

研究成果報告書

グルタミン酸輸送蛋白による GABA 合成能修飾機序の解明と てんかん性病態仮説の検証

(課題番号 16591146)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 植田 勇人

宮崎大学医学部助教授

目次

はしがき	p1
研究組織・研究経費	p2
研究発表	
[1]学会誌（著書・原著）	p4
[2]国際学会プロシーディング	p7
[3]国内学会プロシーディング	p8
[4]国際学会	p9
[5]国内学会	p11
研究目的	p14
研究成果	p16
[1] PTZ キンドリング	p18
[2] PTZ キンドリング完成後のグルタミン酸-GABA シナプス 関連蛋白のキンドリング完成後の発現変化	p19
[3] GTRAP ノックダウンにおけるキンドリング発展	p20
[4] GTRAP ノックダウン後の海馬における グルタミン酸関連蛋白の発現変動	p21
[5] GTRAP3-18 ノックダウンにおける PTZ 誘発性 全身けいれん	p22
[6] GTRAP3-18 ノックダウンにおける PTZ 誘発性 全身けいれん前後のグルタミン酸と GABA の変動	p23
発表論文	p28

はしがき

グルタミン酸作動性興奮系シナプス伝達とγ-アミノ酪酸(GABA)作動性抑制系シナプス伝達間の不均衡についての解析はてんかんの機序解明を進める上で重要な作業仮説である。GABAはグルタミン酸を前駆物質として合成されるため、抑制系を担うGABA合成能そのものが、グルタミン酸トランスポーター機能によって修飾を受けている。

さらに近年、GABA作動性神経のpre-synapse上に確認されているニューロン型グルタミン酸トランスポーターEAAC-1のノックダウン操作がGABA合成能を減弱させ、けいれんを惹起する結果が示され、グルタミン酸-GABA系間の強力な機能的linkageが証明された。GABA合成能を左右する膜蛋白であるEAAC-1は、グルタミン酸トランスポーター機能調整因子(Glutamate transporter associated protein; GTRAP3-18)により抑制的に制御されている。GTRAP3-18は、グルタミン酸とEAAC-1の結合性を制御する蛋白であり、その役割解明はてんかん研究において支持されてきた興奮系-抑制系間の不均衡を解釈していくうえで、重要な蛋白である。現時点ではてんかん焦点および周囲組織でGABA抑制系を凌駕するグルタミン酸の機構昂進にて誘導される均衡崩壊説が強く支持されている。本研究では、キンドリング形成におけるGTRAP3-18・グルタミン酸・GABA関連蛋白の発現変化や、GTRAP3-18ノックダウンにおけるキンドリング形成の観察から、キンドリング形成の背景にある興奮系-抑制系間の不均衡説を再検討した。PTZキンドリング完成後、GTRAP3-18発現低下の長期持続が特徴的であったため、アンチセンス法を用いてGTRAP3-18ノックダウン操作を行い、てんかん原性獲得・けいれん変化やグルタミン酸・GABA動態を観察した。

その結果GTRAP3-18ノックダウン群ではけいれん閾値の低下とキンドリングの早期完成とともに、海馬グルタミン酸・GABA濃度の基礎値上昇がマイクロダイアリースによって観察された。GABA基礎値上昇は、GTRAP3-18発現低下によってEAAC-1経由のグルタミン酸再取り込みが昂進し、GABA合成能が促進された帰結であると考察した。PTZキンドリング完成後にはGTRAP3-18発現低下が長期間にわたり持続し、GTRAP3-18ノックダウン操作でも、けいれん閾値の低下とキンドリングの早期完成を見たことから、GTRAP3-18の低下はpro-convulsantとして作用するものと考えられた。

てんかんを内在する個体からその自発けいれんが突発性に出現し、必

ず発作が自動的に終焉し発作間歇期を迎える現象を同時に説明するうえでも、キンドリング完成後におけるけいれん準備状態維持に対する説明においても、グルタミン酸神経の機能昂進に加えて、その同期発射を保證する GABA 抑制系昂進によって裏打ちされる興奮系と抑制系間の病的均衡を伴う神経ネットワークの再構築が不可欠であると考察した。

研究組織

研究代表者：植田 勇人（宮崎大学医学部助教授）

研究分担者：土井 拓（宮崎大学医学部助手）

研究分担者：中島 暉（宮崎大学医学部助教授）

研究経費

平成 16 年度 1,700 千円

平成 17 年度 1,500 千円

計 3,200 千円

研究発表

[1]学会誌 (著書・原著)

1. Hayashi Y, Ueda Y, Nakajima A, Mitsuyama Y: EPR evidence of hydroxyl radical generation as an initiator of lipid peroxidation in amyloid beta-protein-stimulated PC12 cells, *Brain Res*, 1025 (1-2): 29-34, 2004.
2. 植田 勇人: てんかん性病態におけるグルタミン酸の神経興奮毒性制御機構に関する包括的研究 - グルタミン酸トランスポーターのレドックス感受性とその分子機構 -, てんかん治療研究振興財団研究年報「研究褒賞受賞記念報告」, 16: 10-16, 2004.
3. Ueda Y: Comprehensive research of glutamate neuronal excitotoxicity in the epileptogenesis: Redox sensing property and molecular regulation of glutamate transporters, *Ann Rev Jpn Epi Res Found*, 16: 11-18, 2004.
4. Ueda Y, Yokoyama H, Tokumaru J, Doi T, Nakajima A: Kinetics of extracellular nitroxide radical and glutamate levels in the hippocampus of conscious rats: cautionary note to the application of nitroxide radical on clinical arena, *Neurochem Res*, 29 (9): 1695-701, 2004.
5. Yokoyama H, Ueda Y, Itoh O, Ikeda T, Noor JI, Ikenoue T: EPR imaging to estimate the in vivo intracerebral reducing ability of mature rats after neonatal hypoxic-ischemic brain injury, *Magn Reson Imaging*, 22 (9): 1305-9, 2004.
6. 植田 勇人: てんかんの仮説と興奮系と抑制系の不均衡仮説, In: 改訂精神疾患100の仮説. 石郷岡 純 (ed): pp264-268 星和書店, 東京, 2004
7. 植田 勇人, 石塚 雄太, 橋口 浩志, 河南 洋, 石田 康: 脳内微小透

析法を用いた神経科学研究-宮崎大学における取り組みを中心に-, 脳と精神の医学, 15 (1): 83-89, 2004.

