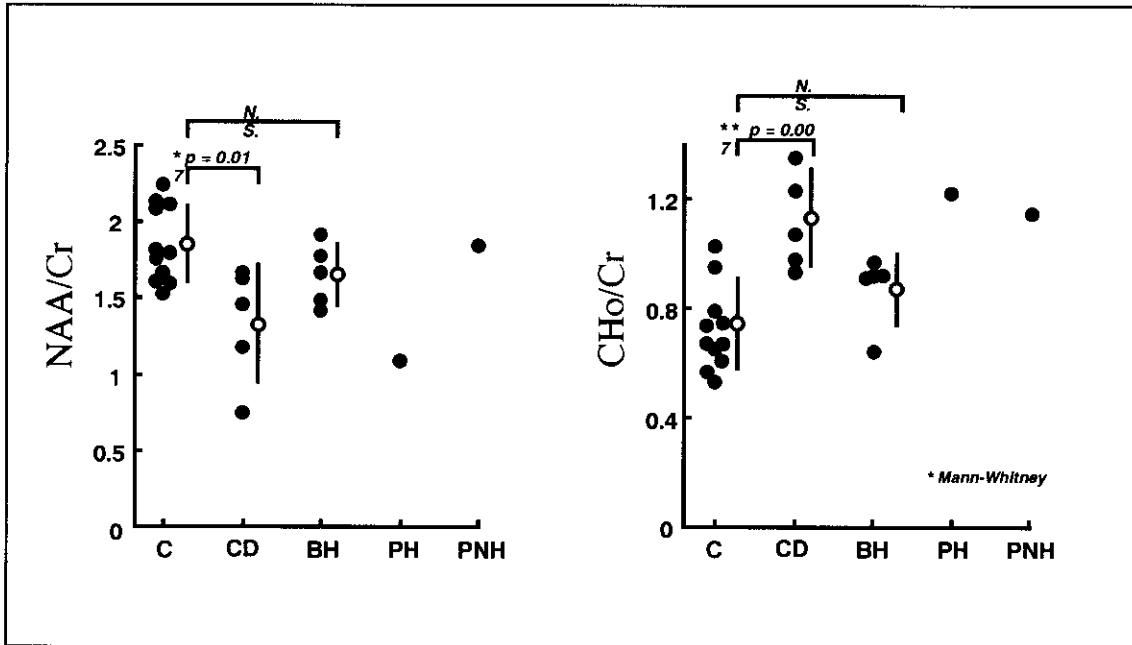


図6 皮質形成異常症の¹H-MRS



NAA/Cr比はcortical dysplasia では対照に比し有意に低値であった。一方、band heterotopiaでは有意差はなかった。Cho/Cr比はcortical dysplasia では対照に比し有意に高値であった。髄鞘化の異常が推察された。band heterotopiaでは有意差はなかった。

(C: control, CD: cortical dysplasia, BH: band heterotopia, PH] periventricular heterotopia, PNH: periventricular nodular heterotopia.)

「グリシン脳症モデルマウスの作成とその解析」

分担研究者 呉 繁夫
(東北大学大学院医学系研究科小児医学講座遺伝病学分野 助教授)

研究協力者 小島加奈子、横山浩之、広瀬（甲田）三恵子
(東北大学大学院医学系研究科小児医学講座小児病態学分野)

研究要旨 グリシン脳症は、けいれん、意識障害、精神発達障害、性格の変容、多動など様々な中枢神経症状を呈する遺伝性代謝病で、脳内グリシンの蓄積を特徴とする。新生児期に発症する症例は難治性のけいれんを伴い、脳内グリシン濃度の上昇はけいれんの発症に深く関与していると考えられる。私共は、乳幼児のけいれん発症に対するグリシンの役割を明らかにする目的でグリシン脳症モデルマウスの作成と解析を行った。モデルマウスは、本症の責任酵素であるGCS構成酵素のドミナント・ネガティブ変異をグリシン脳症患者の遺伝子解析により同定した後、変異酵素をマウス脳で過剰発現させるという独自性高い手法で作成した。モデルマウスは、2種類の方法でマウスに導入した。1)ドミナント・ネガティブ酵素をコードするcDNAを直接CAGプロモーターの下流に繋ぎ、マウス受精卵に導入する方法で作成したマウスは、2系統の脳内グリシンの蓄積を示すマウスを得ることが出来た。これらのマウスは電撃けいれん試験で有意なけいれん閾値の上昇を示した。この作成法では、高度にグリシン蓄積を示すfounder mouseは、体重増加不良、震戦、などの症状を呈し、8週齢までに死亡し、系統維持が出来ない事が判明したため、ドミナント・ネガティブ変異酵素を誘導可能にする系を次に樹立した。2)ドミナント・ネガティブcDNAを2つのloxP配列により挟まれた蛍光蛋白GFPcDNA下流に置きトランスジェニック・マウスを作成した。この系ではfounder mouseにはドミナント・ネガティブ酵素を発現させず、Creリコンビナーゼを発現する親マウスとの掛け合わせにより生まれたF1マウスで初めて発現が起こる。この系では、症状の認められる2つの系統を樹立した。一つは、生後1週間より震戦を示し生後3ヶ月までに約40%のマウスが死亡する系統で、もう一つは、胎生18日以降から生後2日の間に死亡する系統であった。確立された様々の程度で脳内グリシンの蓄積を起こすモデルマウスを用い、現在、高グリシン環境の引き起こすけいれんの機序をモノアミン代謝の面から検索中である。

A.研究目的

Non-ketotic hyperglycinemia (NKH, 別名グリシン脳症) はグリシン分解の主経路であるグリシン開裂酵素(GCS)が遺伝的に欠損し、グリシンが中枢神経系に蓄積する事により発症する。患児は新生児期から呼吸障害や意識障害を呈する予後不良の疾患である。NKH には、難治性のけいれん重積を伴い、てんかん症候群の一つに位置する。アミノ酸性神経伝達物質の乳幼児けいれんへの関与に関し、グルタミン酸には多くの研究があるが、グリシンの知見は乏しい。また、脳内グリシン濃度の上昇は、虚血脳でも認められる現象であるが、その及ぼす影響については極めて研究に乏しい。今回グリシンの引き起こす難治性てんかんの機序の解明を目的として、グリシン脳症モデルマウスを作成した。モデルマウスは、GCS の構成酵素の一つであるグリシン脱炭酸酵素のドミナント・ネガティブ(DN)変異酵素の cDNA を CAG プロモーターの下流につなぎ、トランスジェニック・マウス(Tg マウス)作成し過剰発現させることによった。

B.研究方法

1) DN 変異酵素を持続的に発現させたモデルマウスの作成

GCS の構成酵素の一つであるグリシン脱炭酸酵素の DN 変異酵素の cDNA を CAG プロモーターの下流につなぎ、BDF1 系統のマウス受精卵に導入しトランスジェニック・マウス(Tg マウス)を得た。対照として正常グリシン脱炭酸酵素 cDNA を CAG プロモーターの下流に結合したトランスジェニック・マウスを作成した。このマウスは脳内グリシン含量が正常マウスよりも有意に低値であった。

