

てんかん発作における GABA_B 受容体機構の
薬理学的研究

石 毛 久美子

てんかん発作における GABA_B 受容体機構の
薬理学的研究

石毛久美子

目 次

緒言	1
マウスにおける GHB によるてんかん発作誘発作用	5
実験方法	5
実験結果	6
考察	11
小括 1	12
GABA _B 受容体の性状および GHB の GABA _B 受容体に対する作用	13
実験方法	13
実験結果	15
考察	27
小括 2	29
GHB モデルマウスにおける転写調節因子の誘導	30
実験方法	30
実験結果	35
考察	48
小括 3	50
総括	51
謝辞	53
引用文献	54

緒 言

哺乳類の中枢神経において主要な抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) の受容体は、GABA_A受容体と GABA_B受容体の少なくとも2つに分類されている (1、2)。GABA_B受容体は、ピククリンに感受性のない GABA 受容体として 1981 年に発見されバクロフェンがアゴニストとして結合する (2)。GABA_B受容体は、GABA_A受容体とは異なり、GTP 結合タンパク質と共役しており (3、4)、K⁺チャネルの活性化 (5)、Ca²⁺チャネルの抑制 (6) およびアデニル酸シクラーゼの抑制 (7、8) などにより細胞内に情報を伝達することが示されている。GABA_B受容体は GABA_A受容体に比べ発見が遅く、また、最近まで親和性の高い選択的なアンタゴニストがなかったことなどもあり、その機能には、不明な点が多く残されているが、最近になり、てんかん欠神発作への関与が考えられるようになっている (9、10、11)。

てんかん欠神発作では、けいれんは起こらず、脳波上に棘徐波複合 (spike and wave discharges, SWDs) が出現し、行動の停止、凝視などを伴う。その治療にはエトスクシミドやバルプロ酸などが用いられているが、他のタイプの抗てんかん薬であるカルバマゼピンなどによっては発作が増悪することも知られている。また、その発作発現には視床-大脳皮質回路の関与が示唆されている (12、13)。欠神発作の実験動物モデルには大別して薬物などにより発作を誘発する急性モデルと自発的に SWDs が発現する遺伝的モデルがある。急性モデルの1つである γ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) モデル (10) や遺伝的モデルの1つである lethargic マウス (11) において、GABA_Bアンタゴニストである CGP 35348 が SWDs 出現を抑制し、アゴニストであるバクロフェンがその出現を増強することから、欠神発作発現に GABA_B受容体が関与することが明らかにされた。GHB は Fig. 1 に示したように生体内で GABA から産生され、神経伝達物質やニューロモジュレータとして作用する可能性も示唆されている物質である (14、15、16)。

最近、カイニン酸、ペンチレンテトラゾールまたはピクロトキシン投与によるけいれんの後に c-fos、c-jun および fos-related antigen が誘導されること、および、核内の AP-1 DNA 結合活性の上昇が報告され (17、18、19)、けいれん

発現が転写調節にも影響を与えることが明らかされた。AP-1 は、通常 Fos-Jun などのヘテロ 2 量体であり、核内で標的遺伝子 DNA の AP-1 結合部位 (コンセンサス配列は TGACTCA) に結合し、その遺伝子の転写を調節する。AP-1 DNA と 1 塩基だけ異なるコンセンサス配列 (TGACGTCA) を認識するものとして cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) が示されているが (20)、けいれんによる CREB の誘導は認められていない (20、21)。一方、欠神発作と転写調節因子の関連については、GHB モデルラットで欠神発作発現に伴う Fos タンパクの誘導が報告されているものの (22)、欠神発作と Fos 誘導は関連しないとの報告 (23) もあり、てんかん欠神発作と転写調節因子の関連については統一した見解が得られていない。

本研究においては、てんかん欠神発作発現における GABA_B 受容体の役割を明らかにする目的で、マウスに GHB のプロドラッグである γ -ブチロラクトン (GBL) を投与し、マウスでも GHB モデルが形成されるか否かを検討した後、GHB モデルマウスを用いて GABA_B アンタゴニストの抗てんかん作用を検討した。GHB の GABA_B 受容体に対する作用を受容体結合実験からも検討した。また、欠神発作発現と転写調節因子誘導の関連性について明らかにするため、GHB モデルマウス脳および小脳顆粒細胞初代培養系を用いて核内 AP-1 DNA および CRE 結合活性について検討した。

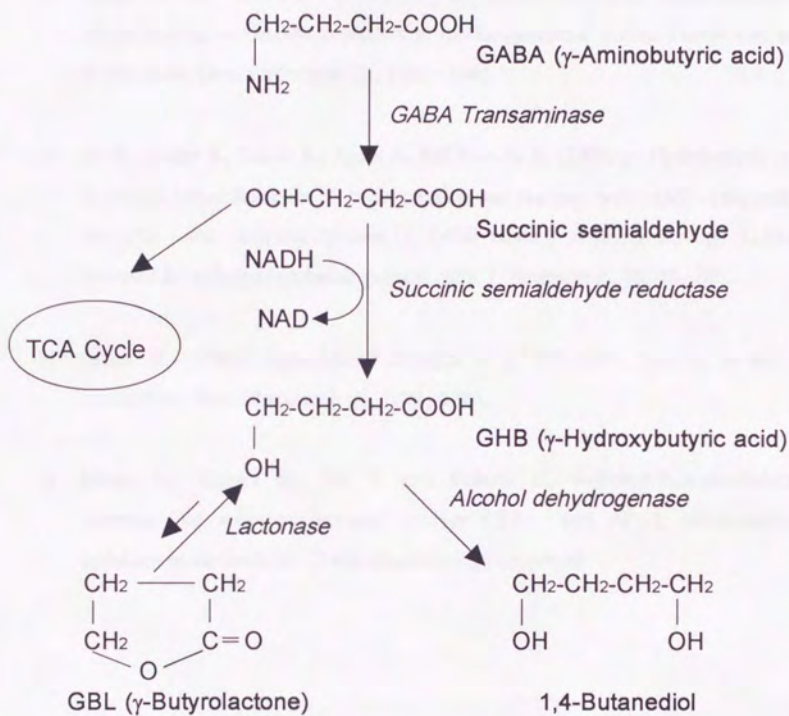


Fig. 1 Metabolic pathway of GABA

本研究の内容は、すでに下記に報告されている。

- 1) Ishige K., Ito Y. and Fukuda H. (1993) Differential effects of Triton X-100 on ligand binding to GABA_B receptors in mouse cerebral cortex, cerebellum and whole brain. *Gen. Pharmacol.* 24, 1533-1540.
- 2) Ito Y., Ishige K., Zaitse E., Anzai K. and Fukuda H. (1995) γ -Hydrobutyric acid increases intracellular Ca^{2+} concentration and nuclear cyclic AMP-responsive element- and activator protein 1 DNA-binding activities through GABA_B receptor in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 65, 75-83.
- 3) Ishige K. (1995) Age-related changes in [^3H]baclofen binding in mouse cerebellum. *Gen. Pharmacol.* 26, 1229-1235.
- 4) Ishige K., Aizawa M., Ito Y. and Fukuda H. γ -Butyrolactone-induced absence-like seizures increase nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities in mouse brain. *Neuropharmacology* (in press)

1. マウスにおける GHB によるてんかん欠神発作誘発作用

てんかん欠神発作発現機構をモデル動物を用いて解明していく際には、1 種のモデル動物での検討にとどまらず、複数のモデル動物の特徴などを比較することも重要であると思われる。薬物誘発モデルとしては、通常、その前駆体である γ -ブチロラクトン (GBL) を投与して欠神様発作症状を誘発させる γ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) モデルがラット (24) やサル (25、26) で報告されており、特に、ラットでは詳細に検討され欠神発作モデルとして有用であると考えられるが、マウスでの報告はない。一方、遺伝的欠神発作モデルとしては、lethargic (11、27)、stargazer (28)、tottering (29、30) の少なくとも 3 種のモデルマウスが報告されており、マウスにおける GHB モデルの作成は、これら遺伝的モデルとの比較検討にとって重要であると思われる。そこで、マウスにおいて GHB モデル動物が作成できるか否かを調べる目的で、マウスにおける GBL の作用を脳波および行動薬理学的な面から検討した。

方 法

脳波測定

ペントバルビタール麻酔下、Zornetzer の方法 (31) に準じて電極を装着した。左右大脳皮質表面に銀電極を接着させ、アース電極として固定をかねたステンレスのねじを鼻骨に埋め込み歯科用セメントで固定した。5 日以上の回復期間をおいた後、無麻酔、無拘束下で脳波を測定した。

自発運動量測定

自発運動量は、測定装置として Digiscan (Omnitech Electronics Inc) を用い、あらかじめケージにならした 1 群 5 匹のマウスで暗期に測定した。

薬物投与

薬物はすべて生理食塩液に溶解し、腹腔内注射した。

使用動物

飼料および水を自由に摂取させた ddY 系雄性マウス (日本エスエルシー、三協ラボサービスより購入) を使用した。

試薬

薬物は以下のものを用いた: GBL (和光純薬工業); GHB (Aldrich Chemical); エトスクシミド (Sigma); CGP 35348 (CIBA-GEIGY 社より供与)。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

結 果

GBL および GHB 投与が脳波に及ぼす影響を調べ、薬物投与 15 分後の典型的な脳波を Fig. 2 に示した。GBL 50 mg/kg の投与では脳波上に変化は認められなかったが、100 mg/kg 投与で、すべてのマウスにおいて 3-6 Hz の棘徐波複合 (spike and wave discharges, SWDs) が出現した。GBL 200 mg/kg ではまず、SWDs が出現したが、間もなく spike and inhibition に移行した。GHB (100 mg/kg) によっても投与 15 分後には SWDs の出現が認められたが、同用量の GBL に比べ作用発現までの時間が長く持続時間は短いなど GHB の SWDs 発現作用は GBL より弱かった。GBL による SWDs の出現は、GABA_B 受容体のアンタゴニストである CGP 35348 (200 mg/kg) 前処置でほぼ、完全に抑制された。GBL が誘発する SWDs の時間経過と欠伸発作治療薬であるエトスクシミド (200 mg/kg) および CGP 35348 (200 mg/kg) 前処置の影響を Fig. 3 に示した。SWDs は GBL 投与 5 分後までに出現し、30 分程度持続した。CGP 35348 前処置は、GBL による SWDs 出現をほぼ完全に抑制した。エトスクシミドも SWDs の出現を有意に抑制したが、その作用は同用量 CGP 35348 よりも弱かった。

GBL (100 mg/kg) を投与したマウスは、投与 3 - 5 分後にほとんど動かなくなり、不動状態は 30 分程度持続した。そこで、行動量測定装置 (Digiscan) により、1 群 5 匹のマウスを用い、暗期に自発運動量を測定したところ、Fig. 4 に示したように、GBL (100 mg/kg) の投与により、投与 5 分後から、自発運動量の著しい減少が認められた。CGP 35348 (200 mg/kg) は GBL 投与による自発運動量の抑制に拮抗したが、単独では自発運動量に影響を与えなかった。GBL による自発運動量抑制の時間経過は SWDs 出現の時間経過とほぼ一致していた。

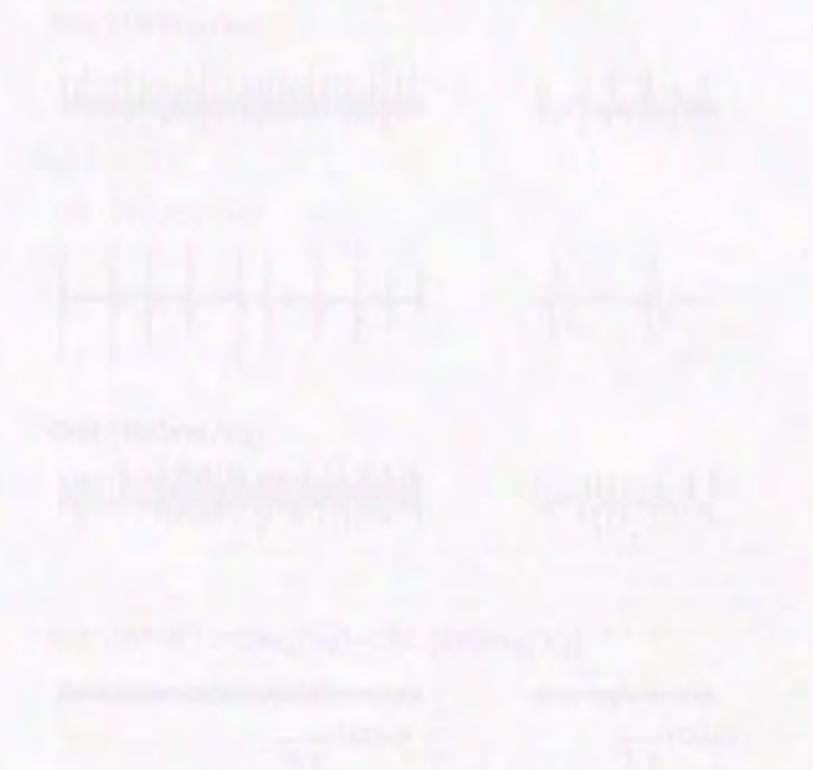
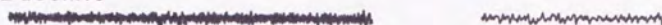
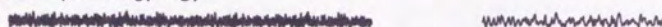


Fig. 4 Digiscan data demonstrating the effect of GBL (100 mg/kg) on spontaneous locomotor activity. The mice were administered saline, GBL, CGP 35348, or GBL in the presence of CGP 35348. The GBL administration significantly reduced locomotor activity, which was partially reversed by CGP 35348. CGP 35348 alone did not significantly affect locomotor activity.

