

—— 研究助成報告 ——

X連鎖性点頭てんかんモデルマウスの解析と新規神経トレーサーを用いた点頭てんかんの責任脳領域同定と発作軽減の試み

森 琢 磨

要旨：点頭てんかんは 主に1歳以下の小児が発症する年齢依存的なてんかんである。その多くは難治であり、発症原因も多岐に渡る。点頭てんかんの治療法は副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）の投与であるが、免疫低下などの副作用も見られることから、新たな治療法の開発が期待されている。本研究計画は、点頭てんかんモデル動物であるCASKノックアウトマウスおよびNMDA投与マウスを対象として、その脳内神経回路の変性と点頭発作に関わる脳領域の同定を試みた。その結果、CASKノックアウトマウスでは脳内の興奮抑制バランスが破綻して興奮優位と変化していることが明らかとなった。また点頭発作後には、中隔野および海馬が活動することが明らかになった。これら脳領域の過興奮が点頭てんかん発症原因である可能性が示唆されたことから、当該脳領域の神経活動を抑制することで点頭発作の抑制できることが期待される。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2021；32：69-74

Key Words：CASK, Infantile Spasms, Trans-synaptic tracing, excitatory/inhibitory balance NMDA

【序論】

点頭てんかんは、主に1歳以下の小児が発症する年齢依存的なてんかんである。その原因は、結節性硬化症、滑脳症などの大脳形成異常、先天性代謝異常、そしてARXなどの遺伝子変異など多岐にわたる。点頭てんかんの動物モデルはこれまでに複数開発されてきたが、その動物を用いて、点頭発作時に活動する脳領域および活動した脳領域の結合関係など、ヒプスアリズミアの発生と伝播メカニズムを示唆するデータはほとんど得られていない。

点頭てんかんの発症メカニズムを明らかにする上で、モデル動物を確立し解析することは必要不可欠である。しかしながら、点頭てんかん患者から同定された原因遺伝子をノックアウトしたマウスは数多く作成されているにも関わらず、多くのマウスでは自発的な点頭てんかん様発作は観察されない。近年、原因遺伝子のひとつとして同定されたCASK遺伝子のノックアウト

トマウスは、自発的な点頭てんかん様発作が観察されている¹⁾。本研究ではこのCASKヘテロ欠損雌マウスの神経生理機能およびその分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

これまでに確立している点頭てんかんモデルは、幼若マウスにNMDAを投与することで急性痙攣を引き起こすことができるNMDA投与幼若マウスモデルである²⁾。本マウスは自発的な発作ではないものの、年齢依存的に痙攣発作が観察されること、その発作の表現形が点頭発作と類似している。本研究では、このNMDA投与幼若マウスモデルを用いて、点頭てんかん発症時に活動する脳領域およびその細胞タイプは何か？そしてそれら細胞にシナプス入力する脳領域はどこなのか？を明らかにすることを目指す。

【方法】

倫理規程：全ての実験は信州大学動物実験等実施規定に基づいて行われた。

使用動物：CASKヘテロ欠損メスマウスは、flox-CASKマウス³⁾ およびZP3-Creマウス⁴⁾ を交配して得られたflox-CASK X ZP3-Cre二重陽性メスマウスを野生型オスマウスと交配して得られた仔マウス（14–19日齢）を解析した。CASK遺伝子ノックダウン動物は、妊娠15日齢のマウス胎児に子宮内エレクトロポレーション法を適用することで、大脳新皮質2/3層の錐体細胞にCASK遺伝子ノックダウンベクターを導入した。NMDA投与幼若マウスモデルは、13日齢のマウス腹腔内にNMDA (15mg/kg体重) を投与することで発作を誘発し、発作観察から2時間後にマウスを灌流固定し、組織学解析を行った。

