

—— 研究助成報告 ——

アンジェルマン症候群におけるてんかんの 病態生理解明と治療法の開発

江 川 潔, 後 藤 健, 白 石 秀 明

要旨：アンジェルマン症候群（AS）はUBE3Aの機能欠失によって発症する遺伝性疾患である。今回てんかん・脳波異常に対するシナプス外GABA持続抑制の関与を探索する目的に、視床および海馬・皮質興奮性神経細胞のGABA持続抑制を評価し、脳波異常に対するGABA受容体 $\alpha 5$ サブユニットあるいは δ サブユニット選択的活性化剤（MP-Ⅲ-022, Gaboxadol）の効果を検証した。AS海馬・皮質興奮性神経細胞ではGABA持続抑制が減弱していたのに対し、視床ニューロンでは減弱を認めなかった。ASマウスの脳波では、低周波成分のパワーが有意に高く、この異常はMP-Ⅲ-022投与により改善したのに対し、Gaboxadolの投与では逆に悪化した。けいれん閾値、不安様神経活動についても同様の結果となった。視床皮質間におけるGABA持続抑制の不均衡がASのてんかん・脳波異常の原因となる可能性が示唆された。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2022；33：27-34

Key Words：アンジェルマン症候群, てんかん, GABA持続抑制, GABA受容体サブユニット, 脳波異常

【序論】

アンジェルマン症候群（AS）は、ユビキチン蛋白リガーゼの一つUBE3Aの機能喪失により発症する先天発達異常症であり、母性発現遺伝子*UBE3A*を原因遺伝とする¹⁾。知的発達症、広汎性発達障害、運動失調、特徴的な顔貌を主徴とし、約80%にてんかんを合併するとされ、その病態生理は多くが未解明である²⁾。申請者はこれまで、母由来*Ube3a*をノックアウトしたASモデルマウス（*Ube3a*ノックアウトマウス）をもちいて、小脳失調に係わる運動機能障害について研究を行い、①AS小脳顆粒細胞において、シナプス外GABA受容体によって惹起されるGABA持続抑制が著明に減弱していること、②その分子機構としてGABAの再取り込みにより細胞外GABA濃度を調整するGABAトランスポーター1（GAT1）の分解が*UBE3A*によ

り制御されていること、③小脳顆粒細胞において、シナプス外受容体を構成する δ サブユニット含有GABA受容体（ δ -GABA_ARs）陽性変力薬（Gaboxadol）の投与によりGABA持続抑制を増強することでASの運動機能障害が改善することを示した³⁾。これらの結果は、GABA持続抑制がASの治療戦略確立のターゲットとなりうることを示唆している。

近年、GABA持続抑制は小脳顆粒細胞以外にも、多様な神経細胞に存在し、てんかん、認知機能障害など様々な中枢神経症状に関与することが示されている⁴⁾。ASにおいては、小脳をのぞく他の脳領域でどのようなGABA持続抑制の変化があるのか、それがどのように症状に関与しているのかは明らかにされていない。一方で、GABA持続抑制の制御機構も、脳領域ごとに異なることが知られている。例えば、GAT1は、視床などの基底核や視床下部ではほとんど存在

せず、GAT3がGABAの再取り込みをになうとされている⁵⁾。また、シナプス外GABA受容体を構成するサブユニットの発現も領域によって異なり、視床・小脳では δ サブユニットが多く発現しているのに対し、海馬・皮質では $\alpha 5$ が優位であり、 δ サブユニットは発現していない⁶⁾。これらの知見は、ASにおけるGABA持続抑制機能不全の程度や、薬理的介入の効果が脳領域毎に異なる可能性を示唆している。本研究では、脳領域間でのGABA持続抑制の不均等性が正常な神経ネットワークを障害し、ASのてんかん・認知機能障害の原因となっているのではないかと、この仮説をたて、ASマウスのGABA持続抑制を皮質、海馬、視床興奮性神経細胞に分けて評価し、 $\alpha 5$ -GABA_ARs、 δ -GABA_ARsそれぞれの選択的な陽性変力薬 (MP-III-022, Gaboxadol⁴⁾) のてんかん・脳波異常などに対する効果を検証した。

