

—— 研究助成報告 ——

細胞内クロライドホメオスタシスの破綻が てんかん発作を引き起こすメカニズムの解明

渡 部 美 穂, Adya Saran Sinha, 新 明 洋 平, 福 田 敦 夫

要旨：KCC2はCl⁻を細胞外にくみ出すトランスポーターで、細胞内Cl⁻濃度を低く保ちGABAによる抑制性伝達を維持している。KCC2の脱リン酸化状態を模倣しKCC2機能が亢進しているKCC2^{A/A}マウスを用いて、行動やてんかん発作への影響を調べた。KCC2^{A/A}マウスでは社会的新奇探索性や不安様行動の低下がみられた。ピロカルピン誘発性のてんかん発作を起こしやすく、けいれん重積を示すまでの時間が短くなっていた。自発脳波でγ波帯域の活動が減少しており、神経回路レベルでは神経細胞間で活動が同期しやすく、シナプスレベルでは神経回路の興奮抑制のバランスが崩れており、これらの変化がてんかん発作の感受性の変化に関与することが考えられた。よって、リン酸化による制御が正常に行われないことによるKCC2機能の異常が、細胞内Cl⁻ホメオスタシスを破綻させ、てんかん発作など脳機能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 2024；35：47-52

Key Words：GABA, クロライド, カリウム-クロライド共輸送体 (KCC2),
てんかん, リン酸化

【序論】

てんかんやさまざまな精神疾患では抑制性神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸 (GABA) が興奮性に作用し、神経回路の興奮性伝達と抑制性伝達のバランスが崩れることが発症の一因であることが明らかになってきている¹⁾。GABA作用が興奮性であるか抑制性であるかは細胞内クロライド濃度により決まるが、クロライドを細胞外にくみ出すトランスポーターであるK⁺-Cl⁻共輸送体 (KCC2) は細胞内クロライド濃度を低く保ち、GABAによる抑制性伝達を維持している。KCC2が正常に機能しないと、細胞内クロライド濃度が高くなり、GABA作用は興奮性に変化する。乳児焦点移動性部分発作という難治性てんかん患者遺伝子のエクソーム解析を行ったところ、KCC2遺伝子に両アレル変異が認められ、変異によるKCC2機能低下が発作の

発症に関わることをこれまでに報告している²⁾。また、KCC2機能はリン酸化による制御をうけており、KCC2の906番目 (Thr⁹⁰⁶) と1007番目 (Thr¹⁰⁰⁷) のスレオニン残基のリン酸化によりKCC2機能は低下し、リン酸状態を模倣した遺伝子改変マウス (KCC2^{E/E}マウス) は生後10時間前後で死亡し、しっぽをピンセットで軽くつまむ痛覚刺激や筆で背中をなでる接触刺激により、けいれん発作が認められ、死亡前には自発発作の頻度の増加がみられることを報告している³⁾。このようにKCC2が正常に機能しないことによる細胞内クロライドホメオスタシスの破綻とてんかん発症との関連が示唆されている。本研究ではKCC2の脱リン酸化状態を模倣したKCC2^{A/A}マウスを作製し、KCC2機能亢進によりGABAによる抑制力が強まることが行動やてんかん発作に及ぼす影響を調べ、その要因となる神経活動の変化を検討した。

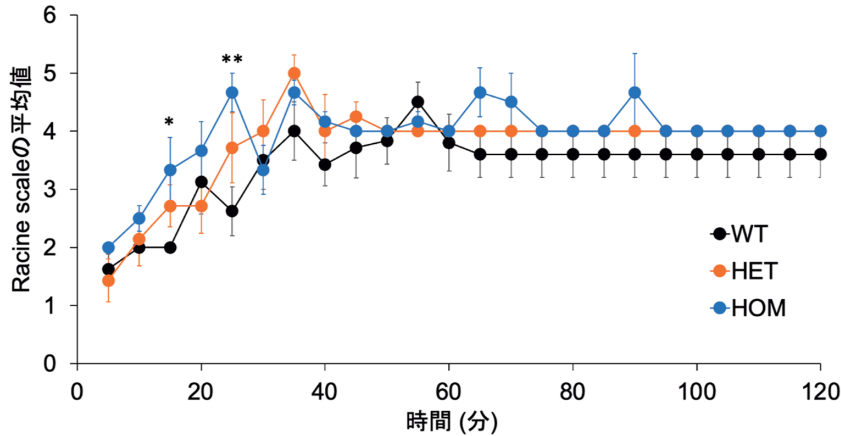


Fig. 1 てんかん発作の感受性の変化についての検討。ピロカルピン投与によりてんかん発作を誘発し、発作の強さをラシーンスケールにより評価した。WTマウスと比べて、HET、HOMマウスではピロカルピン投与後、高いラシーンスケールを示し、全体を通して、高い傾向が認められた(* $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ by Kruskal-Wallis test)。