2) DN 変異酵素を誘導的に発現させたモデルマウスの作成

1) と同じ DN 変異酵素をコードする cDNA を 2つの loxP 配列により挟まれた蛍光蛋白 GFPcDNA 下流に置き、founder mouse には DN 変異酵素を発現させず、Cre リコンビナーゼを発現する親マウスとの掛け合わせにより生まれた F1 マウスで初めて発現が起こる様にした。

3) 易けいれん性の評価

第一世代マウスである P(delF756)-10-4, P(dekF756)-12-2, P(delF756)-5-3 の各マウスと脳グリシン含量の低い P(wt)-1)を電撃けいれんの実験系を用いた。対照としては、同腹産仔のうちトランスジェニック・マウスでないものを用いた。耳介クリップを介し一定条件で通電し、けいれんの各相(強直相、間代相、昏睡相)の持続時間を測定した。

4) その他

外来遺伝子の発現は RT-PCR 法にて、また、脳内グリシン含量はアミノ酸自動分析計にて測定した。基礎運動量は赤外線検知システム(室町科学)を用いて測定した。

C.研究結果

1) DN 変異酵素を持続的に発現させたモデルマウス

得られた 15 匹の Tg マウスのうち、6 匹は体重減少や振戦などを呈し、3 カ月齢までに死亡した。その大脳皮質のグリシン含量は正常の 3.5 倍と著明に上昇していた。継代維持が可能な残りの 9 系統のマウスを脳内グリシン含量と血清グリシン濃度にてスクリーニングした結果、2 系統では脳内グリシン含量の高いマウスを 2 系統(5-3,

10-4)、血清グリシン濃度が高いマウスを1系統(12-2)樹立できた。脳内グリシン含量が高い2系統のマウスを用い検索を進めた。まず、24時間の基礎運動量を調べてみると、2系統共に対照マウスに比べて基礎運動量が増加しており、多動で有ることが判明した。また、電撃により誘発されるけいれんの持続時間を測定した。その結果、図1、2に示すように、これらのマウスは対照マウスに比し有意に長いけいれん持続時間を持ち、けいれん閾値が低かった。更に、図3に示すように脳内グリシン含量の低いマウスでは、けいれん閾値が逆に高くなっていった。症状の強いマウスはfounder mouseの段階で子孫を残すことなく死亡したため、脳内グリシンの蓄積程度が強くないマウスのみが系統樹立されたと考えられる。

2) ドミナント・ネガティブ変異酵素を誘導的に発現させたモデルマウス

この手法により10系統が誕生した。このうち、現在までに、5系統の生存曲線を解析した。一つ目の系統(G11-1)は生後1週間後より震戦などの症状を呈し、生後3ヶ月までに40%のマウスが死亡した。生き残ったマウスはその後、特に症状を示さず現在観察を続けている。もう一つの系統(G15-5)は、すべてのマウスが妊娠後期ないしは生後すぐに死亡する。現在保有するモデルマウスの中で最も症状が強く、ヒトにおける新生児型のモデルマウスと考えられる。他の2系統に関しては約5ヶ月の観察期間では特に症状を示さなかった。

D. 考察

脳内グリシン含量の異なる4種類のマウス(10-4, 5-3, P(wt)-1, 及び対照マウス)の易けいれん性を電撃けいれん試験により評

価したところ、脳内グリシン含量と易けいれん性との間には正の相関が有ることが分かった。正常マウスに比べて脳グリシン含量が高いマウスの易けいれん性が高まるのみならず、正常マウスより脳グリシン濃度が低いP(wt)-1マウスにおいてけいれんに対して抵抗性になる事実は、新しい抗けいれん薬の作用点を示唆するもので興味深い。現在、高グリシン環境がけいれん閾値の低下に至る機序をモデルマウスのモノアミンの濃度変化の面から解析中である。

グリシン脳症には、新生児発症型、乳幼児期発症型、遅発型の3つの臨床型が知られている。これらの違いは主に、残存GCS酵素活性の違いと考えられている。今回樹立したマウスを、グリシン脳症の臨床分類に合わせて考えてみると、5-3と10-4の2系統のマウスは、成獣にまで成長し、多動や易けいれん性を持ち、意識障害、震戦などの症状を欠くことから遅発型のモデルと考えられる。G11-1は、約60%の産仔しか成獣にならず、けいれんや震戦などの症状が認められることから乳幼児発症型のモデルと考えられる。グリシン脳症の症状は新生児期や乳児期早期に最も激しく、それを乗り切ると意識障害やけいれんの程度が軽減することが知られている。このマウスは、その状況をよく反映するものと考えられる。最後のG15-5は、新生児死亡や妊娠後期の流産が認められることから、新生児発症型のモデルと考えられる。現在、このマウスの脳内グリシン濃度やGCS酵素活性について更に詳しい検索を行っている。研究初年度は、このようにグリシン脳症の各病型に対応したモデルマウスの作成とその性格付けを行った。来年度はこのマウスの組織学的、及び薬理的解析を通じ、高グリシン環境のもたらす神経障害の機序とその治療法を検索する予定である。

E. 結論

1) 脳内グリシン濃度の維持はけいれんの抑止において重要な役割を演じていると考えられる。

2) ドミナント・ネガティブ変異酵素の発現誘導を行うことで、高グリシン血症の最重症型である新生児発症型や乳児型のモデル動物の作成に成功した。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表 (欧文)

Kure S, Kanako K, Kudo T, Kanno K, Aoki Y, Suzuki Y, Shinka T, Sakata Y, Narisawa K, and Matsubara Y. Chromosomal localization, structure, single nucleotide polymorphisms, and expression of human H-protein gene of the glycine cleavage system (*GCSH*), a candidate gene for nonketotic hyperglycinemia. *J Hum Genet* (in press)

Takayanagi M, Kure S, Tada K, Sakata Y, Kurihara Y, Ohya Y, Kajita M, Tada K, Matsubara Y, Narisawa K. Human glycine decarboxylase (GLCD) gene and its processed type pseudogene: Structures, expression, and identification of a large deletion in a family with nonketotic hyperglycinemia. *Human Genet* 2000;106:298-305.

Kure S, Hou DC, Suzuki Y, Yamagishi A, Hiratsuka M, Fukuda T, Sugie H, Kondo

N, Matsubara Y, Narisawa K. Glycogen storage disease type Ib without neutropenia. *J Pediatr* 2000;137:253-256.

Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Kawase T, Narisawa K, Takasaka T. New common mutation in the Connexin 26 gene (*GJB2*) in childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 2000;90:141-145.

