

—— 研究助成報告 ——

大脳皮質GABAニューロンの機能維持機構の破綻による てんかん原性獲得の臨界点を探る

江 角 重 行

要旨：大脳皮質は記憶、認知、判断といった高次脳機能が発現されるきわめて重要な働きを担う部位である。これらの機能は、興奮性のグルタミン酸ニューロンと抑制性のGABAニューロンの二種類の細胞によって支えられている。これまでの研究から、大脳皮質GABAニューロン機能異常やGABA濃度減少によるグルタミン酸ニューロンの過剰な活動がてんかん発症の原因一つであると考えられている。しかし発生発達期におけるてんかん原性獲得のメカニズムや臨界期は未解であった。本研究は、GABAニューロンの発生異常によるてんかん原性獲得機構を探るため、GABAを放出するために必須であるvesicular GABA transporter (VGAT) を局所的に欠損させたマウスの解析を行った。生後0日目の大脳皮質を用いて、RNA-seqとChromium Single-cell Expression法による網羅的発現解析を行った結果、GABAはGABAニューロン、グルタミン酸ニューロン、グリア細胞の分裂・分化に重要であることを明らかにした。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2021；32：57-64

Key Words：GABA, GABAニューロン, シングルセル解析, VGAT, 大脳皮質

【序論】

脳機能は興奮性と抑制性の情報伝達のバランスによって制御されており、抑制性神経伝達物質として主にGABA（ γ -アミの酪酸）が使われている。最近の研究で、GABAが脳の発生発達や神経回路形成に重要な役割を持つことが示唆されている¹⁻⁴⁾。

発生期に大脳基底核原基で産生された抑制性神経細胞（GABAニューロン）は、接線方向に移動して、大脳皮質に移動して成熟したGABAニューロンになる。発生発達時のGABAニューロン細胞数は厳密に調節されていると考えられており⁵⁾、GABAニューロンの数が減少した場合や薬理的にGABAニューロンの機能を抑えるとてんかん様発作が起こる^{6, 7)}。近年では、胎生期においてGABAが神経細胞の移動、分裂、分化に重要な役割を担うことが報告されている^{1-4, 8)}。また、GABAが神経細胞の活動電位を抑制する

だけでなく、成体ラットにおいてグルタミン酸ニューロンに対するシナプスの選別や除去に関わる⁹⁾ ことや、発達期にシナプス形成に関わる¹⁰⁾ が明らかになってきた。また、多くのてんかん患者の病的所見で、大脳皮質抑制性GABAニューロンのシナプス異常が認められることから¹¹⁻¹⁴⁾、てんかん症状の一因は大脳皮質のGABA放出機能と関連する推察することができ、発生発達期におけるてんかん原性獲得のメカニズムや破綻機構は未解であった。最近、著者らは、遺伝子改変マウスを用いて、3週齢から長期的（6ヶ月間）にGABA放出停止を起こした大脳皮質GABAニューロンで顕著な樹状突起の退縮や、神経細胞体の縮小などの異常が認められることを見出した（未発表データ）。この結果から、GABAは抑制性の神経伝達物質としての機能以外に、神経細胞の形態を維持する役割を持ち、その異常がてんかん原性獲得に関わっているのではないかと考え、GABA