【方法】

対象：雌性父由来*Ube3a*変異マウスと雄性野生型マウスの掛け合わせで得られる、雄性母由来*Ube3a*変異マウス (ASマウス) および同腹の雄性野生型マウス (WTマウス) を対象とした。ASマウスは運動失調、認知機能障害、脳波異常など、アンジェルマン症候群患者の臨床症状を反映するphenotypeを呈することが示されている⁷⁾。バックグラウンドはC57/BL6であり、繁殖にもちいた野生型マウスは日本クレア社から購入し、父由来*Ube3a*変異マウスは浜松医科大学神経生理学講座から好意により譲受した。遺伝子型判定は尻尾よりDNAを抽出しPCR法にて判定した。すべての実験は北海道大学が定める動物実験倫理のガイドラインに則り承認を得て行われた (承認番号16-0048)。

GABA持続抑制評価：日齢18~28のマウスよりビブラトームを用いて厚さ350 μ mの脳急性スライスを作成し、人工脳脊髄液灌流下 (ACSF) に神経細胞より全細胞電位クランプパッチクランプ法を適応し電流を記録した。ACSFにはAMPA受容体、NMDA受容体、GABA_B受容体、電位依存性Naチャンネル、それぞれの阻害剤を

付加し、GABA_A受容体作動性電流のみが記録される条件で前記録を行った。その後GABA_A受容体阻害剤を追加した際の電流シフトを、GABA持続抑制として評価した。

ビデオ脳波記録：1%イソフルラン吸入麻酔下に、左右皮質V1エリア、小脳、前頭葉にスクリー式硬膜下電極を埋め込み歯科用ボンドにて固定した。1週間後、皮質V1エリア留置電極を記録電極、同小脳を基準電極、前頭葉をグランドとして脳波記録をおこなった。信号は生体アンプにて増幅後、Biopack社MP160システムを用いて記録した (サンプリング周波数は2000Hz、帯域通過フィルター 0.5-100 Hz)。覚醒時脳波記録を10分間行い、ノイズ混入のない9秒間の脳波エポックについて、Power spectrum densityをMatlab (MathWorks社) のオープンソースプラグイン、EEGLABおよびDarbeliaiを用いて解析した。周波数毎 (2-20Hz, bin 0.5Hz) のpowerをspectral density curveの積分値にて定量化し、記録毎に8エポックを解析しその平均値をもとめた。

Flurothyl吸入誘発けいれん⁸⁾：マウスを気密性アクリルシリンダー (径15cm, 高さ25cm, 容積3l) 内におき、ビデオモニター下に自由活動させた。揮発性GABA受容体アンタゴニスト10% Flurothyl (エタノールに溶解) を、高さ18cmの位置に設置したガーゼに200 μ l/分で持続注入すると、マウスは揮発したガスを吸入しけいれんに至ることが示されている。頸部あるいは四肢のミオクロヌス (ミオクロニー発作)、およびそれに引き続き体幹を5秒以上強直させる発作 (姿勢強直発作) に至る時間を測定・検討した。傷害性ガスの誤吸入事故を防ぐため、実験は安全キャビネット内でおこなった。

自発探索運動量、不安様行動評価：40cm四方のアクリルボックス内を30分自由探索させ、ビデオトラッキングソフトウェア (Anymaze) をもちいて、その移動距離を運動量として評価した。中心部 (20cm四方) を移動した距離を

