

厚生科学研究研究費補助金

脳科学研究事業

乳幼児期に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究

平成 13 年 総括・分担研究報告書

主任研究者 飯沼 一字

平成 14 年（2002 年） 4 月

目次

I. 総括研究報告	
乳幼児期に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究 飯沼 一字	1
II. 分担研究報告	
1、高グリシン血症に伴う中枢神経症状の発症機序 ーグリシン開裂酵素系の発生と遺伝子改変動物の解析ー 呉 繁夫	9
2、新生児ラットにおける皮質形成異常モデルの研究 田中 達也	17
3、幼若脳の興奮性を規定する分子群に対する形態学的解析 佐藤 康二	24
4、皮質形成異常症のプロトン核磁気スペクトロスコピーによる検討 飯沼 一字	36
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	44

乳幼児期に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究

主任研究者 飯沼 一字（東北大学医学部）
分担研究者 呉 繁夫（東北大学医学部）、田中 達也（旭川医科大学）、
佐藤 康二（浜松医科大学）

研究要旨 乳幼児期に生じるけいれんの病態、特に興奮系と抑制系のバランスの背景にある脳の物質的異常がどのように関係するかを検討することを目的として以下の研究を行った。新生児期から激裂なけいれんを起こし、てんかん特殊症候群に位置づけられているグリシン脳症のモデルマウスの開発とその解析、新生仔ラットに微量のカイニン酸を注入することによって作成した大脳皮質形成異常の解析、脳興奮-抑制系に強く関与するクロライドコトランスポーターの発達期ラットでの解析である。さらに皮質形成異常患者の magnetic resonance spectroscopy (MRS)による皮質形成異常組織の代謝動態の研究を行い、将来この研究で得られた基礎データを切除組織に応用するための基礎資料としてデータの集積を行った。

グリシン脳症の原因酵素であるグリシン開裂系酵素のドミナントネガティブ (DN) 効果をもつ遺伝子を導入することによるトランスジェニックマウスを作成した。作成の方法については平成12年度研究報告書に詳述した。このモデルマウスの胎生10日、12日の胎児では、野生型に比べて特に頭部が小さく、組織学的解析では重篤な脳形成異常を認めた。DN変異酵素を持続的に発現させたモデルマウスでは易けいれん性が亢進し、正常マウスよりも脳グリシン濃度が低いマウスではけいれんに対して抵抗性を持つことが判明した。脳内グリシン濃度の調節がけいれんの予防に重要であることを示している。

ラット胎生15日では GCS は各脳室周囲の神経上皮細胞と、将来大脳基底核となる終脳基底板上に強い発現を認めた。GCSの局在は神経幹細胞の豊富な部位に一致していた。

クロライドコトランスポーターの発達的变化を幼若ラット嗅球で、KCC1, KCC2, NKCC1 について検討した。その結果、KCC1 と NKCC1 mRNA は全ての神経細胞で生後1日から弱く発現し、その発現は発達に沿って増した。それに対し、KCC2 の遺伝子の発現と神経細胞の成熟度はよく相関した。大脳皮質においては KCC2 mRNA は生後1日目にはほとんど認められなかったが生後15日目には豊富に発現しており、この間に急激な発現上昇が起こることを示している。しかも、顆粒細胞に $100 \mu\text{M}$ の GABA を投与したところ、生後1日と生後6日では細胞内 Ca^{2+} は著明に上昇したが、生後14日では上昇は認められなかった。このことは生直後には細胞内クロライド濃度が高く、GABA_A 受容体が開くとクロライドが細胞外に流出し、脱分極し、GABA が興奮性に効いていることを示している。

臨床データの集積として、皮質形成異常症例のプロトン核磁気共鳴スペクトロスコピー (^1H -MRS) による異所性灰白質の代謝の性質を検討した。皮質形成異常では N-acetyl aspartate/ Creatine 比 (NAA/ Cr) は対側正常大脳皮質に比較し、有意に低値で、逆に Choline/ Creatine 比 (Cho/ Cr) は有意に高値を示した。皮質形成異常組織は、細胞密度自体は正常皮質と同等であるが異常な形態を示す未分化な細胞を含んでいる。これらの細胞は発達過程で起こるべき、神経伝達物質受容体スイッチングの遅延が起きていることが予想される。

A. 研究目的

乳幼児期は他の時期に比較してけいれんを起こし易い。しかも発症時期が早いほど難治になり易く、発作が頻回で、けいれん頻発による二次障害や、基盤に合わせ持つ脳障害による後遺症などその後の生活の質に多大な支障を来す。

このように乳幼児けいれんへの対処法としては発作抑制が鍵であるが、けいれん発作を引き起こすメカニズムが完全には解明されていない。われわれはグリシン脳症とカイニン酸微量注入による皮質形成異常の2つのけいれんモデルを用いて幼若期の興奮-抑制系の動態を検討することを試みた。また興奮-抑制系に密接に関与する細胞内クロライド濃度の動態を解析するため、クロライドコトランスポーター mRNA の発現を発達期ラットを用いて検討した。

一方皮質形成異常症は小児難治てんかんの基礎疾患としての重要さが近年注目されている。また皮質形成異常では治療として外科的切除の対象となることもある。切除標本についてクロライドコトランスポーターなどの興奮-抑制系に関与する要素を検討することは、ヒトの難治てんかんの機序の解明に資すると考えられる。その準備として、生体において皮質形成異常組織の性状を proton magnetic resonance spectroscopy ($^1\text{H-MRS}$) を用いて検討した。

B. 研究方法

1. グリシン脳症モデルの作成とその解析

グリシン脳症モデルマウスの作成については初年度の報告書に詳述したので、概説する。グリシン脳症の病因酵素であるグリシン開裂系(GCS)に対してドミナントネガティブ(DN)効果をもつ変異酵素を発現させるようにした。このマウスには 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質(GFP) cDNA の下流においたトランジェニック・ベクターが導入されている。このマウスと Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニック(Tg)マウスとを掛け合わせるにより、その胎児で DN 変異酵素が発現し、胎児の GCS 活性が抑