8. Ueda Y, Willmore LJ: Acquired focal-adult or immature insult-head trauma-bleeding/iron, In: Animal Models of Epilepsy. Pitkanen A, Schwartzkroin T, Moshe SI(eds). pp495-500 Elsevier Inc, Amsterdam, 2005.
9. Doi T, Ueda Y, Tokumaru J, Willmore LJ: Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by clobazam during epileptogenesis in Fe(+++)·induced epileptic rats, Brain Res Mol Brain Res, 142 (2): 91-6, 2005.
10. Nakajima A, Ueda Y: Effect of biosubstances on the depleted uranium-hydrogen peroxide system, Asia-Pacific Symposium on Radiochemistry: (in press), 2005.
11. Nakajima A, Ueda Y, Endoh N, Tajima K, Makino K: Electron spin resonance analysis of the oxidation reactions of nitron type spin traps with gold(III) ion, Can. J. Chem., 83 (8): 1178-1184, 2005.
12. Noor JI, Ikeda T, Ueda Y, Ikenoue T: A free radical scavenger, edaravone, inhibits lipid peroxidation and the production of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain damage of neonatal rats, Am J Obstet Gynecol, 193 (5): 1703-8, 2005.
13. Ueda Y, Noor JI, Nagatomo K, Doi T, Ikeda T, Nakajima A, Ikenoue T: Generation of lipid radicals in the hippocampus of neonatal rats after acute hypoxic-ischemic brain damage, Exp Brain Res: 169(1): 1-5, 2006.
14. Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Nakajima A, Nagatomo K: In vivo evaluation of the effect of zonisamide on the hippocampal redox state during kainic acid-Induced seizure status in rats, Neurochem Res, 30

(9): 1117-21, 2005.

15. Yokoyama H, Morinobu S, Ueda Y: EPR imaging to estimate the in vivo intracerebral reducing ability in adolescent rats subjected to neonatal isolation, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*: (in press), 2005.
16. 植田 勇人: Redox and Epilepsy; 脳とこころの科学. 鶴 紀子 編, pp86-93 新興医学出版社, 東京, 2006.
17. Kojima T, Mukai W, Fuma D, Ueda Y, Okada M, Kaneko S, Sakaki Y: Determination of Genomic Breakpoints in an Epileptic Patient Using Genotyping Array, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(3); 792-6: 2006.
18. 植田 勇人: 「てんかんと脳の成熟」: 第 26 回国際てんかん学会講演紹介, *臨床精神薬理*, 9: in press, 2006.
19. Takatsuru Y, Takayasu Y, Iino M, Nikkuni O, Ueda Y, Tanaka K, Ozawa S: Roles of glial glutamate transporters in shaping EPSCs at the climbing fiber-Purkinje cell synapses, *Neurosci Res*, 54 (2): 140-8, 2006.
20. 植田 勇人, 土井 拓, 中島 暉, 徳丸 潤, 鶴 紀子, 石田 康: キンドリング形成過程におけるグルタミン酸トランスポーター機能調節因子 (GTRAP3-18) の機能解明と GABA 合成能に関する研究, てんかん治療研究振興財団研究年報, in press, 2006.

[2]国際学会プロシーディング

1. Ueda Y, Tokumaru J, Yokoyama H, Hayashi Y, Doi T, Nakajima A, Mitsuyama Y, Ohya-NIhsiguchi H, Kamada H: Evidence of collapse of NMDA-R activation in the hippocampus and epileptic convulsion, *Epilepsia*, 45 (8): 78, 2004.
2. Doi T, Ueda Y, Tokumaru J, Willmore LJ: Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by clobazam during epileptogenesis in Fe⁺⁺⁺-induced epileptic rats, *Epilepsia*, 45 (7): 15-16, 2004.
3. Willmore LJ, Ueda Y, Nakajima A, Tokumaru J, Doi T: Redox state in the hippocampus following epileptogenesis induced by Fe⁺⁺⁺ injection into rat amygdala, *Epilepsia*, 45 (7): 206, 2004.
4. Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Willmore LJ: Alterations of glutamate and GABA transporters in the hippocampus of pentylenetetrazol-kindled rats, *Epilepsia*, 45 (7): 50-51, 2004.
5. Nagatomo K, Ueda Y, Doi T, Takaki M, Tsuru N: GABA transporter expression and kindling development in the GLAST KO mice, *Journal of brain science*, 30: 52, 2004.
6. Ueda Y, Yokoyama H, Noor JI, Doi T, Nagatomo K, Ikeda T, Ikenoue T: EPR imaging to estimate the in vivo intracerebral reducing ability of mature rats after neonatal hypoxic-ischemic brain, *Journal of brain science*, 30: 54, 2004.
7. Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Willmore LJ: Molecular regulations of hippocampal glutamate and GABA transporters in rats treated with levetiracetum, *Epilepsia*, 46: 363, 2005.

8. Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, Willmore LJ: Alterations of glutamate transporters and receptors in the hippocampus of PTZ-kindled rats, *Epilepsia*, 46: 360, 2005.

[3]国内学会プロシーディング

1. 土井 拓, 徳丸 潤, 植田 勇人: クロバザム慢性投与によるグルタミン酸トランスポーターの発現変化, *てんかん研究*, 22 (1): 34-35, 2004.
2. 植田 勇人, Noor JI, 徳丸 潤, 土井 拓, 池田 智明, 池ノ上 克: 新生児低酸素虚血脳症モデルの PTZ けいれん感受性とグルタミン酸輸送蛋白の発現変化, *てんかん研究*, 22 (1): 36-37, 2004.
3. 土井 拓, 植田 勇人, 長友 慶子, 徳丸 潤: PTZ キンドリングにおける海馬グルタミン酸及び GABA トランスポーターの発現変化, *てんかん研究*, 23 (1): 38, 2005.
4. 土井 拓, 植田 勇人, 長友 慶子: PTZ による早期キンドリング完成群と非完成群における海馬グルタミン酸及び GABA トランスポーターの発現比較, *てんかん研究*, 23: 96, 2005.
5. 植田 勇人, 横山 秀克, 中島 暉, 土井 拓, 長友 慶子: 扁桃体電気キンドリングにおける海馬レドックス均衡の脆弱性と評価方法, *てんかん研究*, 23 (1): 37, 2005.

[4]国際学会

1. Doi T, Ueda Y, Tokumaru J, Willmore LJ: Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by clobazam during epileptogenesis in Fe⁺⁺⁺-induced epileptic rats. The 58th Annual Meeting of the American Epilepsy Society, New Orleans, 2004 December 3rd-7th
2. Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Willmore LJ: Alterations of glutamate and GABA transporters in the hippocampus of pentylenetetrazol-kindled rats. The 58th Annual Meeting of the American Epilepsy Society, New Orleans, 2004 December 3rd-7th
3. Willmore LJ, Ueda Y, Nakajima A, Tokumaru J, Doi T: Redox state in the hippocampus following epileptogenesis induced by Fe⁺⁺⁺ injection into rat amygdala. The 58th Annual Meeting of the American Epilepsy Society, New Orleans, 2004 December 3rd-7th
4. Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, Willmore LJ: Alterations of glutamate transporters and receptors in the hippocampus of pentylenetetrazol-kindled rats. 26th International Epilepsy Congress, Paris, France, 2005 August 28th-September 1st
5. Nakajima A, Ueda Y: Effect of biosubstances on the depleted uranium-hydrogen peroxide system. The International Chemical Congress of Pacific basin Societies (Pacifichem 2005), Honolulu, USA, 2005 December 15th-20th
6. Nakajima A, Ueda Y, Watanabe R, Tajima K, Makino K: Effect of biosubstances on the depleted uranium-hydrogen peroxide system. Asia-Pacific EPR/ESR symposium 2004 (APES04), Bangalore, 2004 November 12-15th