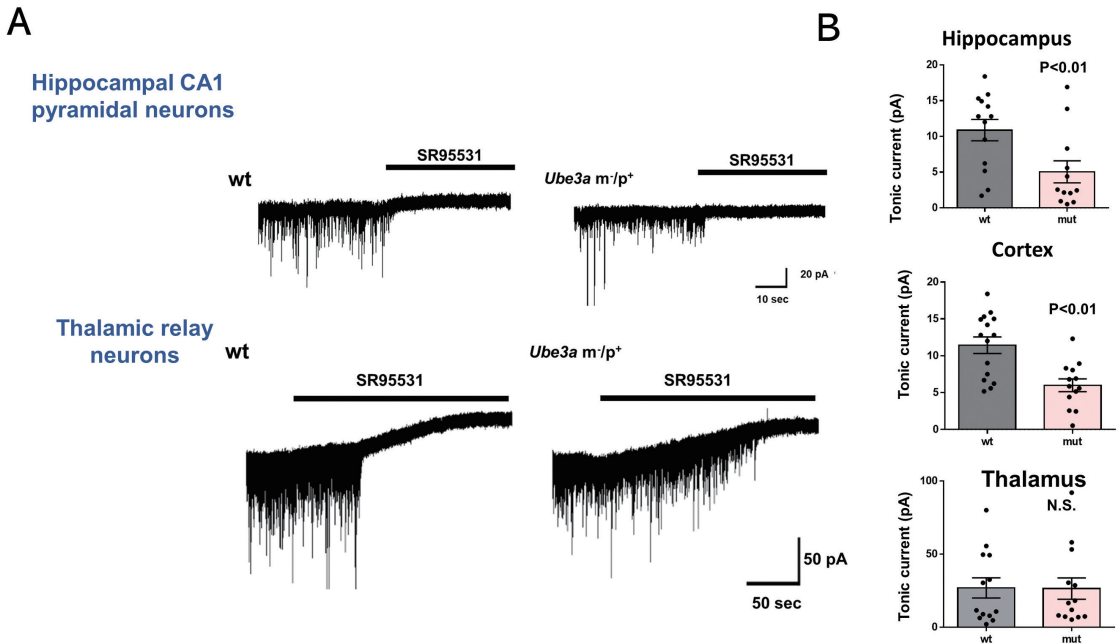


Fig. 1 脳領域毎のGABA持続抑制評価

A) 海馬錐体細胞（上段），視床皮質投射ニューロン（下段）のGABA持続電流代表トレース（左パネル：コントロール，右パネル：AS）。SR95531（GABA_A受容体アンタゴニスト）投与によるベースラインからの電流変化量をGABA持続抑制として評価した。B) 海馬錐体細胞（上段），皮質錐体細胞（中段），視床皮質投射ニューロン（下段）のGABA持続抑制比較。海馬・皮質ではASでGABA持続抑制が有意に低いのに対し，視床では有意な差を認めない。

全体の距離で除した値を（center/total ratio）を不安様行動の指標とし，比較検討した。

薬物投与：MP-III-022（ $\alpha 5$ -GABA_ARs選択的陽性変力薬，ウィスコンシン・ミルウォーキー大学薬学部Cook教授より譲受），Gaboxadol（ δ -GABA_ARs選択的陽性変力薬）をマウスに腹腔内投与し，30分後に行動実験を行うことで，それぞれの薬理作用を評価した。

統計解析：GABA持続抑制の比較には対応のないStudent t testを，脳波パワーの薬剤投与前後変化の評価にはOne-way repeated measure ANOVAを，けいれん閾値，抗不安作用に対する薬剤の効果はTwo-way ANOVAをそれぞれ用いて解析した。統計解析にはGraphpad 6.0を用いた。

【結果】

1. ASマウスにおけるGABA持続抑制機能障害の海馬・皮質/視床間不均等性

生後3週齢のASマウスの皮質・海馬・視床興奮性ニューロンにおいてGABA持続抑制を評価した。皮質・海馬の錐体細胞では，先行研究における小脳顆粒細胞の結果と同様に³⁾，ASマウスにおいてGABA持続抑制が有意に減少していた。一方，視床皮質投射ニューロンでは減弱がみられなかった（Fig. 1A, B）。これらの結果は，ASマウスにおいて，GABA持続抑制の減弱は一様ではなく，皮質・海馬および視床の間で不均等があることを示唆している。