Fujii K, Matsubara Y, Akanuma J, Takahashi K, Kure S, Suzuki Y, Imaizumi M, Inuma K, Sakatsme O, Rinaldo P, Kuniaki Narisawa. Mutation detection by TaqMan-allele specific amplification: its application to the molecular diagnosis of glycogen storage disease type Ia and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum Mutaion* 2000;15:189-196.

Mizugaki M, Hiratsuka M, Agatsuma Y, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Narisawa K. Rapid detection of CYP2C18 genotypes by real-time fluorescence polymerase chain reaction. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:199-205.

Akanuma J, Nishigaki T, Matsubara Y, Fujii K, Takahashi K, Kure S, Suzuki Y, Ohura T, Miyabayashi S, Oagawa E, Inuma K, Inui K, Okada S, Narisawa K. Molecular diagnosis of 50 Japanese patients with glycogenstorage disease type Ia: three mutations in the glucose-6-phosphatase gene account for 96% of mutant alleles. *Am J Med Genet*

2000;91:107-112.

Takahashi K, Akanuma J, Matsubara Y, Fujii K, Kure S, Suzuki Y, Wataya K, Sakamoto O, Aoki Y, Ohura T, Miyabayashi S, Narisawa K. Heterogeneity of mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type Ia. *Am J Med Genet* 2000;92:90-94.

Senoo M, Matsubara Y, Fujii K, Nagasaki Y, Hiratsuka M, Kure S, Uehara S, Okamura K, Narisawa K. Adenovirus-mediated in utero gene transfer in mice and guinea pigs: tissue distribution of recombinant adenovirus determined by quantitative TaqMan PCR assay. *Mol Genet Metab* 2000;69:269-276.

Yong X, Aoki Y, Li X, Sakamoto O, Hiratsuka M, Gibson KM, Kure S, Narisawa K, Matsubara Y, Suzuki Y. Haplotype analysis suggests that the two predominant mutations in Japanese patients with holocarboxylase synthetase deficiency are founder mutations. *J Hum Genet* 2000;45:358-362.

2. 論文発表 (和文)

1. 呉 繁夫「非ケトーシス型高グリシン血症」 先天異常症候群辞典、日本臨床社 (印刷中)

3. 学会発表

1. 呉 繁夫、横山博之、広瀬 (甲田) 三恵子、飯沼一字、成澤邦明 「Non-ketotic hyperglycinemia(NKH)モデルマウスの作成」(第42回日本小児神経学会総会、2000年6月8-10日、大阪)

2. 横山浩之、呉 繁夫、広瀬 (甲田) 三恵子、成澤邦明、飯沼一字 「Non-ketotic hyperglycinemia(NKH)モデルマウスの易けいれん性」(第42回日本小児神経学会総会、2000年6月8-10日、大阪)

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

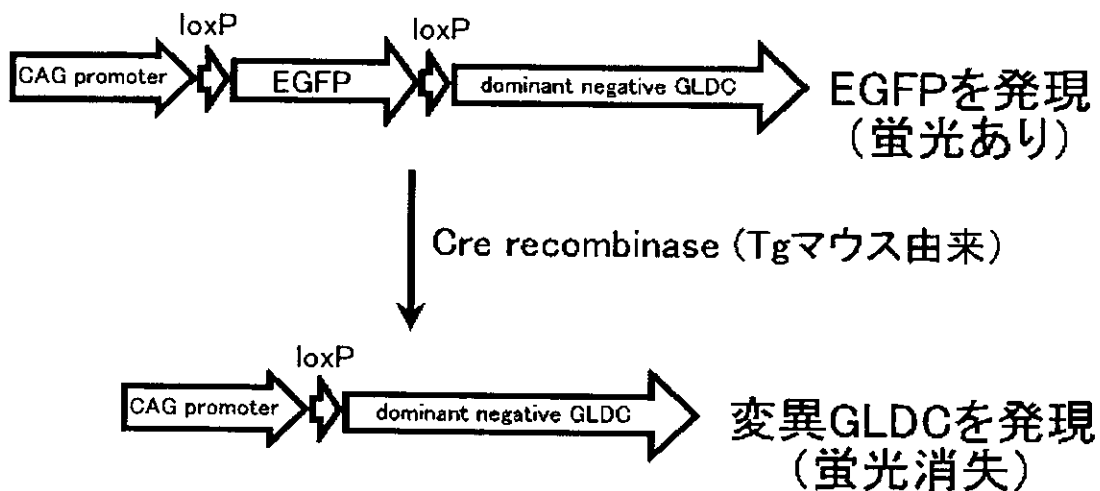
<図1-3の説明>

確立された各系統のマウスの易けいれん性を電撃けいれん試験で評価した結果を示す。各グラフの縦軸は、それぞれ強直相(左グラフ)、間代相(中央グラフ)、昏睡相(右グラフ)の持続時間(秒)を示す。

図の説明

<ドミナント・ネガティブ変異を持ったグリシン脱炭酸酵素 cDNA の発現を誘導する戦略>

上段のトランスジェニック・ベクターを持つマウスは EGFP を発現し、変異 GLDC を発現しないため、蛍光を発するが内因性 GLDC 酵素の活性阻害は起こらない。このトランスジェニック・マウスを Cre リコンビナーゼ cDNA を発現するトランスジェニック・マウスと交配する事により loxP に挟まれた EGFP cDNA が除去された産仔が誕生する。この産仔は、蛍光が消失し、変異 GLDC 酵素が発現するために内因性 GLDC の活性を抑制しグリシンの蓄積を引き起こす。