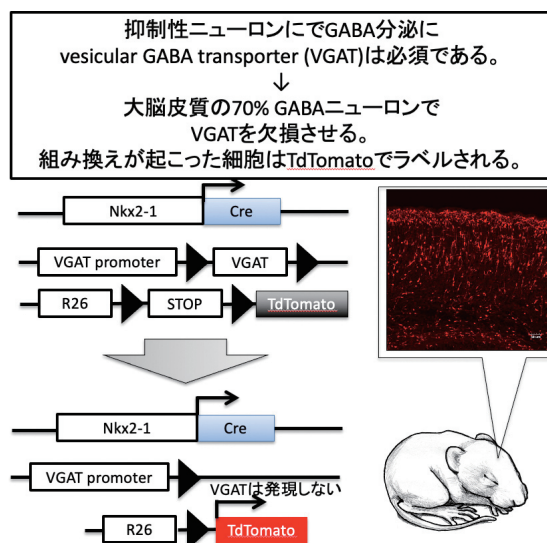


Fig. 1 研究に用いた遺伝子改変マウス (Nkx2-1-Cre ; floxed-VGAT ; Rosa26-floxed-TdTomatoマウス) のコンストラクト。GABAを放出するために必須であるvesicular GABA transporter (VGAT) を領域特異的欠損させる。Nkx2-1-Creマウスは、大脳皮質と視床下部のGABAニューロンで組み換えが起き、VGATを欠損させることができる。また、組み換えが起きた細胞は赤色蛍光色素 (TdTomato) でラベルされる。

放出を停止させることができる遺伝子改変マウスを用いて、

- (1) 大脳皮質GABAニューロン発生過程におけるGABAの機能
- (2) 大脳皮質GABAニューロン形態維持におけるGABAの機能

について解析を行うことにした。

【方法】

(1) 実験に用いた遺伝子改変マウス

本研究は、大脳皮質GABAニューロンの最も重要な生理機能であるGABAの放出を欠損させ、機能不全に陥ったGABAニューロンの動態の解析を通じて、てんかん発症のメカニズムを探ることを目的としている。本研究は、遺伝子改変マウス (Fig. 1) を用いてGABAを放出するために必須であるvesicular GABA transporter (VGAT)¹⁵⁾ を時期特異的にGABAニューロンの一部の細胞で欠損させて解析を行う。具体的にはNkx2-1-Cre ; floxed-VGAT ; Rosa26-floxed-TdTomatoマウスを用いる。Nkx2-1-Creマウス¹⁶⁾ は大脳皮質の約70%のGABA

ニューロンと視床下部の一部で組み換えを起こすことができるので、VGAT-floxマウスと組み合わせることで領域特異的にGABAニューロンのGABA放出を停止させることができる。さらにリポーター遺伝子によって、組み換えが起きた細胞は赤色蛍光色素でラベルされる。

(2) RNA-seqによる変動する遺伝子群の解析

生後0日目のNkx2-1-Cre ; floxed-VGAT (homo/hetero) マウスの大脳皮質よりRNAを抽出して、高速シーケンサー (Illumina NextSeq 500) によって、遺伝子プロファイリングを取得し、変動する遺伝子群を解析した (homo/hetero, n=4)。その結果、1204遺伝子が有為に変動していることが明らかになった (Fig. 4, 一部データ未発表)。ヒートマップ解析は、Rを用いて行い、Gone Ontology 解析はDAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) を利用した。

(3) Chromium Single-cell Gene Expression解析

生後0日目のNkx2-1-Cre ; floxed-VGAT (homo/hetero) マウスの遺伝子型をPCR法により決定し、雄のhomo/heteroマウスの大脳皮質を初発材料として解析を行った。切り出