制される。

このモデルマウス外観および脳の組織学的検索を行った。さらにこのモデルの胎生10日および12日に胎児を摘出し、脳を固定・薄切後 H-E 染色で観察した。

また脳内グリシン濃度の高い系統と低い系統および野生型マウスの大脳皮質の total RNA を Qiagen RNA easy kit で抽出後、蛍光色素 Cy³ 標識ヌクレオチド存在下に逆転写を行い標識 DNA を作成した。この標識 cDNA と 5,000 種類の遺伝子検出用のマイクロ・アレイとハイブリダイズさせ、野生型マウスと異なる遺伝子を同定した。

8週齢マウスの大脳皮質のホモジェネート遠心上清を高速液体クロマトグラフィーでモノアミンおよびその代謝産物 21 種類を同時測定した。

発達期の GCS の発現を検討するため、胎生 12、15、18 日のラットを妊娠子宮より摘出し、GCS 構成酵素である P, T, H 蛋白質をコードする mRNA に相補的なオリゴヌクレオチドを

^{35}S で標識し、in situ hybridization 法にて、P, T, H 蛋白質の発現を検討した。

2. カイニン酸微量注入モデルの作成と解析

新生仔ラット(生後0-2日)の頭皮上からカイニン酸(KA)を 1.0 μg または 0.5 μg を微量注入し、その後体重 200-250g まで成熟させたラットを用いた。

一側股静脈に挿入したカテーテルから ^{125}I -iomazenil 3.7MBq を注入し、2時間後に断頭し、冠状断の凍結切片でオートラジオグラフィ法でベンゾジアゼピン受容体の分布を観察した。

3. 発達期脳のクロライド・コトランスポーターの発現

3種のクロライド・コトランスポーター KCC1, KCC2, NKCC1 それぞれの mRNA ならびに gephyrin, collybistin, Narp, PSD-95 mRNA に特異的な Oligo cDNA プロブをハイブリダイズし、脳内における遺伝子発現を in situ hybridization 法で検討した。

さらに、さまざまな発達ステージのラット脳を

取りだし、嗅球をスライスに作成後、Ca²⁺感受性色素 Fura2 を神経細胞に取り込ませた後 GABA あるいはグリシンを投与し、細胞内 Ca²⁺濃度を測定した。

4. 皮質形成異常症の MRS による検討

皮質形成異常8例(平均 12.6 歳 男性1、女性7)を対象とし、成人以上は本人の、未成年者に対しては親のインフォームドコンセントを得た上で、プロトン磁気スペクトロスコピー (¹H-MRS) を施行した。N-acetyl aspartate(NAA), Choline(Cho) および Creatine(Cr)と Phosphocreatine の和としての Cr 信号を測定し、NAA/Cr 比および Cho/Cr 比を検討した。

MRS で検出される代謝産物は年齢に依存して変化することが知られているので、皮質形成異常症例では病変と反対側の正常皮質を対照とし、Wilcoxon signed-rank test により統計的に有意差を検討した。一方限局性皮質形成異常との比較として band heterotopia5例(9-34 歳平均 20.4 歳)についても検討した。band heterotopia では両側性に病変を持つため、患者とほぼ同一年齢の健常ボランティアの脳皮質と Man-whitney U test によって比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、それぞれの施設の動物実験倫理指針に則って行った。

臨床症例については、今回研究を行った各種の検査は、検査方法、検査の意義、検査の危険性、好ましからざる状況について十分に説明をし、患者本人および保護者から文書での承諾を得た。

C. 研究結果

1. DN 変異酵素を誘発的に発現させたモデルマウスでは5つの系統が胎生致死となり胎生 10.5-12.5 日の3つの系統で形態解析が可能であった。GCS 活性が抑制された胎仔は、野生型に比べて全体的に小さく、特に頭部が体部に比してより小さかった。組織学的解析では、脳全体が低形成で、終脳に変化が強く、皮質は菲薄化し、眼胞、嗅球も著明な低形成を認

めた。

DN 変異酵素を持続的に発現させたモデルマウスで、電撃けいれん試験を行った。脳グリシン濃度が高いマウスでは易けいれん性が充進し、脳内グリシン含量と易けいれん性の間には正の相関が存在した。

マイクロアレイを用いた 5,000 種類の遺伝子発現の検索では、約 30 種類の遺伝子発現の変動が認められた。

一方胎生 15 日のラットの GCS 蛋白の発現の検討では、GCS は各脳室周囲の神経上皮細胞と、終脳基板に強い発現を認めた。GCS は神経幹細胞の豊富な部位に一致していた。T 蛋白や H 蛋白が脳実質にも発現していたのに対して、P 蛋白では神経上皮細胞と終脳基板に限局しており、特に大脳へと分化していく部位で強く発現していた。

2. カイニン酸を微量注入したラットでは異常な皮質が形成されたが、この異常部に一致して、局所性の spike burst が記録されたが、長期的な生存観察では自発的臨床発作は認められていない。

¹²⁵I-iomazenil オートラジオグラムでは、皮質形成異常部位での大脳皮質第3、4層で不規則なトレーサの集積低下が観察され、ベンゾジアゼピン受容体の分布の乱れと、受容体結合能の低下が認められた。

3. 発達期ラットの嗅球におけるクロライドコトランスポーターの遺伝子発現について検討した結果では、KCC1 NKCC1 mRNA は全ての神経細胞で生後1日から弱く発現していることが明らかになった。さらにその発現は発達に沿って増強した。

これに対し、KCC2 の遺伝子発現は生後1日では僧帽細胞にのみ見られ、顆粒細胞では生後14日で観察された。KCC2 の遺伝子発現は各々の神経細胞の成熟の程度と正の相関を示していた。

嗅球顆粒細胞における GABA 応答については、100 μM の GABA を投与することにより、生後1日と6日では細胞内 Ca²⁺は著明に上昇したが、生後 14 日では上昇しなかった。生後 6

日から14日の間にKCC2の発現誘導が生じ、GABAの応答性が興奮から抑制へと変化したことを示している。

その他の部位においてもKCC2の発現を検討したが、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。

4. 皮質形成異常群では8例すべてで形成異常部のNAA/Cr比が対側正常部位より有意に低値を示した。またCho/Cr比は病変部で有意に高値を示した。

一方band heterotopiaの皮質と皮質下灰白質での比較では、NAA/Cr比はほぼ同等であり、Cho/Cr比は異所性灰白質部で高値を示した。

皮質形成異常部のNAA/Cr比が低値であったことは、次のように考えられる。異常組織の細胞密度自体は正常皮質と同等であるが、異常な形態を示す未分化な神経細胞を含んでいる。NAAは成熟神経細胞に特異的に存在する物質であり、神経細胞の未熟性を示唆すると考えられた。

