

薬学博士（論文）2000年9月

てんかんけいれんに伴う Bursting activity とけいれん関連遺伝子に関する研究

金 文

高頻度で発症するてんかんの治療は、phenytoin, barbiturate, valproate などの抗けいれん薬で発作を抑えるのみで根本的な治療法は確立されていない。その理由は、てんかん発作の原因や発症メカニズムが未だに解明されていないためである。てんかんは国際分類によれば、全般発作をもつ全般てんかんと、部分あるいは焦点をもつ焦点てんかんとに二分され、それぞれがさらに、なんらかの器質的脳病変（胎生期・周産期障害、頭蓋内感染症、頭部外傷など）から二次的にてんかん原焦点が形成されて発症する続発性てんかんと原因が明らかでなく、年齢に関連して発症する特発性てんかんに分類されている。特発性てんかんは、特に遺伝子と環境の相互作用が示唆され、分子生物学的手段により、てんかん原因遺伝子の染色体 locus の決定がかなり進行しているものもある。一方、神経細胞レベルでけいれん波を考えると、単に“神経細胞の過剰な興奮”という概念では考えにくい。脳波でけいれん波が大脳皮質に発生している時には、bursting activity(BA) とか paroxysmal depolarization shift(PDS)と称する特有で、異常な膜電位変化が例外なく起こっている。すなわち正常の発火が単に多くなるというのではなく、特有な異常な発火状態を伴う細胞内の病的変化が作りだされていると考えられる。神経細胞でのけいれん発現機構についてみると、ネコに pentylenetetrazol (PTZ) のようなけいれん剤を投与すると確実にけいれんを誘発させることができ、大脳皮質のけいれん波と同時に皮質の神経細胞では BA が記録される。このような PTZ による BA は軟体動物の神経細胞でも、また温血動物の大脳皮質初代培養神経細胞でも誘発させることができる。ラットで PTZ 投与時に誘発される EEG 変化が、てんかん患者の EEG 変化に類似しているという報告もあり、てんかんけいれんの基礎的研究に PTZ で誘発されるけいれんの mechanism を追及することは意義があると考えられる。

Sugaya らは、単一神経細胞での BA 発現機構について、BA 時には細胞内器官に貯蔵されているカルシウムが放出され、細胞膜の内側に移動する。細胞内のタンパク質の質的・量的変化が起こり、遊離したカルシウムは 5k dalton と 15k dalton のタンパク質にとりこまれることを明らかにしている。このような一連のカルシウム関連の病的変化の後に、神経細胞膜にあるいずれかのイオンチャンネルに変化が現れて BA という電気的变化が起こると結論できる。また PTZ によるタンパク質を主とする細胞内諸変化には、おそらくこの発現に関わる遺伝子が存在すると考えられる。PTZ により増加または減少する遺伝子群もすでに Sugaya, Kajiwara らにより発見され、SEZ group genes と命名された。

このような研究背景のもとに本研究では、まずマウス大脳皮質初代培養神経細胞を材料として patch clamp 法により実験を行った。細胞内カルシウムが BA 発現と密接な関係があることから、カルシウム依存性 channel に着目して、Ca²⁺-activated K⁺ channel と BA 発現の関係を明らかにするこ

とを試みた。次いで、臨床的にてんかんに用いられ、PTZ による BA 誘発過程での一連のカルシウム関連細胞内諸変化に対する作用も明らかにされている「柴胡桂枝湯加芍薬」の主要構成生薬であるシャクヤクについても Ca^{2+} -activated K^{+} channel に着目してその抗けいれん作用を検討した。

次にけいれん発現機構に対するけいれん関連遺伝子について検討した。まず、Kajiwara らによりすでに塩基配列まで決定された SEZ group genes 20 クローンのうち、PTZ の全身投与後に明らかに発現変化のある 9 クローンについて、マウス染色体上の座を mapping し、human synteny 領域を調べた。更に、近交系マウスを用いて PTZ 感受性閾値を検討し、閾値を支配するであろう遺伝子の座を決定した。

以上の研究により次のような結果が得られた。

1. BA 発現に対する Ca^{2+} -activated K^{+} channel の関与とシャクヤクの作用

Ca^{2+} -activated K^{+} channel は、大きい conductance 100 ~ 400pS の BK_{Ca} channel と小さい conductance (5 ~ 10pS) の SK_{Ca} channel に分類される。 BK_{Ca} channel はサソリ毒の charybdotoxin (ChTX) または iberiotoxin (IbTX) により抑制される。また SK_{Ca} channel はハチ毒の apamin により阻害される。Channel の同定はこれらの blocker によって行った。

1) ddY マウス大脳皮質初代培養神経細胞に PTZ で誘発される BA は apamin によっては阻害されないが、IbTX により完全に抑制された。また、同じ培養細胞を cell attached patch clamp 法により記録し、PTZ を細胞外から適用すると、ほぼ 150 pS の conductance の channel が burst 状に開閉するようになる。この開閉の異常変化は IbTX により完全に抑制された。従って、PTZ により誘発される BA は BK_{Ca} channel が直接関与していると結論できた。

2) PTZ 誘発の BA は細胞内カルシウムの上昇が誘因となり、PTZ 以外の方法で細胞内カルシウムを上昇させても BA を誘発できる。Caffeine, IP_3 の投与または細胞内高カルシウムによる BA についても IbTX はすべて抑制した。この結果から細胞内のカルシウムがどのような過程で上昇しても、誘発された BA はすべて BK_{Ca} channel が関わっていると結論できた。