Baseline



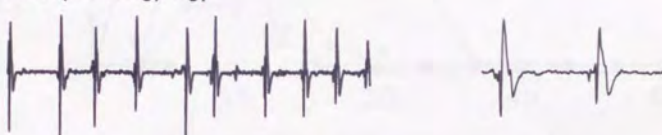
GBL (50 mg/kg)



GBL (100mg/kg)



GBL (200mg/kg)



GHB (100mg/kg)



CGP 35348 (200mg/kg)-GBL (100mg/kg)

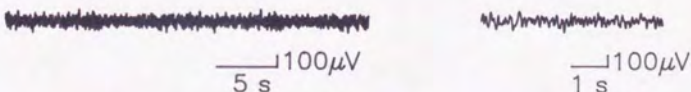


Fig. 2 Representative electrocorticogram (ECoG) of mice. Base line shows the ECoG patten of a naive mouse. CGP 35348 was administered 60 min before GBL injection . ECoG patterns of 15 min after saline, GBL and GHB injection were shown. All ECoGs were recorded between the right and left cortex.

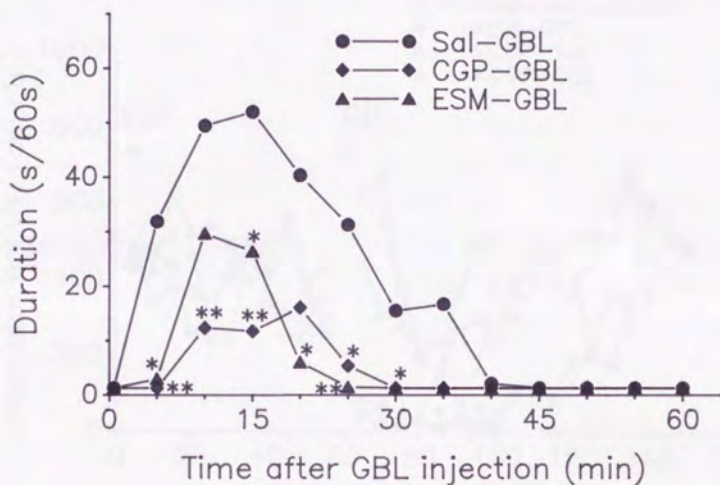


Fig. 3 Effects of CGP 35348 and ethosuximide on GBL-induced spike and wave discharges (SWDs). Duration of SWDs was measured for 1 min of every 5 min. CGP 35348 (200 mg/kg) or ethosuximide (200 mg/kg) was administered 60 min before GBL (70 mg/kg) treatment. Each value represents the mean for four to five different experiments. Statistical significance was determined by Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with GBL alone.

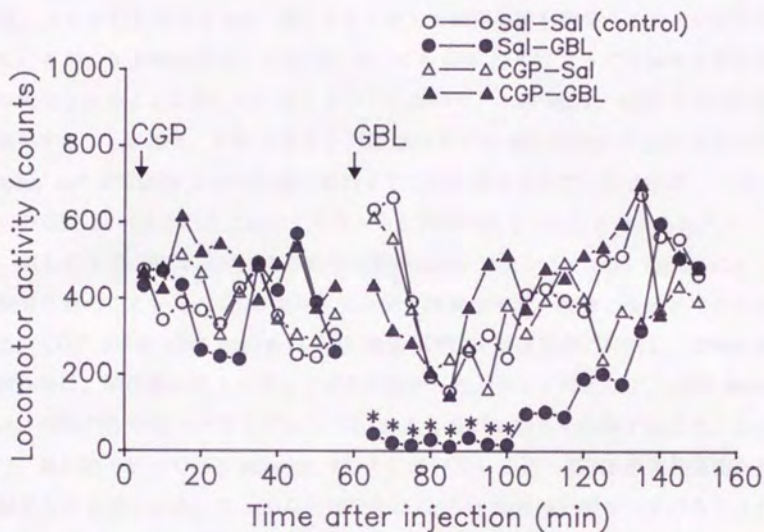


Fig. 4 Effect of GBL on locomotor activity and its antagonism by CGP 35348. First arrow: administration of CGP 35348 (200 mg/kg, i.p.) or saline, Second arrow: administration of GBL (100 mg/kg, i.p.) or saline. Statistical significance was determined by analysis of variance followed by duncan's multiple range test.

* $p < 0.05$ as compared with control.

考 察

てんかん欠神発作では脳波上に SWDs が出現し、行動の停止、凝視などの症状が認められるが、GBL 投与によってマウスにおいても脳波には SWDs が出現し、また、SWDs の出現に伴って行動の停止が認められた。すでに、GBL 投与は、ラット (28) やサル (29、30) でてんかん欠神様発作を誘発することが示されているが、本実験結果は、マウスにおいても GBL 投与によって欠神様発作症状が誘発されることを示している。ラットにおいて、100 mg/kg GBL が SDWs を誘発することに加え、それを超える用量 (200 または 400 mg/kg) の GBL 投与では spike and inhibition という状態に移行することが報告されている (28) が、マウスへの GBL 投与はこの点においてもラットと同様の結果であると考えられる。

GBL による SWDs 出現が欠神発作治療薬のエトスクシミド (200 mg/kg) により抑制されたことから、GBL 投与マウスが欠神発作モデル動物となると考えられる。CGP 35348 (200 mg/kg) は GBL 誘発 SDWs をほぼ完全に抑制し、SWDs 抑制作用は、同用量のエトスクシミドより強かった。ラットにおいて、CGP 35348 は、GBL (10) や R-バクロフェン (31) による SWDs 誘発を抑制すること、および、遺伝的モデルである lethargic マウスにおいても CGP 35348 が欠神発作を抑制すること (11) から、てんかん欠神発作に GABA_B 受容体が関与していることが示されているが、本実験結果もこれまでの報告に一致し、てんかん欠神発作発現に GABA_B 受容体が関与していることを示唆するものであった。

小括 1

- 1) マウスにおいて、GBL 投与により、脳波上に SWDs が出現し、行動の停止が認められた。これらより、マウスにおいて GHB モデルが作成できることが明らかとなった。
- 2) GBL によるてんかん欠神様発作症状は CGP 35348 により抑制された。このことから、欠神様発作発現に GABA_B 受容体が関与することが示唆された。

2. GABA_B 受容体の性状および GHB の GABA_B 受容体に対する作用

GHB がマウス脳膜標品において GABA_B 受容体に親和性を持つか否かを GABA_B アゴニストの [³H] バクロフェンを用いた受容体結合実験で検討しようとしたところ、[³H] バクロフェンの特異的結合に対する非特異的結合の割合の高いことが問題となった。そこで、[³H] バクロフェン結合に対する Triton X-100 (TX) の影響、および、加齢の影響などから GABA_B 受容体結合の性状について検討した後、GHB の GABA_B 受容体に対する作用について調べた。

方 法

膜標品の調製

膜標品の調製は Bowery らの方法 (33) を参考に以下のように行った。マウス全脳または、Glowinski and Iversen (34) の方法で分画した脳各部位を湿重量の 15 倍量の 0.32 M sucrose でホモジナイズし、1,000 x g、10 分間の遠心分離で得た上清を 20,000 x g で 20 分遠心分離した。この沈渣を組織湿重量の 10 倍量の蒸留水で懸濁し、8,000 x g で 20 分の遠心分離後、上清と沈渣の上層をあわせて 48,000 x g、20 分の遠心分離を行い、沈渣を蒸留水で 2 回、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で 1 回洗浄し膜標品とした。加齢による影響の検討には、大脳皮質または小脳を 50 倍量の 50 mM Tris-citrate buffer (pH 7.1) でホモジナイズ後、48,000 x g、10 分の遠心分離を行い、沈渣を同緩衝液で 4 回洗浄し、膜標品とした。膜標品は -70 °C で 24 時間以上凍結後融解し、Tris-HCl buffer (pH 7.4) で懸濁し、48,000 x g、20 分の遠心分離後、-70 °C で 24 時間以上再凍結して実験に用いた。

TX 処置

タンパク濃度が 2 mg/ml となるように 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で懸濁した膜標品と TX を 37 °C で 20 分インキュベートした。48,000 x g、20 分の遠

心分離後、沈渣を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で 2 回洗浄し、TX 処置膜標品とした。

受容体結合実験

[^3H] バクロフェンを放射性リガンドとし、遠心法により行った。膜標品 (タンパクとして 0.6 - 1.0 mg)、10nM [^3H] バクロフェンおよびその他の必要な試薬を含む全量 0.5ml の Krebs-Henseleit solution [143 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)] (KHS) を 20 °C で 10 分インキュベートした。15,000 x g、15 分の遠心分離後、沈渣の表面を冷却した 1 ml の KHS で 2 回すばやく洗浄した。沈渣を Solvable に溶解し、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。全結合量と 1 mM バクロフェン存在下で認められる非特異的結合量の差を特異的結合量とした。Scatchard plot は各種濃度の非放射性バクロフェン (0 - 10 μM) の添加により求め、解析にはコンピュータプログラム (35) を用いた。タンパク定量は、ウシ血清アルブミンを標準品として Lowry らの方法 (36) により行った。

使用動物

飼料および水を自由に摂取させた ddY 系雄性マウス (日本エスエルシー、三協ラボサービスより購入) を使用した。

試薬

薬物は以下のものを用いた: [^3H] バクロフェン, Solvable (New England Nuclear); 2-hydroxysaclofen (Research Biochemicals Incorporated); APPA (Tocris); GHB (Aldrich Chemical); GBL (和光純薬工業); バクロフェン、CGP 35348 および CGP 55845 (CIBA-GEIGY 社より供与を受けた)。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

結 果

マウス全脳膜標品を低濃度 (0.01 - 0.05 v/v%) の TX で処置したところ、特異的結合量は、濃度依存的に増加した (Fig. 5)。TX 処置は、非特異的結合量には影響を与えなかった。 [3 H] バクロフェン結合の Scatchard plot は、曲線となり、高親和性 (K_D 値 147 ± 23 nM、 B_{max} 値 0.94 ± 0.10 pmol/mg protein) と低親和性 (K_D 値 2070 ± 551 nM、 B_{max} 値 2.72 ± 0.32 pmol/mg protein) の 2 つの結合部位を持つことが示された (Fig. 6)。TX 処置後も 2 つの結合部位を示したが、両部位の K_D 値は、高親和性部位 55 ± 19 nM、低親和性部位 1000 ± 256 nM となり、TX 処置による K_D 値の低下が認められた。しかし、最大結合数は両部位とも TX 処置で変化しなかった (Fig. 6)。また、受容体結合実験の際に TX 処置上清を添加すると TX 処置による結合増加は抑制されたが、TX 処置上清の結合抑制効果は、透析により消失した (Fig. 7)。TX 処置の効果がバクロフェンに特異的なものであるかどうかについて数種の GABA_B リガンド (構造式を Fig. 8 に示した) の結合親和性に対する TX 処置の効果を [3 H] バクロフェン結合の阻害曲線から検討したところ、TX 処置は用いた 3 種のアゴニストの IC_{50} 値をいずれも約 1/3 に低下させた。この低下は統計的に有意なものであった。一方、アンタゴニストの親和性は、CGP 35348 のように TX 処置により減少傾向を示すものもあったが、有意な変化は認められなかった (Table 1)。 [3 H] バクロフェン結合に対する Guanylyl-imidodiphosphate (GppNHp) の阻害効果および GppNHp の作用に対する TX 処置の影響を大脳皮質および小脳膜標品を用いて調べたところ、GppNHp は両部位において [3 H] バクロフェン結合を濃度依存的に抑制し (Fig. 9)、両部位の IC_{50} 値 (大脳皮質: 241 ± 37 nM、小脳: 455 ± 50 nM) に有意な差が認められた。両部位とも GppNHp の阻害効果は TX 処置後にも認められ、その IC_{50} 値は未処置膜に比べそれぞれ約 1/2 に低下していた。