7. Nakajima A, Ueda Y: Effect of biosubstances on the depleted uranium-hydrogen peroxide system. Apsorc-05 (Asia-Pacific Symposium On Radiochemistry '05), Beijing, China, 2005 October, 17th-21th
8. Ueda Y, Doi T, Tokumaru J, Willmore LJ: Molecular Regulation of the hippocampal glutamate and GABA Transporters In Rats Treated With Levetiracetam. 26th International Epilepsy Congress, Paris, France, 2005 August 28th-September 1st

[5]国内学会

(特別講演)

1. 植田 勇人:無麻酔における脳内抗酸化能の評価法開発. 第1回抗酸化活性評価に向けたバイオリジカル研究会, 京都, 2004年12月22日
2. 植田 勇人:ダイアリーシス-EPR法を用いた脳内レドックスの *in vivo* 解析. 第9回ESRフォーラム, 京都, 2005年6月18日
3. 植田 勇人:てんかんにおけるけいれん履歴と酸化ストレス. 第48回広島てんかん懇話会, 広島, 2005年3月26日
4. 植田 勇人:てんかん性病態におけるレドックス. 神経科学会議「シンポ'04」, 宮崎, 2004年6月11-12日

(一般講演)

1. 土井 拓, 徳丸 潤, 植田 勇人:クロバザム慢性投与によるグルタミン酸、及びGABAトランスポーターの発現変化. 第8回宮崎ニューロサイエンス研究会, 宮崎, 2004年7月10日
2. 土井 拓, 植田 勇人, 長友 慶子, 徳丸 潤:PTZキンドリングにおける海馬アミノ酸トランスポーター発現変化. 第34回日本神経精神薬理学会、第26回日本生物学的精神医学会合同大会, 東京, 2004年7月21日-23日
3. 土井 拓, 植田 勇人, 長友 慶子, 徳丸 潤:PTZキンドリングにおける海馬グルタミン酸及びGABAトランスポーターの発現変化. 第38回日本てんかん学会, 静岡, 2004年9月30日-10月1日
4. 長友 慶子, 植田 勇人, 土井 拓, 高木麻夕子, 鶴 紀子:GLAST欠損マウスにおけるGABAトランスポーターの発現とキンドリング発展. 第31回日本脳科学会, 宮崎, 2004年6月11-12日

5. 長友 慶子, 植田 勇人, 横山 秀克, 中島 暉: 酸化ストレス履歴に伴う脳実質内レドックスの崩壊. 第 26 回日本フリーラジカル学会, 山形, 2004 年 6 月 24-25 日
6. 植田 勇人, 横山 秀克, Noor JI, 土井 拓, 長友 慶子, 池田 智明, 池ノ上 克: 低酸素虚血性脳症モデルラットにおける脳内還元能の電子スピン共鳴画像法による分析. 第 31 回日本脳科学会, 宮崎, 2004 年 6 月 11-12 日
7. 植田 勇人, 長友 慶子, 徳丸 潤, 土井 拓: キンドリング形成に対する海馬レドックス変動の影響. 第 26 回日本フリーラジカル学会, 山形, 2004 年 6 月 24-25 日
8. 植田 勇人, 中島 暉, 横山 秀克: ラジカル暴露に伴う脳内レドックス均衡に関する検証実験. 第 34 回日本神経精神薬理学会、第 26 回日本生物学的精神医学会合同大会, 東京, 2004 年 7 月 21 日-23 日
9. 植田 勇人, 横山 秀克, 中島 暉, 土井 拓, 長友 慶子: 扁桃体電気キンドリングにおける海馬レドックス均衡の脆弱性と評価方法. 第 38 回日本てんかん学会, 静岡, 2004 年 9 月 30 日-10 月 1 日
10. 植田 勇人, 中島 暉, 土井 拓, 長友 慶子, 横山 秀克: 扁桃体キンドリングにおける海馬レドックス均衡の酸化的脆弱性. SEST04', 東京, 2004 年 11 月 11-12 日
11. 土井 拓, 植田 勇人, 長友 慶子: PTZ による早期キンドリング完成群と非完成群における海馬グルタミン酸及び GABA トランスポーターの発現比較. 第 39 回日本てんかん学会, 旭川, 2005 年 10 月 13-14 日
12. 植田 勇人, 森信 繁, 長友 慶子, 土井 拓: 母仔分離ストレス暴露ラットにおけるてんかん原性獲得と分子機構. 第 39 回日本てんかん学会, 旭川, 2005 年 10 月 13-14 日

13. 植田 勇人, 土井 拓, 中島 暉, 徳丸 潤, 鶴 紀子, 石田 康: キンドリング形成過程におけるグルタミン酸トランスポーター機能調節因子 (GTRAP3-18) の機能解明と GABA 合成能に関する研究. 財団法人てんかん治療研究振興財団研究報告会, 2006 年 3 月 3 日

研究目的

てんかん性病態の生化学的解釈としては興奮系を代表するグルタミン酸(Glu)作動性神経の機能増強と抑制系を代表するGABA作動性神経の機能崩壊に起因する不均衡仮説が現在も強く指示されている。この仮説では、グリア型グルタミン酸トランスポーターGLAST, GLT-1の機能低下によりグルタミン酸の細胞興奮毒性が亢進し興奮系の増強が生じる一方で、GABA合成能の低下により抑制系の崩壊が生じ電気生理学的な均衡バランスが保持されず、てんかん発作が生じると説明されている(Meldrum, *Epilepsy Res.*, 2000)。

従来これら興奮系と抑制系の基礎研究は個別に進行しており、両機能間の相互作用に着目した研究は見られなかったが、近年ニューロン型のグルタミン酸トランスポーターであるEAAC-1はGABA上にも分布していることが判明し、その結果GABAニューロンはEAAC-1経路で細胞内に取り込んだグルタミン酸を基質としてGABAを再合成していることが明らかにされ、EAAC-1は興奮系機能ばかりではなくGABA抑制系機能をも修飾する重要な輸送蛋白として注目されるに至った。このEAAC-1経路のGABA合成系の存在は、今までに知られていなかった興奮系と抑制系間の機能的相互作用の介在を指摘するものであり、興奮系と抑制系が各々独立しててんかん性病態に関与していたとする従来の不均衡仮説を改めて見直す必要性を提示しているものであり、速やかに解明すべき課題である。EAAC-1は、グルタミン酸トランスポーター発現調整因子であるGTRAP3-18によって抑制的に発現が制御されているため、EAAC-1によるGABA合成能修飾機序の全貌を解明するためには、GTRAP3-18に支点を置いた実験系を組み立てる必要がある。

