

みにれびゅう

てんかん脳における興奮性 GABA シグナリングの役割

小山 隆太

1. 陽イオン-Cl⁻共輸送体と GABA シグナリング

脳内の神経回路ネットワークの機能発現において、各種神経伝達物質による神経細胞の興奮と抑制は、その根本となる。神経細胞群の同期した過剰な発火によって引き起こされるてんかん発作を特徴とする慢性の脳疾患「てんかん」では、神経回路ネットワークの興奮と抑制のバランスが障害を受けている。神経伝達物質として広く認知されているγ-アミノ酪酸 (GABA) は、GABA_A 受容体 (Cl⁻チャンネルを形成する) に結合して神経細胞への Cl⁻の流入出を引き起こす。また、陽イオン-Cl⁻共輸送体 (cation-chloride cotransporters: CCCs) が、GABA_A 受容体を介した Cl⁻電流や電位応答の反転電位 (E_{GABA}) を制御している。その結果として、CCCs は、GABA の神経細胞に対する作用 (興奮か抑制か) に強く影響を及ぼす。現在までに、CCCs のうち特に二つのメンバーの研究が精力的に進められてきた。その一つは神経細胞特異的 K⁺-Cl⁻共輸送体アイソフォーム 2 (KCC2) であり、もう一つは神経細胞およびグリア細胞に発現が確認される Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体アイソフォーム 1 (NKCC1) である¹⁾。神経細胞の細胞膜を介した Cl⁻の電気化学的勾配はこれらの CCCs によって制御されている。すなわち、Na⁺-K⁺-ATPase (Na⁺ポンプ) によって形成された Na⁺/K⁺勾配を利用して、KCC2 は Cl⁻を細胞外へ排出し、NKCC1 は Cl⁻を細胞内へ流入させる。興味深いことに、幼若な神経細胞においては、相対的に NKCC1 の発現量が高く、KCC2 の発現量が低いため、細胞内の Cl⁻濃度が高い。発達に伴い、神経細胞における KCC2 の発現量は上昇し、細胞内 Cl⁻濃度は減少する (図 1)。このことが、GABA が幼若神経細胞に対しては興奮性に働き、成熟神経細胞に対しては抑制性に働くことの一因となる²⁾。なお、これから紹介していくように、てんかん脳の一部の神経細胞では幼若な神経細胞のように、NKCC1 の発現量が高

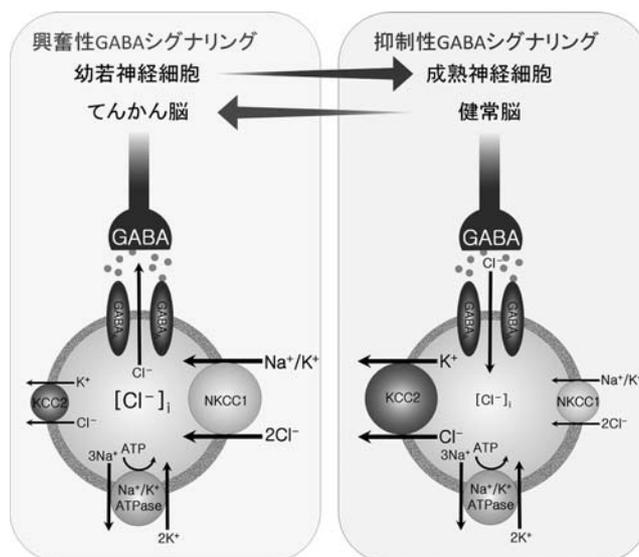


図 1 陽イオン-Cl⁻共輸送体と GABA シグナリングの関係

く、KCC2 の発現量が低くなり、GABA が興奮性に働いている可能性が示唆されている (図 1)。

これまでに、CCCs の阻害薬であり、ループ利尿薬として使用されるフロセミド (furosemide, 非特異的 CCC 阻害薬) やブメタニド (bumetanide, 低濃度において NKCC1 特異的阻害薬) が、抗てんかん作用を発揮することが実験動物学および臨床学的に示されてきた。特に、筆者らはラット複雑型熱性けいれんモデルを利用して、ブメタニドが抗てんかん原生獲得作用を有し、将来のてんかん発症を抑制することを示した³⁾。本稿では NKCC1 と KCC2、そしてこれらの共輸送体によって生じる興奮性 GABA シグナリングとてんかんの関係を、我々の研究成果を紹介しながら記述する。