【方法】

実験にはKCC2のThr⁹⁰⁶とThr¹⁰⁰⁷をアラニンに置換し、脱リン酸化状態を模倣したKCC2^{A/A}マウスと野生型マウスを用いた。KCC2^{A/A}マウスで不安様行動や社会的行動に変化がみられるか調べるために、高架式十字迷路試験、驚愕反応テスト、Three chambers社会性テストを行った。KCC2^{A/A}マウスで、てんかん発作の感受性に変化がみられるか調べるために、ムスカリン性アセチルコリン受容体のアゴニストであるピロカルピンの投与によりけいれん発作を誘発し、投与後120分間の発作の強さについて、ラシーンスケール(ステージ0:症状なし〜ステージ6:死亡の7段階)により評価した。ピロカルピン投与後、大脳皮質より脳波を測定し、けいれん重積を起こすまでの時間を記録した。さらに、KCC2^{A/A}マウスで行動やてんかん発作の感受性に変化がみられる要因となる神経活動の変化を検討した。神経回路レベルでの変化を調べるために、アデノ随伴ウイルスを用いてカルシウムセンサーであるGCaMP6fを大脳皮質の神経細胞に発現させ、二光子励起顕微鏡を用いてマウス脳のin vivoカルシウムイメージングを行い、神経細胞の活動の指標として自発的なカルシウムの上昇を記録した。さらに、電気

生理学的手法を用いて、脊髄の急性スライス標本を用いて、神経細胞にCl⁻を負荷し、KCC2^{A/A}マウスでCl⁻くみ出し能の変化を調べた。シナプスレベルでの変化を検討するために、マウスの脳の急性スライス標本作製し、大脳皮質感覚野の錐体細胞より、ホールセルパッチクランプ法により記録を行った。興奮性シナプスの変化を調べるために、自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)および微小興奮性シナプス後電流(mEPSC)の記録を行った。抑制シナプスでの変化を調べるために、自発性抑制性のシナプス後電流(sIPSC)および微小抑制性シナプス後電流(mIPSC)を記録した。

【結果】

電気生理学的な解析により、KCC2^{A/A}マウスではKCC2のCl⁻くみ出し能が亢進しており、GABAによる抑制力が強まっていることが確認できた。行動解析を行ったところ、KCC2^{A/A}ヘテロ(HET)、ホモ(HOM)マウスで、高架式十字迷路試験により、不安様行動の低下、Three chambers社会性テストにより、新しいマウスに興味を示さないという社会的新奇探索性の低下、驚愕反応テストにより、大きな音に対する驚愕反応の低下が認められた。ピロカルピン誘発性のけいれん発作を調べたところ、野生型マウスと比べて、

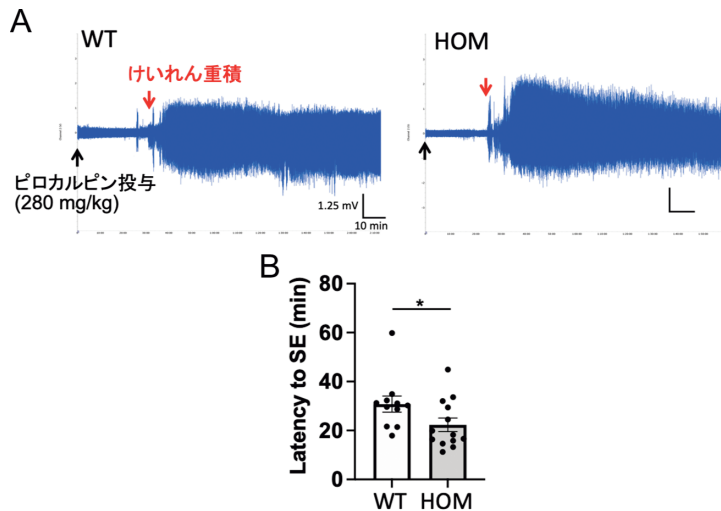


Fig. 2 ピロカルピン誘発性てんかん発作中の脳波の解析。ピロカルピン投与後、脳波の測定を行った。A) 大脳皮質より記録した脳波の波形。B) WTマウスと比較して、HOMマウスではけいれん重積を示すまでの時間が有意に短かった(* $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test)。

