

論文の内容の要旨

論文題目 てんかん様同期活動の薬理的解析とその時間・空間特異性

氏名 本郷 良泳

【序論】

てんかんは、脳の神経細胞が過剰に興奮するために、発作が反復性におこる慢性の脳疾患であり、特徴的な所見として同期的な神経活動が認められる。てんかん様活動としてこの同期活動に着目し、古くから、様々な *in vitro* てんかんモデルを用いた研究が行われているが、その多くが単一神経細胞や局所の集合電位の活動を評価したものであった。一方で脳機能は種々の神経細胞によって形成される神経ネットワークで統御された活動によって実現しているため、てんかん様活動の正確な理解には神経ネットワークレベルでの解析が必要不可欠である。近年、多細胞カルシウムイメージングを用い、てんかん様活動の特性やメカニズムがネットワークレベルで明らかにされつつある。しかし、抗てんかん薬の作用を多細胞で詳細に解析された研究はほとんどない。本研究では、多細胞カルシウムイメージング法によりてんかん様活動を捉え、種々の抗てんかん薬の作用を解析した。

また、同期的な神経活動はてんかんでなく、記憶などの情報処理にも重要であることが知られている。しかし、同期活動の細胞レベルでの活動パターンには未だ不明な点が多い。そこで、今回の抑制性神経伝達が遮断された条件で観察された同期活動から、海馬 CA3-CA1 神経回路における興奮性ネットワークの活動伝播の様式を明らかにすることを目的として、その時間・空間特性を解析した。

【方法・結果・考察】

生後 6-8 日齢ラットから海馬急性切片を作製し、CA1 もしくは CA3 領域の神経細胞の活動を多細胞カルシウムイメージング法により記録した。本手法では、神経細胞の活動に依存した一過的な細胞内カルシウム濃度変化を蛍光輝度変化として捉えることで、多細胞の活動を同時に評価することができる (図 1A)。

1. 多細胞カルシウムイメージングによる抗てんかん薬の評価

てんかん誘発剤である GABA_A antagonist である bicuculline (10 μ M) を処置したところ、大きなカルシウム流入を伴う同期的な神経活動が反復して認められた (図 1B)。この同期活動をてんかん *in vitro* 表現型と捉え、各種抗てんかん薬の評価を実施した。抗てんかん薬として、Na⁺ channel blocker の phenytoin、

