

—— 研究助成報告 ——

シンタキシン1Bの機能欠損による てんかん発症に関する研究：行動学的・電気生理学的解析

三 嶋 竜 弥¹⁾, 藤 原 智 徳^{1, 2)}, 小 藤 剛 史³⁾,
斎 藤 綾 子¹⁾, 寺 尾 安 生¹⁾, 赤 川 公 朗¹⁾

要旨：本研究は、シンタキシン1B (STX1B) の機能欠損が高体温時のシナプス伝達機能に及ぼす影響を解析することにより、熱性けいれん発症の分子機序を解明することを目的とする。近年、「ヒト」においてSTX1B遺伝子のハプロ不全が熱性けいれん・てんかん症候群の原因であることが報告された。STX1Bはシナプス小胞の開口放出を制御するSNAREタンパク質として機能する他、GABA・グリシン等の抑制性神経伝達物質の再取り込みを行うSLC6ファミリー神経伝達物質トランスポーターの機能調節にも関与する。よって、発熱や高体温等による神経伝達物質の放出・再取り込み機能の異常、特に抑制性シナプス伝達機能の低下がけいれん発症の原因となる可能性が想定される。本研究では、STX1Bの機能欠損が高体温時のシナプス伝達機能にどのような影響を与えるのかを解析し、STX1Bのハプロ不全による熱性けいれんの発症機序を検討する。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2020 ; 31 : 31-38

Key Words : シンタキシン1, 熱性けいれん, GABAトランスポーター, SNARE,
持続性GABA電流

序論

近年、ヒトにおいてシンタキシン1B (STX1B) 遺伝子に生じたミスセンス・ナンセンス変異によるハプロ不全により、主に2歳以下の幼少期に熱性けいれんを伴う種々のてんかんを発症し、その後、全般てんかん熱性けいれんプラス (GEFS+) につながる事が報告された¹⁾。しかし、発症の仕組み及びその分子機序は明らかになっていない。

STX1Bは中枢神経系や内分泌系細胞に発現し、シナプス小胞や大型有芯小胞の開口放出に関与する形質膜タンパク質である。STX1Bを含む3種のSNAREと呼ばれるタンパク質 (STX1, SNAP-25 and VAMP2) の働きが開口放出の調節に中心的に関わる²⁾。また、STX1

はSLC6ファミリーの神経伝達物質トランスポーターに直接結合し、その機能調節にも関わっている^{3, 4)}。特にGABAやグリシンといった抑制性神経伝達物質の再取り込み機構は、シナプス間隙での神経伝達物質の濃度制御や近傍シナプスへの神経伝達物質の流出調整、生合成系への再補充等の役割を果たし、抗けいれん薬の標的としても重要である。

STX1Bにはシンタキシン1A (STX1A) というアイソフォームがあり、両アイソフォームの基本的な生理機能は共通しているが、STX1Bはシナプス小胞の、STX1Aは大型有芯小胞の放出に関わる特異的な機能を持つことが明らかになっている^{5, 6, 7)}。特にSTX1Bの機能欠損はシナプス伝達に異常を引き起こす⁸⁾。さらに、STX1Bをノックダウンしたゼブラフィッシュ

¹⁾ 杏林大学 医学部 病態生理学教室

[〒181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2]

²⁾ 埼玉医科大学 保健医療学部 臨床検査学科

³⁾ 杏林大学 医学部 RI部門

では、高体温時にけいれん様行動やてんかん型放電を示すとの報告があり¹⁾、熱により神経機能の異常が顕著になることが示唆されている。

本研究はSTX1B遺伝子のハプロ不全による熱性けいれんの発症機序を解明するために、STX1B遺伝子ヘテロ欠損 (STX1B^{+/-}) マウスの表現型解析を行うと共に、温度上昇によってSTX1Bの機能欠損の影響が神経機能にどのような効果を及ぼすのかを解析する。特に抑制性シナプス伝達機能や海馬神経回路のネットワーク活動に対する影響を解析する。

方法

(1) 行動解析によるSTX1B^{+/-}マウスのけいれん感受性の測定

赤外線ヒーターを用いた高温チャンバーモデルにより熱性けいれんの温度閾値を計測した⁹⁾。生後10~11日齢の幼若マウスの深部体温を直腸温用のプローブにより測定し、上部に設置した赤外線ランプの照射により任意の体温に維持した。マウスの体温を35.0℃から2分毎に0.5℃ずつ上昇させ、強直性けいれん発作もしくは間代性けいれん発作が生じる体温閾値を計測した。成体マウスのけいれん感受性の解析は、薬物誘導モデルにより行った。ペンチレンテトラゾール (PTZ) を30分間隔で腹腔投与し、強直性けいれん発作もしくは間代性けいれん発作が生じるまでの投与量を計測した。