電気生理実験用の脳スライス標本の作成：生後14日から19日齢のマウスを、イソフルラン麻酔薬の過剰投与により安楽死させ、脳を摘出した。氷冷された人工脳脊髄液 (85 NaCl, 75 sucrose, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 25 glucose, 0.5 CaCl₂, and 4 MgCl₂, 単位はmM) 内で、350 μ mの急性脳スライス標本を作成した⁵⁾。前頭葉を含む脳スライスは、32℃の人口脳脊髄液中で30分間、そして室温 (24–26℃) の人工脳脊髄液中で1時間回復されたのちに、電気生理記録に用いられた。

カレントクランプ記録：神経細胞の内在性興奮性を明らかにするために、カレントクランプモードによるホールセルパッチクランプ記録を行なった。人工脳脊髄液中の脳スライスに分布する神経細胞を、赤外光および高感度CCDカメラで可視化し、ガラス電極を用いてホールセル記録を行なった。ガラス電極内には、130 K Gluconate, 6 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA, 2.5 MgCl₂, 2 magnesium ATP, 0.5 sodium GTP, 10 phosphocreatine sodium (単位はmM) の組成をもつ電極内液を用いた。ホールセル記録が確立した直後に静止膜電位を測定し、その後過分極および脱分極のステップパルス (700 ms) を細胞内に注入して、ニューロンに活動電位を誘発した。活動電位閾値は、電位の時間的速度が10mV/msに達した膜電位をとして定義した。

ボルテージクランプ記録：微小シナプス電

流は、セシウムベースの細胞内液 (130 CsOH, 130グルコン酸, 6 CsCl, 10 HEPES, 1 EGTA, 2.5 MgCl₂, 2マグネシウムATP, 0.5ナトリウムGTP, 10ホスホクレアチンナトリウム, 単位はmM) を使用した。細胞外液には1 mMテトロドトキシン (Abcam) を添加した人工脳脊髄液を用いた。興奮性シナプス田リユであるmEPSC (グルタミン酸作動性) を記録する場合には細胞膜電位を-60 mVに保持し、細胞膜電位を0 mVで保持することで、同じ細胞からのmIPSC (GABA作動性) を記録した。

子宮内エレクトロポレーション法：妊娠14日目の妊娠マウスを深麻酔下で開腹し、子宮を体内より引き出した。胎児マウスの側脳室にガラスピペットを用いてCASKノックダウンプラスミド、RFP発現プラスミド、CASK発現プラスミド、NMDA発現プラスミドを含むDNA混合溶液を1 μ l注入した。そして子宮壁ごとに胎児マウスの側頭部を挟み込んでエレクトロポレーション刺激を与えた。その後子宮を体内に戻し、閉腹し分娩させた。出生後にRFPの発現によって遺伝子導入マウスを選別し、その後の実験に使用した。

c-fos陽性発現細胞の組織解析：深麻酔下で、生後2か月のマウスに、氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4), 続いてPBS中の4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流した。厚さ50mmの冠状切片をスライド式ミクロトーム (REM-700, 大和工業) で作製した。切片をPBSで洗浄し、1%ウシ血清アルブミン, 0.1% Triton-X100, および10%の正常ロバ血清を含むPBSでブロックし、ウサギ抗c-fos (1:5000, Abcam)。一次抗体と一晚インキュベートした後、脳切片を0.1%Triton-X100を含むPBSで洗浄し、Alexa 488抗ウサギIgGロバ抗体 (Jackson ImmunoResearch) を二次抗体として用いた。室温で2–3時間二次抗体と反応させた。PBSでさらに洗浄した後、脳切片をスライドガラスにマウントし、DAPIで対比染色した。蛍光画像は、共焦点レーザー走査顕微鏡 (TCS SP8; Leica Microsystems) で撮影した。

