘発けいれん感受性評価

11週齢のGINIP-KOラットおよびF344ラットに300 mg/kgのピロカルピンを腹腔内投与し、けいれん強度、けいれん発現率、けいれん発作持続時間を60分間測定した。けいれん強度およびけいれん発現率の評価には上記けいれんスコアを用い、けいれん発作持続時間の評価には、測定時間内に発現したけいれん発作の合計持続時間を用いた。

(3) キンドリング形成の感受性評価

11週齢のGINIP-KOラットおよびF344ラットを用い、PTZキンドリングに対する感受性を評価した。各動物に、単回投与ではけいれん発作を誘発しない低用量 (30 mg/kg/day, i.p.) のPTZを10日間連日投与し、日々のけいれん強度およびけいれん発現率を、PTZ投与から20分間評価した。

(4) 高架式十字迷路試験

実験には、20週齢のGINIP-KOラットおよびF344ラットを用いた。動物を高架式十字迷路装置の中央ステージに置き、クローズアーム、オープンアームへの侵入回数、およびオープンアームでの滞在時間を測定した。高架式十字迷路装置は、アームの長さが110 cm (左: 50 cm, 中央: 10 cm, 右: 50 cm)、通路幅10 cmであり、クローズアームを高さ50 cmの壁で囲った。また、ステージの高さは床から50 cmとした。

(5) Morris水迷路試験

Morris水迷路装置を用い、20週齢のGINIP-KOラットおよびF344ラットの空間学習機能を評価した。装置は、直径150 cm、深さ50 cmであり、装置内を25℃の水で満たした。また、透明なプラスチック製プラットフォーム (直径: 10 cm) を水面下3 cmの位置に設置した。

(i) 空間記憶の獲得試行

各動物に対してMorris水迷路試験を4試行/日、4日間連続で行い、プラットフォームへの到達時間を測定した。プラットフォームの探索

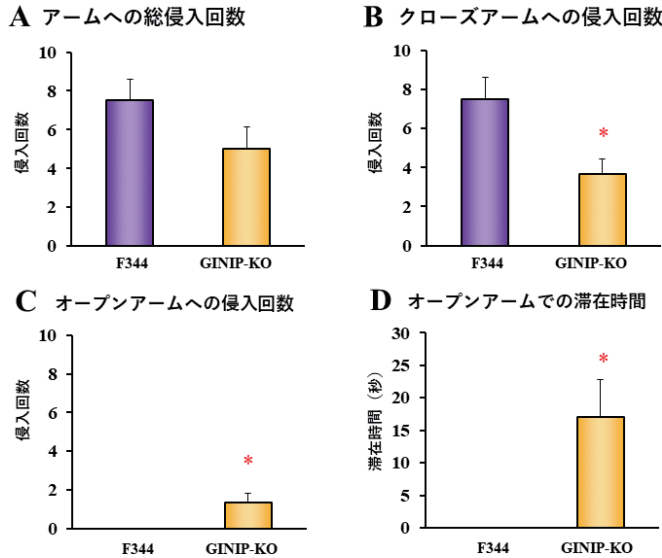


Fig. 4 高架式十字迷路試験における不安状態に対するGINIP欠損の影響

時間は最大300秒間とし、300秒以内にプラットフォームに到達できなかった場合は、動物をプラットフォームに誘導後15秒間放置した。試行ごとに到達時間を記録し、試行間の間隔は60秒以下とした。

(ii) 空間記憶の保持試験

4日目の記憶獲得試行後、空間記憶の保持機能を評価した。記憶保持試験では、プラットフォームを取り除いた装置内で動物を90秒間自由に泳がせ、獲得試行中にプラットフォームがあった場所を通過した回数を計測した。

(6) 情動反応試験

20週齢のGINIP-KOラットおよびF344ラットに棒刺激、エアー刺激、触刺激あるいは尾クリップ刺激を与えた場合の情動反応性をスコア評価した。

(i) 棒刺激に対する情動反応性の評価

動物の顔に棒を近づけた場合の情動反応性を、以下の5段階スコアを用いて評価した。スコア0：反応なし、1：興味を示す、2：防御行動、逃避行動、3：攻撃行動（噛みつきなど）、4：強い攻撃行動

(ii) エアー刺激に対する情動反応性の評価

動物の顔に空気を吹きかけた場合の情動反応性を、以下の5段階スコアを用いて評価した。

スコア0：反応なし、1：わずかな体の動き、2：弱い驚愕反応、3：驚愕反応、4：強い驚愕反応（跳躍など）

(iii) 触刺激に対する情動反応性の評価

動物の身体を掴んだ場合の情動反応性を、以下の5段階スコアを用いて評価した。スコア0：反応なし、筋緊張なし、1：容易に掴むことができる状態、2：容易に掴むことができるが、筋緊張が増加した状態、3：筋緊張の増加により、掴むことが難しい状態、4：掴むことが非常に難しい状態