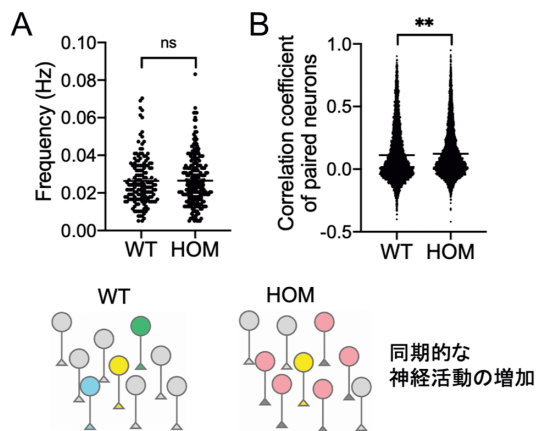


Fig. 3 神経細胞の活動の指標として、大脳皮質の神経細胞から自発的なカルシウムの上昇を記録した。A) WTマウスとHOMマウスで各神経細胞でのカルシウム上昇の頻度に差はみられなかった。B) WTマウスに比べて HOMマウスでは各神経細胞間の活動の相関性が増加していた(ns, not significant, ** $p < 0.01$ by Mann-Whitney U test)。

HET, HOMマウスではピロカルピン投与直後から高いラシンスケールを示し、全体を通して、高い傾向が認められ (Fig. 1), 脳波でもHOMマウスはピロカルピン投与後、けいれん重積を示すまでの時間が短くなっていった (Fig. 2A, B)。行動やてんかん発作の感受性に変化がみられたため、その変化を引き起こす要因となる神経活

動の変化を調べたところ、大脳皮質より自発脳波を測定した結果、HOMマウスでは45, 50, 80 Hzのパワースペクトル密度の減少といった γ 帯域の活動の減少が認められた。さらに、自発的なカルシウムの上昇を記録したところ、各神経細胞でのカルシウム上昇の頻度に差はみられなかったが (Fig. 3A), 各神経細胞間の活動の

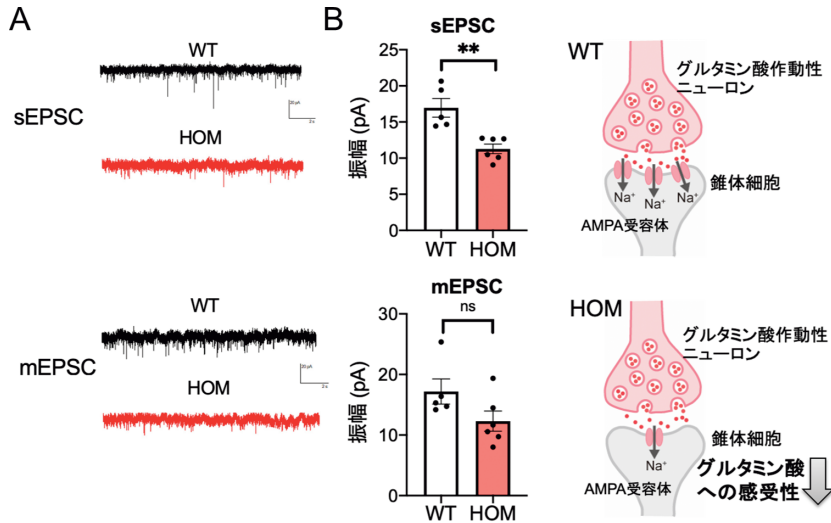


Fig. 4 大脳皮質感覚野錐体細胞より、sEPSCおよびmEPSCの記録を行った。A) sEPSCおよびmEPSCの波形。B) WTマウスと比較して、HOMマウスではsEPSCの振幅の有意な減少、mEPSCの振幅の減少傾向が認められた(ns, $**p < 0.01$ by unpaired t test)。