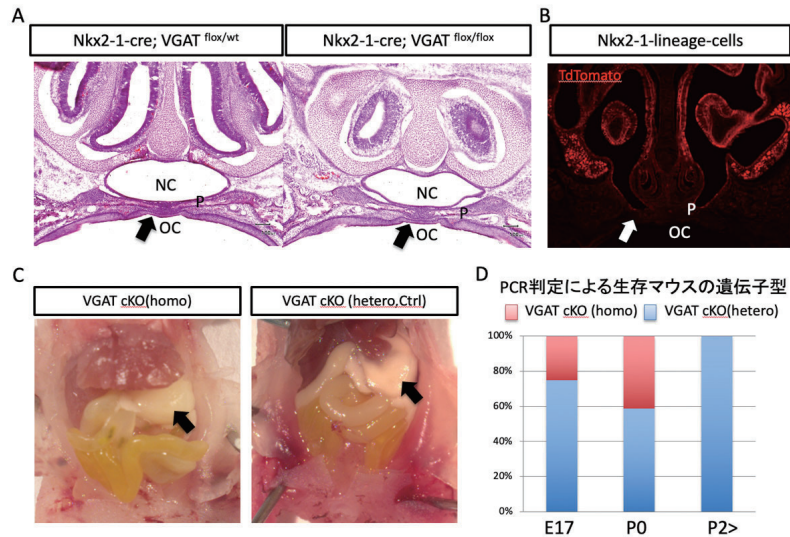


Fig. 2 A. 生後0日目のNkx2-1-Cre; floxed-VGAT (homo/hetero); Rosa26-floxed-TdTomato (homo/hetero) マウスの口蓋の前頭断を示す。いずれのマウスも口蓋裂や臍帯ヘルニアの症状を示さない (矢印)。(OC: oral cavity, NC: nasal cavity, P: palate)
 B. Nkx2-1-Cre-Tdtomato lineage cellsは口蓋周囲には分布していない。
 C. 生後0日目のNkx2-1-Cre; floxed-VGAT (hetero/homo) のマウスの胃でミルクが確認 (矢印) できる。Nkx2-1-Cre; floxed-VGAT (hetero/homo) は摂食には異常がないと考えられる。
 D. PCRによる生存マウスの遺伝子型の判定。Nkx2-1-Cre; floxed-VGAT (homo) マウスは生後2日目までに死亡する。

した大脳皮質は、パパイイン、DNaseIによって酵素的に処理し、遠心分離によって細胞を単離した^{17, 18)}。単離した細胞をChromium Single-cell Gene Expression (10xGenomics) 解析を行うことで、約10000細胞の単一細胞遺伝子発現プロファイリングを取得した。具体的には、Chromium Controller (10xGenomics) を用いてシーケンス用ライブラリーを調製した後、高速シーケンサーによって発現プロファイルを取得した。シングルセル遺伝子プロファイルの解析やクラスター解析はCell RangerまたはSeuratを用いた。

【結果】

<研究1：大脳皮質GABAニューロン発生過程におけるGABAの機能の解析>

大脳皮質の発生発達過程におけるGABAやGABAニューロンの機能維持機構を探るため floxed-VGAT マウス とNkx2-1-Cre; floxed-VGATマウスを組み合わせ、大脳皮質と視床

下部のみ特異的にGABA放出を停止させて解析を行った。このマウスでは、大脳皮質GABAニューロンのおよそ70%がGABA放出不全になる。Nkx2-1-Cre; floxed-VGAT homo/hetero (VGAT cKO homo/hetero) マウス解析の結果、homo/heteroいずれのマウスも口蓋裂や臍帯ヘルニアの症状を示さなかったが、生後2日目には全て死亡することが明らかになった (Fig. 2)。死亡したVGAT cKO homoマウスの胃でミルクが確認できることから、このマウスの摂食機能は正常であると考えられる。そこで、著者らはVGAT cKO homoマウス致死の原因は視床下部のGABAニューロンの機能不全ではなく、大脳皮質の異常によるものではないかと考え、生後0日目のVGAT cKO homo/hetero マウスの大脳皮質の細胞数を免疫組織化学染色によって解析した (Fig. 3) が、有為な変動は認められなかった。

