

—— 研究助成報告 ——

ニューロンおよびアストロサイトの Cl⁻ホメオダイナミクス破綻によるてんかん原性

石 橋 賢, Nguyen Trong Dao, 渡 部 美 穂, Adya Saran Sinha,
Ruksana Yesmin, 福 田 敦 夫

要旨：過剰なGABA入力によるシナプス後細胞内のクロライドイオン蓄積が抑制性GABA作用の興奮性への転換ならびに過剰興奮性を引き起こし、てんかん発作波様活動の誘発をもたらすことが知られている。今回、シナプス間隙内のクロライドイオン緩衝作用を持つと考えられるアストロサイトがてんかん発作波様活動の誘発に関与するかを検討した。実験では、アストロサイト内のクロライドイオンの低下をもたらすと考えられるアストロサイト選択的NKCC1欠損マウス(astroNKCC1-KOマウス)を用いた。astroNKCC1-KOマウスでは、海馬スライスにおいてテタヌス刺激誘発性のてんかん発作波様活動の増大、さらにin vivoではピロカルピン誘発性てんかん発作の憎悪が認められた。このことからアストロサイトによるシナプス間隙内の局所的クロライドイオン濃度緩衝作用がてんかん発作発現に影響を及ぼす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 2023 ; 34 : 15-20

Key Words : アストロサイト, 三者間シナプス, クロライドホメオスタシス,
シナプス間隙, NKCC1

【序論】

中枢神経系のシナプスを介した信号伝達は、主に興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と抑制性神経伝達物質であるGABAの2種類の神経伝達物質によって成り立っている。これらグルタミン酸とGABAによる興奮-抑制バランスの崩壊と過剰興奮がてんかん原性につながると考えられている。グルタミン酸受容体はNa⁺の流入により膜電位を脱分極させ、活動電位を発火(興奮)させる。一方、GABAはCl⁻チャネルを開口させ、一般的に成熟脳ではシナプス後細胞をCl⁻流入による過分極により抑制する。しかし、その作用は細胞内外のCl⁻濃度差に依存する。細胞内外のCl⁻濃度差はCl⁻トランスポーター(KCC2=排出, NKCC1=取込)により制御されることで、このGABA作用の抑制/

興奮の切り替えが行われる。これをCl⁻ホメオダイナミクスと呼ぶ。このCl⁻ホメオダイナミクスが神経回路の発達・可塑性や生理機能あるいは病態に深く関与することが示唆されている。

Cl⁻ホメオダイナミクスでは、細胞内Cl⁻濃度([Cl⁻]_i)の上昇または細胞外Cl⁻濃度([Cl⁻]_o)の低下がGABA_A受容体のCl⁻透過の方向を逆転させ、GABA作用の抑制から興奮への逆転を起こすと考えられる。実際、シナプス入力路を高頻度(テタヌス)刺激すると、大きなテタヌス後脱分極に続いて発作波様後発射が記録され、この間、[Cl⁻]_i上昇が持続しGABA反応は過分極性から脱分極性かつ興奮性に逆転することが報告されている¹⁾。すなわち、テタヌス刺激でバスケット細胞から放出されたGABAによる錐体細胞のGABA_A受容体の過剰刺激が起こり、過剰なCl⁻流入による[Cl⁻]_i上昇とシナ