D. 考察

乳幼児期に生じるけいれんは難治てんかんの主要な部分を占める。てんかんの難治化には、興奮系の亢進と抑制系の未熟さが背景にあると推測し、研究を進めた。このために難治てんかんを呈する先天代謝異常症であり、てんかん症候群の特殊症候群の一つでもあるグリシン脳症のモデルマウスを開発し検討した。

このマウスの検討では、脳内グリシン濃度と電撃によるけいれんの持続時間の間には有意な正の相関が認められ、脳内の高グリシン環境がけいれんを悪化させることが明らかとなった。グリシン脳症ではGCSが欠損しており、そのため脳内にグリシンが蓄積する病態がその本質である。このように病態の物質的背景が明らかであり、この事実と易けいれん性の検討は、新生児期から激裂なけいれんをきたす病態の解明に資すると思われる。

本疾患モデルマウスでは、著明な脳形成異常が認められたが、形成異常が脳機能異常の基盤として重要であることが推測される。

またラット胎生脳におけるGCS遺伝子は神経幹細胞の豊富な部位に強く発現しており、神経発生に本酵素が重要な役割を担っていることを想定させる。

新生児ラットに微量のカイニン酸を注入すると、注入部位周辺に皮質形成異常が生じることが明らかになり、この部位ではベンゾジアゼピン受容体の減少を認めた。神経系における抑制系の低下が局所性てんかん放電に関与していることが推測され、幼若期では抑制系の未熟性、不完全性が主要状態であると考えられた。

本モデルでも脳の形成異常が証明され、脳形成異常が幼若期けいれんのキーワードとして重要である。

一方、興奮-抑制系に重要な因子となっているクロライドコトランスポーターの発達期脳での検討では、細胞内から外へのクロライドの汲み出しを司るKCC2mRNAが、幼若期ラットでは十分に発現せず、生後14日で発現してくることが明らかとなった。

このことは幼若期では、クロライドの細胞内から外への汲み出しが十分に機能せず、細胞内クロライド濃度が高く、コトランスポーターが作動するとクロライドが細胞内から外へと流出し、脱分極すると考えられる。生後14日では全く逆の現象が観察されることが予測される。神経細胞は脱分極するとCa²⁺チャネルが開き、細胞内Ca²⁺が上昇することが知られている。生後1日と6日のラット嗅球顆粒細胞にGABAを投与すると細胞内Ca²⁺は著明に上昇したが、14日目では上昇しなかった。幼若期ではGABA応答が興奮性であり生後14日を過ぎると抑制性へと変化すると考えられた。すなわち幼若期ではGABAが興奮性作動物質としての役割を持つということになる。

今後グリシン脳症モデルマウスおよびカイニン酸注入ラットの脳でのクロライドコトランスポーターmRNAの発現を検討し、これらのモデルでより興奮に偏っていることを証明する予定である。

ヒト皮質形成異常部位では、細胞の未熟性が認められ、神経細胞の発達過程で起こるべき神経伝達物質受容体のスイッチング現象の

遅延が想定された。これは動物実験の結果と合わせ、今後切除標本で確認していく必要がある。またそのための基礎資料として重要である。

E. 結論

グリシン脳症モデルマウス、カイニン酸微量注入新生仔ラット、新生仔ラットのクロライドコトランスポーターの解析から、幼若期には興奮性伝達が勝っており、抑制性伝達はまだ備わっていないことが推測され、これが幼若期での易けいれん性と強く関与していることが考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakata Y, Owada Y, Sato K, Kojima K, Hisanaga K, Shinka T, Suzuki Y, Aoki Y, Satoh J, Kondo H, Matsubara Y, Kure S. Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Mol Brain Res* 2001;94:119-30

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* 2001;46:378-384.

Nakazawa T, Satoh J, Takahashi K, Sakata Y, Ikehata F, Takizawa Y, Bando S, Housai T, Li Y, Chen C, Masuda T, Kure S, Kato I, Takasawa S, Taniguchi T, Okamoto H, Toyota T. Complete suppression of insulinitis and diabetes in NOD mice lacking interferon regulatory factor-1. *J Autoimmun* 2001;17:119-125

Aoki Y, Haginoya K, Yokoyama H, Iinuma K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y. A novel mutation in glial fibrillary acidic

protein (GFAP) in a patient with Alexander disease. *Neuroscience Lett* 2001;312:71-74

Kudo T, Ikeda K, Oshima T, Kure S, Tammasaeng M, Prasansuk S, Matsubara Y. *GJB2* (Connexin 26) Mutations and Childhood Deafness in Thailand. *Otol Neurotol* 2001;22:858-861

Yang X, Aoki Y, Li X, Sakamoto O, Hiratsuka M, Kure S, Taheri S, Christensen E, Inui K, Kubota M, Ohira M, Ohki M, Kudoh J, Kawasaki K, Shibuya K, Shintani A, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Narisawa K, Matsubara Y, Suzuki Y.

Structure of human holocarboxylase synthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylase synthetase deficiency. *Hum Genet* 2001;109:526-534

Tsuda H, Hashizume K, Sawamura A, Yoshida K, Tanaka T. An experimental model of focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 42(Suppl 7): 223, 2001

Sawamura A, Hashizume K, Yoshida K, Tanaka T. Kainic acid-induced substantia nigra seizure in rats: behavior, EEG and metabolism. *Brain Research*, 911:89-95, 2001

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, Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2001, pp 801-806