加齢の影響について 1、3、8、20 ヶ月齢のマウス大脳皮質および小脳の膜標品を用いて調べたところ、小脳においては 3 ヶ月齢で最も高い結合を示し、8 ヶ月齢以降では結合の減少が認められた (Fig. 10)。また、小脳における TX 処置の効果は 1 ヶ月齢で認められるものの、3 ヶ月齢以降認められなかった。一方、大脳皮質膜標品における [3 H] バクロフェン結合は、1 ヶ月齢から 20 ヶ月齢ま

で加齢による変化は認められなかったが、すべての月齢でTX処置による顕著な結合増加が認められた (Fig. 10)。加齢による変化の認められた小脳膜標品において各月齢膜標品を用いて Scatchard plot を行ったら、1ヶ月齢と3ヶ月齢の Scatchard plot はすべて曲線となり、解析の結果、高親和性と低親和性の2つの結合部位を持つことが示された (Fig. 11、Table 2)。高親和性部位の K_D 値は3ヶ月齢に比べ1ヶ月齢の方が有意に高かった。低親和性部位の K_D 値および両部位の B_{max} 値には差が認められなかった。8ヶ月齢の Scatchard plot は直線に近くなり、6例中3例は1 site モデルよりも2 site モデルにあてはまったが、他の3例は1 site モデルにあてはまった。8ヶ月齢では3ヶ月齢に比較し、 B_{max} 値の減少が認められた。20ヶ月齢における Scatchard plot はすべて直線となり、 B_{max} 値は8ヶ月齢よりもさらに減少していた。

以上の結果を考慮し、1ヶ月齢のマウス脳膜標品を用いて、GHBがGABA_B受容体に対し親和性を持つか否かについてTX処置の効果と併せて検討した。GHBは [3 H] バクロフェン結合を濃度依存的に抑制した (Fig. 12)。その IC_{50} 値はTX未処置膜では 1.279 ± 0.194 mMであったが、TX処置膜では 0.555 ± 0.047 mM となり、TX処置による IC_{50} 値の有意な低下が認められた。GBL (1 mM) は、 [3 H] バクロフェン結合に影響を与えなかった。

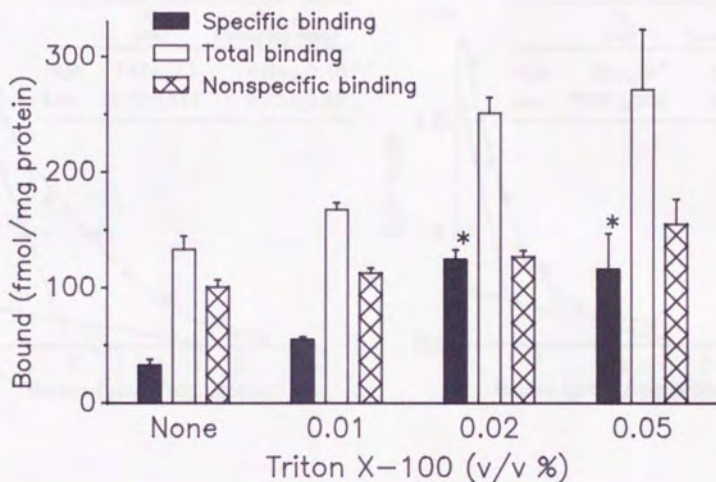


Fig. 5 Effect of membrane pretreatment with Triton X-100 on [3 H]baclofen binding in mouse whole brain. The method of Triton X-100 treatment is described in Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. Statistical significance was determined by Duncan's multiple range test.

* $p < 0.05$ as compared with control (none) value.

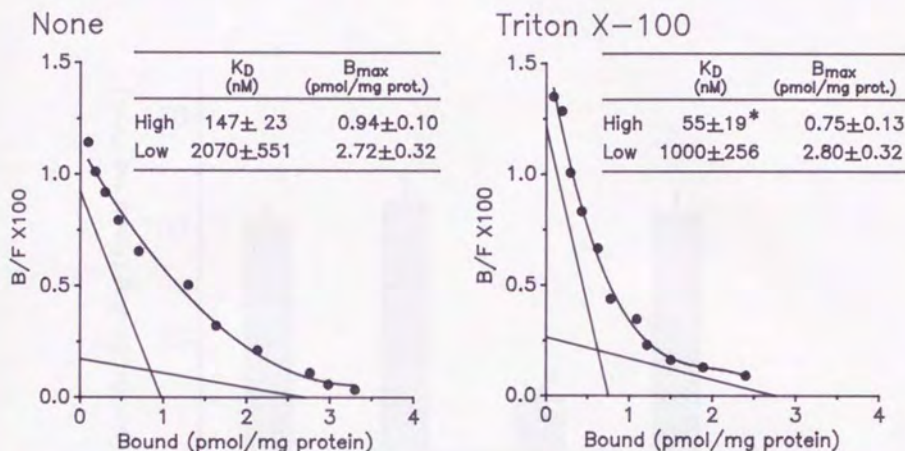


Fig. 6 Representative Scatchard plots of [3 H]baclofen binding to the membranes with or without 0.02 v/v% Triton X-100 treatment in mouse whole brain. Binding assay was performed as described in Methods. LIGAND analysis (35) was used to obtain the K_D and B_{max} values for high- and low-affinity sites. Values represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. Statistical significance was determined by Student's t -test. * $p < 0.05$ as compared with control (None) value.

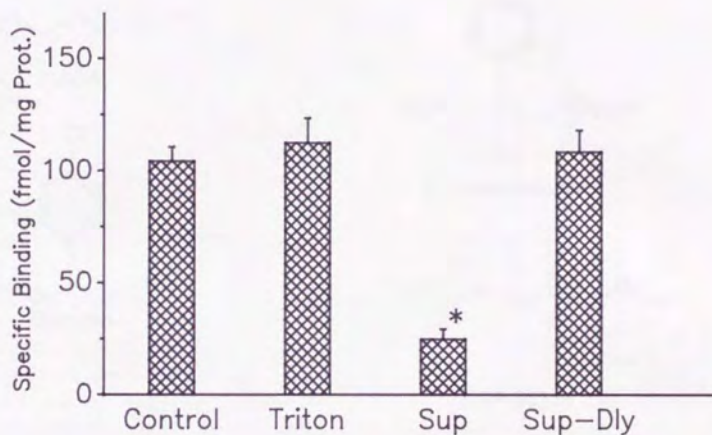


Fig. 7 Effects of supernatant of Triton X-100-treated membranes on [3 H]baclofen binding in mouse whole brain. Concentration of Triton X-100 tested was 0.008 v/v%. Dialysis was performed against Krebs-Henseleit solution at 0 °C for 24 h. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. Statistical significance was determined by Student's *t*-test. Triton : Triton X-100, Sup : supernatant, Dly : dialysis, * $p < 0.05$ as compared with control value.

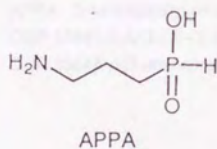
Agonist



GABA

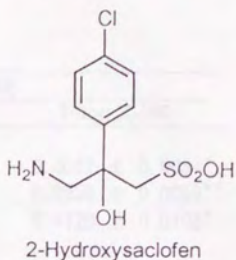


Baclofen

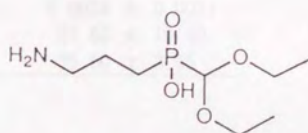


APPA

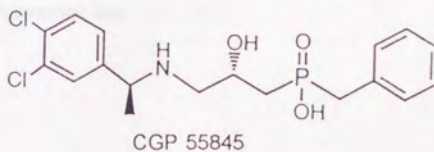
Antagonist



2-Hydroxysaclofen



CGP 35348



CGP 55845

Fig. 8 Chemical structures of GABA_B ligands.

Table 1 IC₅₀ values of various GABA_B agonists and antagonists for [³H]baclofen binding in mouse whole brain

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	None	Triton X-100
Agonist		
APPA	0.0264 ± 0.0031	0.0082 ± 0.0034*
GABA	0.1593 ± 0.0194	0.0536 ± 0.0059**
Baclofen	0.3159 ± 0.0425	0.1120 ± 0.0103*
Antagonist		
CGP 55845	0.0071 ± 0.0009	0.0074 ± 0.0011
CGP 35348	28.20 ± 6.19	57.80 ± 10.10
2-OH-Saclofen	42.20 ± 0.804	39.60 ± 3.55

* p<0.05 as compared with None

** p<0.01 as compared with None

APPA : 3-Aminopropyl phosphinic acid

CGP 55845: 3-*N*-[1-(*S*)-(3,4-dichlorobenzyl)ethanol-2-(*S*)-hydroxy-*P* benzylphosphinic acid

CGP 35348: *p*-[3-aminopropyl]-*P*-diethoxymethylphosphinic acid

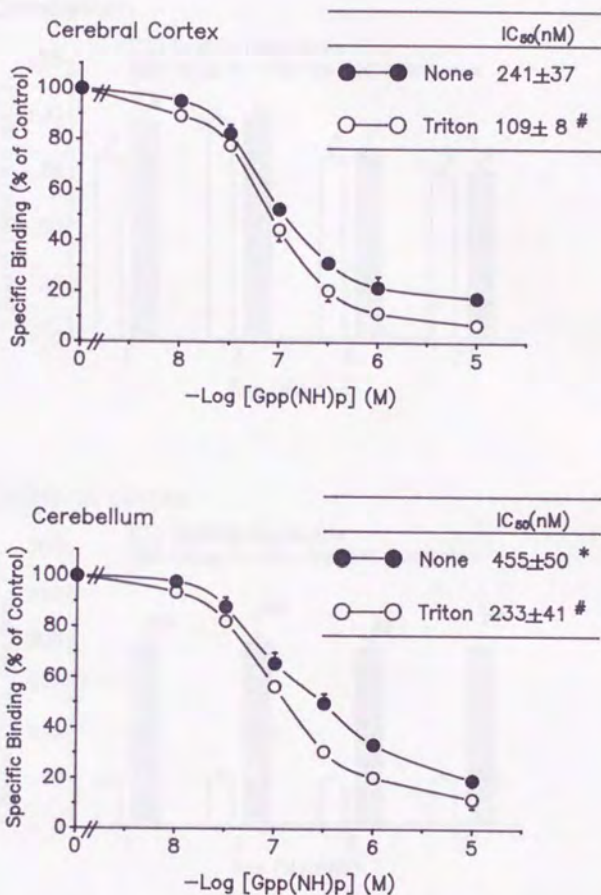
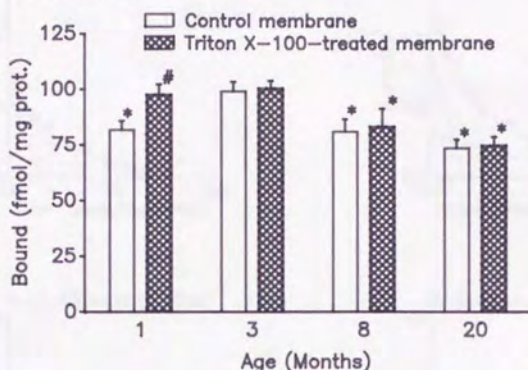


Fig. 9 Effect of membrane pretreatment with Triton X-100 on Gpp(NH)p-induced inhibition of [³H]baclofen binding in the cerebral cortex and cerebellum of mice. Values represent the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. Statistical significance was determined by Student's t test. * $p < 0.05$ as compared with the value without Triton X-100 treatment in the cerebral cortex. # $p < 0.05$ as compared with IC₅₀ value without Triton X-100 treatment.