そこで本申請ではGTRAPノックダウンを行ったラットに対しキンドリング操作を行いいれん準備状態の獲得過程を観察することで、GTRAP3-18の興奮系と抑制系間に対する電気生理学的影響を考察する。またこの影響がどのような分子生物学的背景にて生じているのかを調べるために、GLAST, GLT-1, EAAC-1, Glu受容体などの海馬興奮系制御蛋白やGABAトランスポーター、GABA-A, B受容体、GABA分解酵素(GABA-T)、GABA合成酵素(GAD)など抑制系制御蛋白の発現変化を明らかにする。さらに、測定系全体をオンライン化したマイクロダイアリース法と高時間分解能を誇る測定系をもちいてグルタミン酸並びにGABAトランスポーターとGABA合成能に関する機能的修飾性を

も生化学的に検討する。これら一連のデータを基にして興奮系・抑制系の機能的相互関連とグルタミン酸輸送蛋白による GABA 合成能修飾機序を明らかにする。

興奮系と抑制系の基礎研究は従来、個別に進行したため、両機能の相互作用に着目した研究は見られなかった。当該申請研究の学術的特色はグルタミン酸神経伝達を終焉させる EAATs と GABA 合成能の機能的相互関連性に着目した点にあり、Glu-GABA 不均衡仮説を新たな視点から眺め直す斬新性を内包している。また従来の科研費で申請者らが明確化し国外雑誌に発表してきた EAATs 発現低下と Glu の過剰放出(J. Neurochem, 2001)などの考察に加えて、グルタミン酸トランスポーターと GABA 抑制系の相互作用が明らかにされることで、てんかん性病態を包括的に考察していくことが可能になる。GTRAP3-18 ノックダウン操作によって、EAAC-1 発現が増加、その帰結として GABA 合成能が増大し抑制系が強化されるならば、キンドリング発展は抑制されると予測される。このような電気生理学的検証と分子生物学的検証が行われることで、興奮系と抑制系間に介在する機能的相互作用がさらに明確にされ、基礎てんかん・臨床てんかん学に重要な情報を提供する。またてんかん性病態ばかりでなく Glu の細胞興奮毒性に由来する脳虚血・低酸素脳症・筋萎縮性側索硬化症などにも新たな研究視点を提供する。

上記にも指摘したように、Glu 作動性の興奮系と GABA 作動性の抑制系の機能的相互作用を検討した研究は少なかったが、ニューロン型 EAAC-1 のノックダウンが GABA 合成能を減弱させ、けいれんを誘発するという現象が Rothstein, J. らによって Science など権威ある雑誌に発表されて以来、EAATs によって再取り込みされた Glu から再合成される GABA に注目が集まるようになった。さらに EAAC-1 は、GTRAP3-18 により抑制的に制御されている (Lin, C., Nature, 2001) ことから、グルタミン酸-GABA 系間には存在する強力な機能的相互作用の介在が予測されているが、GABA 合成能やてんかん性病態に対する GTRAP3-18 の直接的な実験検証は未だ存在しない。

研究成果

【緒言】

グルタミン酸作動性興奮系シナプス伝達とγ-アミノ酪酸 (GABA) 作動性抑制系シナプス伝達間の不均衡仮説はてんかんの機序解明を進める上で重要な作業仮説となっている[3,5,6,9]。GABA はグルタミン酸を前駆物質として再合成されるため、抑制系を担う GABA 合成能そのものが、グルタミン酸トランスポーター機能によって修飾を受けている[11]。Rothstein JD らが行った EAAC-1 ノックダウン実験でけいれん誘発現象が確認され、そのけいれん誘発の原因として EAAC-1 経由の GABA 再合成低下が提唱されてきた[11] [12]。彼らの研究はグルタミン酸-GABA 系間の強力な機能的 linkage を示すものとして注目に値する。GABA 合成能を左右する膜蛋白である EAAC-1 は、グルタミン酸トランスポーター機能調整因子 (Glutamate transporter associated protein; GTRAP3-18) により抑制的に制御されている[7]。GTRAP3-18 はグルタミン酸と EAAC-1 の結合性を制御する蛋白であり、てんかん研究において支持されてきた興奮系-抑制系間の不均衡を解釈していくうえでも、重要な蛋白である。現時点でもてんかん焦点および周囲組織の生化学的病理として GABA 抑制系を凌駕するグルタミン酸の機能昂進で形成される均衡崩壊説が強く支持されている。本研究では、キンドリング形成における GTRAP3-18・グルタミン酸・GABA 関連蛋白の発現変化や、GTRAP3-18 ノックダウンにおけるキンドリング形成の観察から、キンドリング形成の背景にある興奮系抑制系間の不均衡説を再検討した。

【方法】

本実験は宮崎大学動物実験委員会（承認番号 1998-158-8）の認可を得て行った。

1. PTZ キンドリングと PTZ 誘発全身けいれん

実験動物には7週令の SD 系雄性ラットを用いて、実験目的を遂げるために、PTZ キンドリングと PTZ 誘発全身けいれんの二種類のモデルを用意した。

1-1. PTZ キンドリング; PTZ (40 mg/kg, 16 mg/ml) を隔日、腹腔内投与し、Becker, A. [2]による分類で stage5 が連続2回出現した時点でキンドリング完成とした。また同時に PTZ 投与時におけるけいれん出現潜時、けいれん持続時間を計測した。

1-2. PTZ 誘発全身けいれん; GTRAP3-18 ノックダウンによって海馬グルタミン酸と GABA 濃度にどのような変化が生じているかを観察するため、PTZ 投与量 50mg/ml 腹腔内投与を用いて、全身けいれんを誘発した。

2. キンドリング完成後におけるグルタミン酸-GABA シナプス関連蛋白の発現変化
キンドリング完成後 24 時間、4 週間後に各ラットから海馬を摘出し膜蛋白を

SDS-PAGE 上に展開し western blot を行った[14]。対照群には週令数をマッチングさせた sham 操作ラットを用意した。海馬におけるけいれん準備性獲得に関する解析対象蛋白としては、GLAST, GLT-1, EAAC-1 のグルタミン酸トランスポーター, GABA トランスポーター GAT-1, -3 および glutamate decarboxylase (GAD65&67), Glu-R1, -R2, NMDA-R1, -R23 のグルタミン酸受容体, GTRAP3-18 の発現解析を行った。