解析手法：すべての値は、平均 $\pm$ SEMによって表されており、分析されたサンプル間

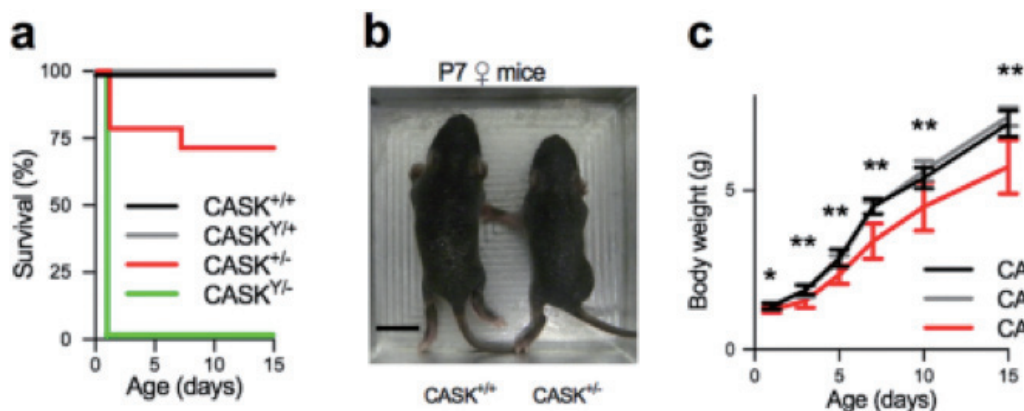


Fig. 1 CASK欠損マウスの生存率および成長曲線

- a) CASK遺伝子欠損マウスの生存率はヘミ接合体雄マウス（緑）は生後24時間以内に死亡する。一方でヘテロ接合体メス（赤）は75%程度が生存する。
 b) ヘテロ接合体メス（右）は体長がやや小さい。
 c) ヘテロ接合体メス（赤）は体重増加が遅い。

の分散は類似していることを確認した。統計的有意性は、スチューデントのt検定（2つのグループの場合）または一元配置分散分析とBonferroniの事後検定（複数のグループの場合）によって検証された。

【結果】

CASK遺伝子はX染色体上の遺伝子であり、報告されている患者のほとんどがde novoヘテロ接合体変異の女性である。CASKの全欠損マウスは生後24時間以内に死亡する一方で、CASKヘテロ接合体欠損メスマウスは成長が遅いものの、その75%程度は生後2週間まで生存することが確認された（Fig. 1）。また、CASK遺伝子欠損症で報告されている小脳低形成という形態的特徴^{6,7)}についても本マウスで確認された。

女性およびメス動物においてCASK遺伝子はX染色体不活性化によって発現が調節されているため、その脳内においてもCASK発現細胞とCASK欠損細胞がモザイク状に分布している。我々はパッチクランプ用ガラス電極を用いたsingle cell RT-PCR法を確立することで、細胞の生理特性を同定すると同時にその細胞の遺伝型を同定することに成功した。この手法を用いて、大脳新皮質における神経細胞のCASK遺伝

型とシナプス入力関係を解析した（Fig. 2）。その結果、CASKヘテロ接合体欠損メスマウスにおけるCASK発現細胞は、野生型マウス同様のシナプス入力パターンが確認された。一方で同じCASKヘテロ接合体欠損メスマウスであっても、CASK欠損細胞では興奮性シナプス入力が高頻度で、かつ、抑制性シナプスが低頻度で入力していることを見出した。

このCASK発現低下にともなうシナプスの興奮/抑制バランス（E/Iバランス）の変化は、CASK遺伝子ノックダウンモデルにおいても同様に観察された⁵⁾。我々はさらにCASK発現低下による影響を明らかにするために、このCASK遺伝子ノックダウンモデルを用いて解析を進めた。CASK遺伝子がノックダウンされた細胞に対して、CASK遺伝子を外来的に補完することで、シナプスのバランス異常が回復することが確認された。しかしながら、グアニル酸キナーゼドメインが欠損したCASK遺伝子では、シナプスのE/Iバランス異常が回復しないことが明らかになった（Fig. 3）。このことからグアニル酸キナーゼドメインがシナプスのE/Iバランス異常において重要な働きを持つことが明らかになった。また、CASKグアニル酸キナーゼドメインは転写因子TBR1に関わる遺伝子発現に関与することが知られている⁸⁾が、