Cerebellum



Cerebral cortex

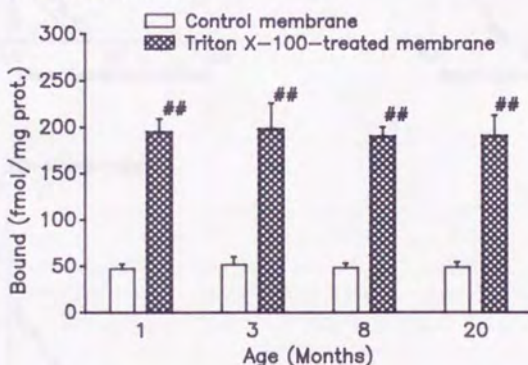


Fig. 10 Age-related changes in [3 H]baclofen binding to cerebellar and cerebral cortical membranes with or without 0.02 v/v% Triton X-100 treatment. Membranes were prepared from 1-, 3-, 8- and 20-month-old mice. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 independent experiments. * $p < 0.05$ as compared with 3-month-old mice. # $p < 0.05$ as compared with control (non-treated) membranes. ## $p < 0.01$ as compared with control membranes.

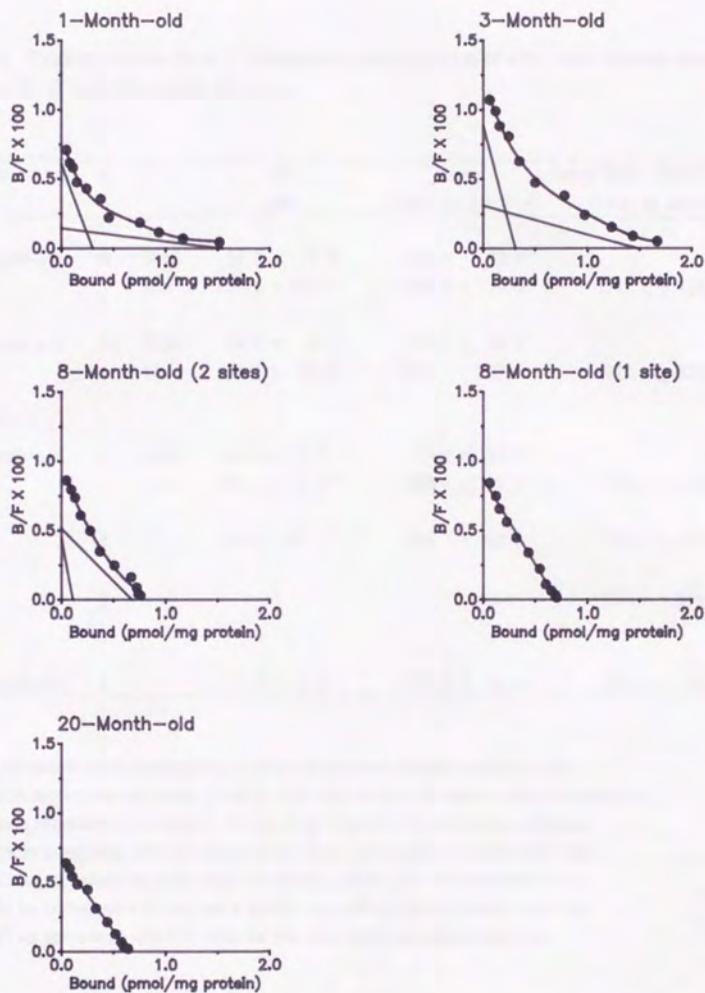


Fig. 11 Representative Scatchard plots of [3 H]baclofen binding to cerebellar membranes from 1-, 3-, 8- and 20-month-old mice. Binding assay was performed as described in Methods. The K_D and B_{max} values obtained by a computer-assisted iterative program (35) are shown in Table 2.

Table 2 Binding constants of [3 H]baclofen binding to cerebellar membranes obtained from 1-, 3-, 8- and 20-month-old mice

Age	n		KD (nM)	Bmax (fmol/mg protein)	Total Bmax (BmaxH + BmaxL) (fmol/mg protein)
1-month-old	6	High	39.8 \pm 5.6	292.9 \pm 28.6	1767.2 \pm 114.1
		Low	670.4 \pm 107.7	1474.4 \pm 140.0	
3-month-old	6	High	28.5 \pm 5.2	326.7 \pm 39.2	1677.8 \pm 136.1
		Low	466.5 \pm 66.8	1351.1 \pm 127.8	
8-month-old	3	High	30.9 \pm 14.7	82.8 \pm 22.2 ^{c)}	1032.4 \pm 150.4 ^{d)}
		Low	158.1 \pm 17.3 ^{b)}	949.6 \pm 172.0	
	3		89.0 \pm 29.3 ^{a), b)}	759.7 \pm 154.3	759.7 \pm 154.3 ^{d)}
	6		-----	-----	896.7 \pm 114.0 ^{a), d)}
20-month-old	4		79.6 \pm 7.7 ^{a), b)}	673.0 \pm 52.9	673.0 \pm 52.9 ^{d)}

Binding constants were obtained by a computer-assisted iterative program (16).

Each value represents the mean \pm S.E.M. from the number of experiments indicated (n).

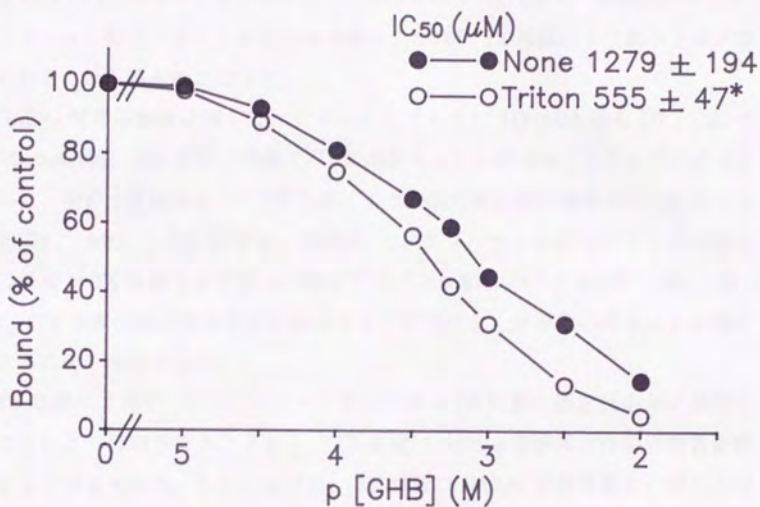
* The value represents the mean \pm S.E.M. of all experiments in 8-month-old mice

a) p<0.05 as compared with the value for the high affinity site in 3-month-old mice

b) p<0.05 as compared with the value for the low affinity site in 3-month-old mice

c) p<0.01 as compared with the value for the high affinity site in 3-month-old mice

d) p<0.01 as compared with the value for the total Bmax in 3-month-old mice



* $p < 0.05$ as compared with None

Fig. 12 Representative displacement curves of [3 H]baclofen binding to the membranes by GHB with or without 0.02 v/v% Triton X-100 treatment in mouse whole brain. IC₅₀ values of GHB compounds obtained by EBDA analysis (35). Statistical significance was determined by Student's t test. * $p < 0.05$ as compared with IC₅₀ value without Triton X-100 treatment.

考 察

マウスの脳膜標品を膜タンパクの可溶化がほとんど起こらないような低濃度の TX で処置したところ [3 H] バクロフェンの特異的結合の増加が認められた。ウシの大脳皮質膜標品において [3 H] GABA の GABA_B 受容体への特異的結合が 0.02 v/v% の TX 処置により上昇することが示されている (4) が、本実験結果より、バクロフェン結合においても GABA の場合と同様に TX 処置により結合上昇が認められることが明らかとなった。

GABA_A 受容体結合に関して、アゴニストである [3 H] GABA 結合 (37、38) や [3 H] muscimol (39) 結合が低濃度の TX 処置により上昇することがすでに示されており、結合上昇機構として TX 処置による内因性結合阻害物質の除去が考えられた (39、40)。しかしながら、GABA_A アンタゴニスト結合はアゴニスト結合とは異なり TX 処置により結合が減少することが明らかにされ (37、38、41、42)、TX 処置は結合阻害物質を除去するだけではなく受容体の構造にも影響を与えることが示唆された。

TX 処置による [3 H] バクロフェン結合上昇も TX 処置上清を反応系に添加することにより抑制されることから、TX 処置は GABA_B 受容体結合阻害物質を除去すると考えられる。しかしながら、TX 処置は GABA_A 受容体結合の場合と同様にアゴニスト結合とアンタゴニスト結合に異なった影響を与えていることから、受容体構造にも影響を与えているかもしれない。GABA_B 受容体は GTP 結合タンパク質と共役していることが明らかにされているが (3、4)、本実験においても、GppNHp により [3 H] バクロフェン結合が阻害され、GABA_B 受容体が GTP 結合タンパク質と共役していることを示している。また、TX 処置により GppNHp の IC₅₀ 値が変化したことから、TX 処置は受容体と GTP 結合タンパク質との共役状態にも影響を与えていると考えられる。GTP 結合タンパク質に共役している受容体は共役の状態によりアゴニストの親和性が変化するので、TX 処置による受容体—GTP 結合タンパクの共役状態の変化によりアゴニストの親和性が高くなったとも考えられる。受容体結合実験は、通常、化合物が受容体にどの程度の親和性を持つかを考察するものであるが、GABA_B 受容体結合実験においては、TX 処置がアゴニストとアンタゴニストの結合親和性に異なった

影響を与えたことから、受容体結合実験からもアゴニストかアンタゴニストかを推測できるように思われた。

GABA_B 受容体リガンドの神経伝達物質遊離抑制効力などの比較から、GABA_B 受容体の多様性が示唆されている (43、44)。本実験においても、 $[^3\text{H}]$ パクロフェン結合に対する加齢による影響が小脳では認められたが、大脳皮質では認められないこと、また、TX 処置の影響が大脳皮質と小脳では異なっていることが示され、これらは、GABA_B 受容体の多様性を示唆するものと考えられる。

GHB は、 $[^3\text{H}]$ パクロフェン結合を濃度依存的に抑制し、その IC₅₀ 値は 1.279 mM であったが、TX 処置により IC₅₀ 値の有意な低下が認められた。このことは、GHB が GABA_B 受容体に対しアゴニストとして結合することを示している。ラットにおいても、GHB は $[^3\text{H}]$ パクロフェン結合を抑制し、その IC₅₀ 値は 150 μM であることが示されており (45)、本実験で得られたマウスにおける IC₅₀ 値より低い値である。また、ラットにおいて脳内 GHB 濃度が 240 μM 以上になると SWDs が出現することが報告されており (46)、IC₅₀ 値と SWDs を出現させる濃度がほぼ一致している。本実験で GBL は 1 mM でも $[^3\text{H}]$ パクロフェン結合に影響を与えなかったことに加え、GBL は投与後速やかに GHB に代謝されること、および GHB が GBL の活性型であることが示されている (46) ことから、マウスにおいても GBL 投与による欠伸様発作発現は、GBL ではなく GHB が GABA_B 受容体に作用した結果であると考えられる。しかしながら、 $[^3\text{H}]$ GHB が、GABA_B 受容体とは別の部位に結合するとの報告もあり (47)、GHB の作用部位については、さらに検討することが必要であろう。

小括 2

- 1) 膜の Triton X-100 処置により、GABA_B アゴニスト結合の親和性上昇が認められたが、アンタゴニスト結合は影響を受けなかったことから、GABA_B リガンドは受容体結合実験からもアゴニストかアンタゴニストかを推測できると考えられた。
- 2) [³H] バクロフェン結合に対する TritonX-100 処置の効果および加齢の影響は大脳皮質と小脳では異なっており、GABA_B 受容体の多様性が示唆された。
- 3) GHB は [³H] バクロフェン結合を阻害し、Triton X-100 処置の影響から、GABA_B 受容体にアゴニストとして作用することが示された。

3. GHB モデルマウスにおける転写調節因子の誘導

てんかん欠伸発作と転写調節因子の関連を調べる目的で、GHB モデルマウスにおいてゲルシフトアッセイ法により、核内 CRE および AP-1 DNA 結合活性に及ぼす GBL 投与および GABA_B アンタゴニストの影響について調べた。また、GHB の細胞内情報伝達系に対する影響を検討する目的で小脳顆粒細胞初代培養系を用い GHB の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) への影響と CRE および AP-1 DNA 結合活性に及ぼす影響について調べた。