(2) ホールセルクランプによるシナプス電流・膜電位の解析

生後0日齢の新生仔マウスから採取した海馬神経細胞をグリアフィーダー上に播種し、14日間培養したものを実験に用いた。神経細胞からホールセル記録により、シナプス電流および膜電位を計測した。ステージヒーターおよび灌流液温度コントローラーにより細胞外灌流液を生理的温度 (35℃)、高体温 (40℃) 条件にし、抑制性自発性微小シナプス後電流 (mIPSC) の頻度や振幅、活動電位の波形等を記録解析した。GABAトランスポーター (GAT) の解析は、GABA_A受容体アンタゴニスト (bicuculline, 10 μM) を局所投与する前後での保持電流を比較

し、これを持続性GABA電流とすることにより解析した。

結果

(1) STX1Bヘテロ欠損マウスのけいれん感受性

STX1B遺伝子のハプロ不全では幼少期に熱性けいれんを伴う種々のてんかんを発症する。さらにSTX1Bの発現抑制をおこなったゼブラフィッシュの解析では、高体温時にけいれん様行動やてんかん型放電を示すとの報告があり、熱により神経機能の異常が顕著になることが示唆されている¹⁾。そこで、当研究室で作成したSTX1Bヘテロ欠損 (STX1B^{+/-}) マウスにおいて、ヒトと同様にけいれん感受性の上昇がみられるかを行動解析により確認した。

生後10日齢の幼若マウスの熱性けいれんの体温閾値を測定したところ、STX1B^{+/-}マウスは野生型マウスに対して有意に閾値が低下していた (WT: 42.43 ± 0.29℃; STX1B^{+/-}: 40.10 ± 0.28℃, Log-rank test: $p < 0.001$)。また、成体マウスを用いたPTZ誘発モデルでもSTX1B^{+/-}マウスは野生型マウスに対して閾値の低下が確認された (WT: 93.85 ± 8.51 mg/kg; STX1B^{+/-}: 42.22 ± 5.21 mg/kg, Log-rank test: $p < 0.001$) (Fig. 1A, B)。以上の結果から、ヒトと同様にSTX1B^{+/-}マウスにおいてけいれん感受性の上昇が確認された。これに関連し、我々はこれまでにSTX1B^{+/-}マウスの中枢神経系において、ドパミンやGABA等の神経伝達物質の細胞外での濃度が部位特異的に変動していることを報告している¹⁰⁾。そこで、けいれん感受性の上昇と関連があると考えられる、海馬での細胞外GABA濃度を測定したところ、STX1B^{+/-}マウスの細胞外GABA濃度の低下が確認された (Fig. 1C)。これらの結果は、STX1Bの機能欠損によって海馬の細胞外GABA濃度が低下し、けいれん感受性の上昇につながることを示唆する。

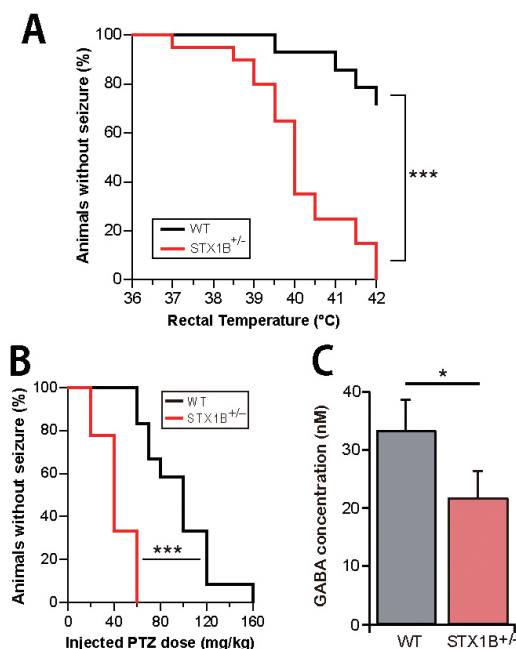


Fig. 1 STX1B^{+/-}マウスのけいれん感受性。(A) 幼若マウスの熱性けいれんの体温閾値の解析。(B) 成体マウスのPTZによるけいれん誘発閾値の解析。(C) 海馬領域の細胞外GABA濃度の比較。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