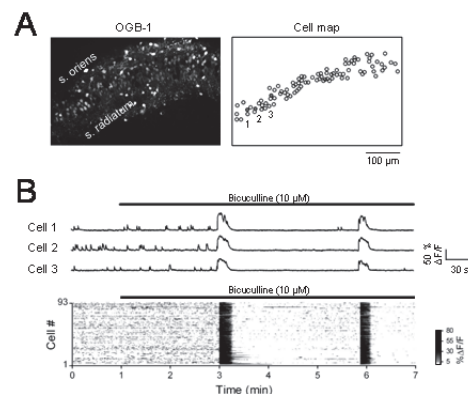


図 1. てんかん様同期活動

A. 海馬 CA1 領域での多細胞カルシウムイメージング像 (左) と、記録した神経細胞の配置 (右)。B. A に示された細胞の蛍光輝度のトレースの代表例 (上)。記録した全細胞の蛍光輝度変化 (下)。

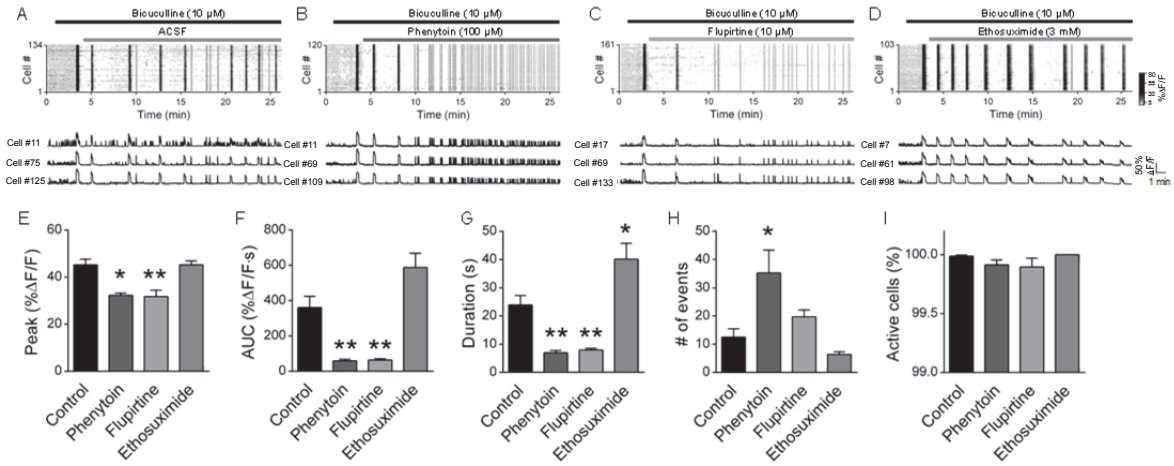


図 2. 各種抗てんかん薬の同期活動への作用

A-D. コントロール (ACSF, A)、phenytoin (100 μM, B)、flupirtine (10 μM, C)、ethosuximide (3 mM, D) 処置のてんかん様同期活動への作用。上段が全細胞の蛍光輝度変化。下段が蛍光輝度トレースの代表例。E. カルシウム流入ピーク。F. カルシウム流入の AUC。G. 流入持続時間。H. 同期イベント回数。I. 同期イベント中に活動した細胞の割合。

K⁺ channel opener の flupirtine、T-type Ca²⁺ channel blocker の ethosuximide を処置し、コントロール処置群と比較し同期活動のカルシウム流入について評価した (図 2A-D)。その結果、

phenytoin、flupirtine は共に同期活動のカルシウム流入のピーク、流入量 (AUC)、流入持続時間を減少させた。一方で ethosuximide はピークを変化させず、流入持続時間を増加させた (図 2E-G)。どの薬剤によっても同期活動自体は消失せず (図 2H)、てんかん様同期イベント中に活動した細胞の割合も変化しなかった (図 2I)。続いて薬剤が特定の細胞集団に顕著に作用するかどうかを検討するため、個々の細胞の薬剤処置前後のてんかん様同期活動のカルシウム流入ピークをプロットした。処置前のカルシウム流入ピークに対する、処置後のピーク変化率の相関について評価したところ、phenytoin では負の相関を示した (図 3A)。この結果は、phenytoin は個々の細胞の活動レベルに応じて薬効強度が変動することを意味する。その理由として、phenytoin が Na⁺ channel に対し state-dependent effect を持つ、すなわち phenytoin は激しく活動する細胞へ高い親和性を持つことによると考えられる。Flupirtine では特定の細胞集団への薬効特異性は認められなかった (図 3B)。

以上の結果から、てんかん様同期活動に対し、抗てんかん薬が多様な作用を示すことが明らかとなった。

2. 海馬 CA3-CA1 領域における神経細胞活動の時間・空間特性

上記の抑制性神経伝達が遮断された条件で観察されたてんかん様活動から、海馬 CA3-CA1 神経回路における興奮性ネットワークの活動パターンを明らかにすることを目的として、同期活動

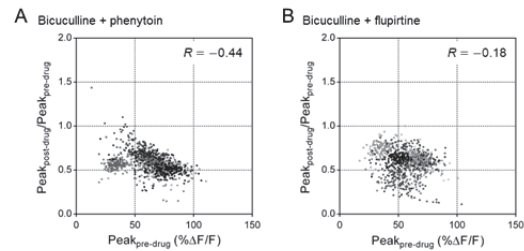


図 3. 薬剤処置前後のカルシウム流入ピーク

A, B. 薬剤処置前のてんかん様同期活動カルシウム流入ピークに対する処置後の変化率を個々の細胞でプロットした散布図。Phenytoin (A)、flupirtine (B)。