- EGFP: enhanced green fluorescent protein
- GLDC: glycine decarboxylase

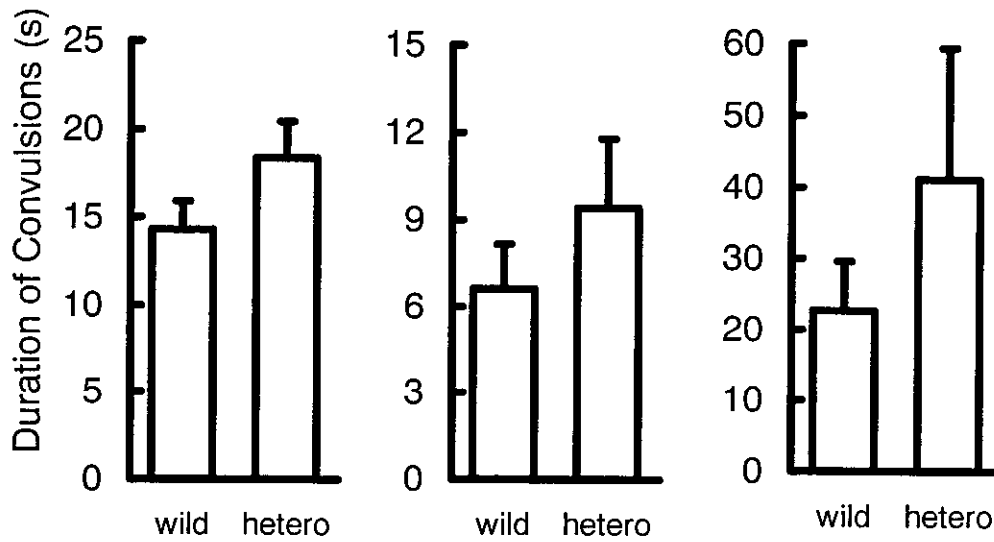


図1 マウス系統 P(delF756)-10-4 の結果

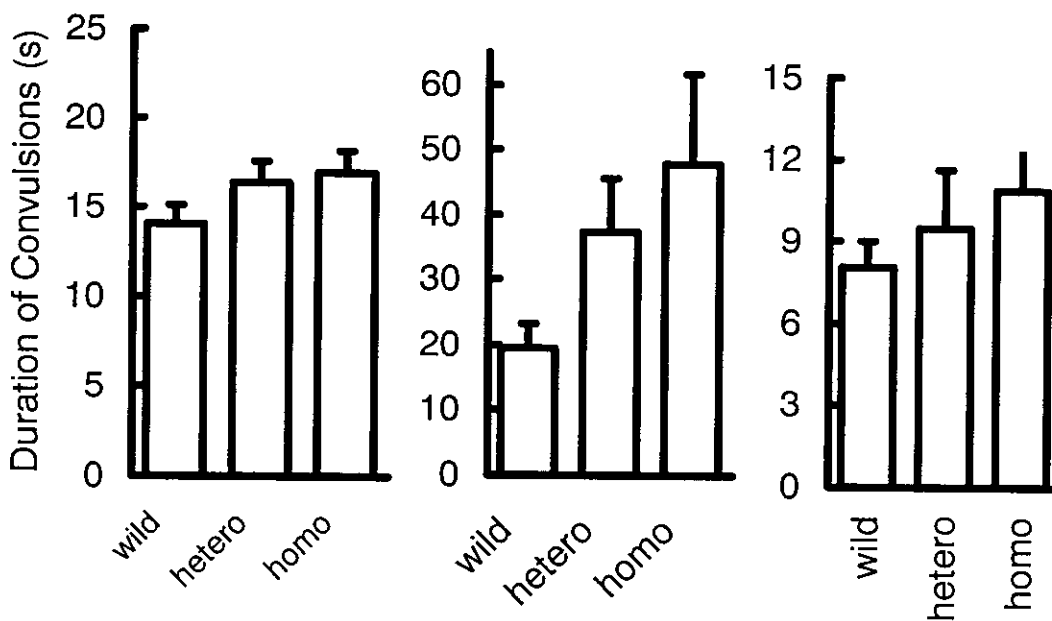


図2 マウス系統 P(delF756)-5-3 の結果

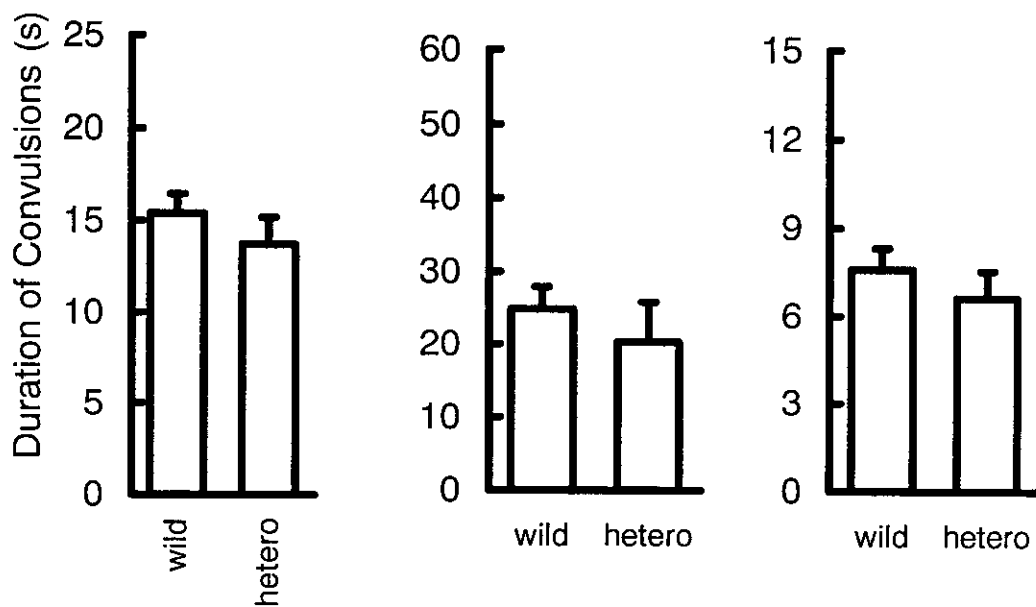


図3 マウス系統 P(wt)-1 の結果

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

新生児ラットにおける皮質てんかんモデルに関する研究

分担研究者 田中達也

旭川医科大学脳神経外科学講座 教授

研究要旨 MRI の発達に伴い、人の難治性てんかんで従来は描出が困難であった皮質形成異常が発見されることが多くなった。しかし、そのてんかん原性のメカニズムについては必ずしもよくわかっておらず、より基礎的な研究が必要と思われる。そのためには、常に一定の皮質形成異常を認め、かつ、自発的にけいれん発作が出現する動物モデルが望ましいと考えるが、これまで報告されている動物モデルには、これらを共に満たすものはない。そこで、新しい皮質形成異常モデルを作成することを目的に、新生児ラット（生後 0～2 日）の皮質内にカイニン酸を微量注入してみた。すべてのラットでカイニン酸注入直後から約 24 時間、全身の強直間代けいれんが観察されたが、その後 2 ヶ月間発作は観察されなかった。カイニン酸注入後の組織学的変化を経時的に検討すると、1 ヶ月後ではカイニン酸注入部周辺の大脳皮質で神経細胞の層構造が不規則となり、奇異な形態の神経細胞が出現していた。2 ヶ月後でも組織学的変化は同様であった。生後 0～2 日目の新生児ラットでは大脳皮質の neural migration が終了していないため、カイニン酸による神経細胞の過剰興奮と神経毒性によって、その後の正常な neural migration が障害された結果、皮質形成異常が生じたものと考えられた。カイニン酸注入の 1 ヶ月、2 ヶ月後には自発的なけいれんは出現していなかったが、今後、本モデルを用いて電気生理学的な研究から皮質形成異常のてんかん原性メカニズムについて検討する予定である。