方 法

小脳顆粒細胞初代培養系の調製

小脳顆粒細胞初代培養系は生後 7 日齢の雌雄 ddY 系マウスより Ito らの方法 (48) に準じて調製した。小脳を摘出し、Hank's balanced solution (HBS) 中で注射筒による吸引および押し出しをくり返して分散後、遠心分離により細胞を沈殿させた。上清を吸引除去し、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin を含む minimum essential medium (MEM) に懸濁した。懸濁液を poly-L-lysine でコーティングしたプレート (核抽出液調製用) またはシリコンゴム製マルチチャンバーを取り付け polyethyleneimine でコーティングしたカバーガラス ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定用) に播種し、 CO_2 インキュベータ (5% CO_2 / 95% air, 37 °C) 中で培養を開始した。培養開始 24 時間後に培地を 10 μM cytosine β -D-arabinofuranoside および 25 mM KCl を含む MEM 培地に交換し、その後 6-8 日培養した。

核抽出液の調製

1) 脳からの調製

マウスは、投与による転写調節因子の変動をおさえるために、1 日 1 回、3 日間腹部に注射針をさす疑似投与を行った後、実験に共した。薬物はすべて腹腔注射により投与した。核抽出液は、全脳または、Glowinski and Iversen (33) の方法で分画した脳各部位より、Gorski ら (49) の方法で得た粗核画分から、Sakurai

ら (50) の方法に準じて調製した。組織を 5 倍量のホモジナイズ用 buffer [10 mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.6), 25 mM KCl, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 M sucrose, 10% glycerol] で懸濁し、1 ml のホモジナイズ用 buffer の上に 2.7 ml 積層した。スイングローターで 100,000 x g、30 分の遠心分離を行い、沈渣を粗核画分とした。この沈渣を Tris-buffered saline [25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 130 mM NaCl, 5 mM KCl] で 20,000 x g、15 分の遠心分離により 2 回洗浄した後、50 μ l の抽出用 buffer [20 mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF] を加え、氷冷下、攪拌しながら 15 分間放置した。20,000 x g で 15 分遠心分離を行い、上清を核抽出液とした。

2) 小脳顆粒細胞初代培養系からの調製

MEM 培地を吸引除去後、Locke's 液 [154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl_2 , 3.6 mM NaHCO_3 , 5.6 mM glucose, 5 mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.4)] で 1 回洗浄した。Locke's 液で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分インキュベートしてから薬物を添加し、さらに一定時間インキュベート後核抽出液を調製した。Locke's 液を吸引除去し、Tris-buffered saline で細胞を集めた。20,000 x g、10 分の遠心分離後、沈渣に 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF を含む HEPES-NaOH buffer (pH 7.9) を 400 μ l 添加し、氷冷下、攪拌しながら 15 分間放置した。10% Nonidet P-40 を 25 μ l 添加し攪拌後すぐに 20,000 x g、10 分の遠心分離をした。沈渣に抽出用 buffer を添加してマウス脳の場合と同様に調製した。タンパク定量はウシ血清アルブミンを標準品として Bradford の方法 (51) で行った。

ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、 ^{32}P で標識した 2 本鎖 CRE または AP-1 DNA をプローブとして行った。0.3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 80 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 10% グリセリンを含む 20 mM HEPES-NaOH buffer (pH 7.9) および 10% グリセリンを含む反応液中で poly(dI-dC)·poly(dI-dC) (マウス脳の場合は

1 μg 、小脳顆粒細胞の場合は2 μg)と核抽出液(マウス脳の場合は5 μg 、小脳顆粒細胞の場合は10 μg のタンパクを含む)を氷冷下、15分間インキュベート後、プローブを加え室温でさらにマウス脳は30分間、培養細胞は15分間インキュベートした。電気泳動[0.5 mM EDTA および 25 mM Tris-borate buffer (pH 8.2)を含む4%ポリアクリルアミドゲルを使用]後、ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィー法でゲル中の放射能を検出した。検出されたバンドの吸光度はデンストメーターで測定した。ゲルシフト法の概略と用いたプローブの配列を Fig. 13 に示した。

[Ca²⁺]_iの測定

[Ca²⁺]_iの測定は、蛍光プローブとして fura-2/AM を用いた顕微蛍光測定法により培養7 - 9日目に行った。まず、MEM 培地を吸引除去し、Locke's 液で3回洗浄後、10 μM fura-2/AM を含む Locke's 液を添加し、37°Cで45分インキュベートした。同液を吸引除去後、Locke's 液で洗浄し、再度 Locke's 液で37°C、45分のインキュベートして測定に用いた。薬物は Locke's 液に溶解し灌流適用した。[Ca²⁺]_iの蛍光レベルは、励起波長として340 nm と 360 nm の二波長を用いた510 nm の発光強度を測定し、両励起波長の蛍光強度比(F340/F360)からCa²⁺濃度に変換した。検量線の作成には、市販のキャリブレーションキットを用いた。

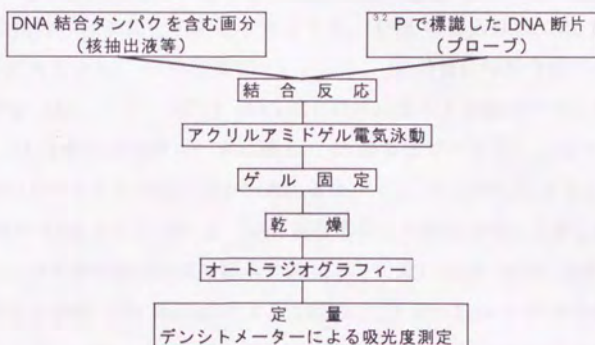
試薬

薬物は以下のものを用いた：[³²P]ATP (New England Nuclear)；T4 kinase (宝酒造)；Oligonucleotides (ボクスイブラウンにて合成)；poly (dI-dC)·poly (dI-dC) (Pharmacia Biotech)；抗 c-jun 抗体、抗 c-fos 抗体 (Oncogene Science)；抗 CREB 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)；GBL、BAPTA-AM、thapsigargin (和光純薬工業)；Fura-2/AM、Fura-2 (同仁化学研究所)；GHB (Aldrich Chemical)；Calcium calibration buffer kit (Molecular Probes)；CGP 35348、CGP 55845 (CIBA-GEIGY 社より供与)。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

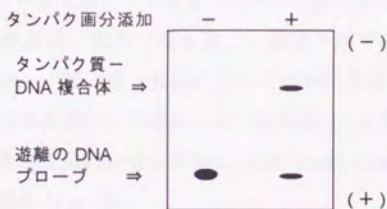
使用動物

飼料および水を自由に摂取させた ddY 系雄性マウス (日本エスエルシー、三協ラボサービスより購入) を使用した。ただし、培養には雌雄のマウスを用いた。

ゲルシフトアッセイ法



泳動パターン



プローブ

CRE (cyclic AMP responsive element)

5' - GATTGGCTGACGTCAGAGAGCT - 3'
 3' - CTAACCGACTGCAGTCTCTCGA - 5'

AP-1 (activator protein 1) DNA

5' - GATCCGGCTGACTCATCACTAG - 3'
 3' - CTAGGCCGACTGAGTAGTGATC - 5'

(下線はコンセンサスシーケンスを示す)

Fig. 13 ゲルシフト法の概略とプローブ

結 果

1) GBL 投与による CRE および AP-1 DNA 結合活性の上昇

欠伸様発作症状を発現させた用量の GBL (100 mg/kg) を投与し、全脳において DNA 結合活性の経時変化を測定したところ、CRE 結合活性は GBL 投与 5 分後から上昇傾向を示し、30 分後にピークとなり、90 分後には投与前のレベルに回復した (Fig. 14)。一方、AP-1 DNA 結合活性は投与 5 分後にすでに有意な上昇を示し、15 分後にはほぼピークに達し、60 分後までプラトーとなり 90 分後でも投与前のレベルより有意に高かった。また、Fig. 15 に示したように、GBL 投与 30 分後の CRE および AP-1 DNA 結合活性は用量依存的に上昇した。SWDs の出現および欠伸様発作症状を顕著に抑制した用量の CGP 35348 (200 mg/kg) を前投与すると GBL (100 mg/kg) による CRE および AP-1 DNA 結合活性の上昇は抑制された (Fig. 16)。DNA 結合活性に対する GBL (100 mg/kg) 投与の影響を脳各部位から調製した核抽出液を用いて検討したところ、CRE 結合活性は大脳皮質および視床 (中脳を含む) で有意な増加が認められた (Fig. 17)。AP-1 DNA 結合活性は大脳皮質、視床で最も高く、視床下部でも有意な増加が認められた (Fig. 17)。海馬、小脳、橋・延髄においては両結合活性とも有意な変化は認められなかった。大脳皮質および視床における GBL による CRE および AP-1 DNA 結合活性の上昇は全脳の場合と同様に CGP 35348 (200 mg/kg) の前処置によって完全に抑制された (Fig. 18)。

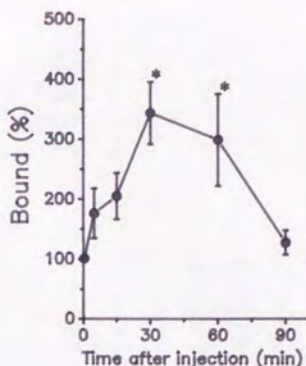
CRE 結合活性は、非放射性の CRE プロープにより完全に抑制されたが、AP-1 DNA プロープによっては影響を受けなかった (Fig. 19)。一方、AP-1 DNA 結合は非放射性の AP-1 DNA および CRE 両プロープによって抑制されたが、CRE プロープによる抑制には AP-1 DNA プロープよりも約 8 倍高濃度を要した。また、ゲルスーパースhift アッセイ法により、GBL 投与後の大脳皮質において各種転写調節因子の抗体の影響を調べたところ、CRE 結合活性は CRE binding protein (CREB) 抗体でスーパースhift し、c-Jun、c-Fos 抗体によって影響を受けなかった (Fig. 19)。一方、AP-1 DNA 結合活性は、c-Jun および c-Fos 抗体によってバンドが消失した。また、CREB 抗体により一部スーパースhift が認められた。

2) 小脳顆粒細胞初代培養系における GHB の作用

マウス小脳顆粒細胞初代培養系の $[Ca^{2+}]_i$ は、GHB を灌流適用したところ、一過性に上昇した (Fig. 21)。この上昇は CGP 35348 (1 mM) や CGP 55845 (1 μ M) により抑制された。この系において、核内 CRE および AP-1 DNA 結合活性に対する GHB の影響を検討したところ、GHB (0.1 - 3 mM) は、CRE および AP-1 DNA 結合活性を濃度依存的に上昇させた (Fig. 22)。一方、GBL は、3 mM でも両結合に影響を与えなかった。1 mM GHB による CRE および AP-1 DNA 結合活性の増加も、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の場合と同様に CGP 35348 (1 mM) または CGP 55845 (1 μ M) の共存により抑制された (Fig. 23)。また、両結合活性の上昇は、細胞内 Ca^{2+} キレート剤である 1,2-bis(2'-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM) (1 μ M) や細胞内小胞の Ca^{2+} -ATPase を阻害して Ca^{2+} を枯渇させる thapsigargin (1 μ M) の前処置でも拮抗された (Fig. 24)。

CRE

Time 0 5 15 30 60 90 min



AP-1

Time 0 5 15 30 60 90 min

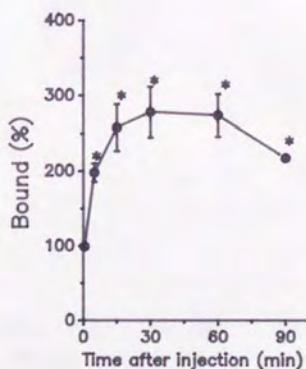


Fig. 14 Time course of induction of nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities following GBL (100 mg/kg, i.p.) administration. Nuclear extract was prepared at each time after GBL administration. Values are expressed as percentage of each saline control. Nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities of saline-treated animals did not show any changes (data not shown). Each value represents the mean \pm S.E.M. for three independent experiments. Statistical significance was determined by analysis of variance followed by Duncan's multiple range test. * $p < 0.05$ as compared with time 0 value.

