

(様式D-2)
(別 紙)

令和 4 年度 海外派遣研究員研究報告書

令和 5 年 4 月 27 日

日本大学理事長 殿
日本大学学長 殿

所 属 歯学部 (総合歯学研究所)
資格・氏名 助教 ・ 金子 啓介

令和 4 年度海外派遣研究員 (短期 A) の研究実績を、下記のとおり報告いたします。

記

1 区 分 短期 A

2 研究課題

Kv3.1 突然変異関連てんかんモデルにおける PV⁺ニューロンの病態生理の調査

3 派遣期間 西暦 2022 年 12 月 15 日 ~ 2023 年 3 月 12 日

4 派遣先 アメリカ合衆国 ・ フィラデルフィア

5 研究目的

電位依存性 K⁺チャネル **Kv3.1** をコードする **KCNKI 遺伝子** の突然変異による機能障害はてんかん、自閉スペクトラム症、運動失調症などの **神経発達性障害** を引き起こす。Kv3.1 は中枢に存在する **Parvalbumin 陽性の GABA 作動性介在ニューロン** に特異的に発現している。Parvalbumin 陽性ニューロンは主に大脳皮質や小脳に存在し、抑制性神経伝達物質である **GABA** を軸索終末から放出することで高次中枢の微小神経回路内で興奮/抑制バランスの調整に深く関わっている。近年の研究では、この **GABA 作動性介在ニューロンの機能障害により興奮/抑制バランスが興奮側に偏ること** で神経発達性障害を誘発すると考えられているが、**KCNKI 遺伝子の突然変異がどのように Parvalbumin 陽性ニューロンの電氣的活動に影響を与えているかは不明である**。また、電位依存性 K⁺チャネルはニューロンの活動電位の再分極過程に寄与し、活動電位の連続性を維持するための最も重要なイオンチャネルであることが既にわかっている。そこで申請者は「**Kv3.1 の機能障害では Parvalbumin 陽性ニューロンの活動電位の連続発火の頻度が減少し、軸索における活動電位の伝達と神経伝達物質の放出が障害されることによって興奮性ニューロンの脱抑制を促し、神経発達性障害を誘発する**」という仮説のもと、Children's Hospital of Philadelphia の Goldberg 研究室にて以下の研究活動を行った。

6 研究概要

Goldberg 研究室が独自に作製した *KCNCL* 突然変異関連てんかんマウスモデル *Kcnc1-V421A/+*および *Kcnc1-p.Arg320His/+*を用いた。両マウスモデルはてんかん、自閉スペクトラム症、運動失調症などの神経発達性障害を示すことが行動実験により既に明らかにされている。本研究で対象となるニューロンは大脳皮質に存在する Parvalbumin (PV) 陽性の GABA 作動性抑制性介在ニューロンであり、同マウスモデルにおいて PV 陽性ニューロンを視覚的に弁別するため、PV-cre マウスと Ai14D マウスを交配させ繁殖させたマウスと同マウスモデルを交配させた。PV-cre と Ai14D が共発現する確率はメンデルの法則に従うため、繁殖されたすべてのマウスが利用可能になるわけではない。そこで、実験可能なマウスを効率よく入手するため、生後 0~1 日に Cre 依存性あるいは非依存性のウイルスベクターを大脳皮質相当部の硬膜下に注射し、PV 陽性ニューロンを蛍光ラベリングした。

生後 16-21 日経過した同マウスの大脳皮質の急性脳スライスを作製し、6 連同時パッチクランプ法を利用して蛍光ラベリングされた PV 陽性ニューロンと非蛍光の興奮性ニューロンから同時に全細胞記録を行い、電流固定モード下において発火特性および膜特性を記録し、電圧固定モード下において単一抑制性シナプス後電流および自発抑制性シナプス後電流の記録を収集した。また、Kv3.1 を選択的に活性化させる AUT-6 を用い、灌流投与前と灌流投与後での電気生理学的変化を解析した。

さらに、単細胞電圧イメージングを行うため、特殊な電位感受性色素を即時に細胞内ローディングし、軸索電圧イメージングを試みた。

現在、本研究の一部は SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE 誌に投稿後、査読者よりレビューが返ってきたばかりの状況である。解析結果、考察、および成果を以下に示す。

7 研究結果・成果

6 連同時パッチクランプ法を利用し、複数の PV 陽性ニューロンと興奮性錐体細胞から全細胞記録を行い、単一シナプスを探索し、PV 陽性ニューロンから興奮性錐体細胞に接続する単一抑制性シナプス後電流 (unitary inhibitory postsynaptic currents: uIPSCs) を記録した。