(iv) 尾クリップ刺激に対する情動反応性の評価

動物の尾を鉗子で挟んだ場合の情動反応性を、以下の5段階スコアを用いて評価した。スコア0：反応なし、1：興味を示す、2：防御行動、逃避行動、3：攻撃行動（鉗子の噛みつきなど）、4：強い攻撃行動

【結果】

(1) けいれん発現の感受性評価

PTZ誘発けいれんに対する感受性を評価した結果、GINIP-KOラットはF344ラットに比べ高いけいれん発現感受性を示し、40 mg/kgのPTZ投与時のけいれんスコアおよびけいれん発現率

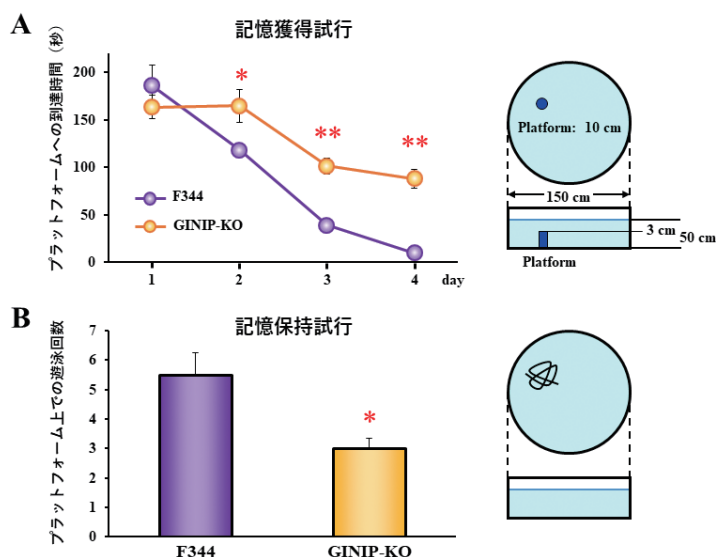


Fig. 5 Morris水迷路試験における学習・記憶機能に対するGINIP欠損の影響

に統計学的な有意差が認められた (Fig. 2A)。また、ピロカルピン (300 mg/kg, i.p.) 投与では、GINIP-KOラットにおけるけいれん発現率の有意な上昇、けいれんスコアおよびけいれん持続時間の増加傾向が認められた (Fig. 2B)。

(2) キンドリング形成の感受性評価

PTZキンドリングに対する感受性を評価する目的で、GINIP-KOラットとF344ラットに低用量 (30 mg/kg) のPTZを10日間連続で腹腔内投与した。その結果、投与4日目までは両群間で差は認められなかったが、投与5日目からGINIP-KOラットで高いけいれんスコアが維持され、投与9日目と10日目においてF344ラットと比較して有意な差が認められた (Fig. 3A)。また、GINIP-KOラットのけいれん発現率は、PTZ投与7日目には50%に達し、9日目と10日目には80~90%を示した。一方、F344ラットでは、けいれん発現率が50%に達したのはPTZ投与10日目のみであった (Fig. 3B)。以上の結果より、GINIP-KOラットでは、キンドリング形成の感受性が亢進していることが明らかになった。

(3) 高架式十字迷路試験

GINIP-KOラットとF344ラットの不安様行

動を評価する目的で、高架式十字迷路試験を行った。その結果、総アーム侵入回数 (オープンアームへの侵入回数+クローズアームへの侵入回数) には両群間で差はなかったが (Fig. 4A), GINIP-KOラットはF344ラットに比べ、クローズアームへの侵入が有意に少なく (Fig. 4B), 逆に、オープンアームへの侵入および滞在時間が有意に増加していた (Fig. 4C, 4D)。以上より、GINIP-KOラットでは、不安が減弱 (衝動性が亢進) していることが示唆された。

(4) Morris水迷路試験

Morris水迷路装置を用いて空間記憶の獲得試行を4日間行った結果、試行1日目ではGINIP-KOラットとF344ラットの両群間でプラットフォームへの到達時間に差はなかったが、試行2日目以降では、GINIP-KOラットのプラットフォームへの到達時間はF344ラットと比べて有意に長かった (Fig. 5A)。また、4日目の獲得試行の後、装置からプラットフォームを取り除き、記憶保持試験を行った。その結果、GINIP-KOラットでは、F344ラットと比較し、獲得試行中にプラットフォームがあった場所を通過した回数が有意に少なかった (Fig. 5B)。以上の結果より、GINIP-KOラットでは、

空間記憶の獲得機能および保持機能が低下していることが示唆された。

(5) 情動反応試験

棒刺激、エアー刺激、触刺激あるいは尾クリップ刺激に対するGINIP-KOラットおよびF344ラットの情動反応を評価した結果、いずれの刺激に対しても、GINIP-KOラットは、F344ラットと比較して有意に高い情動反応性（過敏性）を示した。