さらにVGAT cKO homoマウスが致死にいたる異常を詳細に探るため、生後0日目のVGAT

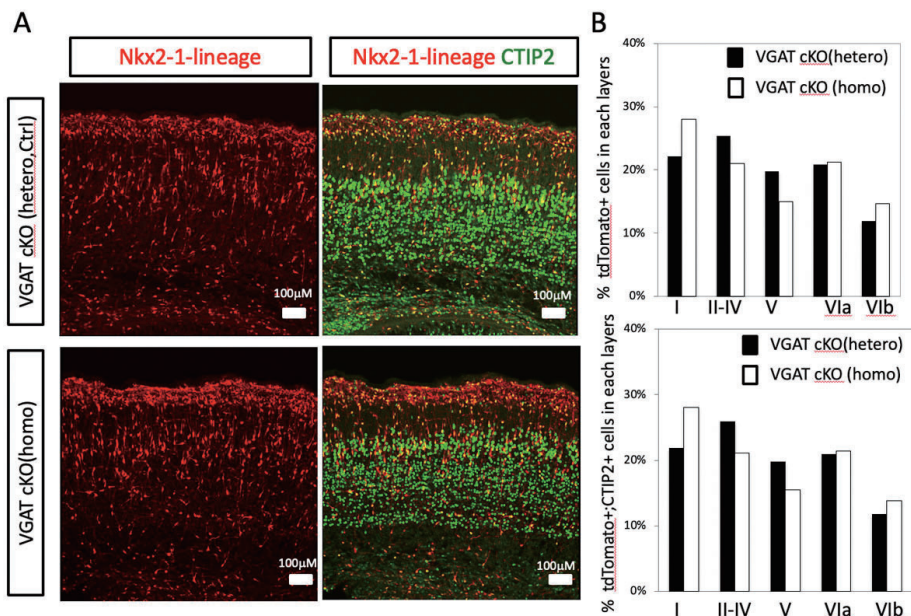


Fig. 3 A. 生後0日目のNkx2-1-Cre; floxed-VGAT (homo/hetero) マウス的大脑皮質の免疫染色。CTIP2は的大脑皮質深層のマーカーである。
B. 免疫染色の結果、生後0日目のNkx2-1-Cre; floxed-VGAT (homo/hetero) マウス的大脑皮質GABAニューロンの細胞数に異常は認められない。

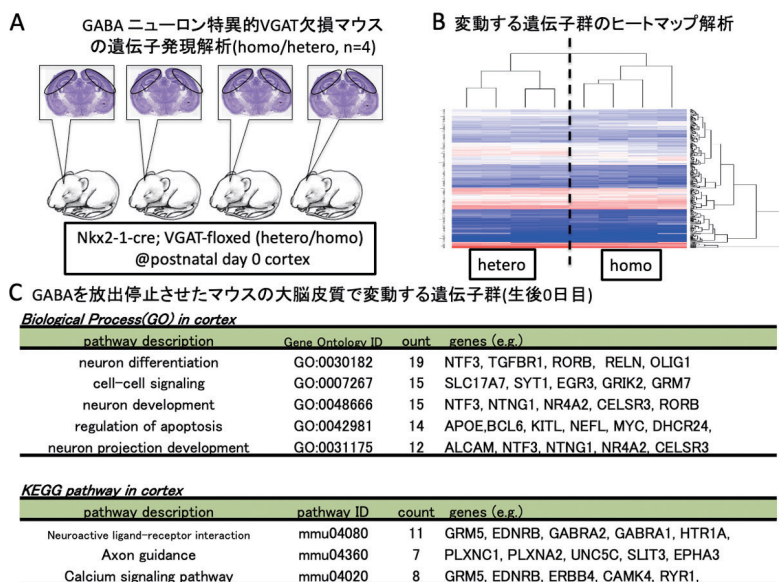


Fig. 4 A. 生後0日目のNkx2-1-Cre; floxed-VGAT (homo/hetero) マウス的大脑皮質で変動する遺伝子群をRNA-seqにより解析した (homo/hetero, n=4)。
B. 変動する遺伝子群のヒートマップ解析。
C. 生後0日目のNkx2-1-Cre; floxed-VGAT (homo/hetero) マウス的大脑皮質で変動する遺伝子群 (一部抜粋)。