2. GABA持続抑制機能障害の脳領域間不均等性がASマウスにおける脳波異常，てんかんの原因となる。

海馬・皮質錐体細胞のシナプス外GABA受容

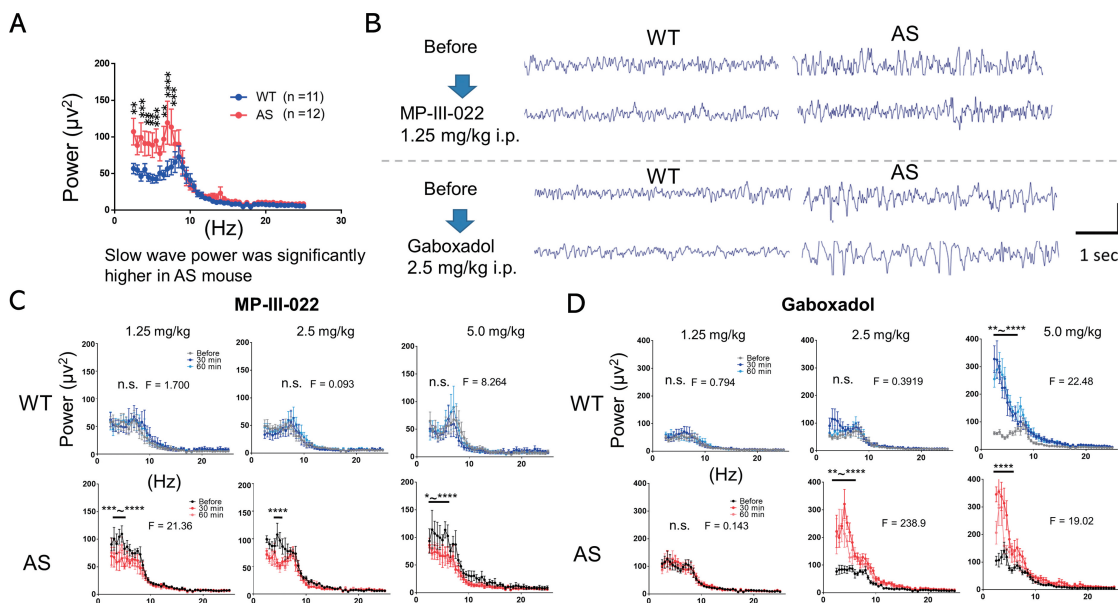


Fig. 2 ASマウスにおける脳波異常とGABA持続抑制増強剤の効果

A) 野生型マウスおよびASマウスの脳波周波数解析による各周波数帯のパワー比較。ASマウスは徐波成分のパワーが有意に高い。B) 野生型マウスおよびASマウスのGABA持続抑制増強剤投与（上段：MP-III-022，下段：Gaboxadol）前後の代表的脳波トレース。C, D) 野生型マウス（上段），ASマウス（下段）のMP-III-022（C），Gaboxadol（D）投与前後による脳波パワーの濃度依存的変化。MP-III-022は低用量でASマウスにおける増大徐波パワーを改善するが，Gaboxadol投与では徐波成分のパワーが逆に増大する。

体は $\alpha 5$ サブユニットを，視床皮質投射ニューロンのシナプス外GABA受容体には δ サブユニットを多く含むため，それぞれの選択的陽性変力薬MP-III-022およびGaboxadolは，ASにおけるGABA持続抑制機能障害の海馬・皮質/視床間不均等性を，前者は改善，後者は増悪させると考えられる。GABA持続抑制機能障害の海馬・皮質/視床間不均等性の影響を調査するため，これらの薬剤を生後6～12か月齢のASマウスに急性投与し，脳波・てんかん閾値を評価した。

先行研究のとおり⁹⁾，ASマウスの覚醒時脳波は野生型（WT）に比して徐波成分のパワーが有意に大きいことが確認された（Fig. 2A）。この結果はアンジェルマン症候群患者の脳波に特徴的とされる，全般性高振幅徐波を反映すると考えられる。MP-III-022腹腔内投与によって，ASにおける徐波成分のパワーは有意に減少したのに対し，WTでは明らかな変化をもとめな

かった（Fig. 2B, C）。一方，Gaboxadolの投与では，ASマウス，WTマウスとも濃度依存的に脳波の徐波パワーは増大し，ASマウスにおいてはWTマウスに比してより低用量のGaboxadolで変化が観察された（Fig. 2B, D）。