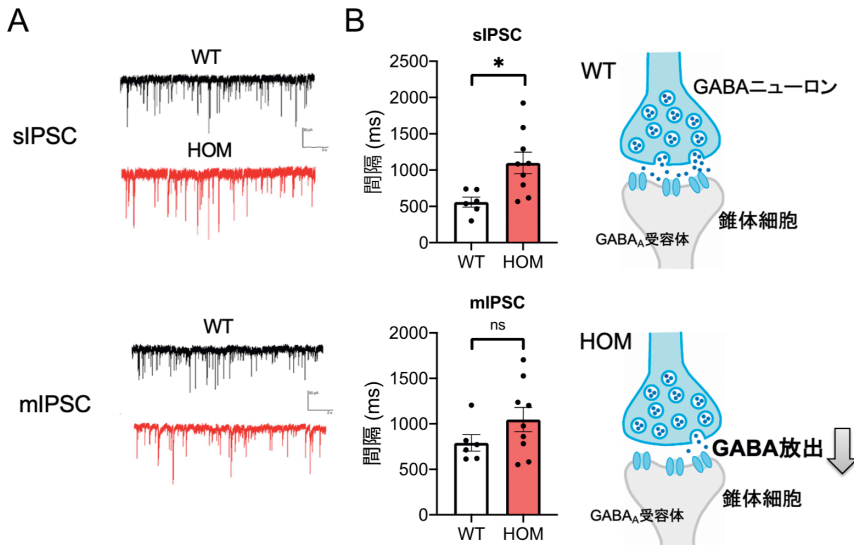


Fig. 5 大脳皮質感覚野錐体細胞より、sIPSCおよびmIPSCの記録を行った。A) sIPSCおよびmIPSCの波形。B) WTマウスと比較して、HOMマウスではsIPSCの間隔の有意な増加、mIPSCの頻度の増加傾向が認められた(ns, $**p < 0.01$ by unpaired t test)。

相関性を調べたところ、WTマウスに比べてHOMでは活動の相関性が増加しており (Fig. 3B)、神経細胞の活動が同期しやすいことがわ

かった。シナプスレベルの変化ではHOMマウスでsEPSCの振幅の有意な低下、mEPSCの振幅の低下傾向が認められ、このことは、錐体細

胞でのAMPA型グルタミン酸受容体発現低下によるグルタミン酸への感受性の低下を反映している (Fig. 4A, B)。また, sIPSCの間隔の有意な増加, mIPSCの間隔の増加傾向が認められた (Fig. 5A, B)。このことは, 錐体細胞に入力するGABAニューロンからの, GABA放出の減少を反映している。

【考察】

KCC2の機能が亢進し, GABAによる抑制力が強まることにより, 不安様行動の低下, 社会的新奇探索性の低下などの行動の変化がみられ, てんかん発作をおこしやすくなることが明らかになった。神経活動の変化を調べたところ, 自発脳波の γ 波帯域の活動が減少しており, 神経回路レベルでは神経細胞間で活動が同期しやすく, シナプスレベルでは神経回路の興奮抑制のバランスが崩れており, このような変化が行動やてんかん発作への感受性の変化に関与している可能性が考えられた。KCC2^{A/A}マウスではKCC2機能が亢進していることから, てんかん発作が起こりにくいことを想定していたが, 起こりにくくなるということはなく, むしろ起こしやすくなっていた。これは, KCC2はCl⁻と共にK⁺を細胞外にくみ出していることから, KCC2機能の亢進により細胞外のK⁺濃度が高まることにより, 神経細胞が興奮しやすくなり, てんかん発作の感受性が高まっている可能性が考えられた。以上の結果より, KCC2のリン酸化が適切に制御されることが, 正常な神経機能に重要であり, リン酸化による制御が正常に行われないことによるKCC2機能の異常が, 細胞内クロライドホメオスタシスを破綻させ, てんかん発作など脳機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。KCC2のThr⁹⁰⁶とThr¹⁰⁰⁷をリン酸化するリン酸化酵素やリン酸化部位をターゲットとした新薬の開発など治療への応用が期待できる。

【文献】

- 1) Fukuda A and Watanabe M : Pathogenic potential of human SLC12A5 variants causing KCC2 dysfunction. *Brain Research* 2019 ; 1710 : 1-7.
- 2) Saitsu H[#], Watanabe M[#], Akita T[#] ([#]contributed equally), Ohba C, Sugai K, Ong WP, et al. Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. *Scientific Reports* 2016 ; 6 : 30072.
- 3) Watanabe M, Zhang J, Mansuri MS, Duan J, Karimy JK, Delpire E, et al. Developmentally regulated KCC2 phosphorylation is essential for dynamic GABA-mediated inhibition and survival. *Science Signaling* 2019 ; 12(603) : eaaw9315.