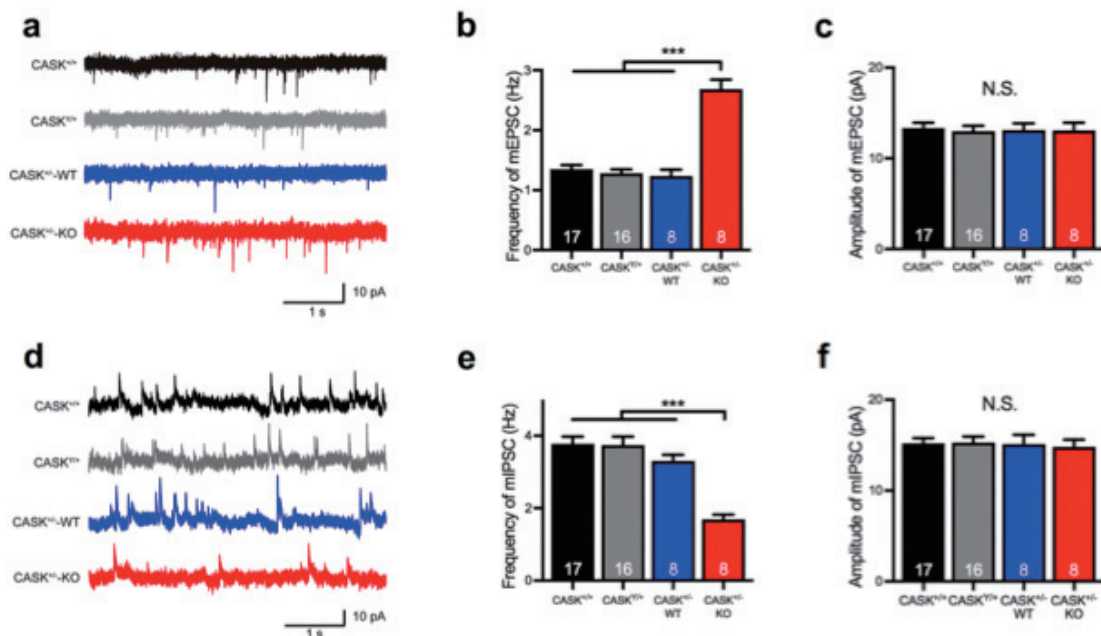


Fig. 2 神経細胞へのシナプス入力解析
興奮性シナプス (a-c) および抑制性シナプス (d-f) はヘテロ接合体マウスにおけるCASK欠損細胞 (赤) でシナプスバランス異常が観察された。

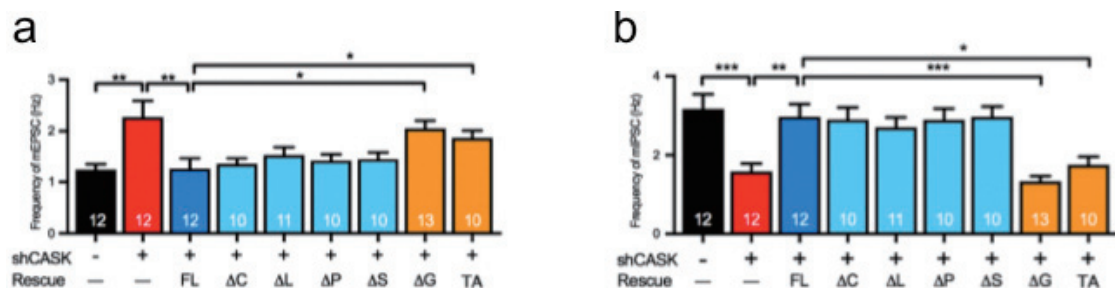


Fig. 3 CASK遺伝子ノックダウン神経細胞へのシナプス入力
CASK遺伝子ノックダウンによる興奮性シナプス (a) および抑制性シナプス (b) のバランス異常は、グアニル酸キナーゼドメイン (ΔG) を欠失したCASKおよび724番目のスレオニンがアラニンと置換されたCASK (TA) では回復しない。