の発火タイミングに着目して解析した。まず、CA1 領域での活動を解析したところ、同期活動は全ての神経細胞が完全に同一のタイミングで発火するのではなく、個々の細胞は約 100 ミリ秒間の中の様々なタイミングで活動することが認められた。また、細胞が発火する順序は同期活動間で保存されていることが認められた。そこで、発火タイミングと細胞の位置情報を解析したところ、層構造の stratum oriens から stratum radiatum の方向で細胞の発火タイミングが異なり、stratum oriens に近い細胞ほど早く発火することが明らかとなった(図 4A, B)。海馬では CA3 領域から CA1 領域へ情報が伝達されることが知られていることから、次に、CA1 領域へ入力を行う CA3 領域での同期活動の発火タイミングを解析した。CA3 領域では、CA1 領域と異なり層構造の方向での発火タイミングの特異性は認められなかった(図 4C, D)。一方で、細胞ペアの全ての組み合わせにおいて細胞間距離を算出し累積分布を示したところ、全体の細胞群での分布に比べ、発火タイミングの早い上位 5% 群の分布は左にシフトし、細胞間距離が短いことが明らかとなった(図 4E)。すなわち、発火タイミングが早い細胞がスポット状に集積していることが示唆された。

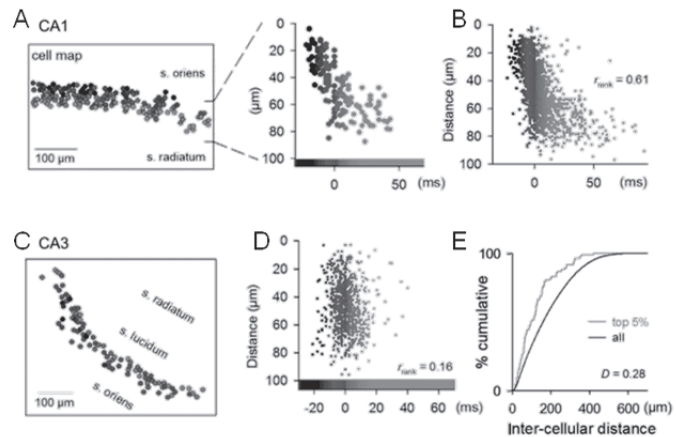


図 4. てんかん様同期活動の発火タイミングの細胞位置特異性

A. CA1 領域における同期活動の個々の細胞の発火開始タイミング (左)。発火タイミングに対する、stratum oriens と錐体細胞層との境界線からの距離の散布図 (右)。B. スライス 10 枚分、1444 細胞を纏めた結果。C. CA3 領域の同期活動の個々の細胞の発火タイミング。D. スライス 8 枚分、808 細胞における、発火タイミングに対する境界線からの距離の散布図。E. D のデータについて、発火タイミング上位 5% および全体の細胞ペアの細胞間距離の累積分布。

次に、CA1 領域へ入力を行う CA3 領域での同期活動の発火タイミングを解析した。CA3 領域では、CA1 領域と異なり層構造の方向での発火タイミングの特異性は認められなかった(図 4C, D)。一方で、細胞ペアの全ての組み合わせにおいて細胞間距離を算出し累積分布を示したところ、全体の細胞群での分布に比べ、発火タイミングの早い上位 5% 群の分布は左にシフトし、細胞間距離が短いことが明らかとなった(図 4E)。すなわち、発火タイミングが早い細胞がスポット状に集積していることが示唆された。