2. 神経細胞内 Cl⁻濃度のホメオスタシスの破綻とてんかん

世界には、約 5,000 万人 (約 100 人に 1 人の割合である) ものてんかん患者が存在する。現在のところ、ほぼすべての抗てんかん薬は発作をコントロールする対症療法として用いられており、てんかんの発症自体を防ぐものではな

東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Excitatory GABA signaling in epilepsy

Ryuta Koyama (Laboratory of Chemical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

い。また、患者の約30%では、既存の抗てんかん薬による薬物療法に耐性を示す。このような薬物療法耐性は合併症の発症や、死亡率の増加、そして quality of life (QOL) を低下させる各種の原因につながるため、新規抗てんかん薬の創薬には緊急な必要性がある。また、乳幼児期のけいれんや脳障害後による将来のてんかんの発症、いわゆるてんかん原生の獲得（最初のとてんかん発作が生じる原因となる脳構造や脳機能の変化とその過程）を阻止するための抗てんかん原生薬の開発も重要である。近年、新規の抗てんかん薬のターゲットとして、てんかん脳における神経細胞内 Cl^- 濃度の調節（以下、 Cl^- ホメオスタシスと呼ぶ）が注目されている。

Cl^- ホメオスタシスは、神経細胞内外に Cl^- を流通させる GABA_A 受容体を介した神経伝達に直接関与するため、てんかん脳における神経細胞の過剰な発火に影響を及ぼすと考えられる。通常は、成体脳において GABA が GABA_A 受容体に結合すると、 Cl^- が神経細胞内に流入し、細胞が過分極することで、その活動が抑制される（いわゆる抑制性神経伝達である）。そのため、抑制性 GABA シグナリングの機能不全とてんかんを関連づけるデータは現在までに数多く報告されてきた。実際に、既存の抗てんかん薬には、 GABA の代謝を阻害する薬物（ビガバトリン vigabatrin, チアガピン tiagapine）や GABA_A 受容体を活性化させる薬物（フェノバルビタール phenobarbital, ベンゾジアゼピン benzodiazepine）がある。しかしながら、 Cl^- ホメオスタシスの異常に着目した抗てんかん薬に注目が集まってきたのは最近の話である。 Cl^- ホメオスタシスの異常とてんかんの関連を示唆した最初の報告は、成人の難治性てんかんの大部分を占める側頭葉てんかんの患者の標本を用いた電気生理学的な研究によってなされた⁴⁾。同標本で観察された、神経細胞群の同期した過剰な発火は GABA およびグルタミン酸（興奮性神経伝達物質）のそれぞれの阻害薬で阻止され、 GABA シグナリングが神経細胞の興奮性の上昇に寄与している可能性が示唆された。また、記録が行われた神経細胞の中には、 Cl^- ホメオスタシスに異常を来しているものが確認された。 Cl^- ホメオスタシス異常のより直接的な証拠として、側頭葉てんかん患者の標本で CCCs の mRNA 量とタンパク質量を検証した複数の報告がなされ、てんかん脳内の神経細胞においては、NKCC1 の発現量が増加し、KCC2 の発現量が減少している傾向があることが示された⁵⁻⁷⁾。これらの結果は、てんかん脳において Cl^- ホメオスタシスに異常が生じ、結果として GABA シグナリングが本来の抑制性から興奮性に変化していることを示唆する。しかしながら、 GABA の反転電位は神経細胞ごとに異なり Cl^- ホメオスタシスの変化が細胞間で同一でない可能性があることや、KCC2 発現の低下は一部の神経細胞のみで確認されていること⁸⁾などに注意しなくてはならな