その機能を欠失させる724番目のスレオニンをアラニンと置換したCASK変異体⁹⁾でもシナプスのE/Iバランス異常が回復しなかった。

CASKが転写活性を調節するTBR1の下流遺伝子のひとつにNMDA型受容体2Bサブユニット (GluN2B) が知られている^{9, 10)}。このNMDA型受容体2Bサブユニットタンパク質を低下させることで、CASK遺伝子ノックダウ

ン同様のシナプスのE/Iバランス異常を確認した。ここでCASKによるGluN2B発現調節がシナプスのE/Iバランス異常を引き起こすという仮説を検証するために、GluN2B遺伝子の外来補完がCASK遺伝子ノックダウンに与える影響を解析した。その結果、CASK遺伝子発現低下によるシナプスのE/Iバランス異常がGluN2B遺伝子の補完によって回復することが明らかに

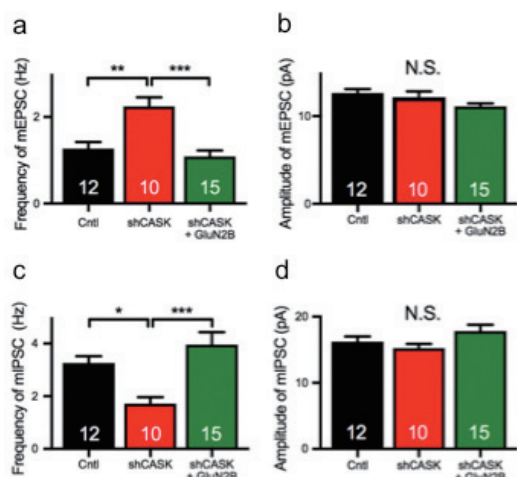


Fig. 4 GluN2Bの外来補完がCASK遺伝子ノックダウン神経細胞に与える影響の解析。CASK遺伝子ノックダウンによるシナプス入力の変化（赤）がGluN2B補完によって回復した（緑）。

なった (Fig. 4)。

以上の結果から、CASKヘテロ接合体欠損メスマウスでは、CASK欠損細胞において、CASK依存的なGluN2B遺伝子発現の低下がシナプスの興奮抑制バランスの異常を引き起こすことが明らかになった。

次に、現在進行中のNMDA投与幼若マウスモデルについて報告する。NMDAを腹腔内投与され點頭様発作を示したマウスの脳切片からは海馬、視床下部を含む複数の脳領域でc-fos陽性細胞の優位な発現が観察された。細胞タイプの詳細な構成が報告されている海馬において、c-fosを発現する神経細胞タイプを解析した結果、興奮性錐体細胞および抑制性カルレチニン陽性介在細胞における発現が認められた。次に、狂犬病ウイルス単シナプストレース法を用いて、これら細胞タイプに入力する神経細胞を網羅的に可視化した。錐体細胞は抑制性介在細胞から局所的なシナプス入力を受けること、一方で、カルレチニン陽性介在細胞は局所的な入力ほとんど受けず、マイネルト基底核などからの神経投射が強いことが明らかになった。これらの実験は、実験結果を論文として報告すべく、追加の実験を実施している。今後、これら

脳領域が點頭てんかん、なかでもヒプスアリズミアの発生に与える影響について明らかにしていきたい。

【考察】

我々の研究からCASK遺伝子の欠損はGluN2Bの発現低下を引き起こし、その結果として興奮性シナプスが過剰となるシナプスのE/Iバランス異常が引き起こされると考えられる。點頭てんかん患者からはGluN2Bの遺伝子変異も報告されているが¹¹⁾、その遺伝子変異は機能獲得型変異だと考えられている¹²⁾。また、點頭てんかんと関わるCDKL5のノックアウトマウスにおいてもGluN2Bの機能亢進が報告されている。これらの結果を総合すると、GluN2Bの機能変化ではなく、その結果として攪乱されるシナプスのE/Iバランス異常など、より下流の生物学的現象が點頭てんかんの発症に関わると推察される。今後は、このシナプスのE/Iバランス異常によってヒプスアリズミアが発症する脳領域および神経回路メカニズムを明らかにすることで、點頭てんかんの発症理解につなげていきたい。