【考察】

これまでの研究から、GINIP-KOマウスにおいてGABA_B受容体を介する疼痛抑制機能が低下することが示され、GINIPがGABA_B受容体とG_{ai}との共役反応の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた⁴⁾。今回、TALEN法により作出されたGINIP-KOラットを用いた研究から、GINIPがけいれん発現ならびにキンドリング形成の感受性を抑制的に制御していることが明らかとなった。これらの結果は、NERにおけるけいれん発現が、第5染色体上*Ginip*遺伝子の発現低下に起因するとの以前の結果⁵⁾を裏付けるものである。

一方、高週齢（20週齢）のGINIP-KOラットでは、情動性（過敏性）が亢進しており、不安心理の低下（衝動性の亢進）と認知機能の低下が認められた。これらの結果は、GINIPがてんかん原性のみでなく、情動機能および認知機能の維持にも深く関与していることを示唆する。予備検討において、これら情動および認知機能の障害は若齢のGINIP-KOラットでは観察されなかった。このため、GINIP欠損による情動および認知機能の障害は、脳機能の加齢変化に伴って発現すると考えられた。

GINIPの欠損によるてんかん原性の亢進、ならびに情動機能、認知機能の障害に関わるメカニズムは不明であるが、GINIPがGABA_B受容体機能を制御すること⁴⁾を考慮すると、GINIP欠損に伴う行動表現型の変化もGABA_B受容体の機能低下に基づく可能性が高い。GABA_B受容体にはGABA_{B1}およびGABA_{B2}受容体の2種のサブタイプが存在し、これら2種の受容体が

2量体を形成して機能することが知られている（Fig. 1）。これまでの研究から、GABA_{B1}受容体-KOおよびGABA_{B2}受容体-KO動物が、いずれも自発性のけいれん発作を発現すること、記憶・学習機能の障害を呈すること、さらに、不安・うつなどの情動障害がおこることが報告されている^{7,8)}。これらGABA_B受容体-KO動物の行動変化と今回GINIP-KOラットで観察された行動変化がよく一致している。従って、GINIP-KOラットにおけるてんかん原性の亢進、衝動性・情動性の亢進、学習・記憶機能の低下も、GINIP欠損によるGABA_B受容体機能の低下に起因する可能性が高い。

以上、本研究結果から、GINIPが新たなてんかん原性調節因子として機能することが明らかとなった。GINIPを欠損しても自発的なけいれん発作が発現しないが、けいれん発現の閾値が低下すること、てんかん原性（キンドリング）の形成が促進されることが示された。このことから、GINIP機能を促進する薬物が新たなてんかん治療薬になりうると考えられた。さらに、GINIPは情動調節や認知機能の制御にも重要な働きを有すると考えられた。てんかん患者においても情動障害や認知障害がみられることも多い。これら症状の発現には、けいれん発作の後遺症や治療薬の副作用など二次的な要因が関与する場合もあるが、今回の検討から、GINIPが直接関与している可能性が考えられた。GINIPはてんかんの発症制御と情動・認知機能障害の発症の関わるメカニズムに関しては、今後さらなる研究が必要である。

【文献】

- 1) Y. Ohno, K. Tokudome, Therapeutic role of synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) in modulating epileptogenesis., *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **16**, 463-471 (2017)
- 2) Y. Ohno, M. Kinboshi, S. Shimizu, Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 as a novel modulator of BDNF expression in astrocytes., *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3313 (2018)
- 3) T. Serikawa, T. Mashimo, T. Kuramoto, B. Voigt, Y. Ohno, M. Sasa, *Advances on Genetic*

- Rat Models of Epilepsy., *Exp. Anim.*, **64**, 1-7 (2015)
- 4) S. Gaillard, L. Lo Re, A. Mantilleri, R. Hepp, L. Urien, P. Malapert et al., GINIP, a $G\alpha_i$ -interacting protein, functions as a key modulator of peripheral GABAB receptor-mediated analgesia., *Neuron*, **84**, 123-136 (2014)
- 5) T. Kuramoto, B. Voigt, S. Nakanishi, K. Kitada, T. Nakamura, K. Wakamatsu et al., Identification of candidate genes for generalized tonic-clonic seizures in Noda epileptic rat., *Behav. Genet.*, **47**, 609-619 (2017)
- 6) T. Serikawa, N. Kunisawa, S. Shimizu, M. Kato, H. A. Iha, M. Kinboshi et al., Increased seizure sensitivity, emotional defects and cognitive impairment in PHD finger protein 24 (Phf24)-null rats., *Behav. Brain Res.*, **369**, 111922 (2019)
- 7) V. Schuler, C. Lüscher, C. Blanchet, N. Klix, G. Sansig, K. Klebs et al., Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA_B responses in mice lacking GABA_{B1}: *Neuron*, **31**, 47-58 (2001)
- 8) M. Gassmann, H. Shaban, R. Vigot, G. Sansig, C. Haller, S. Barbieri et al., Redistribution of GABA_{B1} protein and atypical GABA_B responses in GABA_{B2}-deficient mice., *J. Neurosci.*, **24**, 6086-6097 (2004)