A. 研究目的

神経画像診断の発達に伴い、難治性てんかん患者で皮質形成異常が発見されることが多くなり、外科的に治療可能なてんかん症候群として近年注目されている。皮質形成異常のてんかん原性については、病変内の異常な神経細胞がてんかん原性を有すると言われているが、病変周辺の正常神経細胞の役割についてはよくわかっていない。そこで皮質形成異常のてんかん原性メカニズムを解明するには、より基礎的なアプローチも必要と思われる。皮質形成異常の動物モデルとしては① TISH mutant rat などの遺伝性モデル、②胎児に X 線や化学物質に暴露するモデル、③新生児の皮質に病変を作成するモデル（凍結病変モデルなど）がある。皮質形成異常のてんかん原性を研究する上では、常に一定の形成異常を持ち、自発的にけいれん発作が出現することが望ましいが、両方を

満たすモデルは現在見られない。そこで我々はその両方を満たすモデルを作成するために、新生児ラットの大脳皮質にアミノ酸興奮性物質であるカイニン酸を微量注入し、大脳皮質形成異常のモデルを作成し、そのてんかん原性メカニズムについて検討した。

B. 研究方法

生後 0～2 日の新生児ラット 46 匹を用いてハロセン吸入麻酔下でカイニン酸を大脳皮質内に微量注入した。新生児ラットは定位脳手術装置に固定することは困難なので、体形に合った石膏の上に固定した（図 1）。刺入点からまずは 27G の翼状針を、つづいてステンレスパイプを刺入してカイニン酸を注入した。注入針は、外径 0.6mm のステンレスパイプ内に外径 0.3mm のステンレスパイプ

を先端が3mm露出するように入れてハンダ固定したものを自作した。カイニン酸はリン酸緩衝液 (pH8.0) で溶解し、 $1.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の2種類の濃度溶液を作成

し、マイクロシリンジで $0.5\mu\text{l}$ を約1分間かけて注入した。注入後カイニン酸の拡散を待つために1分間留置してから注入針を抜去した。カイニン酸注入部の確認とくも膜下腔への漏出を確認するために、カイニン酸を少量のメチレンブルーで着色した。カイニン酸注入後は、急性のけいれん発作の有無を確認するために約1時間、肉眼的に観察した。その後は母ラットと共に飼育箱で飼育した。離乳期の過ぎる約3週間は母ラットと共に飼育し、その後は個別に飼育した。カイニン酸注入の1ヵ月後、2ヵ月後にネンプター深麻酔下で生理食塩水、10%ホルマリンで灌流固定した後に脳を摘出した。摘出した脳は冠状断で薄切して病理標本を作成し、H-E染色、cresyl violet染色で観察した。

C. 研究結果

カイニン酸 $0.5\mu\text{g}$ 、 $1.0\mu\text{g}$ いずれの群でも注入後、全ての新生児ラットに tonic-clonic convulsion を認めた。このけいれんは約24時間観察された後は消失した。しかし、その間に発作重責状態となり死亡したラットもいた。生存したラットは1~2ヶ月そのまま成長させたが、その間にラットに明らかなけいれん発作は観察されなかった。1ヶ月後、2ヵ月後の、脳の病理所見(肉眼的所見、H.E染色、cresyl violet染色)を検討すると、肉眼的には、大脳皮質の表面にわずかにメチレンブルーに青く染まる部位があり、カイニン酸の注入部位が確認できた。カイニン酸がくも膜下腔や脳室内に漏れていないことはこれらにメチレンブルーが存在しないことから確認できた。顕微鏡下では注入部位の皮質内に注入針による空隙を認めた(図2)。Freeze-lesionモデルのようにカイニン酸注入をした部位に異常な脳溝や脳回は認めなかったが、その周囲において大脳皮質の神経細胞の層構造が不規則に乱れていた(図3)。

また神経細胞は核が濃染しているもの(pyknosis)や奇異な形態の神経細胞を認め、注入部位の反対側と比較して明らかな皮質の形成異常を認めた(図4)。

D. 考察

カイニン酸がラットの大脳皮質に注入されていること、注入部位の周囲に大脳皮質形成異常が認められることより、カイニン酸注入後の全身けいれんは、局所でのてんかん性興奮が速やかに2次性全般化したものと考えられた。幼若な脳はてんかん原性閾値が低く全般化しやすいことも直後から全身けいれんに至った原因と考えられた。その神経細胞の過剰興奮の結果、migrationが終了しない新生児の大脳皮質で正常なmigrationが障害され、laminationの異常、異常な神経細胞といった皮質形成異常が形成されたと考える。ラットが成長した2ヶ月間は自発的なけいれん発作を認めなかったが、それは皮質形成異常における神経細胞の興奮が発作を起こすまでには至らなかった可能性がある。自発性発作の出現については今後の経時的な観察が必要であり、また、さらに成長したラットで脳波を記録し本モデルにおけるてんかん原性について検討していく予定である。

E. 結論

新生児ラットの皮質にカイニン酸を局所注入することで、皮質形成異常を作成することができた。カイニン酸の神経興奮作用により、その後のmigrationに異常をきたした結果と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

Tanaka T, Hashizume K, Sawamura A, Yoshida K, Takano k, Hodozuka A, Nakai H. Influence of basal ganglia upon seizure propagation of the kainic acid-induced

focal epilepsy
Epilepsia, 41(Suppl 7): 26-27, 2000

Tanaka T, Hashizume K, Kunimoto M, Maeda T, Hodozuka A, Nakai H.

Multiple subpial transection versus callosal section in the treatment of experimentally induced cortical focal seizures

In: Epilepsy Surgery, 2nd Edition, (Eds) H O Luders and Y Comair, Bermedica Production, Maryland, 2000, pp 801-806

Hashizume K, Kiriyama K, Kunimoto M, Maeda T, Tanaka T, Miyamoto A, Miyokawa N, Fukuhara M: Correlation of EEG, neuroimaging and histopathology in an epilepsy patient with diffuse cortical dysplasia

Child's Nervous System 16(2): 75-79, 2000.

Hashizume, K, Tanaka T: Antiepileptic effect of nefiracetam on kainic acid-induced limbic seizure in rats. Epilepsy Research 39(3): 221-228, 2000.

Hashizume, K, Tanaka T, T. Fujita, S. Tanaka

Generalized seizures induced by an epileptic focus in the mesencephalic reticular formation: Impact on the understanding of the generalizing mechanism

Stereotact Funct Neurosurg 74:153-160, 2000

2. 学会発表

Tanaka T, Hashizume K, Maeda T, Sawamura A, Hodozuka A, Nakai H.