NMDA投与モデルにおける発作関連細胞は海馬CA1および視床下部弓状核などに認められた。特に海馬CA1領域では、カルレチニン陽性細胞においてc-fosの発現が認められた。カルレチニン陽性細胞は抑制性介在細胞にシナプス入力する「脱抑制」型の細胞であることが知られている¹³⁾。そのためこのカルレチニン陽性細胞の活動が亢進することで、海馬の脱抑制が亢進したと考えられる。今後は光遺伝学および薬理遺伝学を用いて、これまでに同定された脳領域における神経活動の操作が點頭てんかん発作発症に与える影響を解析することで、いまだ明らかになっていない點頭てんかんの発症機序の解明を目指したい。

【謝辞】

信州大学分子細胞生理学教室員の皆様、中でも熱心にご指導いただきました田渕克彦教授のご理解とご助力なしには、本研究は有り得ません。厚く御礼申し上げます。また點頭てんかんをはじめとする小児てんかんの症例に触れる貴

重な機会を与えてくださった，ウエスト症候群患者家族会およびらぶはんず（CDKL5患者家族会）の皆様にも，この場をお借りして，心より御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) Srivastava S, McMillan R, Willis J, Clark H, Chavan V, Liang C *et al.* X-linked intellectual disability gene CASK regulates postnatal brain growth in a non-cell autonomous manner. *Acta neuropathologica communications* 2016 ; **4** : 30.
- 2) Shi XY, Yang XF, Tomonoh Y, Hu LY, Ju J, Hirose S *et al.* Development of a mouse model of infantile spasms induced by N-methyl-D-aspartate. *Epilepsy research* 2015 ; **118** : 29-33.
- 3) Atasoy D, Schoch S, Ho A, Nadasy KA, Liu X, Zhang W *et al.* Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 ; **104** (7) : 2525-2530.
- 4) de Vries WN, Binns LT, Fancher KS, Dean J, Moore R, Kemler R *et al.* Expression of Cre recombinase in mouse oocytes : a means to study maternal effect genes. *Genesis (New York, NY : 2000)* 2000 ; **26** (2) : 110-112.
- 5) Mori T, Kasem EA, Suzuki-Kouyama E, Cao X, Li X, Kurihara T *et al.* Deficiency of calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase disrupts the excitatory-inhibitory balance of synapses by down-regulating GluN2B. *Molecular psychiatry* 2019 ; **24** (7) : 1079-1092.
- 6) Najm J, Horn D, Wimplinger I, Golden JA, Chizhikov VV, Sudi J *et al.* Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nature genetics* 2008 ; **40** (9) : 1065-1067.
- 7) Burglen L, Chantot-Bastaraud S, Garel C, Milh M, Touraine R, Zanni G *et al.* Spectrum of pontocerebellar hypoplasia in 13 girls and boys with CASK mutations : confirmation of a recognizable phenotype and first description of a male mosaic patient. *Orphanet journal of rare diseases* 2012 ; **7** : 18.
- 8) Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M. Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 2000 ; **404** (6775) : 298-302.
- 9) Huang TN, Hsueh YP. CASK point mutation regulates protein-protein interactions and NR2b promoter activity. *Biochemical and biophysical research communications* 2009 ; **382** (1) : 219-222.
- 10) Huang TN, Chang HP, Hsueh YP. CASK phosphorylation by PKA regulates the protein-protein interactions of CASK and expression of the NMDAR2b gene. *Journal of neurochemistry* 2010 ; **112** (6) : 1562-1573.
- 11) Lemke JR, Hendrickx R, Geider K, Laube B, Schwake M, Harvey RJ *et al.* GRIN2B mutations in West syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Annals of neurology* 2014 ; **75** (1) : 147-154.
- 12) Mullier B, Wolff C, Sands ZA, Ghisdal P, Muglia P, Kaminski RM *et al.* GRIN2B gain of function mutations are sensitive to radiprodil, a negative allosteric modulator of GluN2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology* 2017 ; **123** : 322-331.
- 13) Gulyás AI, Hájos N, Freund TF. Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1996 ; **16** (10) : 3397-3411.