次に，けいれん発作閾値の変化を検討した。GABA_A受容体アンタゴニストであるFlurothylを持続吸入させ，ミオクロニー発作，それに引き続く姿勢発作様強直発作に至るまでの時間を計測し，けいれん発作閾値の比較検討を試みた。我々の先行研究では，生後6～12か月齢においてはASマウスの発作誘発閾値がWTに対し有意に低いことを報告した（Fig. 3A⁸⁾）。この結果は，成人期以降においてAS患者のてんかん発作頻度が増加する，との臨床知見を反映すると考えられる。MP-III-022の投与量とジェノタイプにおける発作閾値変化には有意な交互作用があり（ミオクロニス発作：F=4.601, P=0.0016，姿勢強直発作，F=7.623, P<

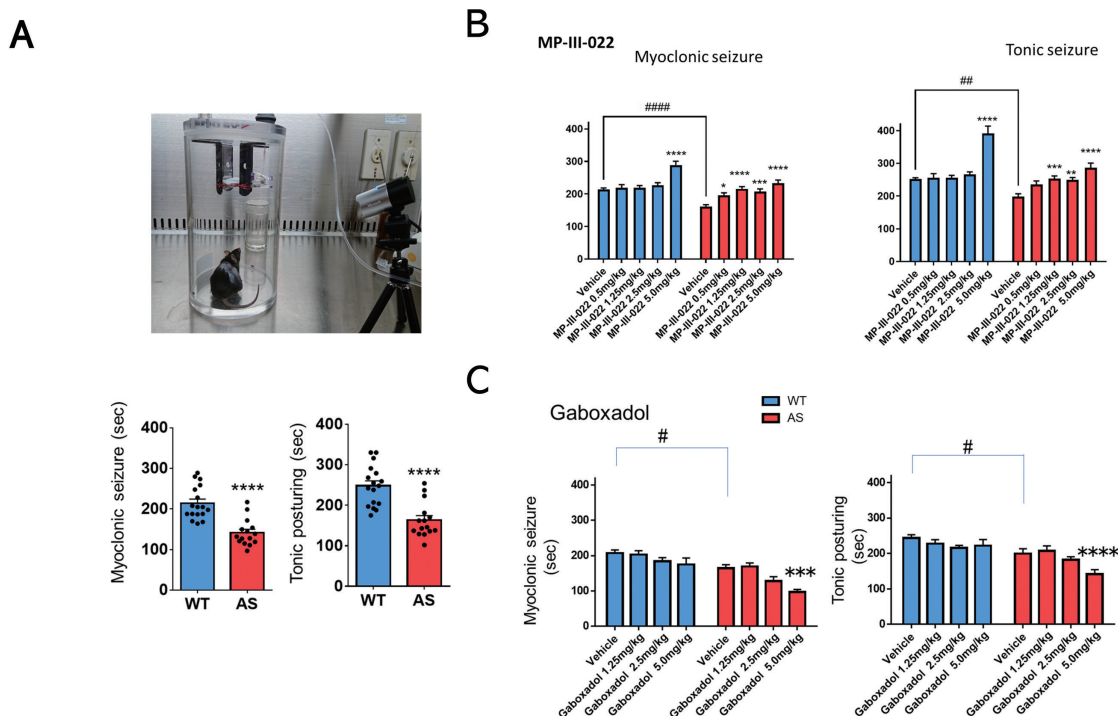


Fig. 3 ASマウスにおけるけいれん発作閾値とGABA持続抑制増強剤の効果

A) Flurothyl吸入誘発けいれんの実験セットアップ (上段) およびけいれん閾値の比較 (下段)。ASマウスではけいれんに至る潜時が有意に短い。B, C) MP-III-022 (B), Gaboxadol (C) 投与による発作閾値の濃度依存的変化。MP-III-022は低用量でASマウスにおける発作閾値を上昇させるが、Gaboxadol投与では逆に低下する。

0.0001), ASにおいてより低用量で発作閾値の上昇をみとめた (Fig. 3B)。一方Gaboxadol投与では、投与量とジェノタイプに有意な交互作用はみとめなかったが、AS群において高容量投与時に発作閾値は逆に減少した (Fig. 3C)。