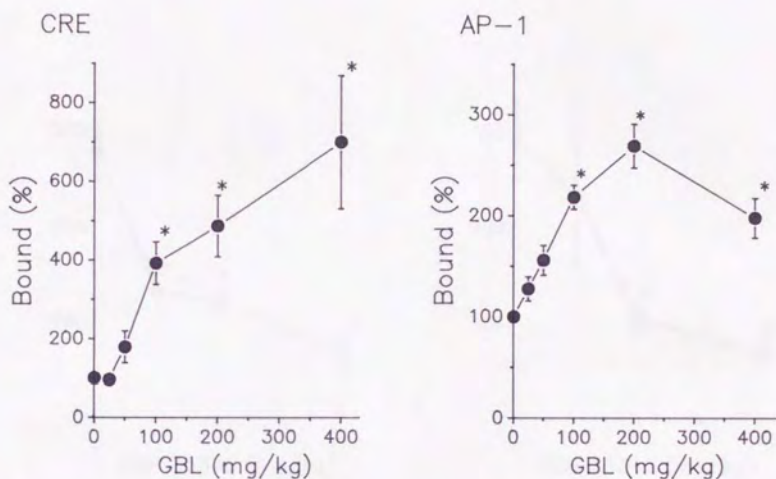


Fig. 15 Dose-dependent induction of nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities by GBL in mouse whole brain. Nuclear extracts were prepared 30 min after GBL administration. Values are expressed as percentage of saline control (GBL 0). Each value represents the mean \pm S.E.M. for three independent experiments. Statistical significance was determined by analysis of variance followed by Duncan's multiple range test. * $p < 0.05$ as compared with saline control value.

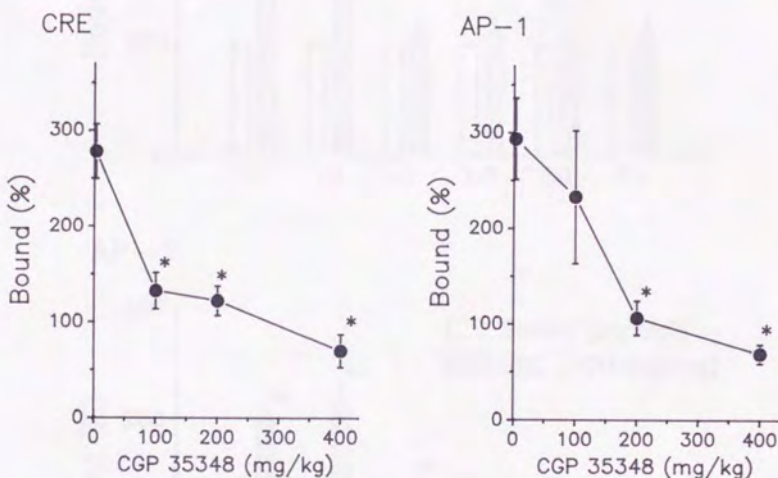


Fig. 16 Antagonistic effect of CGP 35348 on GBL-induced increase in nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities. CGP 35348 (CGP, 100, 200 and 400 mg/kg, i.p.) was injected 60 min before GBL administration (100 mg/kg, i.p.). Nuclear extracts were prepared 30 min after GBL administration. Values are expressed as percentage of saline control. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three independent experiments. Statistical significance was determined by analysis of variance followed by Duncan's multiple range test. * $p < 0.05$ as compared with saline control value.

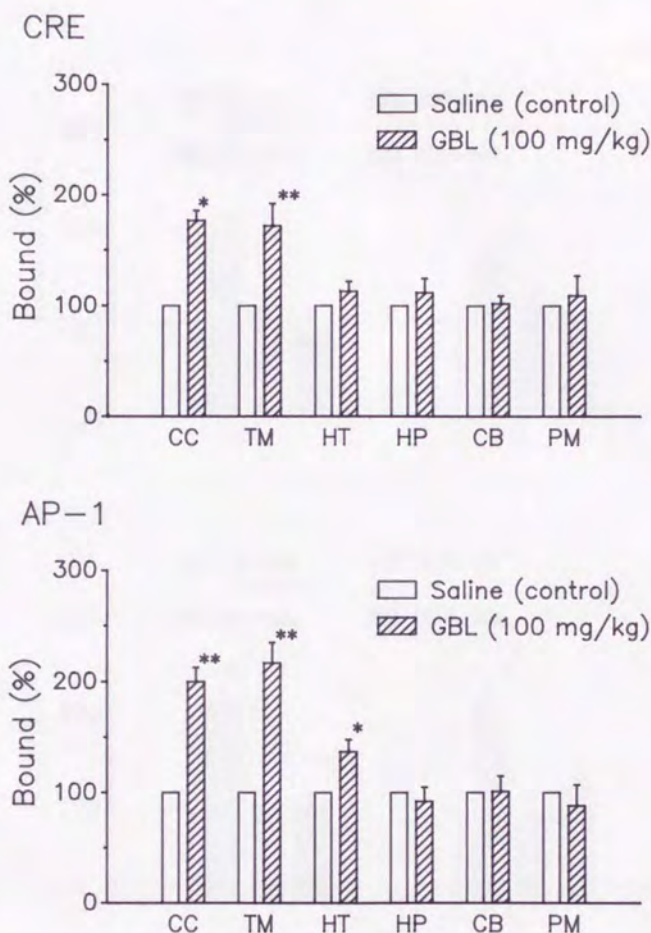


Fig. 17 Effect of GBL administration on nuclear CRE- and AP-1 DNA binding activities in various brain regions. Nuclear extracts were prepared 30 min after GBL (100 mg/kg) administration. Values are expressed as percentage of saline control. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three independent experiments. Statistical significance was determined by Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with control (Saline) value. CC : Cerebral cortex, TM : Thalamus + midbrain, HT : Hypothalamus, HP : Hippocampus, CB : Cerebellum, PM : Pons + medulla oblongata

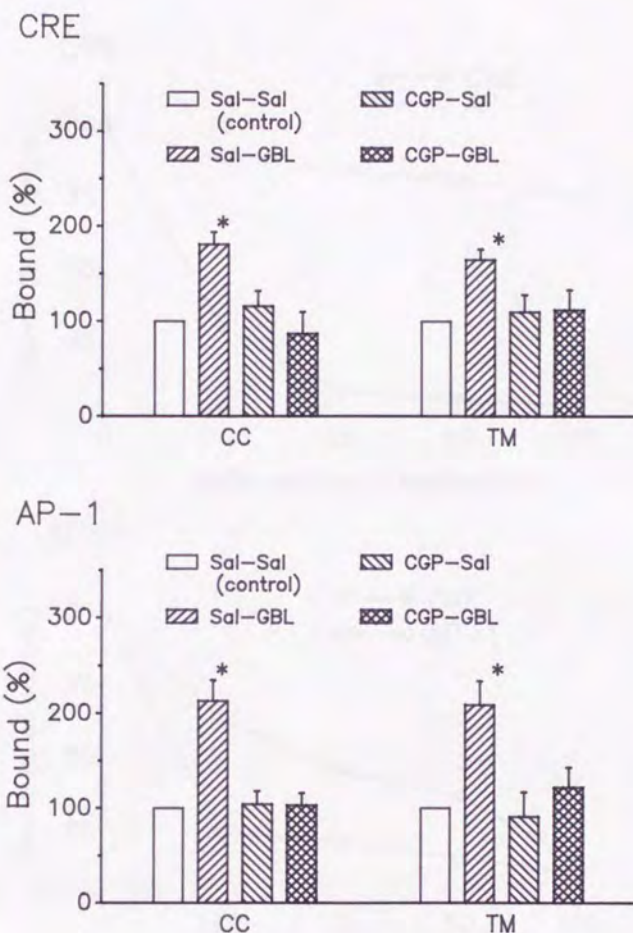


Fig. 18 Antagonistic effect of CGP 35348 on GBL-induced increase in nuclear CRE- and AP-1 DNA binding activities in the cerebral cortex and thalamus. CGP 35348 (100 mg/kg, i.p.) was injected 60 min before GBL administration (100 mg/kg, i.p.). Nuclear extracts were prepared 30 min after GBL administration. Values are expressed as percentage of saline control. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three independent experiments. Statistical significance was determined by analysis of variance followed by Duncan's multiple range test. * $p < 0.05$ as compared with saline control value. CC : Cerebral cortex, TM : Thalamus + midbrain

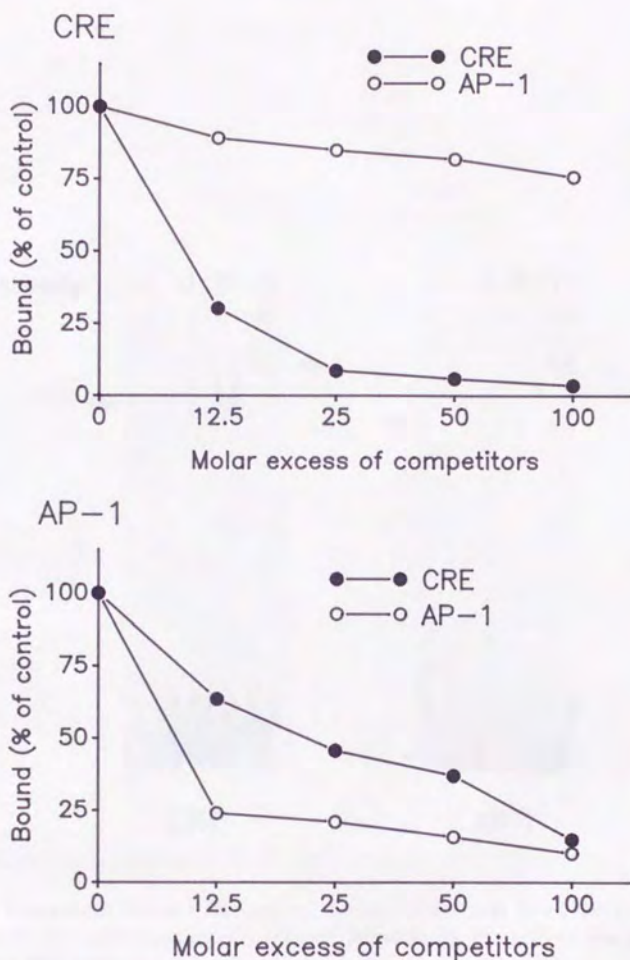


Fig. 19 Competition of unlabeled CRE- and AP-1 DNA-binding for nuclear CRE- or AP-1 DNA-binding activities. Nuclear extracts were prepared 30 min after GBL (100 mg/kg, i.p.) administration in mouse whole brain. Gel-mobility assay was performed after treatment of the nuclear extract with various concentrations of unlabeled CRE or AP-1 DNA. Quantitative analysis was performed using densitometric measurements as described in Methods.

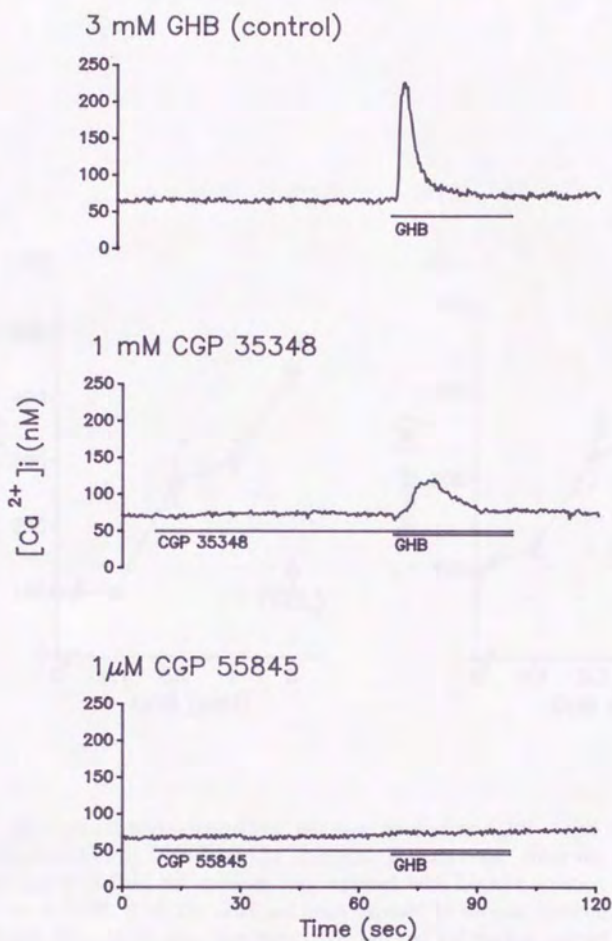


Fig. 21 GABA_B antagonists block GHB-induced increases in [Ca²⁺]_i in mouse cerebellar granule cells. Antagonists (CGP 35348 or CGP 55845) was loaded 1 min prior to GHB. An average of eight cells is shown. GHB was applied for 30 sec.