- Tanaka T, Hashizume K, Yoshida K, Tsuda H, Hodozuka A, Nakai H.
Surgical treatment of intractable epilepsy: Experimental approach
In: The proceeding of the 2nd International Mt. Bandai Symposium for Neuroscience 2001, (Ed.) K. Watanabe, Ishii Densan Printing Co., Koriyama, 2001, pp 344-346
- Tanaka T, Hashizume K, Sawamura A, Yoshida K, Tsuda H, Hodozuka A, Nakai H.
Nefiracetam: a potent antiepileptic effect on kainic acid-induced focal cortical seizure status in rats.
Epilepsia, 42(Suppl 7): 83, 2001
- Sawamura A, Hashizume K, Tanaka T
Electrophysiological, behavioral and metabolic features of globus pallidus seizures induced by a microinjection of kainic acid.
Brain Research, 935: 1-8, 2002
- Tanaka T, Hashizume K, Sawamura A, Yoshida K, Tsuda H, Hodozuka A, Nakai H.
Basic science and epilepsy: experimental epilepsy surgery.
Stereotact Funct Neurosurg, 2002, in press
- Utsumi M., Ohno K., Onchi H., Sato K. and Tohyama M.
Differential expression patterns of three glutamate transporters (GLAST, GLT1 and EAAC1) in the rat main olfactory bulb
Mol. Brain Res. 92 (2001) 1-11.
- Kanaka C., Ohno K., Okabe A., Kuriyama K., Itoh T., Fukuda A., and Sato K.
The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system.
Neuroscience 104 (2001) 933-946.
- Sugamoto T., Tanji N., Sato K., Fujita H., Nishio S., Sakanaka M., Yokoyama M.
The expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with neovascularization.
Anticancer Res. 21 (2001) 77-88.
- Fujita H., Zhang B., Sato K., Tanaka J., Sakanaka M.
Expressions of neuropilin-1, neuropilin-2 and semaphorin 3A mRNA in the rat brain after middle cerebral artery occlusion.
Brain Res, 914 (2001) 1-14.
- Sakata Y., Owada Y., Sato K., Kojima K., Hisanaga K., Shinka T., Suzuki Y., Aoki Y., Satoh J., Kondo H., Matsubara Y., and Kure S.
Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system.
Mol Brain Res, 94 (2001) 119-130.
- Morita F., Wen T.-C., Tanaka J., Hata R., Desaki K., Sato K., Nakata K., Ma Y.-J., Sakanaka M.
Protective effect of a prosaposin-derived 18-mer peptide on slowly progressive neuronal degeneration after brief ischemia.
J. Cereb Blood Flow and Metab, 21 (2001) 1295-1302.
- Ueki T., Fujita M., Sato K., Asai K.,

Yamada K. and Kato T.

Epidermal growth factor down-regulates connexin-43 expression in cultured rat cortical astrocytes.

Neurosci. Lett. 313 (2001) 53-56.

Kuriyama K., Ohno K., Shu F., Ueki T., and Sato K.

Developmental changes in gephyrin and collybistin mRNA expressions in the rat olfactory bulb.

Dev. Brain Res. 131 (2001) 67-72.

Shu F., Ohno K., Kuriyama K., Wang T., Ueki T., Kanayama N., Sato K.

Developmental changes in Narp and PSD-95 mRNAs in the rat Olfactory Bulb

Dev. Brain Res. 132 (2001) 91-95.

Miyake S., Yamashita T., Taniguchi M., Tamatani M., Sato K., Mitsuda N., Hori O., Yamaguchi A., Tohyama M.

Expression of mitochondrial tricarboxylate carrier TCC mRNA and protein in the rat brain.

Mol. Brain Res. in press.

Mikawa S., Shu F., Wang T., Fukuda A., Sato K.

Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum.

Dev. Brain Res. in press

Aoki, Y., Haginoya, K., Munakata, M., Yokoyama, H., Nishio, T., Togashi, N., Ito, T., Suzuki, Y., Kure, S., Iinuma, K., Brenner, M. & Matsubara, Y.

A novel mutation in glial fibrillary acidic protein gene in a patient with Alexander disease.

Neurosci. Lett. 312: 71-74, 2001.

Haginoya, K., Munakata, M., Yokoyama, H., Kato, R., Tanaka, S., Hirose, M., Ishitobi, M., Kon, K., Yoshihara, Y., Takayanagi, M., Yamazaki, T. & Iinuma, K.

Two successful cases of bromide therapy for refractory symptomatic localization-related epilepsy.

Brain Dev. 24:194-196, 2002.

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、pp832-824, 日本臨床社(大阪) 2001年6月

田中達也、橋詰清隆、中井啓文、程塚 明

「実験てんかんのてんかん外科への寄与」
高倉高朋、菊地晴彦著、先端医療シリーズ16・脳神経外科「機能的脳神経外科の最先端」、

先端医療技術研究所、東京、pp4-11、2002

田中達也、橋詰清隆、津田宏重、加藤宏一、松尾厚子、山本和秀、程塚 明、中井啓文
「21世紀の小児てんかん外科---基礎からのアプローチ」

小児の脳神経、27(1): 1-6, 2002

飯沼一字

小児疾患シリーズ 小児疾患の診断と治療 15
てんかん 臨床医薬 17:677-682, 2001.

2、学会発表

小島加奈子、呉 繁夫、新家利一、横山浩之、広瀬美恵子、青木洋子、鈴木洋一、松原洋一

「ドミナント・ネガティブ変異グリシン脱炭酸酵素の過剰発現による高グリシン血症モデルマウスの作成と解析」
第44回日本先天代謝異常学会総会 久留米 2001年11月8日-10日