3. GTRAP3-18 ノックダウン操作

3-1. PTZ キンドリング ; 脳室注入用の 26G ガイドカニューレ先端を左側側脳室上部に慢性留置し, 27G 注入カニューレを用いて脳室内投与を行った。GTRAP3-18 のノックダウンに用いたオリゴ設定は, Lin, CL らの報告に準じた[7]。GTRAP3-18 に対する anti-sense (5'-GAG CGG GGC AAG GGT TCA-3') を脳室内に隔日投与, 平行して PTZ キンドリングを行った。対照群には GTRAP3-18 sense (5'-GTG AAC CTT GCC CGC TC-3') の脳室内投与群を設定した。オリゴ濃度は人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid; aCSF) で $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.8mM) に調整し, $1.5 \mu\text{l}$ を $1 \mu\text{l}/\text{min}$ の速度で脳室内投与を行った。投与時期は, 48 時間毎で GTRAP3-18 sense, anti-sense を isoflurane 麻酔下にて脳室内投与を行った。投与総回数は PTZ キンドリング刺激開始前に 4 回, キンドリング刺激と平行して 3 回, 合計 7 回行った。後半 3 回は, PTZ 投与 3 時間前に脳室内投与を行った。

3-2. PTZ 全身性けいれん ; 海馬腹側部灌流目的のマイクロダイアリース用ガイドカニューレの慢性留置を追加したのち, 3-1 の方法に準じた GTRAP3-18 ノックダウンを行った。投与総回数は計 7 回とした。計 7 回のオリゴ投与終了後, 4mm の I 型プローブを急性留置したのち aCSF を 2 時間灌流した。その後, PTZ 全身性けいれんを誘発しけいれん段階, 潜時, 持続時間を計測した。その後, 15 分毎にマイクロダイアリース試料を回収し, OPA 誘導体化後, HPLC-ECD でグルタミン酸及び GABA のけいれん前後における濃度を測定した[13]。

【結果】

1. PTZ キンドリング 40mg/kgPTZ のキンドリング操作では、図 1 に示す過程でキンドリングが進行し、4 週間のキンドリング刺激休止期間を設けても、全てのラットで stage 5 の再出現が確認された (Fig.1)。

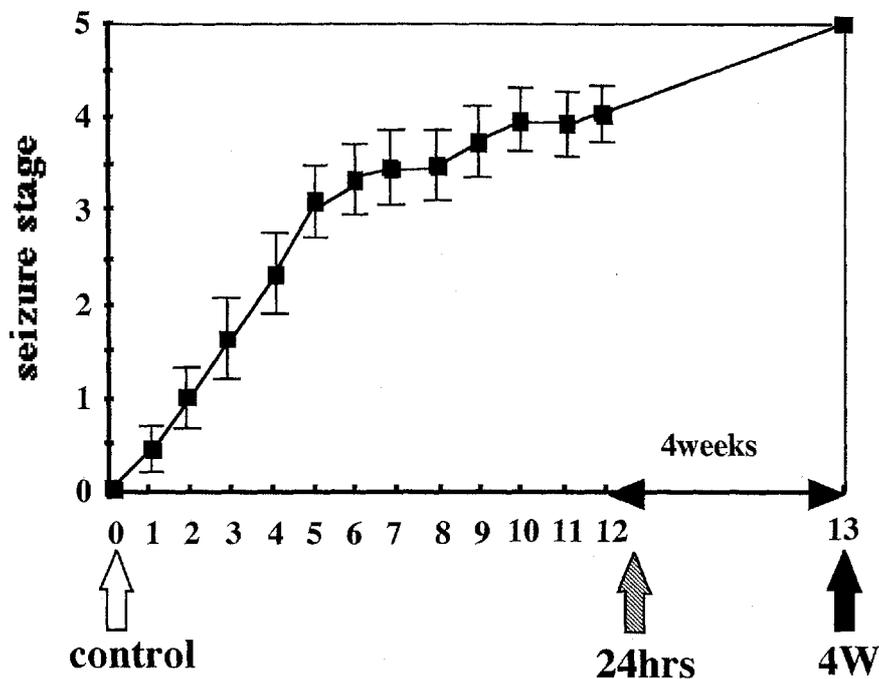
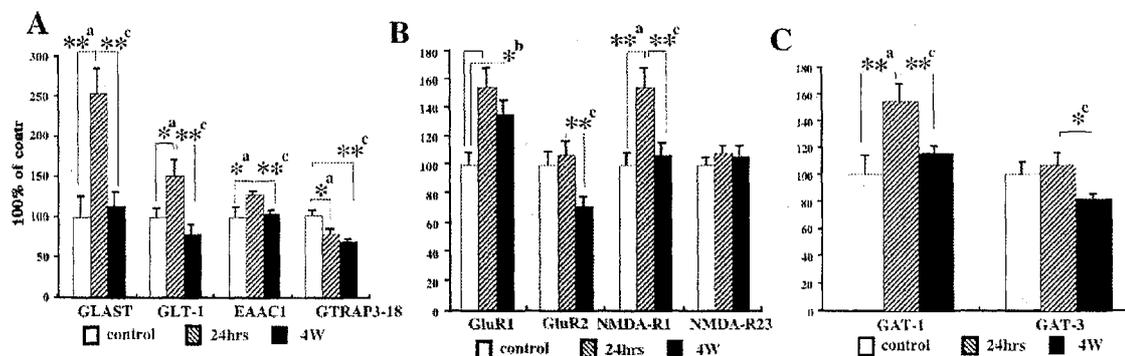


Fig.1

Kindling development and the sustained seizure prone state at 4 weeks after the last PTZ administration. Data represent mean \pm S.E..

次に、無刺激群、キンドリング完成 24 時間、4 週間後が経過したラット海馬を摘出し、



western blot を行った (Fig.2)。

Fig.2

Time-dependent changes in expressions of glutamate transporters (Fig.2A), glutamate receptor (Fig.2B) and GABA transporters (Fig.2C) in the hippocampus of rats with intracerebroventricular injection of sense and anti-sense oligonucleotides

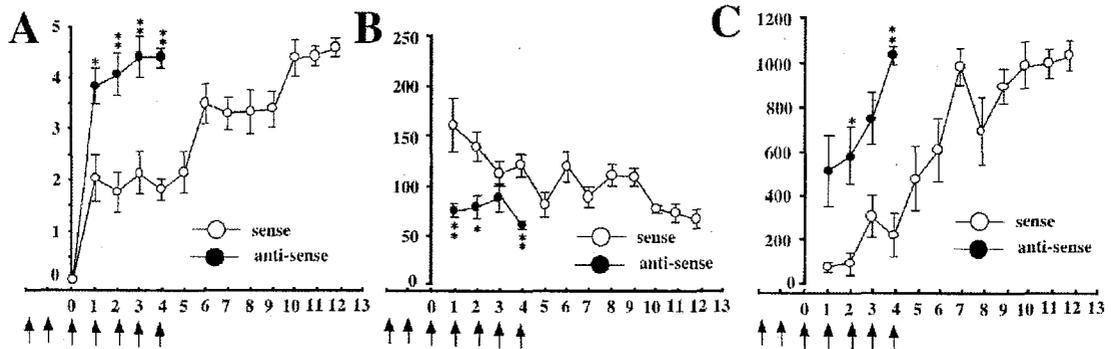
respectively. Statistical analysis was performed by one-way (GROUP effect) ANOVA followed by Newman-Keuls's test for multiple comparisons. Data represent mean \pm S.E.. **aP<0.01, *aP<0.05, values of control vs. values at 24 hrs; *bP<0.01, *bP<0.05, values of control vs. values at 4weeks; **cP<0.01, *cP<0.05, values at 24 hrs vs. values at 4weeks.