い。

ヒトにてんかん発作が最も頻繁に生じるのは乳幼児期（0歳から小学校就学くらいまで）である。乳幼児期発作は場合によっては将来のとてんかん発症や、認知機能、そして運動機能の障害につながることもあるため、その正確な対処は非常に重要である。乳幼児期におけるけいれん発作を阻止するための抗てんかん薬の新規発見および創薬は緊急を要する。臨床上の大きな問題として、抑制性 GABA シグナリングを増強する類の既存の抗てんかん薬は、成体期のてんかん発作には効果があるが、乳幼児期のてんかん発作に対する効果が弱いという事実があげられる⁸⁾。このような現象には、乳幼児期の脳では GABA シグナリングが興奮性に働く幼若神経細胞が多く存在することが影響している可能性がある。

3. 熱性けいれんによる異所性神経回路の形成

精密に配線された神経回路は脳機能発揮の根本だが、てんかん脳では、神経細胞の局在、神経突起の形態、そしてシナプス形成部位や数などに異常が生じ、異所性神経回路が形成されることがある。異所性神経回路は神経細胞群の同期した過剰な発火を誘導しうるため、異所性神経回路形成のメカニズム解明とその阻止は、てんかん発症の抑制や新規抗てんかん薬の開発につながりうる。

成人の難治性てんかんの大部分を占める側頭葉てんかんでは、歯状回と呼ばれる脳領域が重要な役割を果たす。歯状回は、記憶・学習に関与する脳領域として広く認知されている海馬とともに海馬体の一部を構成する辺縁葉の原皮質である。歯状回は分子層、主要な神経細胞である顆粒細胞を含む顆粒細胞層、そして歯状回門の三層からなる。顆粒細胞層の大部分は密に詰め込まれた顆粒細胞によって構成されており、顆粒細胞層は多種多様な細胞が数多く存在する歯状回門を囲い込んでいる。側頭葉てんかん患者およびその動物モデルでは、顆粒細胞が歯状回門に異所的にクラスターを形成して存在する「異所性顆粒細胞の出現」がしばしば生じる⁹⁾。異所性顆粒細胞は、海馬および歯状回に異所性興奮回路を付加することに加え、自発的かつ律動的なバースト活動を有し、CA3野の錐体細胞のてんかん様のバースト発火と同期することが報告されている⁹⁾。このことから、異所性顆粒細胞は海馬神経回路の興奮性を上昇させることで、てんかん原生獲得に寄与すると推察される。また、海馬依存的な認知機能の障害は側頭葉てんかん患者で報告される重要な合併症だが、異所性顆粒細胞は歯状回依存的な認知行動を障害する可能性が示唆されている¹⁰⁾。

熱性けいれんは、乳幼児に最も頻繁に生じるけいれんであり、多くの場合は良性だが、全体の約30%は発作時間

が15分を超える複雑型熱性けいれんである。そして、成人の側頭葉てんかん患者の30~70%が複雑型熱性けいれんを経験しているという報告がある。また、乳幼児期は、顆粒細胞が歯状回門を移動して顆粒細胞層を形成する時期であり、歯状回の発達において非常に重要な時期となる。このことから、筆者らは、熱性けいれんと異所性顆粒細胞の出現の間に何らかの関連があり、将来のてんかん発症に関与するとの仮説を立て、複雑型熱性けいれんモデルラットを利用して、これを検証した³⁾。その結果、熱性けいれんモデルラットにおいて異所性顆粒細胞が出現し、この現象は自発発作の発症に先行するとともに、異所性顆粒細胞の密度とてんかん発作の発症頻度には有意な相関関係があることを明らかにした。また、以下に述べるように、異所性顆粒細胞の出現には興奮性GABAシグナリングが関与することを発見した。