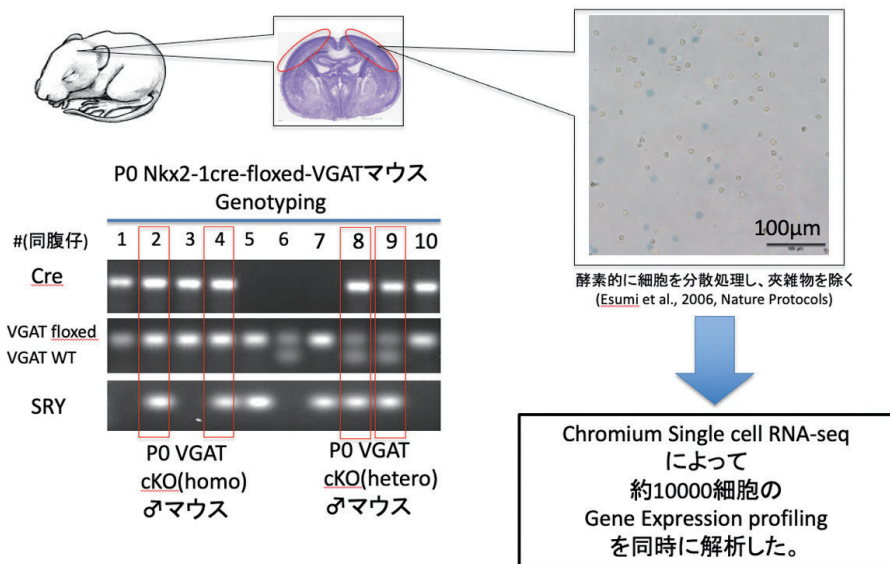


Fig. 5 Chromium Single-cell Gene Expression Analysis による生後0日目のNkx2-1-Cre ; floxed-VGAT(homo/hetero) マウスの大脳皮質細胞の発現解析。生後0日目のマウスの遺伝子型をPCR法によって決定した後、大脳皮質を切り出し酵素的に処理した (Esumi et al., 2005, Nature Genetics) (Esumi et al., 2006, Nature Protocols)。分散した細胞を用いてChromium Single-cell Gene Expression (10xGenomics) 解析を行うことで、約10000細胞の遺伝子発現プロファイリングを取得した。

cKO homo/heteroの大脳皮質のRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて変動する遺伝子を解析した。その結果、1024遺伝子において有為な差が認められた。Gene Ontology解析では "neuron differentiation" "neuron development" などに変動がみられ、KEGG解析では "axon guidance" などに関わる分子群などに変動が認められた (Fig. 4)。さらに変動する遺伝子群について解析を進めたところ、VGAT cKO homoマウスの大脳皮質においては、GABAニューロンで発現して、精神疾患で変異がみられるシナプス蛋白ErbB4¹⁹⁾、GABAシグナルに直接関与するGABARa2、グルタミン酸ニューロンの分化に関わるFabp7 (BLBP)、アストロサイトで発現するGFAPが大きく変動していることが明らかになった。この結果は、大脳皮質発生過程において、GABAが興奮性、抑制性神経それぞれの発生だけでなくグリア細胞の発生も関わることを示唆している。

そこで、GABA減少による大脳皮質発生異

常を細胞群ごとに網羅的にとらえるために、Single-cell RNA-seq 解析を行うことにした。生後0日目のVGAT cKO homo/heteroマウスの大脳皮質の細胞を単離し、単一細胞ライブラリーを作成し、約10000細胞のSingle-cell RNA-seq解析を行い、遺伝子プロファイリングを取得した (Fig. 5)。その結果、細胞群を16のクラスターに分類することができた。次に、分類したクラスター群において特徴的な遺伝子群を抽出し、細胞種を特定しVGAT cKO homo/heteroマウス間で比較を行ったところ、VGAT cKO homoマウスでは、GABAニューロン、グルタミン酸ニューロン、グリア細胞それぞれのクラスター群の細胞分布が変動していた (Fig. 6)。具体的には、GABAニューロン群においては、"Migrating GABA Progenitor" が上昇し、グルタミン酸ニューロン群では、"Projection Neuron Progenitor"が上昇、"Layer II / III Progenitor" "Intermediate Neuron Progenitor"が減少し、グリア細胞群では、"Radial Glia/Astrocyte"