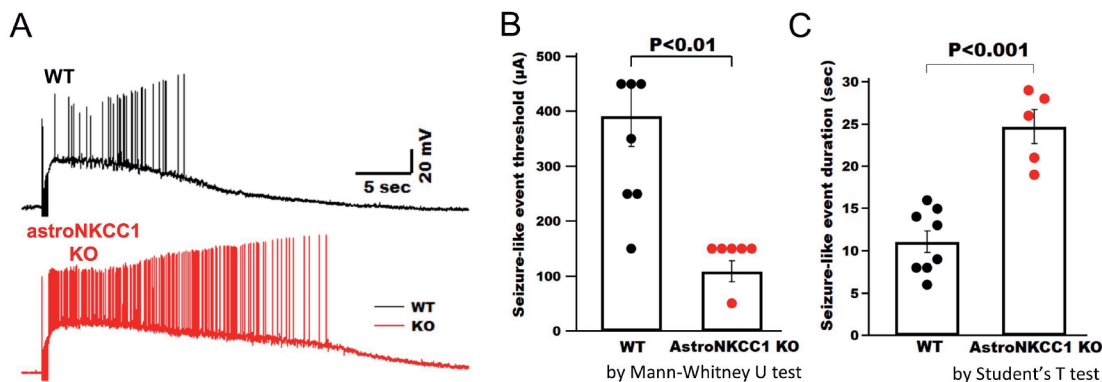


Fig. 1 astroNKCC1-KO マウスにおいて発作波様活動が増大する

A) 450 μ A テタヌス刺激において誘発される発作波様後発射の代表トレース (上段: WT マウス, 下段: astroNKCC1-KO マウス)。B) 発作波様後発射を誘発するために必要となる刺激閾値は astroNKCC1-KO マウスで有意に低い。C) テタヌス刺激後脱分極は astroNKCC1-KO マウスで有意に大きい。

プス間隙 $[Cl^-]_o$ 低下のため GABA 作用が興奮性に逆転し、発作波様後発射の引き金となると考えられる。

一方で、神経細胞間のシナプスにアストロサイトも加えた tripartite synapse (三者間シナプス) という概念もシナプス伝達恒常性に及ぼす影響において重要と考えられている^{2,3,4)}。アストロサイトはシナプスを緻密に被覆し神経伝達に影響するが、そのひとつとして、ギャップジャンクションを介する細胞外イオンの濃度の調整がある。上で述べたシナプス間隙での急激な $[Cl^-]_o$ 低下に関しても、GABA 細胞の連続発火にตอบสนองして、近傍のアストロサイトがシナプス間隙から漏れ出した GABA にตอบสนองし、GABA_A 受容体を介してシナプス間隙に Cl^- を補填することでアストロサイトが抑制性シナプス伝達恒常性を維持する機能を果たしていると考えられる。従って、このアストロサイトによるシナプス間隙 $[Cl^-]_o$ の緩衝効果が過剰神経活動時のシナプス後神経細胞の Cl^- 電気化学勾配破綻による興奮への逆転を防ぎ、抗てんかん機能を有する可能性を検討する必要がある。本研究では、アストロサイト選択的 NKCC1 欠損によりアストロサイトによるシナプス間隙 Cl^- 濃度の緩衝機能の低下を引き起こすことで、アストロサイトが GABA 作動性抑制性シナプス

伝達の手メオスタシスに果たす役割ならびにてんかん原性抵抗性における重要性を検討した。

【方法】

対象: アストロサイト選択的に Cre タンパク質を発現する Aldh1L1-Cre マウス (Jackson Lab, #023748) と NKCC1^{flx/flx} マウスの掛け合わせによりアストロサイト選択的 NKCC1 欠損マウス (astroNKCC1-KO マウス) を作成した。NKCC1^{flx/flx} マウスは、Friedrich-Schiller University の Prof. Christian A. Hübner から好意により提供された⁵⁾。実験には astroNKCC1-KO マウスおよび比較対象群として野生型 littermate control マウス (WT マウス) を用いた。すべての実験は、浜松医科大学が定める浜松医科大学動物実験規程に則り承認 (承認番号 2019007) を得て行われた。

パッチクランプ法による海馬 CA1 錐体細胞シナプスにおける発作波様後発射の評価: 3 週齢のマウスからビプラトームを用いて厚さ 250 μ m の急性海馬スライスを作製し、シャファー側枝のテタヌス刺激 (パルス幅 400 μ s を 100 Hz で 50 回) により誘発されるテタヌス刺激後脱分極および発作波様後発射活動を CA1 錐体細胞からホールセルパッチクランプにより記録した。発作波様後発射は、神経回路レベルで

