

氏名	とくどめ けんたろう 徳留 健太郎
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博薬第30号
学位授与の日付	平成29年3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位論文題目	シナプス小胞蛋白質 SV2A のてんかん原性調節機能に関する薬理研究
論文審査委員	(主査) 教授 松村 靖夫 (副査) 教授 松村 人志 (副査) 教授 大野 行弘

論文内容の要旨

Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) は神経終末のシナプス小胞膜に局在し、神経伝達物質の開口分泌を調節している。これまでの報告から、SV2A をノックアウトした動物は生後数週間で重度のけいれん発作を示すことや、SV2A がラセタム系抗てんかん薬 (levetiracetam など) の結合蛋白質であることが知られており、SV2A がてんかんの発症・進展 (てんかん原性) に深く関与していることが示唆されている。しかしながら、SV2A のてんかん原性の調節メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、SV2A 遺伝子にミスセンス変異を導入した新たな動物モデル *Sv2a^{L174Q}* ラットを用い、てんかんの発症調節における SV2A の役割とメカニズムについて検討を行った。

遺伝子解析の結果、*Sv2a* に導入された変異は T521A の一塩基変異であることが明らかとなり、この変異により SV2A の第一膜貫通領域に L174Q のミスセンス変異が起っていた。*Sv2a^{L174Q}* 変異による脳内における SV2A 発現への影響を Western blot 法により評価した結果、*Sv2a^{L174Q}* 変異は SV2A の発現レベルおよび発現分布に影響を与えないことを確認した。また、免疫組織学的検討においても、SV2A は海馬 CA3 領域の透明層および歯状回の回門部に多く発現することが確認され、この発現パターンにも

Sv2a^{L174Q} 変異による影響は認められなかった。

初めに、*Sv2a*^{L174Q} ラットは通常飼育条件下で異常行動を示さなかった。次に、各種けいれん誘発剤に対するけいれん感受性を評価した。その結果、*Sv2a*^{L174Q} ラットは GABA_A 受容体拮抗薬である pentylenetetrazole (PTZ) によるけいれん発現に対して特異的な感受性の亢進を示した。また、PTZ を累積投与 (10, 20, 30 mg/kg, i.p., 30 min interval) した場合、*Sv2a*^{L174Q} ラットは 30 mg/kg の PTZ を処置した際に初めてけいれん発作を示した。一方、F344 ラット (対照群) はけいれん発作を示さなかった。さらに、てんかん原性のモデルと考えられているキンドリング形成に対する *Sv2a*^{L174Q} 変異の影響を評価した。その結果、全般発作モデルの PTZ キンドリングおよび部分発作モデルの扁桃核キンドリングの両方で、*Sv2a*^{L174Q} ラットはキンドリング形成を有意かつ顕著に促進した。また、けいれん誘発閾値の PTZ を投与した際の脳内興奮部位を、Fos 蛋白発現を指標に探索した結果、*Sv2a*^{L174Q} ラットの大脳皮質下 (深部) 領域において扁桃核が部位特異的に興奮していることが明らかとなった。

さらに、*Sv2a*^{L174Q} ラットのてんかん原性促進メカニズムを探る目的で、扁桃核および海馬におけるシナプス遊離機能を *in vivo* microdialysis 法により評価した。その結果、*Sv2a*^{L174Q} 変異は定常状態の GABA およびグルタミン酸のシナプス遊離に影響を及ぼすことなく、脱分極刺激により誘発される GABA のシナプス遊離を有意に低下させた。一方、脱分極刺激により誘発されるグルタミン酸の遊離に有意な影響を与えなかった。また、蛍光二重染色法により SV2A の扁桃核および海馬の発現パターンを細胞レベルで解析した結果、SV2A は GABA 神経マーカーである glutamate decarboxylase 1 と共染色された。一方、SV2A はグルタミン神経マーカーである vesicular glutamate transporter 1 とはほとんど共染色されなかった。これらの結果より、SV2A は扁桃核および海馬において GABA 神経に特異的に発現することが示され、これにより *Sv2a*^{L174Q} 変異は GABA のシナプス遊離機能を特異的に低下させると考えられた。さらに、海馬における開口分泌調節蛋白の発現に対する *Sv2a*^{L174Q} 変異の影響を Western blot 法により評価した。その結果、*Sv2a*^{L174Q} 変異は Ca²⁺ センサー蛋白質として機能する synaptotagmin1 (Synt1) の発現を特異的に低下させることが明らかとなり、*Sv2a*^{L174Q} 変異による GABA のシナプス遊離機能障害に Synt1 の発現低下が関与していることと示唆された。

本研究から、SV2A は扁桃核および海馬において GABA のシナプス遊離機能を特異的に調節しており、SV2A-GABA 系がてんかん原性を抑制的に制御することにより、てんかんの発症を調節していることが明らかとなった