最後に、CA1 領域の同期活動について、連続する活動の時間特性を解析した。ある 2 つの同期活動について、1 つ目の発火タイミングを横軸、2 つ目の発火タイミングを縦軸として、細胞をプロットし、直交回帰直線の傾きを算出した(図 5A)。仮に 2 つの同期活動の発火タイミングが完全に同一であった場合、傾きは 1 となることが想定される。しかし、図 5A での傾きは 0.45 であり、2 つの同期活動の発火タイミングは異なることが示された。そこで、記録した全ての同期活動の組み合わせについて同様に回帰直線を引き、その傾きのマトリックス表を作成した(図 5B)。同期活動の性質が均一

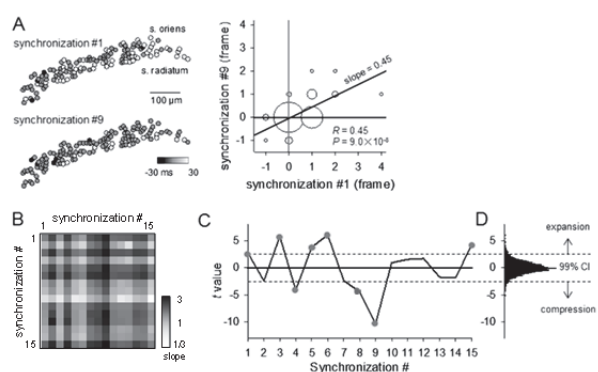


図 5. CA1 領域の同期活動の時間的揺らぎ

A. 記録された 2 つの同期活動 (#1、#9、左) の発火タイミングの相関プロット。直交回帰直線の傾きは 0.45。B. 記録された 15 回の同期の全ての組み合わせの直交回帰直線の傾きのマトリックス表。C. B のマトリックス表を 1000 回シャッフルして求めた chance distribution (D) の 1% 有意水準と比較して分類した同期活動の性質。

か否かを検証するため、回帰直線の傾きの大小で同期活動の状態を分類した。傾きが大きい場合、縦軸にプロットした同期は横軸の同期に比べ、発生時間幅が長い（同期の性質が拡大である）ことを反映する。一方で傾きが小さい場合、縦軸の同期は発生時間幅が短い（同期の性質が縮小である）ことを反映する。それぞれの同期の傾き（図 5B マトリックス表の行）について、マトリックス表をシャッフルして求めた **chance distribution** の 1% 有意水準（図 5D）と比較することで、同期の性質を検証した（図 5C）。その結果、それぞれの同期活動の性質は均一ではなく、拡大と縮小を繰り返す揺らぎを生じていることが明らかとなった。

以上の結果より、同期活動は CA3 領域の **hot spot** から発生し、CA1 領域の錐体細胞へ、**stratum oriens** から **stratum radiatum** の方向で活動が伝わるのが明らかとなった。CA1 領域での活動の順序は同期間で保存されているが、同期活動の性質は毎回均一ではなく、揺らぎが存在することが明らかとなった。

【総括】

本研究では、てんかん様同期活動を多細胞カルシウムイメージングで記録することにより、①抗てんかん薬の新たなプロファイル、および②海馬 CA3-CA1 神経回路における神経活動の伝播様式を明らかにした。①において、てんかん様イベント中に活動する細胞の割合は抗てんかん薬により影響を受けない点や、細胞活動程度に応じて **phenytoin** の薬効が変動する点は、多細胞イメージングの実施により初めて明らかとなった点であり意義深い。多細胞カルシウムイメージングによる薬剤評価は、今後、新たな薬剤プロファイルの発見へ繋がるのが期待される。また、同期活動は記憶などの情報処理にも重要であり、②では、多細胞カルシウムイメージングにより、興奮性ネットワークにおける同期活動の活動パターンはランダムではなく、時間・空間特異性があることを見出した。今回発見した海馬 CA3-CA1 神経回路における神経活動の伝播様式は、海馬における情報処理の新たな知見を提供するものとして意義があると考えられる。