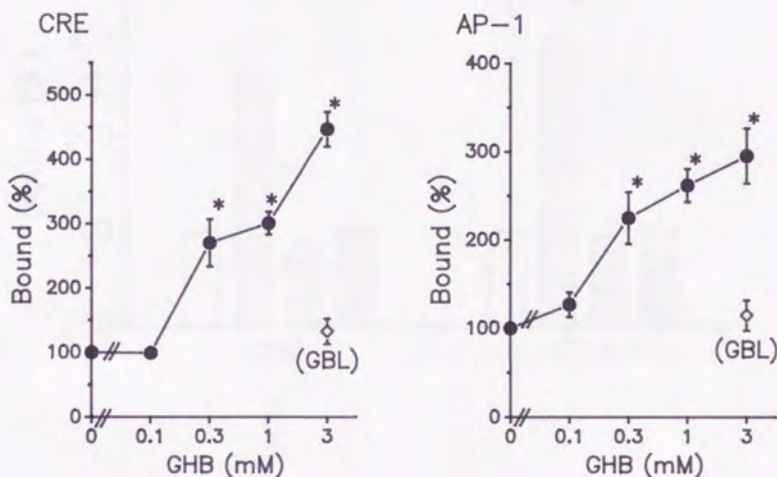


Fig. 22 Concentration-dependent increase in nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities by GHB in mouse cerebellar granule cells. After the cells had been grown for 8-9 DIV, the medium was replaced with Locke's solution 1 hour before addition of GHB. After the cells had been exposed to various concentrations of GHB or 3 mM GBL for 60 min, they were collected and the nuclear extract was prepared. Values are expressed as control. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three independent experiments. Statistical significance was determined by analysis of variance followed by Duncan's multiple range test. * $p < 0.05$ as compared with saline control value.

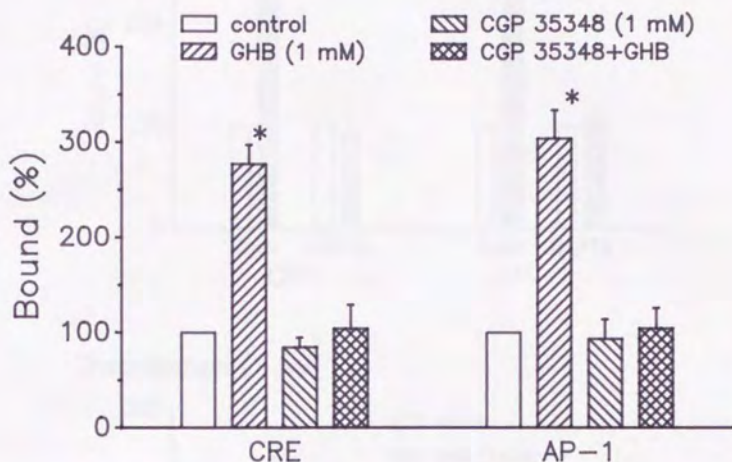
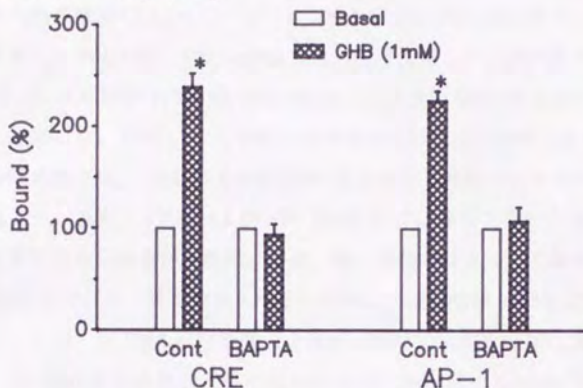


Fig. 23 Antagonistic effect of CGP 35348 on GHB-induced increase in nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities in mouse cerebellar granule cells. Cells were stimulated with 1 mM GHB in the presence or absence of 1 mM CGP 35348 in Locke's solution, then the nuclear extract was prepared. Values are expressed as control. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three independent experiments. Statistical significance was determined by analysis of variance followed by Duncan's multiple range test. * $p < 0.05$ as compared with saline control value.

BAPTA-AM (1 μ M)



Thapsigargin (1 μ M)

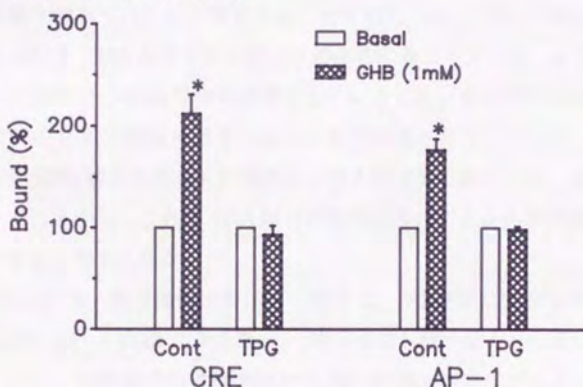


Fig. 24 Effects of BAPTA-AM and thapsigargin on GHB-induced increase in nuclear CRE- and AP-1 DNA-binding activities in mouse cerebellar granule cells. The cells were pretreated with BAPTA-AM for 10min or thapsigargin for 2 min, and then the cells were treated with GHB for 60 min. Values are expressed as control. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three independent experiments. Statistical significance was determined by Student's *t*-test. * $p < 0.05$ as compared with basal value.

考 察

マウス全脳の核内 CRE および AP-1 DNA 結合活性は GBL 投与により用量依存的に上昇し、特に GBL 100 mg/kg 以上の投与で著しい上昇が認められた。また、CGP 35348 の前投与は GBL (100 mg/kg) による両 DNA 結合活性上昇を用量依存的に抑制した。GBL による SWDs の出現をほぼ完全に抑制した 200 mg/kg CGP 35348 前投与は、GBL による両 DNA 結合活性上昇もコントロールレベルにまで抑制した。また、CRE および AP-1 DNA 結合活性の上昇が大脳皮質および視床で顕著に認められるが、海馬、小脳、橋・延髄ではまったく認められず、両部位の DNA 結合活性上昇も全脳の場合と同様に CGP 35348 前投与で抑制された。これらのことは、両 DNA 結合活性の上昇が SWDs の出現と密接に関連したものであり、両 DNA 結合活性の上昇に視床および大脳皮質の GABA_B 受容体が関与していることを示している。けいれんを伴うてんかんモデルにおいては、CRE 結合活性の上昇は認められておらず、AP-1 DNA 結合活性の上昇も視床ではなく大脳皮質や海馬でおこると報告されており (17、18、19)、GBL 投与後に認められる AP-1 DNA 結合活性上昇とは部位的に異なっている。てんかん欠神発作発現には視床の GABA_B 受容体が関与していること、およびけいれん発作とは異なってその発現に海馬が関与しないことが示唆されている (13、32)。GBL 投与後の両 DNA 結合活性上昇が視床および大脳皮質で認められ、海馬で認められなかったことから、これら DNA 結合活性の上昇はてんかん欠神発作に関連したものであると考えられる。

GBL による CRE 結合活性上昇は、一過性で、90 分後には投与前のレベルに回復したが、AP-1 DNA 結合活性は、90 分後でも投与前より有意に高いままであった。また、CRE 結合活性は非放射性 AP-1 DNA プローブによっては影響を受けず、AP-1 DNA 結合は非放射性の CRE プローブによっても抑制されたが、その抑制には AP-1 DNA プローブよりも約 8 倍高濃度を要した。これらのことから、両 DNA 結合活性上昇は GBL 投与により異なったタンパクが誘導された結果であると推測された。そこで、各種転写調節因子の抗体を用いてゲルスーパージフトアッセイ法で調べたところ、CRE 結合活性の上昇が CREB によるものであることが明らかとなった。また、AP-1 DNA 結合活性は、c-Jun および

c-Fos 抗体によってバンドが消失し、CREB 抗体により一部スーパーシフトが認められたことから、AP-1 DNA に結合する複数のタンパク複合体が GBL 投与により誘導されることが明らかとなった。

以上、GBL 投与によって SWDs 発現に重要な部位である大脳皮質と視床で AP-1 DNA および CRE 結合活性の上昇が認められ、欠伸発作発現と転写調節因子の誘導が関連することが明らかとなった。けいれん発作においては AP-1 の標的遺伝子としてプレプロエンケファリンやプレプロダイノルフィン遺伝子の報告 (18、19) があるが、欠伸発作においては最終的にどのような後期遺伝子に結びつくのかはまったく不明であり、今後の課題である。

小脳顆粒細胞初代培養系において GHB は、 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、CGP 35348 および CGP 55845 により拮抗されたことから、GHB による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は $GABA_B$ 受容体を介したものであると考えられる。 $GABA_B$ 受容体は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを抑制し、 $^{45}Ca^{2+}$ の取り込みを阻害することが示されている (6) が、小脳顆粒細胞においては、 $GABA_B$ 受容体を介した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇も報告されており (53)、本実験結果と一致している。また、最近になってクロマフィン細胞においても $GABA_B$ 受容体を介した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が報告された (54)。小脳顆粒細胞初代培養系において、核内 CRE および AP-1 DNA 結合活性も GBL ではなく GHB により濃度依存的に上昇し、CGP 35348 (1 mM) および CGP 55845 (1 μ M) で抑制され、GHB の DNA 結合活性上昇作用が $GABA_B$ 受容体を介したものであることが確認された。 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる GHB の濃度範囲と DNA 結合活性を上昇させる濃度範囲はほぼ一致しており、両者が関連していることが推測されたので、BAPTA-AM や thapsigargin の前処置の影響を検討したところ、GHB による両 DNA 結合活性の上昇がこれらの化合物により抑制された。また、GHB による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇も thapsigargin 処置により抑制されることを確認しており (データには示していない)、GHB は $GABA_B$ 受容体を介し、細胞内ストアから Ca^{2+} を遊離させ $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させること、およびこの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が GHB による CRE および AP-1 DNA 結合活性の上昇に重要な役割を演じていることが示唆された。培養系で認められた GHB の作用が GBL 投与時に生体内、特に欠伸発作発現に重要な部位であるとされている視床において起こっているか否かについては今後の検討課題である。

小括 3

- 1) GHB モデルマウスの大脳皮質および視床において欠伸様発作発現に伴う AP-1 DNA および CRE 結合活性の上昇が認められた。
- 2) AP-1 DNA および CRE 結合活性の上昇に大脳皮質および視床の GABA_B 受容体が関与することが明らかとなった。
- 3) 小脳顆粒細胞初代培養系を用いた実験から、GHB による CRE および AP-1 DNA 結合活性の上昇には細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が重要な役割を果たしていることが示唆された。

総 括

てんかん欠神発作発現に脳内伝達物質が関与することが考えられるが、本研究では、 γ -アミノ酪酸 (GABA)_B 受容体の役割を明らかにする目的で、 γ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) モデルをマウスで作成し、GABA_B アンタゴニストの抗てんかん作用および欠神発作発現と転写調節因子誘導の関連性について検討した。また、GHB の GABA_B 受容体に対する作用についても検討した。

マウスに GHB のプロドラッグである γ -ブチロラクトン (GBL) を投与すると、行動が停止し、脳波上に 3-6 Hz の棘徐波複合放電 (SWDs) が出現したが、これらのことは GABA_B アンタゴニストの CGP 35348 および欠神発作治療薬のエトスクシמידにより抑制された。これらより、GBL 投与マウスが欠神発作の実験モデルとなることが明らかとなった。また、GBL による欠神様発作発現に GABA_B 受容体が関与することが示唆された。 $[^3\text{H}]$ バクロフェンを用いた受容体結合実験において、粗シナプス膜の Triton X-100 (TX) 処置は GABA_B アゴニストの親和性を上昇させた。GHB は、 $[^3\text{H}]$ バクロフェン結合を濃度依存的に抑制し、その親和性は TX 処置により増大したが、GBL は、 $[^3\text{H}]$ バクロフェン結合に影響を与えなかったことより、GBL ではなく GHB が GABA_B 受容体にアゴニストとして作用することが明らかとなった。GBL 投与により、欠神発作に重要な役割を持つと考えられている大脳皮質および視床において CRE および AP-1 DNA 結合活性は上昇し、欠神様発作症状を顕著に抑制した用量の CGP 35348 前処置により抑制された。他の脳部位においては両 DNA 結合活性の有意な変化は認められなかったことから、これらの転写調節因子の誘導が欠神発作と密接に関連したものであると考えた。小脳顆粒細胞初代培養系において、細胞内 Ca^{2+} 濃度および核内 CRE および AP-1 DNA 結合活性は GHB により上昇したが、特異的 GABA_B アンタゴニストにより抑制された。両 DNA 結合活性の上昇は、細胞内 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM や細胞内小胞の Ca^{2+} -ATPase を阻害して小胞内 Ca^{2+} を枯渇させる thapsigargin の前処置でも抑制された。これらより、GHB による DNA 結合活性の上昇には、細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離による Ca^{2+} 濃度の上昇が重要な役割を果たしていることが示された。