佐藤康二

「KCC1, KCC2, NKCC1 遺伝子のラット脳内における発現」

日本神経科学会 2001年

栗山寛奈, 佐藤康二

「発達期嗅球における gephyrin, collybistin 遺伝子の発現」

日本神経科学会 2001年

萩野谷和裕、横山浩之、宗形光敏、広瀬三恵子、吉原康、飯沼一字

「振戦様ミオクローヌスとてんかんを合併した弧発例の2例」

第35回日本てんかん学会 東京 2001年9月27日—28日

大沼晃、小林康子、萩野谷和裕、飯沼一字、戸田達史

「先天性筋ジストロフィーの頭部 MRI 所見:特に脳表レリーフ像および白質異常を中心に」

第43回日本小児神経学会 岡山 2001年6月7日—9日

飯沼一字

「てんかんの薬物療養—薬理学的機序を踏まえて」

第43回日本小児神経学会 岡山 2001年6月7日—9日

石飛真美子、中里信和、山本克哉、飯沼一字

「てんかん波焦点識別における脳磁図の有用性: BCECT の1例」

第43回日本小児神経学会 岡山 2001年6

月7日—9日

宗形光敏、萩野谷和裕、北村太郎、横山浩之、飯沼一字

「光トポグラフィーによる小児てんかんの発作時モニタリング」

第43回日本小児神経学会 岡山 2001年6月7日—9日

加藤里恵、萩野谷和裕、宗形光敏、田中総一郎、横山浩之、高柳勝、山本克哉、飯沼一字

「West 症候群の髄液中炎症性サイトカインの検討」

第43回日本小児神経学会 岡山 2001年6月7日—9日

北村太郎、宗形光敏、萩野谷和裕、飯沼一字

「ラット大脳皮質神経細胞における Phenylethylamine の K⁺電流抑制作用の検討」

第43回日本小児神経学会 岡山 2001年6月7日—9日

富樫紀子、飯沼一字

「小児慢性特定疾患意見書の集計からみた神経・筋疾患の状況」

第43回日本小児神経学会 岡山 2001年6月7日—9日

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

高グリシン血症に伴う中枢神経症状の発症機序 ーグリシン開裂酵素系の発現と遺伝子改変動物の解析ー

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、一戸明子
(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)

研究協力者 佐藤康二
(浜松医科大学解剖学第一講座 教授)

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けいれんや意識障害を引き起こし極めて予後不良である。新生児発症の大部分の症例では、脳梁欠損、小頭症、小脳低形成、脳回異常などの脳形成異常を伴い、高グリシン環境に加え脳形成異常も難治性けいれんの発症に深く関与しているものと推察される。脳形成異常の成因探査のためグリシン脳症の責任酵素であるグリシン解裂酵素系(GCS)の胎生期における発現をin situ hybridization法にて解析したところ、幼弱神経細胞の存在する皮質板、神経上皮細胞、及び終脳基板に強く認められ、GCSが神経幹細胞に存在することが判明した。昨年度作成したCre-loxPシステムを組み込んだグリシン脳症モデルマウスを利用しドミナント・ネガティブ変異酵素を神経幹細胞中で発現させGCS活性を抑制すると、終脳皮質、側脳室、第3脳室、眼胞、鼻部および嗅球の低形成、小脳原基の形成異常、ラトケ嚢、後交連の無形成など広範かつ重篤な脳形成異常を認めた。この結果から、神経幹細胞中に存在するGCSは中枢神経系の発生に重要な役割を演じていることが示唆された。次に、以前作成したグリシン蓄積が軽度のモデルマウスの行動解析を更に進めた結果、昨年度見出した易けいれん性亢進と多動の他、不安様行動の増加を見出した。大脳皮質モノアミン濃度を測定するとグリシン脳症マウスでは、ドパミン、ノルエピネフリン代謝が亢進する一方で、セロトニン代謝が抑制されていた。この結果から、グリシン脳症の軽症型モデルマウスに見られる行動異常は、脳内モノアミン代謝の異常に起因することが示唆された。以上の結果はGCSの生理的役割の多様性とグリシン脳症における中枢神経障害の複雑さを示すものと考えられる。

A. 研究目的

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、グリシンの蓄積をきたす疾患である。患児は新生児期からけいれん重積など重篤な中枢神経障害症状を呈すし、極めて予後不良である。グリシン脳症には小頭症、脳梁欠損、小脳低形成、脳回異常などの脳形成異常を高率に伴う。これらの脳形成異常は、けいれん重積などのグリシン脳症の病態形成に寄与しているものと推察される。本研究ではグリシン脳症に伴う脳形成異常の成因を検索する目的で胎生期における GCS 遺伝子発現を *in situ hybridization* 法にて解析した。次にマウス胎生期に GCS 活性を抑制し、脳形成異常が認められるかどうかを検討した。この実験には、昨年度作成した Cre-loxP システムによりドミナント・ネガティブ (DN) 変異酵素の発現を誘導可能にしたトランスジェニック (Tg) マウスを用いた。

昨年度グリシン蓄積が軽度のグリシン脳症モデルマウスが多動を示し、易けいれん性が亢進している事を示した。今年度は更にモデルマウスの行動解析を進め、行動異常の原因探査の目的で脳内モノアミン濃度の検討とマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングを行い高グリシン環境がもたらす中枢神経系の変化を解析した。

B. 研究方法

1) 実験動物

In situ hybridization 解析には Wistar rat を用いた。胎児における GCS 活性の機能的ノックアウトには昨年度作成した DN 変異酵素の発現を誘導可能にしたモデルマウスを用いた。このマウスには、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質 (GFP) cDNA 下流に置いたトランスジェニック・ベクターが導入されている。このマウスと Cre リコンビナーゼを発現する Tg マウスとを掛け合わせるにより、その胎児で DN 変異酵素が発現し胎児の GCS 活性が抑制される。

十字迷路試験、モノアミン測定、マイクロアレイ検索には脳内グリシンの蓄積が軽度のモデルマウス (系統 #5-3, #10-4)、グリシン濃度が低いマウス (系統 WpCpDNA) の 3 系統を用いた。

2) *In situ hybridization*

胎生 12, 15, 18 日のラットを妊娠子宮より摘出し、直ちにドライアイスで凍結後薄切し標本作製した。GCS 構成酵素である P、T、H 蛋白質をコードする mRNA に相補的なオリゴヌクレオチド (45mer) を ³⁵S にて標識しプローブとして用いた。検出は感光乳剤によるオートラジオグラフィー法にて行った。

3) 組織学的検索

胎生 10 及び 12 日に胎児を摘出し 10%パラホルムアルデヒドにて固定・薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色にて観察した。

4) 高架式十字迷路試験

昨年度作成したグリシン脳症モデルマウス (#5-3, #10-4, WpCpDNA) 及び C57BL 野生型マウス、各 6-10 匹を解析に使用した。5 分間の試験中 open arm と closed arm に位置する時間を測定した。

5) 大脳皮質モノアミン濃度測定

8 週齢マウスの大脳皮質の 10%ホモジェネートを遠心後上清を回収し電子化学型検出装置付高速液体クロマトグラフィー (クーロアレイ、ESA 社) にてモノアミン及びその代謝産物 21 種類を同時測定した。

6) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

脳内グリシン濃度が高い系統 (#10-4) と低い系統 (WpCpDNA)、及び野生型 C57BL マウス (Wt) 各 2 匹の大脳皮質をプールし、total RNA を Qiagen RNeasy kit にて抽出後蛍光色素 Cy3 標識ヌクレオチド存在下に逆転写を行い標識 cDNA を作成する。この標識 cDNA と 5,000 種類の遺伝子検出用のマイクロ・アレイ (3.8K 及び 1.0 K mouse glass array, クロンテック社) とハイブリダイズさせ結合した cDNA の蛍光強度を専用スキャナーで検出した。#10-4, WpCpDNA, Wt 各マウスの差を解析し、Wt との発現が異なる遺伝子を同定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「東北大学における動物実験に関する指針」に則って行った。

C. 研究結果

1) ラット胎生脳におけるGCS遺伝子発現

ラット胎生15日では、GCSは側脳室、中脳水道、第4脳室の各脳室周囲の神経上皮細胞と、将来大脳基底核となる終脳基板に強い発現を認めた。成熟したラットの脳でも、脳室周囲や基底核に属する線状体には、神経幹細胞の存在が報告されており、GCSの局在部位は神経幹細胞の豊富な部位に一致していた。T蛋白やH蛋白が脳実質にも発現を認めたのに対して、P蛋白の発現は神経上皮細胞と終脳基板に限局しており、特に側脳室周囲の大脳へと分化していく部位での発現が、他の脳室周囲よりも強く見られた。

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の解析

Cre-loxPシステムを用いてGCS活性を抑制した遺伝子改変マウスにおいて、5つの系統が胎生致死となった。それらの系統に対して胎子を解析したところ、2つの系統では発生早期に胎子が死亡しており、形態解析は困難であった。3つの系統、14-5、15-3、15-4では、胎生10.5日から12.5日で形態解析が可能であった。いずれの系統においても、変異GLDCを発現してGCS活性が抑制された変異型胎子は、野生型に比べて全体的に小さく、特に頭部が体部に比してより小さかった。組織学的解析において、14-5では変異型胎子は野生型より神経上皮細胞層が縮小していたが、明らかな形成異常は認められなかった。15-3、15-4では変異型胎子に重篤な形成異常が生じていた。脳全体が低形成であったが、終脳に変化が強く認められ、終脳皮質は菲薄化し、側脳室、第3脳室の形成不全を認めた。眼胞、鼻部、嗅球も著明な低形成を呈した。また小脳原基の形成異常を認め、ラトケ囊、後交連が認められなかった。

3) DN変異酵素を持続的に発現させたモデルマウスの解析

マウス系統(#5-3, #10-4, WpCpDNA)、及び野生型C57BLマウス(control)を高架式十字迷路試

験で解析した結果、#10-4, #5-3, control, WpCpDNAの順にopen armに位置する時間が短く脳内グリシン濃度が高くなると不安が増強することが示唆された。

この原因を探る目的でcontrolと#10-4系統マウスの大脳皮質モノアミン濃度を測定したところ、#10-4ではドパミン代謝産物であるDOPAC、エピネフリンとその代謝産物であるVMA濃度が有意に上昇していた。一方、セロトニンの前駆物質であるトリプトファン濃度が有意に上昇していたことから高グリシン環境では、ドパミン・エピネフリン代謝系が亢進する一方、セロトニン代謝系の抑制が示唆された。

マイクロアレイを用いた5,000種類の遺伝子発現の検索では、約30種類の遺伝子の遺伝子発現の変動が認められた。この内、高グリシン・マウスでは発現が減少し、反対に低グリシン・マウスでは発現が強くなる遺伝子が5種類あり、この中にはadenocine A2 receptor遺伝子などの神経伝達物質関連遺伝子が含まれていた。

D. 考 察

今年度の研究で、成獣では主にアストログリアに存在するGCSが胎生期には神経幹細胞や幼弱な神経細胞である神経芽細胞に存在することが明らかになった。このことは、GCSが胎生早期に発現し中枢神経系の発達に重要な役割を果たしていることを示唆している。

次にGCSの構成酵素の一つであるP蛋白質のDN変異酵素を胎生期に発現させGCS活性を抑制し、その影響を調べた。その結果、神経系全体の低形成、終脳皮質の菲薄化、側脳室、第3脳室の形成不全、眼胞、鼻部、嗅球の低形成、小脳原基の形成異常、ラトケ囊、後交連の未形成など広汎かつ重篤な脳形成障害を認めた。このうち神経系全体の低形成、小脳低形成、交連の未形成は、グリシン脳症患者で認められる小頭症、小脳低形成、脳梁欠損にそれぞれ関連する所見と考えられこのグリシン脳症モデルマウスは、本症における脳形成障害の解析に有用な材料となることが示された。

中枢神経系にグリシンの軽度蓄積をきたすモデルの解析では、十字迷路試験により不安様行動の増加が認められた。これらのモデルマウスには多動性が認められることは昨年度報告した。グリシン脳症の遅発型の患児では、多動、

攻撃性亢進、衝動性亢進などの行動異常が報告されており、マウスの示す行動異常と一致する点が多い。行動異常の原因を検索すべく、マウスの大脳皮質モノアミン濃度を測定したところ高グリシンマウスでは、ドパミン・エピネフリン代謝系の亢進とセロトニン代謝系の抑制が認められたため、マウスの行動異常は高グリシン環境により引き起こされたモノアミン代謝異常に起因することが示唆された。更にマイクロアレイによる遺伝子発現の包括的解析により、高グリシン環境で発現が低下し、低グリシン環境で上昇する遺伝子がいくつか見出されておりこれらの遺伝子の解析によりグリシン脳症の病態が一層明らかになっていくものと考えられる。

E. 結論

- 1) GCS は胎生脳で神経幹細胞で発現している。
- 2) 胎生脳でGCS活性を抑制すると脳形成異常を引き起こし、グリシン脳症患者で認められる脳形成異常の所見と共通点が多い。
- 3) グリシン脳症に伴う行動異常は、モデルマウスでも認められた。これらのマウスでは脳モノアミン代謝異常が認められるため、この変化が行動異常の原因であることが示唆された。
- 4) 脳グリシン濃度変化で発現が変化する遺伝子のいくつかを同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表 (欧文)

Sakata Y, Owada Y, Sato K, Kojima K, Hisanaga K, Shinka T, Suzuki Y, Aoki Y, Satoh J, Kondo H, Matsubara Y, Kure S. Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Mol Brain Res* 2001;94:119-30

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* 2001;46:378-384.