3) IbTX の BA 抑制作用には、細胞内カルシウムの遊離または細胞外からのカルシウム流入の抑制も加わっている可能性がある。そこで PTZ による細胞内カルシウム遊離を画像解析法で、 Ca^{2+} current を Whole cell voltage clamp 法で検討した結果、IbTX はいずれに対しても抑制作用を認めなかった。従って IbTX の BA に対する抑制作用は BK_{Ca} channel を抑えることによるものであると結論できた。

4) てんかんモデルマウスとして知られている EL マウスは PTZ によるけいれん発現の閾値が低く、また大脳皮質初代培養神経細胞では先天的に BA および burst 状の channel の開閉が観察される。このような EL マウスの自発的な BA および burst 状の channel の開閉も IbTX によって確実に抑制された。EL マウスでみられる先天的な BA も BK_{Ca} channel の異常又はその関連物質の細胞内変化によるものであることが明らかになった。

以上の結果から、IbTX はてんかんけいれんに伴って発現する BA を完全に抑制することが出来る

ので、抗けいれん剤として使える可能性が期待される。しかし、IbTX は毒物であり、その濃度・適用方法など考慮しなければならない問題を有する。

5) 上記のように BA は BK_{Ca} channel が関わる事が判明し、IbTX により抑制できたが、実際にてんかん患者への適用にはほど遠いと考えられる。そこで、すでに抗けいれん作用が報告されているシャクヤクについて Ca^{2+} -activated K^+ channel に着目して IbTX の作用と、また一般に抗てんかん薬に頻用される phenytoin(PHT)の作用とも比較しながら検討した。その結果、

(1) PTZ 誘発の BA を、シャクヤクエキス(PR)およびその成分 paeoniflorin(PAE) albiflorin(ALB) および gallotannin(TA)は IbTX と同様に抑制し、その作用は $PR > TA > PAE > ALB$ であった。また、PHT は BA の頻度を抑制したが IbTX や PR とその成分のように spike を完全に抑えることはなかった。Whole cell voltage clamp 法で K^+ current を測定すると、IbTX は早い部分の current を抑制し apamin は遅く現れる K^+ current を抑制することが明らかになった。そして、PR およびその成分は早い K^+ current と遅い K^+ current の両方を抑制し、シャクヤクの作用は BK_{Ca} channel と SK_{Ca} channel を共に抑制することが明らかになった。PHT は K^+ current をほとんど抑制しない。

(2) IbTX が抑制しなかった Ca^{2+} current に対して、PR およびその成分は明らかに抑制し PHT も抑制作用を示した。

(3) EL マウスの BA に対して PR およびその成分は IbTX と同様に完全に抑制した。

以上 IbTX は単に BK_{Ca} channel の抑制だけに留まるが、シャクヤクが BA の発現に関わる細胞内カルシウム上昇を抑えたこと、更に SK_{Ca} channel にも効果を示したことは、シャクヤクの抗けいれん作用は IbTX より優れていると考えられる。

2. けいれん関連遺伝子の mapping と PTZ 感受性遺伝子のマウス染色体座の決定

1) けいれん関連(SEZ group genes)のマウス染色体上での mapping は、backcross panel と radiation hybrid panel を用いて linkage analysis を行った。その結果、backcross panel により 3 genes の座を決定することができ(SEZ 6:Chr.11, SEZ 12:Chr.16, SEZ 17:Chr.18)、radiation hybrid panel により 6 genes の座を決定できた(SEZ 2:Chr.15, SEZ 4:Chr.10, SEZ 7:Chr.2, SEZ 9 and 15:Chr.3, SEZ 10:Chr.17)。SEZ group の 9 genes 全てが決定でき、human synteny 領域からヒトてんかん関連遺伝子との関係の考察が可能になった。

2) PTZ によるけいれん発現閾値は、近交系の C57BL/6J と DBA/2J の系統間でも異なる。本実験では更にこれらの交配種 BDF₁, BDF₂, BXD を用いて PTZ けいれん発現の閾値を検討し、Map Manager QTb 17 により linkage analysis を行った。BXD R1 系で高い linkage を示した BDF₂ に対して QTL 解析を行った結果、Chr.2 上に 2 つの非常にはっきりした PTZ 感受性遺伝子座が認められた。この位置は電位依存性の Ca^{2+} channel の 2 subunit(*Cacn* b2)と 4 subunit(*Cacn* b4)に極めて近い位置であった。

以上、 BK_{Ca} channel がてんかんけいれんに伴う bursting activity に関与することを明らかにしたのは本研究が初めてである。この結果は、催奇形性が指摘されている抗けいれん薬に替わって、新た

な薬剤開発のきっかけを提供するものとする。またシャクヤクおよびその成分が IbTX と同様に BK_{Ca} channel を抑制すると共に、BA の誘因となる Ca²⁺ current に対しても抑制作用を示したことは、細胞内諸変化や遺伝子レベルの今後の研究によって、より安全な抗けいれん薬の開発に和漢薬を加える期待がもたれる。

また、SEZ-group genes の座が決定され、そのうち SEZ 17 は *Xenopus* oocyte に発現させると Ca²⁺ current を引き起こすこと、SEZ 15 はイオンチャネルの変調に関与することなどが知られておりけいれん発現に関連が深い。また SEZ 4, 9, 10 および 15 の genes が、ヒトで解明されたてんかん関連遺伝子に近い領域に位置することがわかったが、ヒトのてんかん関連遺伝子は特殊な家系を主とした検索であり普遍的なものではなく、今後の広範な研究解析によって、SEZ-group genes との更なる相同性が期待される。てんかんは複数の遺伝子が関与する多因子疾患であると考えられるが、SEZ-group genes と PTZ 感受性遺伝子についても、更に変異や欠失のような詳細な研究が必要であり、それについて mapping を行うことにより個々の遺伝子の詳細な解析を行うことが可能である。本研究はてんかんの原因療法への糸口を作ったと考える。