(2) 抑制性シナプス伝達機構の温度依存性の解析

細胞外GABA濃度はGABA作動性神経終末からの活動電位依存的・自発的なGABA放出と、GABAトランスポーターによる再取り込みにより決まる。STX1Bはこのどちらの機構にも関与するため、STX1B^{+/-}マウスでは体温上昇に伴うGABA放出・再取り込み機構の異常が抑制性シナプス伝達機能の低下を引き起こし、熱性けいれん発症につながる可能性が考えられる。そこで、抑制性シナプス伝達機能の温度依存性を生理的体温(35℃)と高体温(40℃)の各条件下で解析した。

自発性抑制性微小シナプス後電流(mIPSC)の頻度は温度上昇により増加した(WT: 35℃ 19.01 ± 1.23 , 40℃ 23.39 ± 2.47 , $p < 0.05$; STX1B^{+/-}: 35℃ 13.74 ± 1.71 , 40℃ 20.07 ± 3.42 ,

$p < 0.05$)。また、生理的体温条件下では野生型マウスに対してSTX1B^{+/-}マウスのmIPSCの頻度は低下していたが、高体温条件下では有意差は見られなかった(Fig. 2A)。mIPSCの頻度はシナプス前終末に発現する代謝型GABA_B受容体の活性化により抑制される。よって高体温時に細胞外GABA濃度が上昇すれば、ネガティブフィードバックによりmIPSCの頻度が抑制される可能性がある。そこで、GABA_B受容体のアンタゴニストであるCGP44545を細胞外灌流液に投与したところ、生理的体温条件下では野生型・STX1B^{+/-}マウスともにGABAの放出頻

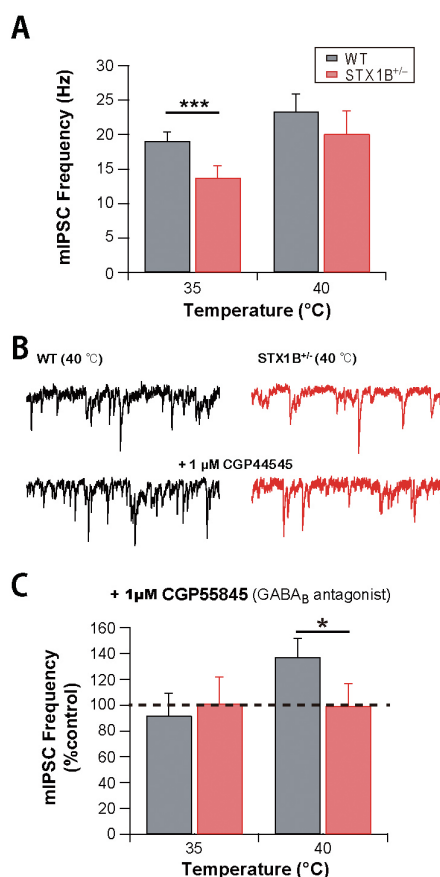


Fig. 2 シナプス小胞の放出頻度の温度依存性。(A) mIPSC頻度の温度依存性の比較。(B) 高体温条件下でのmIPSCの記録の例。(C) シナプス前終末のGABA_B受容体アンタゴニスト(CG55845, 1 μM)の効果の比較。* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

度に変化は見られなかったが (WT: $91.80 \pm 17.42\%$; STX1B^{+/-}: $101.35 \pm 20.26\%$), 高体温条件下では野生型マウスでのみmIPSCの頻度の上昇がみられた (WT: $137.54 \pm 14.14\%$; STX1B^{+/-}: $99.66 \pm 17.06\%$, $p < 0.001$) (Fig. 2B, C)。

細胞外GABA濃度の変化は, シナプス前終末の代謝型GABA_B受容体だけでなく, シナプス外GABA_A受容体による持続性GABA電流にも影響を及ぼすと考えられる。そこで次に, 持続性GABA電流の振幅の温度依存性を観察した。その結果, 野生型マウスでは高体温時に持続性GABA電流が増加したが, STX1B^{+/-}マウスでは温度上昇による持続性GABA電流の増加は見られなかった (WT: 35°C 34.33 ± 2.92 pA, 40°C 67.21 ± 6.33 pA, $p < 0.05$; STX1B^{+/-}: 35°C 28.65 ± 2.26 pA, 40°C 36.66 ± 5.08 pA) (Fig. 3)。これらの結果から, 高体温時には野生型マウスでのみ細胞外GABA濃度が上昇していることが示唆された。