Generalized seizure status induced by an epileptic focus in the mesencephalic reticular formation: Impact to understand the generalizing mechanism. American Epilepsy Society, Annual Meeting, Orlando, December 1999

H.知的財産の出願・登録状況

なし

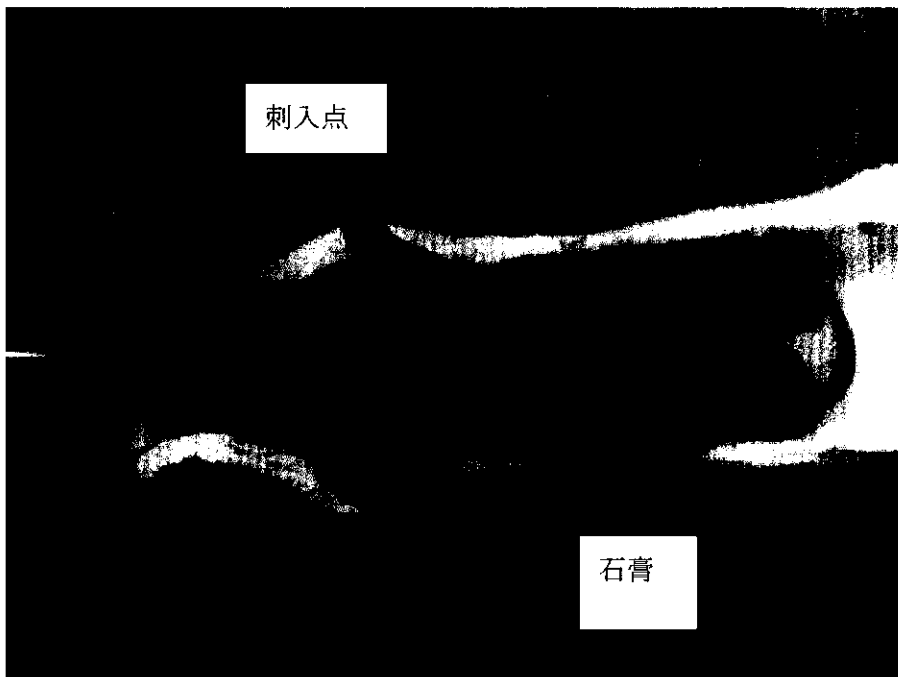


図1 シェーマ：新生児ラットを、石膏の上に固定している様子。矢印の刺入点からまずは 27G の翼状針を、つづいてステンレスパイプを刺入してカイニン酸を注入する。けいれんは、カイニン酸注入約 15 分後から出現した。

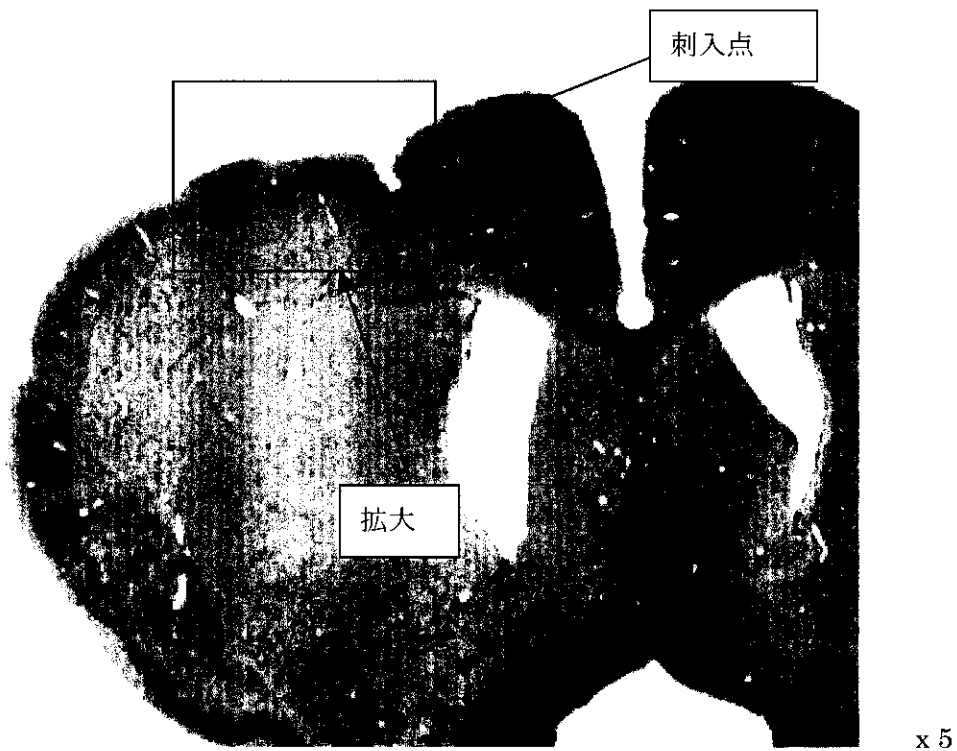
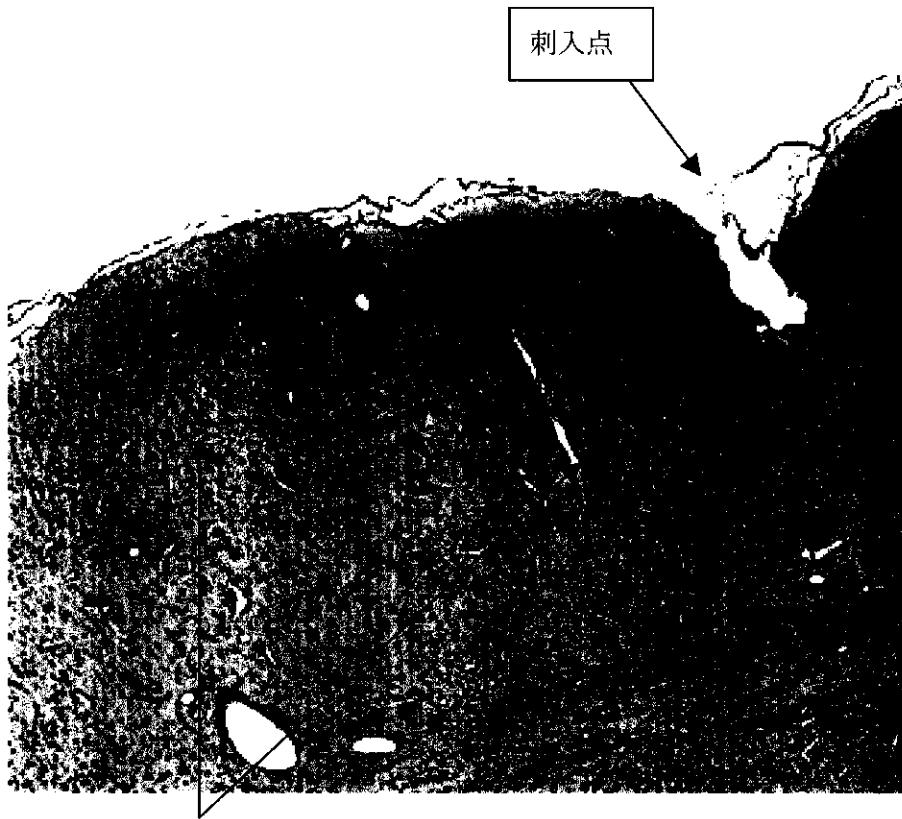