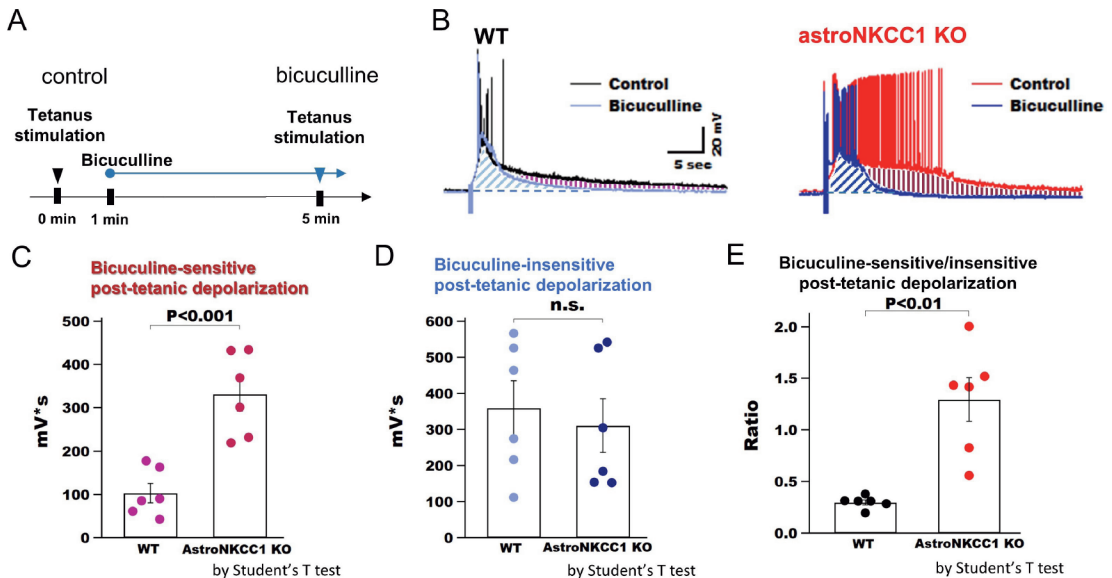


Fig. 2 astroNKCC1-KO マウスにおいて GABA_AR 依存性発作波様活動が増大する

A) 実験スキーム。B) Bicuculline 存在下において誘発される発作波様後発射の代表トレース (左パネル: WT マウス, 右パネル: astroNKCC1-KO マウス)。C) GABA_A 受容体依存性のテタヌ刺激誘発脱分極は astroNKCC1-KO マウスで有意に大きい。D) GABA_A 受容体非依存性のテタヌ刺激誘発脱分極は astroNKCC1-KO マウスと WT マウスで差はない。E) GABA_A 受容体依存性のテタヌ刺激誘発脱分極は astroNKCC1-KO マウスにおいて有意に増大している。

のてんかん発作の原型である神経細胞の超同期的活動であると考えられる。発作波様後発射を誘発するために必要となる刺激閾値 (テタヌ刺激強度: 50-450 μ A) ならびに、テタヌ刺激後脱分極の大きさ (面積: $\text{mV} \cdot \text{sec}$) と持続時間を計測し比較対象とした。

薬剤誘発性てんかん発作によるてんかん原性評価: 10-12 週齢のマウスにおいてピロカルピンの腹腔内投与 (100mg/kg, 20 分毎に 4 回) による急性重積発作を誘発し、発作発現からけいれん重積発作に至るまでの過程や易けいれん性を Racine scale により評価し比較検討した。末梢におけるピロカルピンの副次作用を抑制するためスコボラミン (1mg/kg) を初回ピロカルピン投与 30 分前に皮下注射により投与した。