STX1はGABAトランスポーター (GAT) と直接結合し, 細胞内局在や取込み活性の調節に関わることが報告されている。そこで, 細胞外GABA濃度の上昇に対してGATによる取込み機構がどのように関与しているのかを調べた。海馬における主要なGATであるGAT-1の機能を阻害し, 持続性GABA電流に対する影響を観察した。GAT-1の阻害剤であるNNC-711を細胞外灌流液に投与したところ, 野生型・STX1B^{+/-}マウスともに生理的温度条件下でも持続性GABA電流の増加がみられた (WT: control 34.33 ± 2.92 pA, NNC-711 81.12 ± 16.66 pA, $p < 0.05$; STX1B^{+/-}: control 28.65 ± 2.26 pA, NNC-711 86.23 ± 12.24 pA, $p < 0.001$)。高体温条件下では, STX1B^{+/-}マウスでは持続性GABA電流が増加したが, 野生型マウスではGAT-1を阻害しても更なる増加は見られなかった (WT: control 67.21 ± 6.33 pA, NNC-711 85.99 ± 11.36 pA; STX1B^{+/-}: control 36.66 ± 5.08 pA, NNC-711 79.06 ± 6.91 pA, $p < 0.001$) (Fig. 3)。この結果から, 野生型マウスでは体温上昇に伴ってGAT-1の活性が低下して細胞

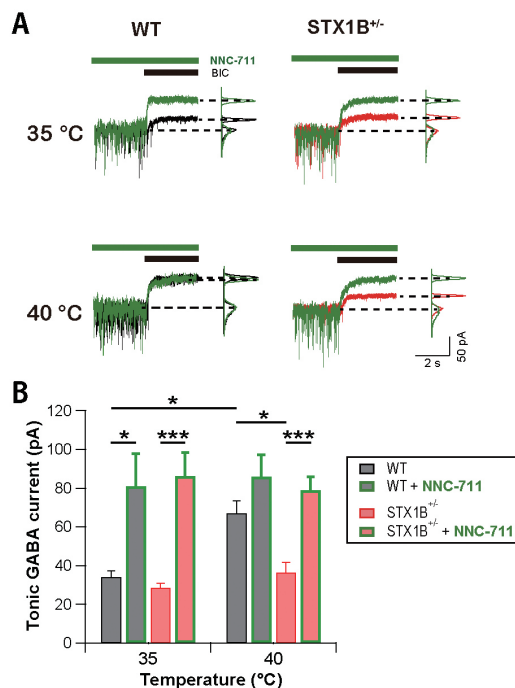


Fig. 3 細胞外GABA濃度の温度依存性。(A) 持続性GABA電流の記録の例。BIC: bicuculline (B) 持続性GABA電流の温度依存性および, GAT-1アンタゴニスト (NNC-711, 1 μ M) の効果を比較。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

外GABA濃度が上昇するが, STX1B^{+/-}マウスでは高体温時にもGAT-1の活性が低下しないことが示唆された。

(3) STX1Bヘテロ欠損マウスの神経ネットワーク活動の解析

高体温条件下ではGABA放出・再取り込み機構の両方に変化が生じ, 抑制性シナプス伝達機能が增強することが示唆された。そこで, この抑制性シナプス伝達機能の変化が神経ネットワークの活動にどのような影響がみられるのかを観察した。初代培養した海馬神経細胞は細胞間でランダムにシナプスを形成し, 局所的な神経ネットワークを構築する。このネットワーク内の神経細胞間では同期した自発性のバースト放電が起こる。自発性バースト放電は, てんか

ん発作中の神経活動と関連すると言われている¹¹⁾。そこで、この自発性バースト放電の頻度や持続時間等の温度依存性を解析した。その結果、生理的温度条件下では野生型・STX1B^{+/-}マウス間でバースト放電の頻度に違いは見られなかった (WT: 0.15 ± 0.02 Hz, STX1B^{+/-}: 0.13 ± 0.03 Hz)。一方、高温時には野生型マウスでは活動電位の閾値に達しない脱分極性の応答が出現すると共に、バースト放電の頻度が大きく低下した。これに対し、STX1B^{+/-}マウスではバースト放電の頻度低下は起こらなかった (WT: 0.03 ± 0.01 Hz, STX1B^{+/-}: 0.09 ± 0.01 Hz, $p < 0.001$) (Fig. 4)。そこで、高温条件下でのバースト放電の頻度の減少が抑制性シナプス伝達機能の増強によるものなのかを確認した。GABA_A受容体のアンタゴニストであるbicucullineを細胞外灌流液に投与すると、野生