Nakazawa T, Satoh J, Takahashi K, Sakata Y, Ikehata F, Takizawa Y, Bando S, Housai T, Li Y, Chen C, Masuda T, Kure S, Kato I, Takasawa S, Taniguchi T, Okamoto H, Toyota T

Complete suppression of insulinitis and diabetes in NOD mice lacking interferon regulatory factor-1. *J Autoimmun* 2001;17:119-125

Aoki Y, Haginoya K, Yokoyama H, Iinuma K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y.

A novel mutation in glial fibrillary acidic protein (GFAP) in a patient with Alexander disease. *Neuroscience Lett* 2001;312:71-74

Kudo T, Ikeda K, Oshima T, Kure S, Tammasaeng M, Prasansuk S, Matsubara Y. *GJB2* (Connexin 26) Mutations and Childhood Deafness in Thailand. *Otol Neurotol* 2001;22:858-861

Yang X, Aoki Y, Li X, Sakamoto O, Hiratsuka M, Kure S, Taheri S, Christensen E, Inui K, Kubota M, Ohira M, Ohki M, Kudoh J, Kawasaki K, Shibuya K, Shintani A, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Narisawa K, Matsubara Y, Suzuki Y. Structure of human holocarboxylase synthetase gene and mutation spectrum of holocarboxylase synthetase deficiency. *Hum Genet* 2001;109:526-534

2) 論文発表 (和文)

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、pp832-824, 日本臨床社(大阪) 2001年6月

3) 学会発表

小島加奈子、呉 繁夫、新家利一、横山浩之、広瀬美恵子、青木洋子、鈴木洋一、松原洋一
「ドミナント・ネガティブ変異グリシン脱炭酸酵素の過剰発現による高グリシン血症モデルマウスの作成と解析」

第 44 回日本先天代謝異常学会総会 (2001 年 11
月 8-10 日久留米)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

a. P 蛋白遺伝子



b. T 蛋白遺伝子

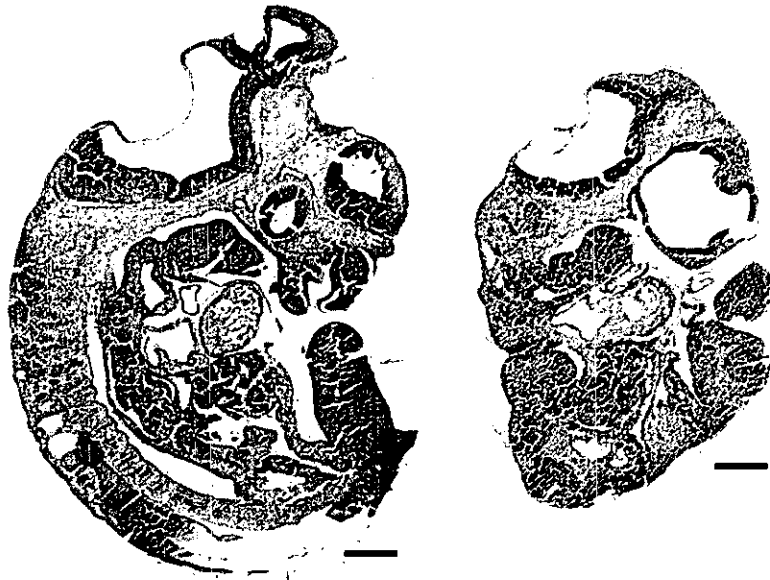


c. H 蛋白遺伝子



<図1> 胎児15日におけるグリシン分解酵素系の発現

胎生15日ラット脳におけるGCSの発現をin situ hybridization法で解析した。T蛋白遺伝子とH蛋白遺伝子の発現は、P蛋白質遺伝子より比較的広範に認められる。脳室周囲など神経幹細胞の豊富な領域では3遺伝子が共通して強い発現が認められる。



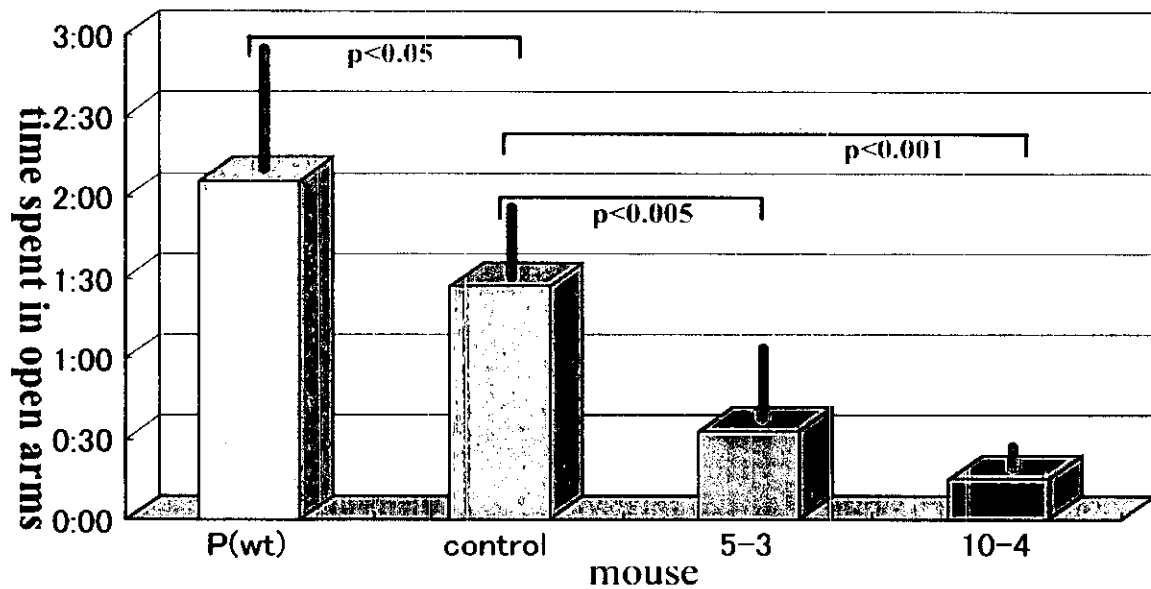
a. 胎生 10 日正常対照(全体像矢状断) b. 胎生 10 日モデルマウス



c. 胎生 12 日正常対照 (頭部矢状断) b. 胎生 12 日モデルマウス

<図 2> グリシン脳症モデルマウス系統 15-4 の胎生期に認められた脳形成異常

胎生 10 日は全体像の矢状断、胎生 12 日は頭部の矢状断を示す(Hematoxyline-Eosin 染色)。皮質板が薄く、腹腔内臓器の発達に比べ神経系の発達が著しく障害されている。