【結果】

1. astroNKCC1-KO マウスにおける発作波様活動の増大

3 週齢の astroNKCC1-KO マウスから作製し

た海馬スライスにおいてシャッファー側枝のテタヌ刺激により誘発される発作波様活動を評価した。WT マウスに比べ astroNKCC1-KO マウスにおいてテタヌ刺激により CA1 錐体細胞で記録される脱分極 (テタヌ刺激後脱分極) が有意に大きく、一方で発作波様後発射の誘発に必要な最小テタヌ刺激強度が有意に小さかった (Fig. 1B)。さらに発作波様後発射の持続時間に有意な増大が確認された (Fig. 1C)。また、GABA_A 受容体阻害薬である bicuculline 存在下におけるテタヌ刺激誘発脱分極を比較したところ、GABA_A 受容体非依存性の脱分極 (bicuculline で阻害されない) に astroNKCC1-KO マウスと WT マウスの間で有意な差を認めなかったのに対して (Fig. 2D), GABA_A 受容体依存性の脱分極 (bicuculline で阻害される) は、astroNKCC1-KO マウスで有意に大きかった (Fig. 2C, E)。

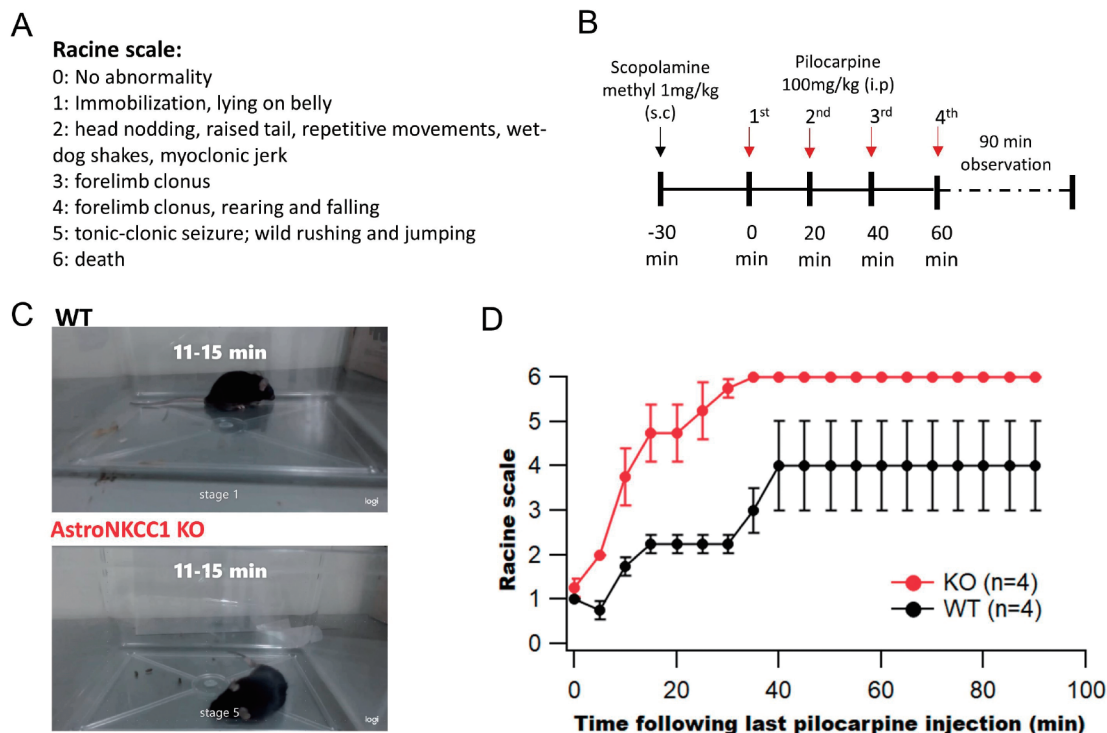


Fig. 3 astroNKCC1-KOマウスにおいてピロカルピン誘発性てんかん発作が増悪する

A) てんかん発作評価に用いたラシーンスケール。B) 実験スキーム。C) ピロカルピン誘発性てんかん発作の例 (上段: WTマウス, 下段: astroNKCC1-KOマウス)。D) astroNKCC1-KOマウスにおいてピロカルピン誘発性てんかん発作の有意な増悪を示す。