図2 病理所見：H.E 染色



x 40

図3 刺入部位周囲とやや離れた部位に層構造の異常を認める。



x 100

図4 皮質の端まで神経細胞を認め、その神経細胞も異形の細胞である。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

幼若脳におけるクロライド・コトランスポーター遺伝子発現の特殊性

分担研究報告書 佐藤康二 浜松医科大学教授

研究要旨 クロライド・コトランスポーター (KCC1, KCC2, NKCC1) の幼若脳における遺伝子発現を検討し、成熟脳と比較したところ、KCC2 は幼若な脳では発現が弱いことが明かとなった。幼若脳における易興奮性の一因はKCC2の動きが弱く細胞内クロライド濃度が高く保たれることであると考えられた。

A. 研究目的

神経細胞の細胞内クロライド濃度は、他の細胞よりもかなり低く保たれており、そのことが GABA-A 受容体を介した細胞内へのクロライド流入を可能にし、ひいては細胞内電位を過分極側に導き、結果的に神経細胞の抑制を可能ならしめる生理学的基盤となっている。近年、クロライドの細胞内濃度、ひいては神経細胞の興奮性を規定すると考えられる三種のクロライド・コトランスポーター (KCC1, KCC2, NKCC1) の遺伝子が発見され注目を集めている。生理的条件下では、KCC1, NKCC1 は細胞外からのクロライド流入を司り、KCC2 は細胞内から外へのクロライドの汲み出しを司ることが報告されており、この三者のバランスにより各々の神経細胞の興奮性が決定されることが推定されている。また、最近の知見では、幼若な神経細胞では GABA ヲグリシン等の伝達物質によって脱分極を起こしていたのが、神経細胞の発達に伴って KCC2 の発現が

増強され、GABA ヲグリシン等の伝達物質によって過分極を起こす成熟型に転換されることが明かとなってきた。よって、乳幼児に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究を進めていく上で、三種のクロライド・コトランスポーターの発現動向を調べておくことが不可欠である。故に、我々は、それら三者の遺伝子発現について検討を加えることとした。

B. 研究方法

KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA にそれぞれ特異的な oligo cDNA プローブを作成した。それぞれの cDNA の 3'端に酵素を用いて ³⁵S-dATP を結合した。発達の様々なステージのラット脳を取りだし、クライオスタットで 20 μ m の切片を作成し、上記のプローブをハイブリシ、洗浄後、乳剤を塗布し暗箱中にて数週間保存後、現像した。その切片を暗視野顕微鏡下で観察し、脳内に於ける三者の遺伝子発現を in situ hybridization 法にて

調べた。

(倫理面への配慮)

浜松医科大学の動物実験倫理指針に則って実験を行った。

C. 研究結果

1. 成熟ラットにおけるクロライド・コトランスポーター遺伝子の発現

まず、基本的な神経解剖学的知見を得るために、成熟ラット脳全体に於ける KCC1, KCC2, NKCC1 の遺伝子(mRNA)発現を *in situ hybridization* 法を用いて検討した。その結果、KCC2 mRNA の発現は、ほぼ脳全体にわたっており、しかも神経細胞特異的であった。このことは、KCC2 を介したクロライド汲み出し機構が、大部分の神経細胞に取って非常に重要であることを示唆している。ところが興味深いことに、詳細に観察してみると、全ての神経細胞が KCC2 mRNA を発現している訳ではないことが明らかになってきた。例えば、視交叉上核、視床下部室傍核、視床網様核などいくつかの領域で、KCC2 mRNA を全く発現していない神経細胞が発見された。これらの神経細胞では、その特殊な生理的作用のため細胞内クロライドが異なる系によって調節されていることが推定される。KCC1 及び NKCC1 遺伝子は、グリア細胞と神経細胞どちらにおいても発現が確認された。そのことはこの二つのクロライド・コトランスポーターは、神経細胞だけでなく、他の種類の細胞でも重要な

役割を果たしていることが示唆された。この所見を論文として纏めたものは *Neuroscience* 誌に受理され現在印刷中である。

2. 発達過程におけるクロライド・コトランスポーター遺伝子発現変動

a. 嗅球における変動

嗅球は中枢神経内でも、比較的層構造がはっきりしており、神経細胞種の同定が容易であり、その特徴から様々な研究に利用されている。我々もその利点を利用すべく、生直後から成熟にいたるラット嗅球におけるクロライド・コトランスポーター遺伝子の発現変動を検討した。その結果、KCC2 の遺伝子発現はまず一番始めに、嗅球の神経細胞の中で最も早く成熟する僧帽細胞に見られた。興味深いことには、その後、これまでにトリチウムの取り込み実験によって記載されている順に KCC2 の遺伝子発現は観察された。このことは、KCC2 の遺伝子発現と各々の神経細胞の成熟の程度は正の相関を有することを示唆しており、KCC2 を発現して細胞内クロライド濃度を低く保てること、換言すれば GABA に対して抑制性に応答できることが、成熟神経細胞にとって必須であることを示唆している。現在、この結果をイメージングで証明するために、細胞内クロライドの測定を行っており、それらの結果を纏めて *J. Neuroscience* 誌に投稿予定である。

b. その他の部位における変動

上記の実験結果が非常に興味深かったので、更に大脳、小脳、間脳などにおける発現も検討した。その結果、脳全体にわたって、KCC2 の遺伝子発現と神経細胞の成熟度はよく相関した。すなわち、最初に下位の脳から成熟し、次第に上位の脳が成熟していくという流れに従い、脳幹部では、胎生期より、KCC2 の遺伝子発現が観察された、それに比べて大脳皮質における発現は脳の中ではかなり遅いほうであった。このことは、上位脳においては GABA 抑制系はかなり遅れて発達してくることを示唆しており。この GABA 抑制系の未熟が乳幼児に生じるけいれん発作の病態に密接に関与していることが、推測される。現在この結果に基づいて投稿を準備中である。

D. 考察

本年度の研究により、明かとなったことは、脳内に成熟度の差異により、成熟脳では抑制系の神経伝達物質である、GABA やグリシンが興奮性の神経伝達物質として働く可能性があるということである。このことは、特に小児期のけいれん病態を考える上で、避けては通れない観点である。今後、ヒトにおける知見が必要となってくると考えられる。また、ここを出発点として、小児期のけいれんの特殊性に対する科学的理解をより一層深めていくことが重要である

と痛感した。次年度以降は、更に臨床的な視点のもと、皮質形成異常症、グリシン脳症モデル動物、カイニン酸注入モデルに取り組み、乳幼児に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究を進展させていく所存である。

E. 結論

本研究では、クロライド・コトランスポーター (KCC1, KCC2, NKCC1) の幼若脳における遺伝子発現を検討し、成熟脳との比較を行った。一般的に KCC2 mRNA は幼若な脳では発現が弱いことが明かとなった。幼若脳における易興奮性の一因は KCC2 の働きが弱く細胞内クロライド濃度が高く保たれ、GABA やグリシンの抑制作用が十分に働かないことであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
Developmental changes in GABA transporter (GAT1, GAT3) mRNA expressions in the rat olfactory bulb. Masahiro Kawamoto, Koji Ohno, Kanna Kuriyama, Takeshi Kubo, and Kohji Sato Dev. Brain Res. 126 (2001) 137-145.