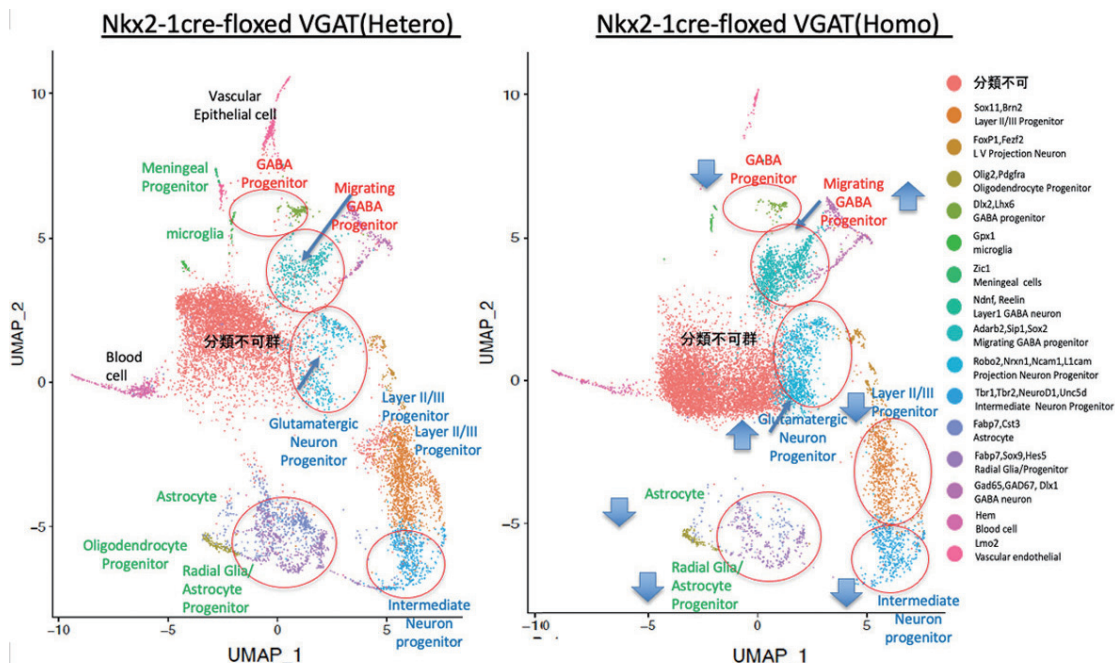


Fig. 6 Chromium Single-cell RNA-seq Gene Expression解析による生後0日目のNkx2-1-Cre ; floxed-VGAT (homo/hetero) マウスの大脳皮質細胞の単一細胞遺伝子発現解析。約10000細胞のGene Expression profiling を取得して、クラスター解析を行い、16のクラスターに分類し、含有される遺伝子群からクラスターの性質を決定した。VGAT cKO homo/hetero マウスの単一細胞遺伝子発現プロファイリングを比較した結果、複数のクラスターで発現変動が認められた（矢印は細胞群の発現変動を示す）。

(Sox11, Brn2 : Glutamatergic neuron layer II/III progenitor, FoxP1, Fezf2 : Glutamatergic neuron layer V progenitor, Olig2, Pdgfra : Oligodendrocyte progenitor, Dlx2, Lhx6 : GABAergic neuron progenitor, Gpx1 : Microglia, Zic1 : Meningeal cell, Ndnf, Reelin : GABAergic neuron layer1 progenitor, Adarb2, Sip1, Sox2 : Migrating GABAergic neuron progenitor, Robo2, Nrnx1, Ncam1, L1cam : Glutamatergic projection neuron progenitor, Tbr1, Tbr2, NeuroD1, Unc5d : Glutamatergic intermediate neuron progenitor, Fabp7, Cst3 : Astrocyte, Fabp7, Sox9, Hes5 : Radial glia progenitor, Gad65, GAD67, Dlx1 : GABAergic neuron progenitor, Hem : Blood cell, Lmo2 : Vascular endothelial cell)

"Astrocyte" が減少していた。著者らの解析から、大脳皮質発生発達過程においては、GABAは神経伝達物質として働くだけでなく、GABAニューロンやグルタミン酸ニューロン、アストログリアの発生発達にも大きく影響を与えていることが網羅的に明らかになった。