2. astroNKCC1-KOマウスにおけるピロカルピン誘発性てんかん発作の増悪

astroNKCC1-KOマウスにおけるピロカルピン誘発性てんかん発作の発作発現からけいれん重積発作に至るまでの過程や易けいれん性を評価すると、WTマウスに比べastroNKCC1-KOマウスにおいて、てんかん様発作の早期発現がみられた (Fig. 3)。さらに、astroNKCC1-KOマウスにおいてけいれん重積発作発症率ならびに致死率に有意な増加が確認された (Fig. 3C, D)。従って、astroNKCC1-KOマウスでは易けいれん性の増大が引き起こされていると考えられる。

【考察】

GABA作動性介在細胞は、正常な成熟脳において他の神経性細胞を抑制している。しか

し、astroNKCC1-KOマウスでは高頻度発射を伴うてんかん発作発現時には、アストロサイトによるシナプス間隙の Cl^- 濃度の緩衝機能低下が生じるため、シナプス間隙において急激な Cl^- 濃度低下が引き起こされ、抑制作用の大きな興奮作用への逆転がより早期に生じていると考えられる。本研究は、三者間シナプスにおけるニューロン-アストロサイト間での Cl^- ホメオスタシスが、てんかん原性において如何に重要であるか、さらに正常な状態では、アストロサイトがてんかん発作に対して発現抑制にはたらき保護作用を果たしている可能性を示唆する。てんかん発作に対する治療薬としてNKCC1阻害薬であるbumetanideがけいれん作用をもつことが示されたが⁶⁾、新生児発作を対象とした臨床試験ではbumetanideの効果が認められなかった⁷⁾。これに対して本研究結果は、アストロサイト選択的なNKCC1欠損に

よりてんかん発作の憎悪を示した。従って、神経細胞選択的NKCC1阻害により理想的な抗けいれん作用が得られると考えられる。しかし、今回の実験結果ではシナプス間隙におけるクロライドイオンの減少について直接的な証拠は未だ得られていない。従って、今後クロライドイメージングの導入により更なる検討を続ける予定である。

【文献】

- 1) Isomura Y, Sugimoto M, Fujiwara-Tsukamoto Y, Yamamoto-Muraki S, Yamada J, Fukuda A. Synaptically activated Cl⁻ accumulation responsible for depolarizing GABAergic responses in mature hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 2003 ; **90** : 2752-2756.
- 2) Ishibashi M, Egawa K, Fukuda A. Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *Int J Mol Sci.* 2019 ; **20** : 2964. doi : 10.3390/ijms20122964.
- 3) Semyanov A, Verkhratsky A. Astrocytic processes : from tripartite synapses to the active milieu. *Trends Neurosci.* 2021 ; **44** : 781-792.
- 4) Purnell BS, Alves M, Boison D. Astrocyte-neuron circuits in epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2023 ; **179** : 106058. doi : 10.1016/j.nbd. 2023. 106058.
- 5) Antoine MW, Hübner CA, Arezzo JC, and Hébert, JM. (2013). A causative link between inner ear defects and long-term striatal dysfunction. *Science* 2013 ; **341** : 1120–1123.
- 6) Dzhalal VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, et al. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med.* 2005 ; **11** : 1205-1213.
- 7) Soul JS, Ann M Bergin AM, Stopp C, Hayes B, Singh A, Fortuno CR, et al. A Pilot Randomized, Controlled, Double-Blind Trial of Bumetanide to Treat Neonatal Seizures. *Ann Neurol.* 2021 ; **89** : 327-340.