結 論

てんかん欠神発作における GABA_B 受容体の役割を明らかにする目的で GHB モデルマウスおよび神経細胞初代培養系を用いて実験を行い以下の結論を得た。

1. γ -ブチロラクトン (GBL) がマウスにおいて行動の停止、棘徐波複合放電 (SWDs) の出現などてんかん欠神様発作症状を誘発することを明らかにし、マウスにおいて γ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) モデルの作成を確立した。
2. GBL 誘発欠神様発作症状発現には、GABA_B 受容体が深く関与することが明らかとなった。
3. 受容体結合実験より、GHB が GABA_B アゴニストであることが示唆された。
4. GBL 誘発欠神様発作症状発現に伴い、大脳皮質および視床において AP-1 DNA および CRE 結合活性の上昇が認められた。また、両 DNA 結合活性上昇は抗てんかん作用を示す用量の CGP 35348 によって抑制され、欠神発作発現と転写調節因子誘導が密接に関連していることが明らかとなった。
5. GHB による核内 CRE および AP-1 DNA 結合活性の上昇には、細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離による細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇が重要な役割を果たしていることが示唆された。

謝 辞

本論文作成にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学薬学部 斉藤洋教授に謹んで感謝いたします。

本研究にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学薬学部 福田英臣教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、終始ご助言をいただきました日本大学薬学部 伊藤芳久講師に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Bowery N.G., Doble A., Hill D.R., Hudson A.L., Shaw J.S., Turnbull M.J. and Warrington R. (1981) Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.* 71, 53-70.
- 2) Hill D.R. and Bowery N.G. (1981) ^3H -baclofen and ^3H -GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature* 290, 149-152.
- 3) Hill D.R., Bowery N.G. and Hudson A.L. (1984) Inhibition of GABA_B receptor binding by guanyl nucleotides. *J. Neurochem.* 42, 652-657.
- 4) Asano T., Ui M. and Ogasawara N. (1985) Prevention of agonist binding to γ -aminobutyric acid B receptors by guanine nucleotides and islet-activating protein, pertussis toxin, in bovine cerebral cortex. *J. biol. Chem.* 260, 12653-12658.
- 5) Gähwiler B.H. and Brown D.A. (1993) GABA_B-receptor-activated K^+ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1558-1562.
- 6) Wojcik W.J., Travagli R.A., Costa E. and Bertolio M. (1990) Baclofen inhibits with high affinity an L-type-like-voltage dependent calcium channel in cerebellar granule neurones. *Neuropharmacology* 29, 969-972.
- 7) Wojcik W.J. and Neff N.H. (1984) γ -Aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain, and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol. Pharmacol.* 25, 24-28.
- 8) Wojcik W.J., Cavalla D. and Neff N.H. (1985) Co-localized adenosine A1 and γ -aminobutyric acid B (GABA_B) receptors of cerebellum may share a common adenylate cyclase catalytic unit. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 232, 62-65.
- 9) Bittiger H., Froestl W., Mickel S. and Olpe H.-R. (1993) GABA_B receptor antagonists: from synthesis to therapeutic applications. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 391-411.

- 10) Snead O.C. (1992) Evidence for GABA_B-mediated mechanisms in experimental generalized absence seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 213, 343–349.
- 11) Hosford D.A., Clark S., Cao Z., Wilson W.A., Lin F.-H., Morrisett R.A. and Huin A. (1992) The role of GABA_B receptor activation in absence seizures of lethargic (*lh/lh*) mice. *Science* 257, 398–401.
- 12) Crunelli V. and Leresche N. (1991) A role for GABA_B receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *Trends Neurosci.* 14, 16–21.
- 13) Snead O.C. (1995) Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann. Neurol.* 37, 146–157.
- 14) Roth R.H., Delgado J.M.R. and Giarman N.J. (1966) γ -Butyrolactone and γ -hydroxybutyric acid—II. The pharmacologically active form. *Int. J. Neuropharmacol.* 5, 421–428.
- 15) Roth R.H. and Giarman N.J. (1968) Conversion in vivo of γ -aminobutyric to γ -hydroxybutyric acid in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 18, 247–250.
- 16) Snead O.C., Nicols A.C. and Liu C.C. (1992) γ -Hydroxybutyric acid binding sites: Interaction with the GABA-benzodiazepine-picrotoxin receptor complex. *Neurochem. Res.* 17, 201–204.
- 17) Sonnenberg J.L., Mitchelmore C., Macgregor-Leon P.F., Hempstead J., Morgan, J.I. and Curran T. (1989) Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *J. Neurosci. Res.* 24, 72–80.
- 18) Pennypacker K.R., McMillian M.K., Douglass J. and Hong J.S. (1994) Ontogeny of Kinate-induced gene expression in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 62, 438–444.
- 19) Pennypacker R., Walczak D., Thai L., Fannin R., Mason E., Douglass J. and Hong J.S. (1993) Kainate-induced changes in opioid peptide genes and AP-1 protein expression in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 60, 204–211.

- 20) Montominy M.R., Gonzalez G.A. and Yamamoto K.Y. (1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci.* 13, 184–188.
- 21) Lukasiuk K. and Kaczmarek L. (1994) AP-1 and CRE DNA binding activities in rat brain following pentylentetrazole induced seizures. *Brain Res.* 643, 227–233.
- 22) Zhang X., Ju G. and Salle G. Le Gal La (1991) Fos expression in GHB-induced generalized absence epilepsy in the thalamus of the rat. *NeuroReport* 2, 469–472.
- 23) Willoughby J.O., Mackenzie L., Hiscock J.J. and Sagar S. (1993) Non convulsive spike-wave discharges do not induce Fos in cerebro-cortical neurons. *Mol. Brain Res.* 18, 178–180.
- 24) Lin F., Cao Z. and Hosford D.A. (1993) Increased number of GABA_B receptors in the lethargic (*lh/lh*) mouse model of absence epilepsy. *Brain Res.* 608, 101–106.
- 25) Noebels J.L., Qiao X., Branson R.T., Spencer C. and Davisson M.T. (1990) Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the mouse with prolonged cortical seizures. *Epilepsy Res.* 7, 129–135.
- 26) Kostopoulos G., Veronikis D.K. and Efthimiou I. (1987) Caffeine blocks absence seizures in the tottering mutant mouse. *Epilepsia* 28, 415–420.
- 27) Noebels J.L. and Rutecki P.A. (1990) Altered hippocampal network excitability in the hypernoradrenergic mutant mouse *tottering*. *Brain Res.* 524, 225–230.
- 28) Snead O.C. (1988) γ -Hydroxybutyrate model of generalized absence seizures: Further characterization and comparison with other absence models. *Epilepsia* 29, 361–368.
- 29) Snead O.C. (1978) Gamma hydroxybutyrate in the monkey I. Electroencephalographic, behavioral, and pharmacokinetic studies. *Neurology* 28, 636–642.
- 30) Snead O.C. (1978) Gamma hydroxybutyrate in the monkey II. Effect of chronic oral anticonvulsant drugs. *Neurology* 28, 643–648.

- 31) Zornetzer S. (1970) A simple and reliable chronic brain implantation technique for the mouse. *Physiol. Behav.* 5, 1197–1199.
- 32) Liu Z., Vergnes M., Depaulis A. and Marescaux C. (1992) Involvement of intrathalamic GABA_B neurotransmission in the control of absence seizures in the rat. *Neuroscience* 48, 87–93.
- 33) Bowery N.G., Hill D.R. and Hudson A.L. (1983) Characteristics of GABA_B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br. J. Pharmacol.* 78, 191–206.
- 34) Glowinski J. and Iversen L.L. (1966) Regional studies of catecholamines in the rat brain—I. *J. Neurochem.* 13, 655–669.
- 35) McPherson G.A. (1985) Analysis of radioligand binding experiments: A collection of computer programs for the IBM PC. *J. Pharmacol. Methods* 14, 213–228.
- 36) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- 37) Enna S.J. and Snyder S.H. (1977) Influences of ions, enzymes, and detergents on γ -aminobutyric acid–receptor binding in synaptic membranes of rat brain. *Mol. Pharmacol.* 13, 442–453.
- 38) Ito Y., Ishige K., Makimura M., Fukuda H. and Murakoshi Y. (1990) Comparative study of agonist and antagonist binding to GABA_A receptors in rat brain. *Abstr. Soc. Neurosci.* 16, 75.
- 39) Yoneda Y. and Kuriyama K. (1980) Presence of a low molecular weight endogenous inhibitor on ^3H -muscimol binding in synaptic membranes. *Nature* 285, 670–673.
- 40) Napias C., Bergman M.O., Van Ness P.C., Greenlee D.V. and Olsen R.W. (1980) GABA binding in mammalian brain : inhibition by endogenous GABA. *Life Sci.* 27, 1001–1011.

- 41) Moeler O. and Okada T. (1978) Properties of γ -aminobutyric acid receptor binding with (+)-[3 H]bicuculline methiodide in rat cerebellum. *Mol. Pharmacol.* 14, 256–265.
- 42) Heaulme M., Chambon J.-P., Leyris R., Weemuth C.G. and Biziere K. (1987) Characterization of binding of [3 H]SR 95531, a GABA_A antagonist, to rat brain membranes. *J. Neurochem.* 48, 1677–1686.
- 43) Bonanno G. and Raiteri M. (1992) Functional evidence for multiple γ -aminobutyric acidB receptor subtypes in the rat cerebral cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262, 114–118.
- 44) Bonanno G. and Raiteri M. (1993) Multiple GABA_B receptors. *Trens Pharmacol. Sci.* 14, 259–261.
- 45) Drew C.A., Johnston G.A.R., Keer D.I.B. and Ong J. (1990) Inhibition of baclofen binding to rat cerebellar membranes by phaclofen, saclofen, 3-aminopropylphosphonic acid and related GABA_B receptor antagonists. *Neurosci. Lett.* 113, 107–110.
- 46) Bernasconi R., Lauber J., Marescaux C., Vergnes M., Martin P., Rubio V., Leonhardt T., Reymann N. and Bittiger H. (1992) Experimental absence seizures: potential role of γ -aminobutyric acid and GABA_B receptors. *J. Neural. Transm.* 35, 155–177.
- 47) Snead O.C. (1991) The γ -hydroxybutyrate model of absence seizures: correlation of regional brain levels of γ -hydroxybutyric acid and γ -butyrolactone with spike wave discharges. *Neuropharmacology* 30, 161–167.
- 48) Snead O.C. (1994) The ontogeny of [3 H] γ -hydroxybutyrate and [3 H]GABA_B binding sites: relation to the development of experimental absence seizures. *Brain Res.* 659, 147–156.

- 49) Ito Y., Koshihara T., Doi M., Asami S., Fukuda H. and Murakoshi Y. (1992) Characterization of antagonistic activity and binding properties of SR 95531, a pyridazinyl-GABA derivative, in rat brain and cultured cerebellar neuronal cells. *Synapse* 10, 326-333.
- 50) Gorski K., Carneiro M. and Schibler U. (1986) Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 47, 767-776.
- 51) Sakurai H., Kurusu R., Sano K., Tsuchiya T. and Tsuda M. (1992) Stimulation of cultures cerebellar granule cells via glutamate receptors induced TRE- and CRE-binding activities mediated by common DNA-binding complexes. *J. Neurochem.* 59, 2067-2075.
- 52) Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 53) De Erausquin G., Brooker G., Costa E. and Wojcik W.J. (1992) Stimulation of high affinity γ -aminobutyric acid receptors potentiates the depolarization-induced increase of intraneuronal ionized calcium content in cerebellar granule neurons. *Mol. Pharmacol.* 42, 407-414.
- 54) Parramon M., Gonzalez M.P., Herrero M.T. and Oset-Gasque M.J. (1995) GABA_B receptors increase intracellular calcium concentration in chromaffin cells through two different pathways: their role in catecholamine secretion. *J. Neurosci. Res.* 41, 65-72.