4. 異所性顆粒細胞の出現における興奮性GABAシグナリングの関与

GABA_A受容体シグナリングは、皮質形成期における細胞移動の制御に重要なことが知られていた。そこで、顆粒細胞の移動にもGABA_A受容体シグナリングが関与する可能性を、GABA_A受容体の阻害薬（ピクロトキシン picrotoxin）または活性化薬（フェノバルビタール）を熱性けいれん誘導後に腹腔内投与することで検証した。その結果、ピクロトキシンが熱性けいれんによる異所性顆粒細胞の出現を抑制した一方、フェノバルビタールは異所性顆粒細胞の数を増加させた。このことは、熱性けいれんによる細胞移動の変化と、その後の異所性顆粒細胞の出現にGABA_A受容体シグナリングが関与することを示唆した。

筆者らはさらに、全身に緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するGFPラット由来の歯状回門切片を野生型ラット由来の海馬切片に挿入して培養する組織片共培養法を確立し、歯状回門から顆粒細胞層へと移動する顆粒細胞を可視化することに成功した。同系において、電気生理学的手法を用いて移動中の顆粒細胞の機能的特徴を調べたところ、これらの細胞は移動中に興奮性GABA_A受容体シグナリングを受けていることが明らかになった。また、熱性けいれんを経験したラット由来の顆粒細胞の細胞膜上に存在するGABA_A受容体（βサブユニット）の発現量が、コントロールラットと比較して有意に上昇していることが明らかになった。さらに、GABA_A受容体の発現上昇は、細胞移動に必須な構造であるリーディングプロセスの成長円錐上で確認されたため、移動中の顆粒細胞の成長円錐に局所的にGABA_A受容体活性化薬のムシモールを処置したところ、コントロールラット由来の細胞では観察されない細胞移動の停止や逆走が誘導された。最後に、組織片共培養系にお

いてタイムラプスイメージングを行ったところ、熱性けいれんを経験した顆粒細胞は、顆粒細胞層に行き着く前に、歯状回門内でしばしば停止や逆走を行って歯状回門内にとどまり、最終的に異所性顆粒細胞になるようすが観察された。重要なことに、この現象はGABA_A受容体の阻害薬で阻止された。

5. 異所性顆粒細胞の出現とてんかん発症の、NKCC1阻害薬による阻止

先述したように、幼若神経細胞においてGABAが興奮性に働く理由の一つは、NKCC1の発現量が高い結果、細胞内のCl⁻濃度が高く保持されるためである。そこで、熱性けいれんラット由来の顆粒細胞の移動制御にNKCC1が関与する可能性を検証した。その結果、GABA_A受容体活性化薬ムシモールの処置による顆粒細胞の移動距離の減少が、NKCC1の阻害薬であるブメタニドを処置すること、または、siRNAを用いて顆粒細胞のNKCC1をノックダウンすることにより阻止された。

最後に、熱性けいれんによる異所性顆粒細胞の出現と将来のてんかん発症の関連を検証した。その結果、熱性けいれんを経験したラットでは、成体期において、海馬の神経細胞群がてんかん様発火をすること、薬物誘導性のけいれんへの感受性が高いこと、そして自発発作を生じることが明らかになった。一連の*in vitro*実験系により、興奮性GABA_A受容体シグナリングによる異所性顆粒細胞の出現の原因がNKCC1であることを突き止めたため、筆者らは、ブメタニドを熱性けいれん誘導後に1週間にわたって処置した。その結果、成体期における異所性顆粒細胞の出現、海馬における神経細胞の過剰な発火、発作閾値の低下、自発発作の発症が抑制され、てんかん発症の阻止に成功した。以上の結果は、歯状回の異所性神経回路の形成を阻止することが、てんかんの発症を抑制することを示すとともに、ブメタニドが抗てんかん原生獲得効果を発揮することを実験的に初めて示した。

6. Cl⁻ホメオスタシスの制御は新規抗てんかん薬のターゲットとなるか

新規抗てんかん薬および抗てんかん原生獲得薬には大きな需要がある。Cl⁻ホメオスタシスを制御する薬物は、特に乳幼児期のてんかん発作を抑制するものとして、強い候補となるだろう¹¹⁾。現在までに、動物モデルを利用して、ブメタニドとフェノバルビタールの併用が、成体期におけるてんかん原生の獲得を抑制できる可能性が示され¹²⁾、臨床的には、薬物療法耐性を示すヒトてんかん患者に対してブメタニドが有効であるとの報告がなされている¹³⁾。一方