3. GABA持続抑制機能障害の脳領域間不均等性がASマウスにおける不安様行動の原因となる。

ASマウスの自発探索行動を評価すると、全運動量はWTに比べ有意に低く、中心部を探索する割合は有意に低かった (Fig. 4A)。前者はASの運動機能障害を、後者は不安様神経障害を反映すると考えられる。MP-III-022の投与とジェノタイプにおける不安様行動の変化には有意な交互作用があり ($F=9.421$, $P=0.0021$), 低用量のMP-III-022でASの不安様神経活動は有意に改善したのに対し、WTでは高容量で悪

化した (Fig. 4B)。一方、GaboxadolではASマウスの不安様神経活動は有意な変化がなかった (Fig. 4C)。

【考察】

シナプス外に発現するGABA受容体は特殊なサブユニットアセンブリを有し、シナプス外に一定濃度存在するGABAによって持続的な活性をうける。そのようなGABA持続抑制は、短絡効果によって神経細胞の興奮性を抑制し、シナプス性抑制に比べより長い時間スケールで神経活動を制御すると考えられている¹⁰⁾。また、発達期においてはシナプス可塑性を制御するなど多岐にわたる機能が提言されており、その生理学的意義はまだ不明な点が多い。さらに、近年多くの神経疾患モデルマウスでGABA持続抑制の異常が示されており、治療戦略の対象として注目をあつめているが、その病的意義も未解

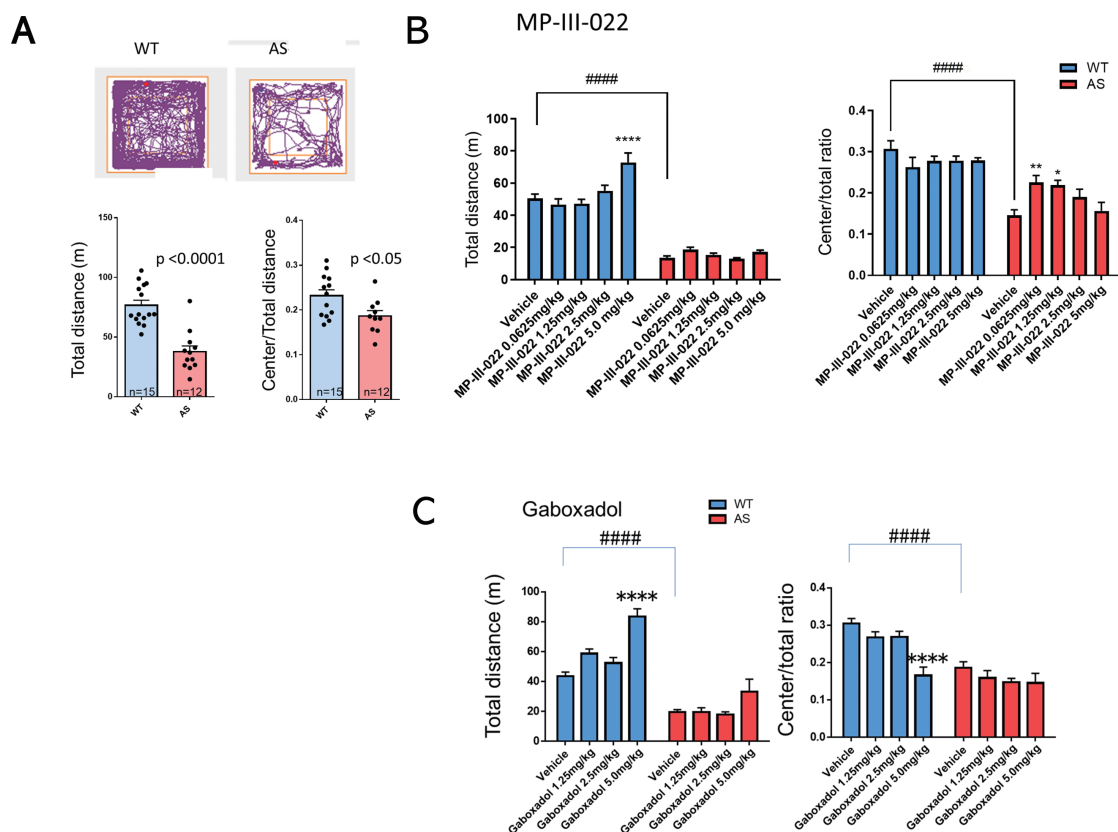


Fig. 4 ASマウスにおける不安様行動とGABA持続抑制増強剤の効果

A) 代表的な野生型（左）およびASマウス（右）の自発探索行動トレースと全運動量（下段左）、中心部探索比率（下段右）の比較。ASマウスは全運動量、中心部探索比率とも有意に低い。B, C) MP-III-022 (B), Gaboxadol (C) 投与による中心探索比率の濃度依存的変化。MP-III-022は低用量でASマウスにおける中心部探索を上昇させるが、Gaboxadol投与では有意な変化をみとめない。