2. PTZ キンドリング完成後のグルタミン酸-GABA シナプス関連蛋白の発現変化
キンドリング完成 24 時間後の急性期, GLAST, GLT-1, EAAC1, GAT-1, GluR-1, NMDA-R1 はともに発現上昇を示し, その一方で GTRAP3-18 は発現低下を示した。GAT3 と GluR-2 は対照群と同等の発現を示した。完成 24 時間後発現上昇を示した GLAST, GLT-1, EAAC1, GAT-1, NMDA-R1 は 4 週間後には対照群と同等レベルに回復したが, Glu-R1 との上昇と GTRAP3-18 の低下は 4 W 間以上持続した。急性期には対照群と同レベルであった GAT-3, Glu-R2 は 4 W 間後には減少していた (Fig.2)。

3. GTRAP ノックダウン操作に伴う PTZ 誘発全身けいれん・キンドリング変化

3-1. GTRAP ノックダウンにおけるキンドリング発展 GTRAP ノックダウン群で発作潜時は PTZ 刺激初期から短縮しており, 長い発作持続時間を呈し, キンドリング形成は著しく早期に確立した (Fig.3)。

Fig.3



Schema of the kindling development in rats with intracerebroventricular injection of sense and anti-sense oligonucleotides respectively. Fig.3A represented seizure stage development; Fig.3B, latency; Fig.3C, duration. Statistical analysis was performed by two-way (GROUPSTIMULATION NUMBER effect) ANOVA followed by Newman-Keuls's test for multiple comparisons. Data represent mean \pm SE.. ** P < 0.01, * P < 0.05 compared with corresponding value of sense-injected group

3-2. GTRAP ノックダウン後の海馬におけるグルタミン酸関連蛋白の発現変動 Lin, CLらのノックダウン操作では, 25 μ M GTRAP3-18 anti-sense で処理した HEK293 細胞の EAAC-1 発現には影響なく, GTRAP3-18 発現量が約 50%減少し, その結果 EAAC-1 経由グルタミン酸再取り込みは約 2.5 倍上昇し, またラット脳室投与を mini-osmotic pump で 7 日間行った場合, GTRAP3-18 発現量は 大脳皮質で約 50%減少させるなどの結果が指摘されている[7]。本研究でも, EAAC-1 発現には影響せず GTRAP3-18 発現を約 40%減少させるなど, 蛋白発現に及ぶ影響に関して共通結果をみた。その他, GLT-1 は有意に減少していたが, GLAST, GAD65&67 発現には影響しなかった。このことから, GTRAP3-18 anti-sense により, EAAC-1 経由のグルタミン酸再取り込みは上昇し, その結果 GAD 非依存性に GABA 再合成が促進されている可能性が示唆された (Fig.4)。

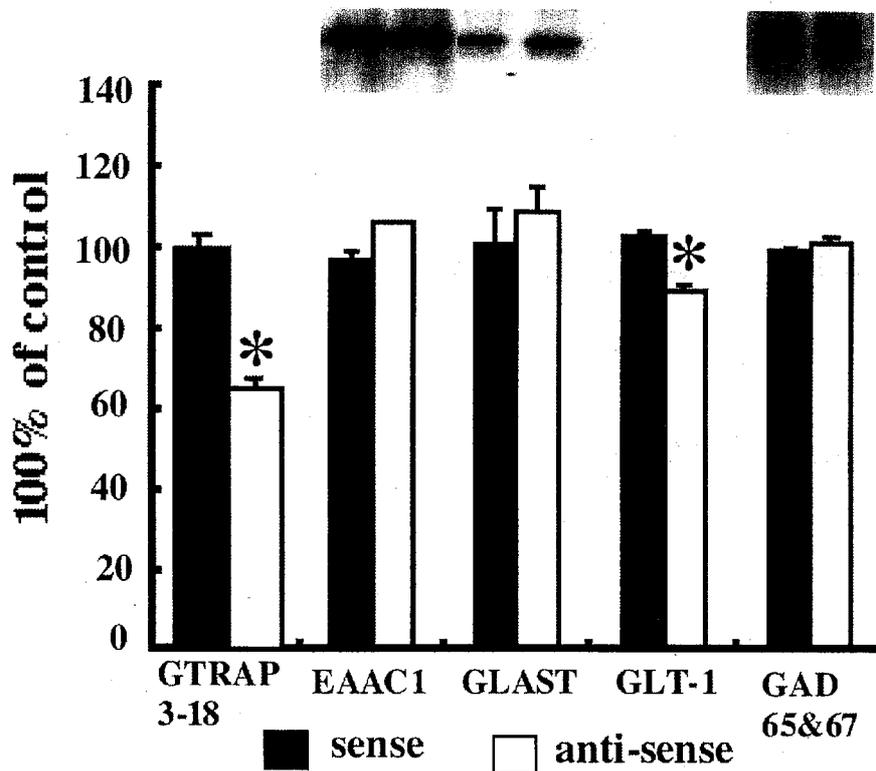


Fig.4

Alterations in the glutamate transporters and GAD65&67 in the hippocampus of rats injected with sense and anti-sense. Inserted figures indicate representative western blots of each protein expression, respectively. Data represent mean \pm S.E.. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U- test. *P<0.05 vs. values of sense-injected group

3-3. GTRAP3-18 ノックダウンにおける PTZ 誘発性全身けいれん PTZ 全身けいれんはともに観察されたが、GTRAP3-18 anti-sense 投与群で早期にけいれんが出現し持続時間も長く、sense 群と比較しそれぞれ有意差を認めた (Fig.5)。