で、興奮性 GABA シグナリングは、神経細胞の成熟にも重要な役割を果たすため、その阻害には十分に注意を払う必要がある。実際に、発達期におけるブメタニドの長期投与は皮質形成異常を誘導し、自閉症や統合失調症様の行動を惹起する恐れがあるとの指摘もある¹⁴⁾。また、非常に効果の強い利尿薬であるブメタニドは臨床上的利用には注意を要するし、低カリウム血症を伴うアルカローシスはてんかん発作を誘導する可能性がある¹⁵⁾。また、ブメタニドは生理的 pH 下で電離するため、脳への移行性が低い。これらの問題をクリアし、Cl⁻ホメオスタシスを制御することで抗てんかん作用を発揮する薬物の創薬が期待される。

- 1) Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C., & Kaila, K. (2009) *Neuron*, 61, 820-838.
- 2) Ben Ari, Y. (2002) *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 728-739.
- 3) Koyama, R., Tao, K., Sasaki, T., Ichikawa, J., Miyamoto, D., Muramatsu, R., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. (2012) *Nat. Med.*, 18, 1271-1278.
- 4) Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M., & Miles, R. (2002) *Science*, 298, 1418-1421.
- 5) Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., & Rivera, C. (2007) *J. Neurosci.*, 27, 9866-9873.
- 6) Munoz, A., Mendez, P., DeFelipe, J., & Alvarez-Leefmans, F. J. (2007) *Epilepsia*, 48, 663-673.
- 7) Palma, E., Amici, M., Sobrero, F., Spinelli, G., Di Angelantonio, S., Ragozzino, D., Mascia, A., Scoppetta, C., Esposito, V., Miledi, R., & Eusebi, F. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 8465-8468.
- 8) Bonifacio, S.L., Glass, H.C., Peloquin, S., & Ferriero, D.M. (2011) *Nat. Rev. Neurol.*, 7, 485-494.
- 9) Scharfman, H., Goodman, J., & McCloskey, D. (2007) *Dev. Neurosci.*, 29, 14-27.
- 10) Myers, C.E., Bermudez-Hernandez, K., & Scharfman, H.E. (2013) *PLoS ONE*, 8, e68208.
- 11) Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., & Staley, K.J. (2005) *Nat. Med.*, 11, 1205-1213.
- 12) Brandt, C., Nozadze, M., Heuchert, N., Rattka, M., & Loscher, W. (2010) *J. Neurosci.*, 30, 8602-8612.
- 13) Eftekhari, S., Mehvari, H.J., Najafi, Z.M., Hashemi Fesharaki, S.S., Gharakhani, M., Mostafavi, H., Joghataei, M.T., Beladimoghadam, N., Rahimian, E., & Hadjighassem, M.R. (2013) *Epilepsia*, 54, e9-12.
- 14) Wang, D.D. & Kriegstein, A.R. (2011) *Cereb. Cortex*, 21, 574-587.
- 15) Loscher, W., Puskarjov, M., & Kaila, K. (2013) *Neuropharmacology*, 69, 62-74.

著者寸描

●小山隆太 (こやま りゅうた)



東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室助教。博士 (薬学)。

■略歴 2001年に東京大学薬学部を卒業。06年に同大学院薬学系研究科にて博士号を取得し、薬品作用学教室助手に就任。10～13年までハーバード大学医学校ボストン小児病院にて学術振興会海外特別研究員として研究の後、現職。

■研究テーマと抱負 将来、重篤な脳疾患に繋がる神経発達障害の、細胞生物学的メカニズムの解明を目的とした研究をおこなうとともに、これをターゲットにした創薬という夢を有します。また、謎の多いマイクログリアの、神経系発達への関与に興味を持っております。

■ウェブサイト <https://sites.google.com/site/ryutakoyama2/home>

■趣味 筋トレ。