明な点が多い⁴⁾。

本研究では、ASのGABA持続抑制が皮質/海馬では減弱しているものの、視床では維持されていることを明らかにした。GABA持続抑制の制御は脳領域によって異なることが知られており、たとえばシナプス外GABAの量を規定するGATについて、視床ではGAT1がほとんど発現しておらず、多くがGAT3であることが過去示されている⁵⁾。我々は先行研究で、ASにおけるGABA持続抑制の減弱はGAT1の発現過剰によるGABA再取り込みの亢進ことが示しており³⁾、今回のASにおけるGABA持続抑制減弱の脳領域間不均等も、GAT1発現の不均等性で説明されると考察される。

我々が今回もちいた薬剤、MP-III-022、

GaboxadolはいずれもGABA持続抑制を増強させる薬剤である。しかしながら、その脳波異常、けいれん閾値低下、抗不安様神経活動に対する効果はいずれも真逆となる結果となった。MP-III-022は皮質/海馬に選択的に発現する $\alpha 5$ サブユニットを含むシナプス外受容体を、Gaboxadolは視床に強く発現する δ サブユニットを含むシナプス外受容体を、それぞれ活性化させるため、前者は脳領域間のGABA持続抑制の不均衡を改善し、後者は増大させる。したがって、MP-III-022によるこれらの症状の改善、Gaboxadolによる増悪は、脳領域間のGABA持続抑制不均衡そのものがASのこれらの病態生理に重要であることを強く示唆している (Fig. 5)。欠神てんかんの原因が視床皮質投射ニュー