<研究2：大脳皮質GABAニューロン形態維持におけるGABAの機能>

これまでの報告や上記の実験からも多数の大脳皮質GABAニューロンの機能異常は致死に至

ることがわかっている。そこで、時期特異的に大脳皮質GABAニューロンの一部でGABA放出不全を起こし、その形態や性質を詳細に解析するためGAD67-CrePR ; floxed-VGAT ; Rosa26-floxed-TdTomatoマウスを用いて解析を行うことにした。このGAD67-CrePRマウスはMifepristoneの投与時にのみ、一部の細胞で組み換えを起こすことができるので¹⁹⁾、VGAT-floxマウスと組み合わせることで時期特異的にGABAニューロンにGABA放出停止を起こすことができる (Esumi et al., Frontiers in

Neuroscience. 2021., in press)。これまでの実験で、生後3週齢にGABA放出不全を起こしたGABAニューロンは、6ヶ月後には顕著な樹状突起の退縮や、神経細胞体の縮小などの形態異常が生じ、さらにbuttonのサイズが変動しているという予備的な結果を得ることができた。興味深いことに、3週齢からに長期的（6ヶ月間）にGABA放出停止を起こした大脳皮質GABAニューロンは、形態異常を起こしているにもかかわらず、細胞死を起こすことなく、機能不全のまま長期間にわたって脳内にとどまり続けている。このような現象は、これまでに報告されておらず、本研究はてんかん原性獲得の概念を変えることが期待できる。このマウスは、Mifepristoneの複数回投与で、投与回数依存的にGABA放出不全を起こすGABAニューロンを増やすことができる。この実験系を応用することで、てんかんを引き起こすトリガーとなる臨界点を決めることができるのではないかと考え実験を進めている。

【考察】

哺乳類の高次脳機能を担う大脳皮質は興奮性のグルタミン酸ニューロンと抑制性のGABAニューロンの二種類の神経細胞によって支えられている。大脳皮質それぞれの層では、固有の役割を持つグルタミン酸ニューロンやGABAニューロンが多階層的に分布してシナプスを作ることによって、脳の高次機能が成り立つ。大脳皮質のGABAニューロンは、多様なサブタイプに分類されているがそのうちPV陽性GABAニューロンの異常とてんかん発症の関連^{20, 21)}や、PV陽性GABAニューロンで発現するErbB4+細胞におけるVGAT欠損がGABAニューロンのシナプス形成や形態異常を引き起こすことが報告されている¹⁹⁾。今回の研究で利用したNkx2-1-Cre; floxed-VGAT (homo/hetero) マウスは、大脳皮質GABAニューロンのうち、PVニューロンとSstニューロンにおいて組み換え酵素Creが働き、VGATを欠損させている。著者らの結果は、PVニューロン、Sstニューロン何れか、もしくは両方の欠損に起因する発生異常かを断定することはできないが、大脳皮質を構成

する多くの細胞群の発生発達過程にGABAが神経伝達物質以外の重要な役割を担うことを示している。今回の著者らの研究で大脳皮質発生におけるGABA減少がもたらす影響を網羅的に明らかにすることができた。本研究が創薬や新規のてんかん治療法開発に少しでも寄与できるよう今後も研究を続けたい。

【謝辞】

本研究は、熊本大学大学院生命科学研究部形態構築学分野 福田孝一教授、脳回路構造学分野 玉巻伸章名誉教授のもとで行いました。また、RNA-seq解析、シングルセル解析は熊本大学 発生医学研究所との共同研究で行いました。最後に研究助成をいただいた財団法人てんかん治療研究振興財団に心より御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) 福田敦夫. 胎児脳発達における母体ストレスの影響：特に抑圧性神経との関係について. ベビーサイエンス 2013. vol. 13.
- 2) 柳川右千夫. 統合失調症のGABA仮説, モデル動物を用いた研究. 日本生物学的精神医学会誌. 2013. 24 (3) : 163-168.
- 3) Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic Interneurons in the Neocortex : From Cellular Properties to Circuits. Neuron. 2016, 91 (2) : 260-92.
- 4) Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. Front Cell Neurosci. 2015. 9 : 4. doi : 10.3389/fncel. 2015. 00004.
- 5) Wu S, Esumi S, Watanabe K, Chen J, Nakamura KC, Nakamura K et al. Tangential migration and proliferation of intermediate progenitors of GABAergic neurons in the mouse telencephalon. Development. 2011, 138 (12) : 2499-509.
- 6) 小幡 邦彦. GABAとてんかん. 神経研究の進歩, 2000, 44 (1) : 5-12.
- 7) 小山隆太. てんかん脳における興奮性GABAシグナリングの役割. 生化学, 2014, 86 (6) : 803-806.
- 8) Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nat Rev