Differential expression patterns of three glutamate transporters (GLAST,

GLT1 and EAAC1) in the rat main olfactory
bulb

Makio Utsumi, Koji Ohno, Hiroyuki Onchi,
Kohji Sato and Masaya Tohyama Mol.
Brain Res. in press

The differential expression patterns of
messenger RNAs encoding K-Cl
cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl
cotransporter (NKCC1) in the rat nervous
system.

Kanaka, K. Ohno, A. Okabe, K. Kuriyama,
T. Itoh, A. Fukuda, and K. Sato.
Neuroscience, in press

2. 学会発表

KCC1, KCC2, NKCC1 の遺伝子のラット脳内
における発現 佐藤康二 平成 12 年度
日本解剖学会中部地方会

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

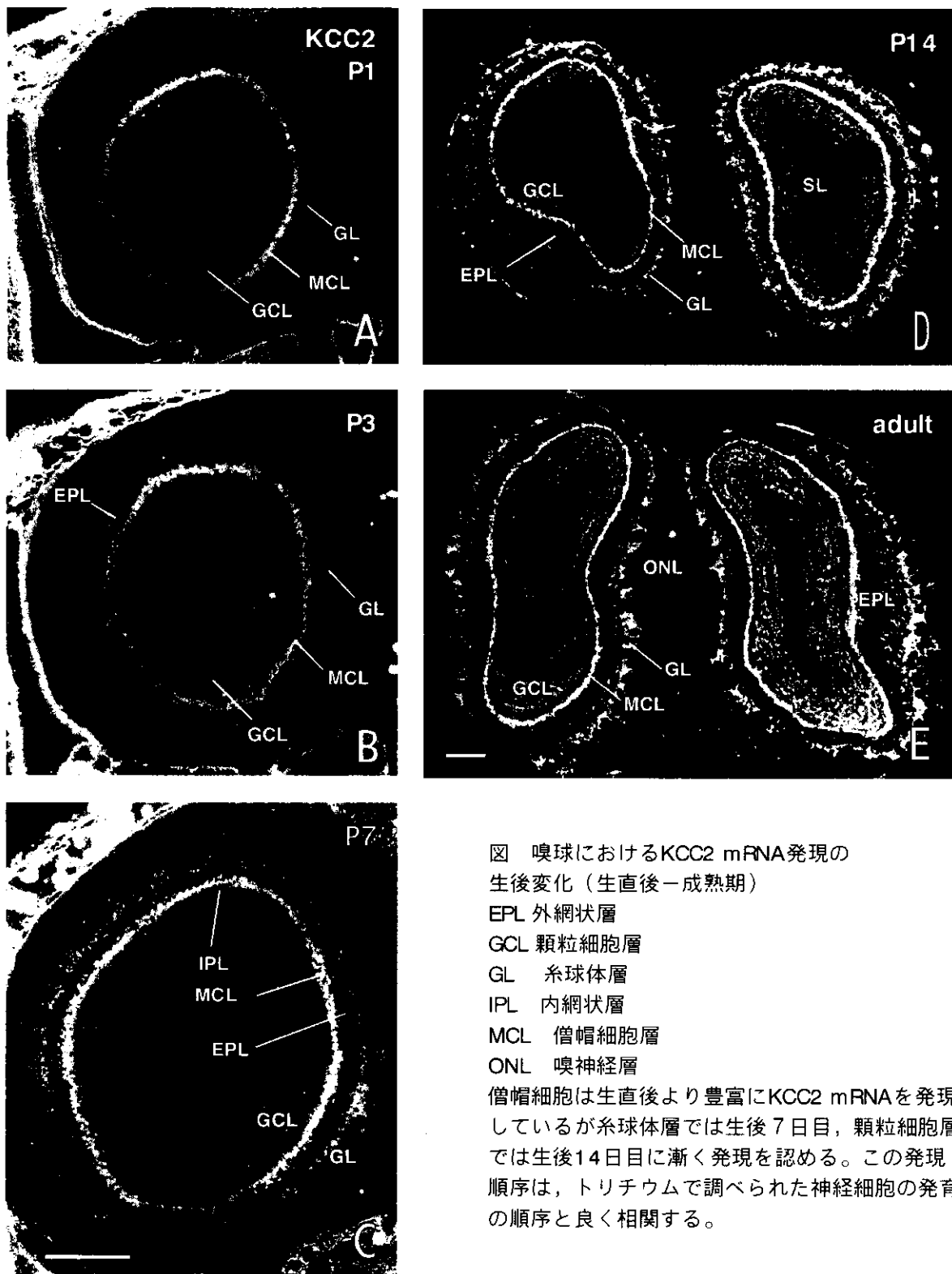


図 嗅球におけるKCC2 mRNA発現の
生後変化（生直後～成熟期）

EPL 外網状層

GCL 顆粒細胞層

GL 糸球体層

IPL 内網状層

MCL 僧帽細胞層

ONL 嗅神経層

僧帽細胞は生直後より豊富にKCC2 mRNAを発現しているが糸球体層では生後7日目、顆粒細胞層では生後14日目に漸く発現を認める。この発現順序は、トリチウムで調べられた神経細胞の発育の順序と良く相関する。

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
飯沼 一字	「痙攣のPET」	上島国利 鴨下重彦	「症候から 診断へ・第 4集」	日本医師 会	東京	2001	16
飯沼 一字	「2.成長・発達・ 加齢に伴う注意す べき徴候」 「7. 痙攣」	上島国利 鴨下重彦	「症候から 診断へ・第 4集」	日本医師 会	東京	2001	129-133

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
飯沼 一字	「学会名改訂検討委員会 からのメッセージ：神経機 能検査の進歩と小児への 応用」	臨床神経生 理学	28	405-406	2000
Togashi N., Haginoya, K., Munakata, M., Kato, R., Yokoyama, H. & Iinuma, K.,	Image analysis of intractable epilepsy: 18F- FDG PET scan of the cortical dysplasia.	CYRIC	Annual Report 1999	151-154	2000.
Haginoya, K., Kon, K., Yokoyama, H., Tanaka, S., Kato, R., Munakata, M., Yagi, T., Takayanagi, M., Yoshihara, Y., Nagai, M., Yamazaki, T., Maruoka, S. & Iinuma, K.	The perfusion defect seen with SPECT in West syndrome is not correlatd with seizure prognosis ordevelopmental outcome.	Brain Dev.	22	16-23	2000