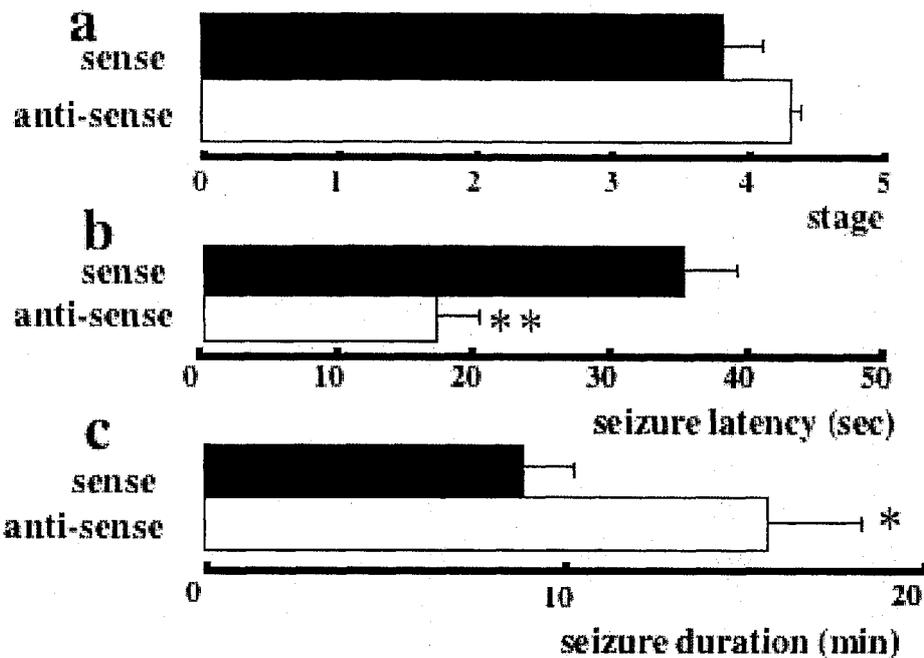


Fig.5

Alterations in stage (Fig.5a), latency (Fig.5b) and duration (Fig. 5c) of convulsion induced by 50mg/kg PTZ systemic administration. Data represent mean \pm S.E.. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. values of sense-injected group.

3-4. GTRAP3-18 ノックダウンにおける PTZ 誘発性全身けいれん前後のグルタミン酸と GABA の変動

anti-sense 群と sense 群におけるグルタミン酸並びに GABA 基礎値を比較すると, anti-sense 群でグルタミン酸・GABA 細胞外濃度は有意に高値を示した。anti-sense 群においても sense 群においても, 全ラットで全身けいれんが観察された。sense 群のグルタミン酸は刺激前に比べ緩やかな上昇を認め、anti-sense 群でのグルタミン酸上昇は, 全身けいれん終焉後から一過性の巨大上昇が観察された。GABA 動態では anti-sense 群・sense 群ともに緩やかな上昇をみた (Fig.6)。

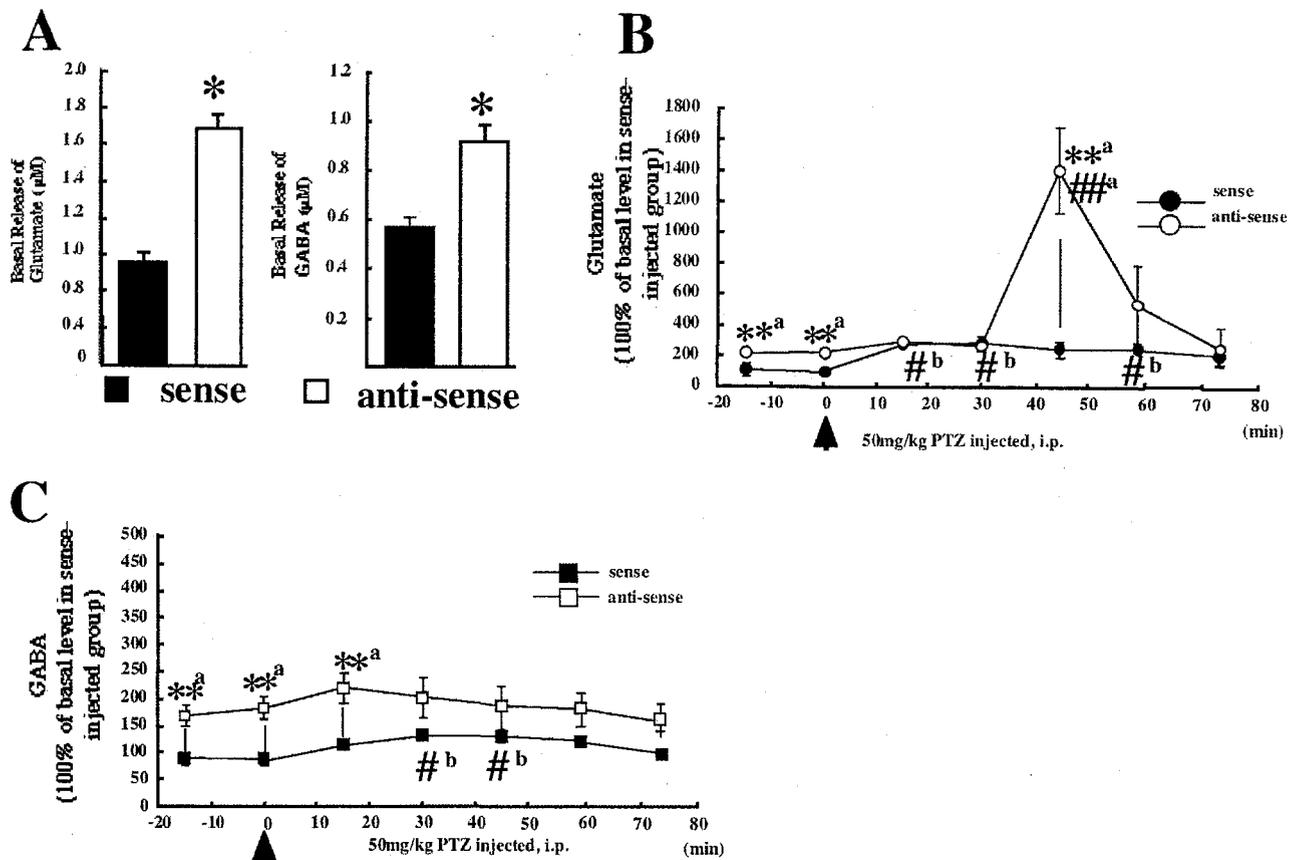


Fig.6 Time-dependent changes in extracellular glutamate (Fig.6.B) and GABA (Fig.6C) concentration following systemic PTZ administration in rats injected oligonucleotides with sense and anti-sense respectively. Statistical analysis was performed by two-way (GROUPTIME effect) ANOVA followed by Newman-Keuls's test for multiple comparison. **aP<0.01, *aP<0.05 compared with corresponding value of sense-injected group; ##aP<0.01, #bP<0.05 compared with corresponding value at pre-PTZ injected in each group. Fig. 6A show the basal release of hippocampal glutamate and GABA in each group. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. *P<0.01 vs. values of sense-injected group. Data represent mean \pm S.E.. in each figure.