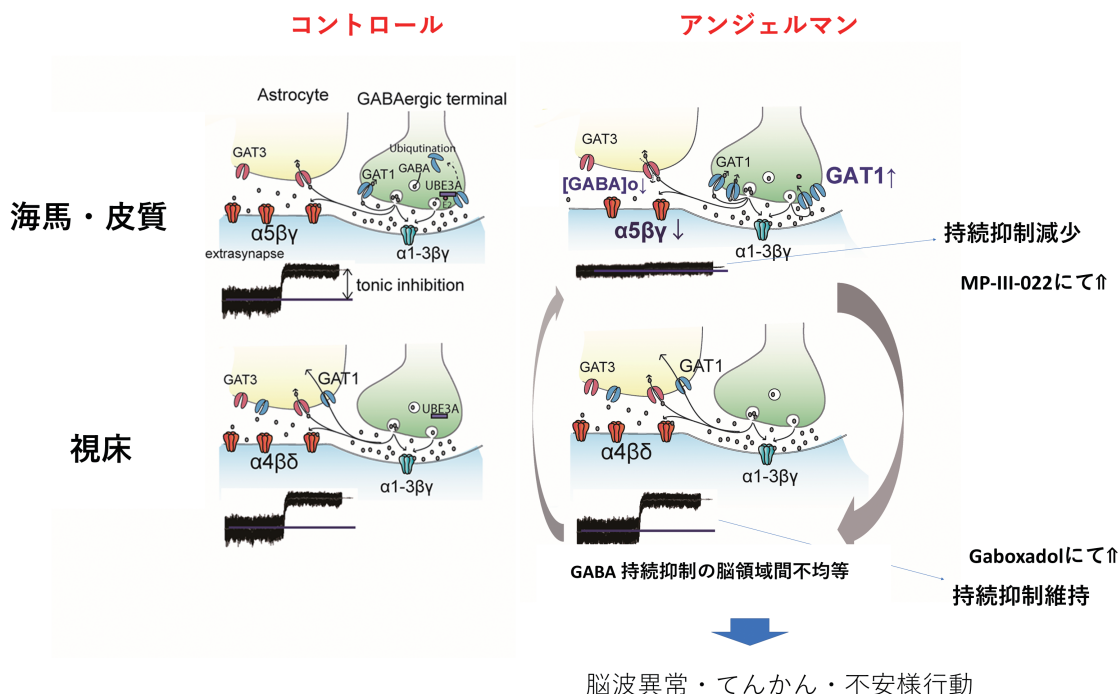


Fig. 5 本研究のまとめとGABA持続抑制不均等仮説のシエーマ

皮質・海馬ではGAT1が神経細胞に発現しており、ASマウスでは発現亢進によりシナプス外GABA濃度が減少し、GABA持続抑制が減少する。一方、視床では神経細胞にGAT1が発現しておらず、視床皮質投射ニューロンのGABA持続抑制は保たれている。MP-III-022はこの脳領域間不均等を是正し、Gaboxadolは増大する。前者はASマウスの異常phenotypeを改善し、後者は増悪させたことから、この脳領域間GABA持続抑制不均等そのものがその原因となっていると考えられる。

ロンのGABA持続抑制の増大であることを示した過去の研究も¹¹⁾、本考察を支持している。

本研究から $\alpha 5$ -GABA_ARs選択的陽性変力薬がASの治療に有望であることが示された。本研究でもちいたものとは別の $\alpha 5$ -GABA_ARs選択的陽性変力薬は現在米国で自閉症の治療薬として開発が続けられている。ASも自閉症スペクトラムを呈することから、今回示したGABA持続抑制の不均衡はASのみならず他の発達障害性疾患に共通した病態生理である可能性が考えられる。今後他の疾患モデルでも検討を続けていく予定である。

【文献】

- 1) Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. Ube3a/e6-ap mutations cause angelman syndrome. *Nat Genet.* 1997 ; 15 : 70-73.
- 2) Saitoh S, Harada N, Jinno Y, Hashimoto K, Imaizumi K, Kuroki Y, et al. Molecular and clinical study of 61 angelman syndrome patients. *Am J Med Genet.* 1994 ; 52 : 158-163.
- 3) Egawa K, Kitagawa K, Inoue K, Takayama M, Takayama C, Saitoh S, et al. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of angelman syndrome. *Sci Transl Med.* 2012 ; 4 : 163ra157.
- 4) Egawa K, Fukuda A. Pathophysiological power of improper tonic gaba (a) conductances in mature and immature models. *Front Neural Circuits.* 2013 ; 7 : 170.
- 5) Vitellaro-Zuccarello L, Calvaresi N, De Biasi S. Expression of gaba transporters, gat-1 and gat-3, in the cerebral cortex and thalamus of the rat during postnatal development. *Cell Tissue Res.* 2003 ; 313 : 245-257.
- 6) Zheng P. Neuroactive steroid regulation of

- neurotransmitter release in the cns : Action, mechanism and possible significance. *Prog Neurobiol.* 2009 ; **89** : 134-152.
- 7) Miura K, Kishino T, Li E, Webber H, Dikkes P, Holmes GL, et al. Neurobehavioral and electroencephalographic abnormalities in ube3a maternal-deficient mice. *Neurobiol Dis.* 2002 ; **9** : 149-159.
- 8) Egawa K, Nakakubo S, Kimura S, Goto T, Manabe A, Shiraishi H. Flurothyl-induced seizure paradigm revealed higher seizure susceptibility in middle-aged angelman syndrome mouse model. *Brain Dev.* 2021 ; **43** : 515-520.
- 9) Judson MC, Wallace ML, Sidorov MS, Burette AC, Gu B, van Woerden GM, et al. Gabaergic neuron-specific loss of ube3a causes angelman syndrome-like eeg abnormalities and enhances seizure susceptibility. *Neuron.* 2016 ; **90** : 56-69.
- 10) Mody I, Pearce RA. Diversity of inhibitory neurotransmission through gabaa receptors. *Trends in Neurosciences.* 2004 ; **27** : 569-575.
- 11) Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orbán G, Errington AC, Lorincz ML, et al. Enhanced tonic gabaa inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med.* 2009 ; **15** : 1392-1398.