- Neurosci. 2002, **3** (9) : 715-27.
- 9) Hayama T, Noguchi J, Watanabe S, Takahashi N, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC et al., GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling. *Nat Neurosci.* 2013, **16** (10) : 1409-16.
 - 10) Chattopadhyaya B, Cristo GD, Wu CZ, Knott G, Kuhlman S, Fu Y et al., GAD67-mediated GABA Synthesis and Signaling Regulate Inhibitory Synaptic Innervation in the Visual Cortex. *Neuron.* 2007, **54** (6) : 889-903.
 - 11) Bozzi Y, Casarosa S, Caleo M. Epilepsy as a neurodevelopmental disorder. *Front Psychiatry.* 2012, **3** : 19. doi : 10.3389/fpsy.2012.00019.
 - 12) David M. Treiman. GABAergic Mechanisms in Epilepsy. *Epilepsia*, 2001 : **42** Suppl 3 : 8-12.
 - 13) Takano T, Sawai C. Interneuron dysfunction in epilepsy : An experimental approach using immature brain insults to induce neuronal migration disorders. *Epilepsy Res.* 2019, **156** : 106185.
 - 14) RRossini L, De Santis D, Mauceri RR, Tesoriero C, Bentivoglio M, Maderna E et al., Dendritic pathology, spine loss and synaptic reorganization in human cortex from epilepsy patients. *Brain.* 2021, **144** (1) : 251-265.
 - 15) Saito K, Kakizaki T, Hayashi R, Nishimaru H, Furukawa T, Nakazato Y et al., The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development : a study using knockout mice. *Mol Brain.* 2010, **3** : 40.
 - 16) Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marín, O., Pachnis, V. and Kessaris, N. Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J. Neurosci.* 2007, **27** : 10935-10946.
 - 17) Esumi S, Kakazu N, Taguchi Y, Hirayama T, Sasaki A, Hirabayashi T et al., Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the CNR/Protocadherin- α gene cluster in single neurons. *Nature Genetics* 2005. **37** (2) : 171-6.
 - 18) Esumi S, Kaneko R, Kawamura Y, Yagi T. Split single-cell RT-PCR analysis of Purkinje cell. *Nature Protocols*, 2006, **1** : 2143-2151.
 - 19) Lin TW, Tan Z, Barik A, Yin DM, Brudvik E, Wang H, et al., Regulation of Synapse Development by Vgat Deletion from ErbB4-Positive Interneurons. *J Neurosci.* 2018, **38**(10) : 2533-2550.
 - 20) Esumi S, Nasu M, Kawauchi T, Miike K, Morooka K et al., Characterization and stage-dependent lineage analysis of intermediate progenitors of cortical GABAergic interneurons. *Front. Neurosci.* 2021, doi : 10.3389/fnins.2021.607908
 - 21) Ogiwara I, Iwasato T, Miyamoto H, Iwata R, Yamagata T, Mazaki E et al., Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of Dravet syndrome. *Hum Mol Genet.* 2013, **22** : 4784-804.
 - 22) Tatsukawa T, Ogiwara I, Mazaki E, Shimohata A, Yamakawa K. Impairments in social novelty recognition and spatial memory in mice with conditional deletion of Scn1a in parvalbumin-expressing cells. *Neurobiol Dis.* 2018, **112** : 24-34.