【考察】

PTZ キンドリング完成後のけいれん準備性長期維持には、グルタミン酸作動性神経を主体とするてんかん性回路の強化とその同期発射システムが必要である。グルタミン酸代謝昂進を示唆する NMDA 型グルタミン酸受容体やグルタミン酸トランスポーターの

発現昂進などが、海馬を中心とした神経細胞死と再生・再構築を同時に促進し、てんかん性回路形成の基本的な分子基盤を形成すると考察した。一方 GABA 抑制系に関しては、キンドリングモデルやてんかん患者死後脳を用いた研究で、GABA 神経の脱落が極めて少ないことを示唆する報告から [1] [4,8], てんかん原性獲得後の GABA 抑制系は比較的温存されると考えられている。また PTZ キンドリングに伴うマイクロダイアリースによるアミノ酸研究でも、本研究同様にグルタミン酸・GABA とともに上昇する傾向が報告されている [10]。本研究結果であるキンドリング慢性期の GTRAP3-18 発現低下は EAAC1 経路の GABA 合成亢進を通じ、発作形成に向けて強化されたグルタミン酸神経系ネットワークの同期発射を促す分子機構であると推測した。GTRAP3-18 アンチセンス実験によるキンドリング形成の促進は EAAC1 の機能上昇により GABA 合成が促された結果、同期発射しやすいシナプス環境がキンドリング形成に促進的に関与したと考察した。キンドリング慢性期の Glu-R1 発現上昇や Ca^{++} 流入を抑制制御する Glu-R2 の発現低下なども、キンドリング完成後のグルタミン酸作動性神経回路の易刺激性や興奮状態に係わる背景分子機構と考えられた。鉄塩外傷性てんかんモデルやカイン酸てんかんモデルの慢性期でグルタミン酸トランスポーター低下が見いだされ (従来の研究成果), キンドリングでは観察されないことから、グルタミン酸トランスポーターの低下に伴うグルタミン酸の細胞興奮毒性の亢進や GTRAP3-18・GABA トランスポーター発現低下などの膜蛋白発現変化が、自発性けいれんに結びつく と推測された。

【まとめ】

PTZ キンドリング完成後には GTRAP3-18 発現低下が長期間にわたり持続し、GTRAP3-18 ノックダウン操作でも、けいれん閾値の低下とキンドリングの早期完成を見たことから、GTRAP3-18 の低下は proconvulsant として作用するものと考えられた。ノックダウン群では、海馬グルタミン酸・GABA 濃度の基礎値上昇がマイクロダイアリースによって観察された。これらの結果は、EAAC-1 経路のグルタミン酸再取り込みが昂進され、GABA 合成能が促進された帰結である。てんかんモデルである“キンドリング”完成とそのけいれん準備状態維持並びに、てんかんにおける発作間歇期の存在と自発けいれんの突発性出現を同時に説明するには、グルタミン酸神経の機能昂進に加えて、その同期発射を保証し発作停止を可能にする GABA 抑制系昂進を内包する均衡崩壊が不可欠であると考察した。

Summary

Summary

The functional role of glutamate transporter associated protein (GTRAP3-18) in the epileptogenesis induced by PTZ-kindling

Yuto Ueda, MD, PhD

As well known the knockdown EAAC-1 by anti-sense induces epileptic convulsion in rats, EAAC-1 is important protein to connect glutamate re-uptake with GABA synthesis. It is important study to elucidate the role of glutamate transporter associated protein 3-18 (GTRAP3-18), because GTRAP3-18 inhibitory regulates the glutamate re-uptake through EAAC-1 into GABAergic neurons. In this study, suppression of GTRAP3-18 protein expression was long-lasting after PTZ kindling, and GTRAP3-18 knockdown by anti-sense method decreases seizure threshold and accelerates the kindling phenomena. Hippocampal glutamate and GABA basal release in GTRAP3-18 knockdown group higher rather than those of sense-injected group suggested knockdown of GTRAP3-18 promotes GABA synthesis. Sustainance of high seizure susceptibility in the PTZ kindled state and the existence of inter-paroxysmal period could be explained by synchronization of glutamatergic neuron caused by the enhanced GABAergic system.

【文 献】

- [1] T.L. Babb, J.K. Pretorius, W.R. Kupfer and P.H. Crandall, Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus, *J Neurosci* 9 (1989) 2562-2574 ISSN: 0270-6474.
- [2] A. Becker, G. Grecksch, W. Thiemann and V. Holtt, Pentylentetrazol-kindling modulates stimulated dopamine release in the nucleus accumbens of rats, *Pharmacol Biochem Behav* 66 (2000) 425-428.
- [3] M. Dutuit, M. Touret, R. Szymocha, A. Nehlig, M.F. Belin and M. Didier-Bazes, Decreased expression of glutamate transporters in genetic absence epilepsy rats before seizure occurrence, *J Neurochem* 80 (2002) 1029-1038.
- [4] C. Freichel, U. Ebert, H. Potschka and W. Loscher, Amygdala-kindling does not induce a persistent loss of GABA neurons in the substantia nigra pars reticulata of rats, *Brain Res* 1025 (2004) 203-209.
- [5] E.M. Ingram, S. Tessler, N.G. Bowery and P.C. Emson, Glial glutamate transporter mRNAs in the genetically absence epilepsy rat from Strasbourg, *Brain Res Mol Brain Res* 75 (2000) 96-104.
- [6] D. Kondziella, J. Hammer, O. Sletvold and U. Sonnewald, The pentylentetrazole-kindling model of epilepsy in SAMP8 mice: glial-neuronal metabolic interactions, *Neurochem Int* 43 (2003) 629-637.
- [7] C.I. Lin, I. Orlov, A.M. Ruggiero, M. Dykes-Hoberg, A. Lee, M. Jackson and J.D. Rothstein, Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18, *Nature* 410 (2001) 84-88.
- [8] X. Liu and L.S. Leung, Partial hippocampal kindling increases GABAB receptor-mediated postsynaptic currents in CA1 pyramidal cells, *Epilepsy Res* 57 (2003) 33-47.
- [9] K. Morimoto, M. Fahnstock and R.J. Racine, Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain, *Prog Neurobiol* 73 (2004) 1-60.
- [10] L. Rocha, M. Briones, R.F. Ackermann, B. Anton, N.T. Maidment, C.J. Evans and J. Engel, Jr., Pentylentetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems, *Epilepsy Res* 26 (1996) 105-113.
- [11] J.D. Rothstein, L. Martin, A.I. Levey, M. Dykes Hoberg, L. Jin, D. Wu, N. Nash and

- R. W. Kuncel, Localization of neuronal and glial glutamate transporters, *Neuron* 13 (1994) 713-725.
- [12] J.P. Sepkuty, A.S. Cohen, C. Eccles, A. Rafiq, K. Behar, R. Ganel, D.A. Coulter and J.D. Rothstein, A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy, *J Neurosci* 22 (2002) 6372-6379.
- [13] Y. Ueda and N. Tsuru, Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling, *Epilepsy Res* 20 (1995) 213-219.
- [14] Y. Ueda and L.J. Willmore, Sequential changes in glutamate transporter protein levels during Fe(3+)-induced epileptogenesis, *Epilepsy Res* 39 (2000) 201-209.