型マウスでみられた高温条件下でのバースト放電の頻度低下が起こらなくなり、生理的温度条件下と同程度の頻度になった (35°C: WT $110.37 \pm 24.68\%$; STX1B^{+/-} $117.71 \pm 10.06\%$; 40°C: WT $96.63 \pm 10.72\%$, $p < 0.001$; STX1B^{+/-} $101.79 \pm 8.37\%$, $p < 0.05$)。

高温条件下でのバースト放電の頻度低下は、GAT-1の活性の低下が関与すると考えられるため、GAT-1の活性を阻害すると生理的温度条件下でもバースト放電の頻度が低下するかを確認した。GAT-1の阻害剤であるNNC-711を細胞外灌流液に投与したところ、野生型・STX1B^{+/-}マウスともに生理的温度条件下でも活動電位の閾値に達しない脱分極性の応答が出現すると共にバースト放電の頻度が低下した (35°C: WT $39.41 \pm 7.00\%$, $p < 0.001$; STX1B^{+/-} $27.85 \pm 8.81\%$, $p < 0.01$; 40°C: WT

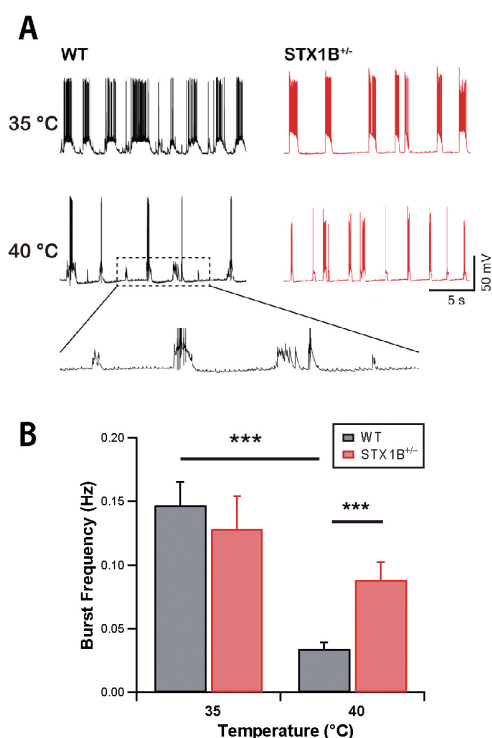


Fig. 4 神経ネットワーク活動の温度依存性。(A) 海馬培養細胞からの膜電位記録の例。Inset: 閾値に達しない脱分極性の応答の例。(B) バースト頻度の温度依存性の比較。*** $p < 0.001$

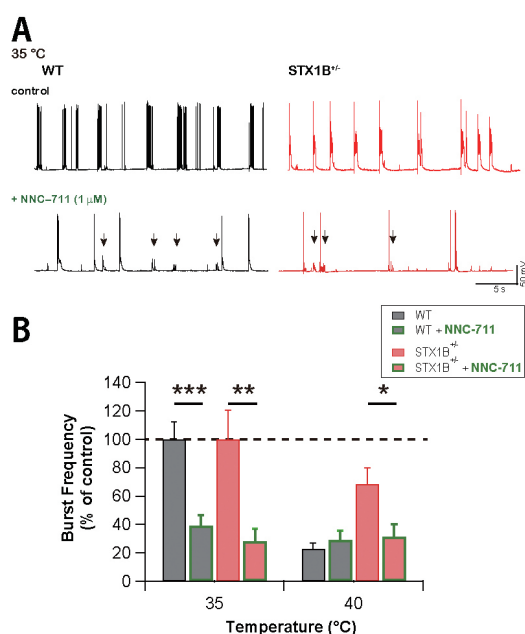


Fig. 5 神経ネットワーク活動に対する細胞外GABA濃度の効果。(A) GAT-1アンタゴニスト (NNC-711, $1 \mu\text{M}$) 投与時の膜電位記録の例。(矢印) 閾値に達しない脱分極性の応答。(B) バースト頻度に対するGAT-1アンタゴニスト投与による効果の比較。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