<図3> 高架式十字迷路によるグリシン脳症モデルマウスの解析

縦軸は5分間の試験時間のうち open arm に位置していた時間の合計を示す。脳グリシンの蓄積を認める系統 (#5-3 及び #10-4) では対照マウスに比べ有意に open arm にいる時間が短い。一方、脳内グリシンの低い WpcDNA 系統では、open arm にいる時間が有意に長い。

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形成異常モデルの研究

分担研究者 田中 達也

（旭川医科大学脳神経外科教授）

研究協力者 津田 宏重、橋詰 清隆、松尾 厚子

（旭川医科大学脳神経外科）

研究要旨 新生児ラットの大脳皮質内にカイニン酸を微量注入して作成した大脳皮質形成異常の動物モデルを用いて、異常皮質のてんかん原性メカニズムを解明する目的に、神経抑制系の変化を検討した。神経抑制系の機能は、中枢性ベンゾジアゼピン受容体の agonist である ^{125}I -iomazenil をトレーサーとしたオートラジオグラフィ法を用いて、中枢性ベンゾジアゼピン受容体結合能の変化を調べた。本動物モデルは、電気生理学的には、大脳皮質形成異常が形成された部位から頻発する spike burst が記録されているが、 ^{125}I -iomazenil オートラジオグラフィ法では、同部位にベンゾジアゼピン受容体結合能の減少が認められた。このことから、本モデルで観察された頻発する spike burst は、異常皮質内の抑制系の機能低下が原因であることが推測され、大脳皮質形成異常のてんかん原性の機序を解明するための重要な情報が得られた。今後このモデルを用いて、大脳皮質形成異常のてんかん原性について更なる研究が期待できると思われる。

A. 研究目的

大脳皮質形成異常は、外科治療可能な小児の難治性てんかんの原因として重要な病態であるが、その手術成績は満足できるものに至っていない。大脳皮質形成異常のてんかん原性の発現機序については、病変皮質内の異常な神経細胞の活動や、異常皮質内の興奮性、抑制性連絡の異常が考えられているが、必ずしも明らかにされていない。我々は、生後2日以内の新生児ラットの大脳皮質にカイニン酸を微量注入することで、成熟後(1,2ヵ月後)に限局性皮質形成異常が形成されるモデルを作成することに成功した。しかしながら、本モデルでは局所に頻発する spike burst が記録されたものの、臨床的なけいれん発作は現在まで確認されていない。今回我々は、中枢性ベンゾジアゼピン受容体の agonist である ^{125}I -iomazenil をトレーサーとしたオートラジオグラフィ法を用いて、中枢性ベンゾジアゼピン受容体結合能の変化を調べることで、この大脳皮質形成異常モデルにおける神経抑制系の変化を検討した。

B. 研究方法

1. 大脳皮質形成異常モデルの作成

Wistar rat の新生仔(生後0~2日)を用いて、頭皮上からカイニン酸を $1.0\mu\text{g}$ 、または、 $0.5\mu\text{g}$ を微量注入し、その後、体重200~250gまで成熟させたラットを用いた。この動物モデルの詳細な作成方法は今年の報告書の通りである。

2. ^{125}I -iomazenil オートラジオグラフィ法

カイニン酸を $1.0\mu\text{g}$ 注入したラット2匹、 $0.5\mu\text{g}$ 注入したラット10匹を使用した。1%ハロセン吸入麻酔下で、ラットの一側股静脈にポリエチレンカテーテル(径0.58mm)を挿入・固定し、カテーテルが抜けないようにラットの胴部から後肢をギプスで固定した。麻酔から覚醒後、

^{125}I -iomazenil 3.7MBq をポリエチレンカテーテルより注入し、2時間後に無麻酔下で断頭した。脳を素早く摘出後、ドライアイスで冷却したヘキサン($-30\sim 40^\circ\text{C}$)にて瞬時に凍結した。凍結した脳はクライオスタットを用いて厚さ $20\mu\text{m}$ の冠状断の凍結切片を作製した。この連続切片を 60°C のホットプレート上で乾燥させ、X線フィルム上に連続して配置・密着させ、7日間露光した。露光したX線フィルムから、 ^{125}I -iomazenil オートラジオグラムを得た。フラットヘッドスキャナーを用いてオートラジオグラムをパーソナルコンピューターにデジタル画像として取り込み、画像解析プログラムで以下の部位にROIを設定して optical density (OD) を計測した。

A: カイニン酸注入部の皮質形成異常部

B: 反対側の大脳皮質

C: 左側の脳梁内白質

D: 右側の脳梁内白質

以下の計算式によって、左右の脳梁の平均値に対する皮質のOD値の比を求め、異常皮質と反対側の正常皮質でのこの値を比較し、student t-test を用いて統計学的に検討した。

皮質形成異常: $(A \text{ の OD 値}) / \{(C \text{ の OD 値}) + (D \text{ の OD 値}) / 2\}$

反対側の正常皮質: $(A \text{ の OD 値}) / \{(C \text{ の OD 値}) + (D \text{ の OD 値}) / 2\}$

(倫理面への配慮)

本研究は、旭川医科大学倫理委員会の動物実験倫理指針にのっとり、実験を行った。

C. 研究結果

本動物モデルでは、脳波上は異常皮質部分に一致した局所性の spike burst が記録されているが、依然として臨床発作は観察されないまま経過している。今回の研究である ^{125}I -iomazenil オートラジオグラムでは、カイニン酸注入量が $1.0\mu\text{g}$ 、 $0.5\mu\text{g}$ のいずれのラットにおいても、皮質形成異常が作成された部位での大脳皮質第3、4