論文審査の結果の要旨

Synaptic vesicle glycoprotein 2A (SV2A) は神経終末のシナプス小胞膜に局在し、神経伝達物質の開口分泌を調節している。これまでの報告から、SV2A をノックアウトした動物は生後数週間で重度のけいれん発作を示すことや、SV2A がラセタム系抗てんかん薬 (levetiracetam など) の結合蛋白質であることが知られており、SV2A がてんかんの発症・進展 (てんかん原性) に深く関与していることが示唆されてきた。しかし、SV2A のてんかん原性の調節メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、SV2A 遺伝子にミスセンス変異を導入した新たな動物モデル *Sv2a^{L174Q}* ラットを用い、てんかんの発症調節における SV2A の役割とメカニズムについて検討を行った。

初めに遺伝子解析を行った結果、*Sv2a* に導入された変異は T521A の一塩基変異であることが明らかとなり、この変異により SV2A の第一膜貫通領域に L174Q のミスセンス変異が起こっていた。*Sv2a^{L174Q}* 変異による脳内 SV2A 発現への影響を Western blot 法により評価した結果、*Sv2a^{L174Q}* 変異は SV2A の発現レベルおよび発現分布に影響を与えないことを確認した。また、免疫組織学的検討においても、SV2A は海馬 CA3 領域の透明層および歯状回の回門部に多く発現することが確認され、この発現パターンにも *Sv2a^{L174Q}* 変異による影響は認められなかった。

Sv2a^{L174Q} ラットは通常飼育条件下で異常行動を示さなかった。次に、各種けいれん誘発剤に対するけいれん感受性を評価した結果、*Sv2a^{L174Q}* ラットは GABA_A 受容体拮抗薬である pentylenetetrazole (PTZ) によるけいれん発現に対して感受性の亢進を示した。また、PTZ を累積投与 (10, 20, 30 mg/kg, i.p., 30 min interval) した場合、*Sv2a^{L174Q}* ラットは 30 mg/kg の PTZ を処置した際にけいれん発作を発現したのに対し、F344 ラット (対照群) ではけいれん発作は認められなかった。さらに、てんかん原性のモデルと考えられているキンドリング形成に対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響を評価した結果、全般発作モデルの PTZ キンドリングおよび部分発作モデルの扁桃核キンドリングの両方で、*Sv2a^{L174Q}* ラットは有意かつ顕著なキンドリング形成の促進現象を示した。また、けいれん誘発閾値の PTZ を投与した際の脳内興奮部位を、Fos 蛋白発現を指標に探索した結果、*Sv2a^{L174Q}* ラットでは扁桃核が部位特異的に興奮していることが明らかとなった。

さらに、*Sv2a^{L174Q}* ラットのてんかん原性促進メカニズムを探る目的で、扁桃核およ

び海馬におけるシナプス遊離を *in vivo* microdialysis 法により評価した。その結果、*Sv2a^{L174Q}* 変異は定常状態の GABA およびグルタミン酸のシナプス遊離に影響を及ぼすことなく、脱分極刺激により誘発される GABA シナプス遊離を有意に低下させた。一方、脱分極刺激により誘発されるグルタミン酸の遊離には有意な影響を与えなかった。また、蛍光二重染色法により SV2A の扁桃核および海馬の発現パターンを細胞レベルで解析した結果、SV2A は GABA 神経マーカーである glutamate decarboxylase 1 と共染色された。一方、SV2A はグルタミン神経マーカーである vesicular glutamate transporter 1 とはほとんど共染色されなかった。これらの結果より、SV2A は扁桃核および海馬において GABA 神経に特異的に発現することが示され、これにより *Sv2a^{L174Q}* 変異は GABA のシナプス遊離機能を特異的に低下させると考えられた。さらに、海馬における開口分泌調節蛋白の発現に対する *Sv2a^{L174Q}* 変異の影響を Western blot 法により評価した結果、*Sv2a^{L174Q}* 変異は Ca^{2+} センサー蛋白質として機能する synaptotagmin1 の発現を特異的に低下させることが明らかとなり、*Sv2a^{L174Q}* 変異による GABA のシナプス遊離機能障害に synaptotagmin1 の発現低下が関与していることが示唆された。

本研究から、SV2A は扁桃核および海馬において GABA のシナプス遊離機能を特異的に調節しており、SV2A-GABA 系がてんかん原性を抑制的に制御することにより、てんかんの発症を調節していることが明らかとなった。これらの結果は、SV2A のてんかん原性調節における役割と機能メカニズムを理解する上で重要な情報を提供し、今後のてんかん治療研究への応用展開を期待させるものである。

以上により、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。