$28.93 \pm 6.92\%$; $STX1B^{+/-} 31.19 \pm 8.76\%$, $p < 0.05$) (Fig. 5)。

考察

ヒトと同様に $STX1B^{+/-}$ マウスにおいて、幼若期には熱性けいれん、成体期には薬物誘発けいれんに対するけいれん感受性が増加していることが確認された。ヒトとマウスでは $STX1A$ と $1B$ それぞれのアミノ酸配列の相動性も高く($STX1A$ 98%, $STX1B$ 100%), 中枢神経系での生理機能も相同だと考えられるため、マウスをモデルとした病態解析は有用性が高いと考えられる。

$STX1B^{+/-}$ マウスでけいれん感受性が増加する原因として、①GABA作動性神経終末からのGABAの放出量が低下していること、②それにより細胞外GABA濃度が低下していることが挙げられる。 $STX1B$ ノックアウトマウスでは興奮性・抑制性どちらのシナプス伝達にも異常がみられるが、グルタミン酸よりもGABAの放出確率のほうが顕著な低下を示す⁸⁾。 $STX1B^{+/-}$ マウスでも同様に、抑制機能の低下がけいれん感受性が増加する原因の一つと考えられる。また、生理的温度条件下でmIPSCの頻度の低下が観察されていることから、GABAの放出量低下が生理的温度条件下での細胞外GABA濃度の低下につながると考えられる。一方、高体温条件下では、GABAの放出量はシナプス前終末に発現する代謝型GABA_B受容体によるネガティブフィードバックにより野生型・ $STX1B^{+/-}$ マウス間で差は見られない。しかし、野生型マウスではGAT-1の活性の低下により細胞外GABA濃度が上昇し、これにより持続性GABA電流が増加することで抑制性シナプス伝達機能が亢進すると考えられる。これに対して $STX1B^{+/-}$ マウスでは高体温条件下でもGAT-1の活性低下がみられなかった。このため、細胞外GABA濃度が上昇しにくく、抑制性シナプス伝達機能が亢進せずに熱性けいれん発症につながるのではないかと考えられる。

今後は、高体温時の興奮性シナプス伝達機能に関しても $STX1B$ の機能欠損の影響を調べる必要がある。また、 $STX1B$ が高体温時にどの

ようにしてGAT-1によるGABAの取り込み活性を調節し、細胞外GABA濃度の維持に関与しているのか、さらには $STX1A$ との機能的差異は何なのかを詳細に検討していきたい。

文献

- 1) Schubert J, Siekierska A, Langlois M, May P, Huneau C, Becker F, et al. Mutations in $STX1B$, encoding a presynaptic protein, cause fever-associated epilepsy syndromes. *Nat Genet* 2014 ; **46** : 1327-32.
- 2) Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion : grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 2009 ; **323** : 474-7.
- 3) Horton N, Quick MW. Syntaxin 1A up-regulates GABA transporter expression by subcellular redistribution. *Mol Membr Biol* 2001 ; **18** : 39-44.
- 4) Chen NH, Reith MEA, Quick MW. Synaptic uptake and beyond : The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2004 ; **447** : 519-31.
- 5) Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, Chiba T, Tanaka K, Yamamoto A, et al. Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1 / syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *J Neurosci* 2006 ; **26** : 5767-76.
- 6) Mishima T, Fujiwara T, Kofuji T, Akagawa K. Impairment of catecholamine systems during induction of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses in HPC-1 / syntaxin 1A knock-out mice. *J Neurosci* 2012 ; **32** : 381-9.
- 7) Kofuji T, Fujiwara T, Sanada M, Mishima T, Akagawa K. HPC-1 / syntaxin 1A and syntaxin 1B play distinct roles in neuronal survival. *J Neurochem* 2014 ; **130** : 514-25.
- 8) Mishima T, Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Kanai-Azuma M, Akagawa K. Syntaxin 1B, but not syntaxin 1A, is necessary for the regulation of synaptic vesicle exocytosis and of the readily releasable pool at central synapses. *PLoS One* 2014 ; **9** : e90004.

- 9) Oakley JC, Kalume F, Yu FH, Scheuer T, Catterall WA. Temperature- and age-dependent seizures in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; **106** : 3994-9.
- 10) Fujiwara T, Kofuji T, Mishima T, Akagawa K. Syntaxin 1B contributes to regulation of the dopaminergic system through GABA transmission in the CNS. *Eur J Neurosci* 2017 ; **46** : 2867-74.
- 11) Bacci A. Synaptic and intrinsic mechanisms shape synchronous oscillations in hippocampal neurons in culture. *Eur J Neurosci* 1999 ; **11** : 389-97.