収集した uIPSCs のサンプルを解析し、以下の結果が得られた。Failure rate (uIPSCs の失敗率) をシナプス前 PV 陽性ニューロンの活動電位周波数 20 Hz, 40 Hz, および 120 Hz における解析を野生型マウスと *Kcnc1* モデルマウスで比較した結果、1 発目 uIPSC, 40 Hz の 10 発目 uIPSC, 120 Hz の 30 発目 uIPSC では有意差は認めなかった (1 発目 uIPSC : $p = 0.7424$, 40 Hz の 10 発目 uIPSC : $p = 0.3546$, 120 Hz の 30 発目 uIPSC : $p = 0.0797$)。一方で、20 Hz の 5 発目 uIPSC では $p = 0.0428$, 40 Hz の 5 発目 uIPSC では $p = 0.0213$, 120 Hz の 5 発目 uIPSC では $p = 0.0213$ であり、Failure rate が *Kcnc1* モデルマウスで有意に上昇していた。使用したマウスの数は野生型マウスで 29 頭 ($n = 61$), *Kcnc1* モデルマウスで 9 頭 ($n = 26$) であった。その他 uIPSCs の振幅および Paired-pulse ratio (PPR) を解析した結果、いずれも有意差は認めなかった (振幅 : $p = 0.7805$, 20 Hz PPR : $p = 0.9782$, 40 Hz PPR : $p = 0.8876$, 120 Hz PPR : $p = 0.9196$)。

また、同テクニックを利用して AUT-6 を灌流投与し、野生型マウスおよび *Kcnc1* モデルマウスにおいて投与前と投与後を比較解析した。*Kcnc1* モデルマウスにおいて各周波数の Failure rate および PPR に有意差は認めなかった (1 発目 uIPSC : $p = 0.5438$, 20 Hz の 5 発目 uIPSC : $p = 0.3427$, 40 Hz の 5 発目 uIPSC : $p = 0.6455$, 40 Hz の 10 発目 uIPSC : $p = 0.7563$, 120 Hz の 5 発目 uIPSC : $p = 0.6827$, 120 Hz の 30 発目 uIPSC : $p = 0.0705$, 20 Hz PPR : $p = 0.6295$, 40 Hz PPR : $p = 0.9199$, 120 Hz PPR : $p = 0.1704$)。一方で uIPSC の振幅は $p = 0.0182$ であり、AUT-6 による有意な振幅の減少を認めた。野生型マウスにおいてはいずれの解析結果においても有意差は認めなかった (1 発目 uIPSC : $p = 0.3870$, 20 Hz の 5 発目 uIPSC : $p = 0.2206$, 40 Hz の 5 発目 uIPSC : $p = 0.5486$, 40 Hz の 10 発目 uIPSC : $p = 0.6560$, 120 Hz の 5 発目 uIPSC : $p = 0.7533$, 120 Hz の 30 発目 uIPSC : $p = 0.0514$, 20 Hz PPR : $p = 0.7813$, 40 Hz PPR : $p = 0.7952$, 120 Hz PPR : $p = 0.8696$, 振幅 : $p = 0.5208$)。使用したマウスの数は *Kcnc1* モデルマウスで 5 頭 ($n = 5$), 野生型マウスで 4 頭 ($n = 13$) であった。

さらに、同テクニックを利用して複数の興奮性錐体細胞から全細胞記録をとり、電圧固定モードで AUT-6 を灌流投与し、野生型マウスおよび *Kcnc1* モデルマウスにおいて AUT-6 投与前と投与後の自発抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory postsynaptic currents: sIPSCs) を比較解析した。sIPSCs の振幅と発生頻度を解析した結果、*Kcnc1* モデルマウスでは AUT-6 により有意に振幅および発生頻度が減少した (振幅 ; $p = 0.0002$, 発生頻度 ; < 0.0001)。野生型マウスにおいても同じ傾向が認められ、AUT-6 により有意に振幅および発生頻度が減少した (振幅 ; $p = 0.0002$, 発生頻度 ; $p = < 0.0001$)。使用したマウスの数は *Kcnc1* モデルマウスで 4 頭 ($n = 21$), 野生型マウスで 4 頭 ($n = 33$) であった。

(様式D-2)

[7 研究結果・成果 (つづき)]

PV 陽性ニューロンの軸索において活動電位電動の電圧イメージングを行うため、即時発現型電位感受性色素である di-2-AN(F)EPPTEA を記録電極用ガラスピペットに充填する細胞内液に溶解させ細胞内ローディングし、超高速 CMOS カメラを用いて電圧イメージングを数回試みたが、di-2-AN(F)EPPTEA の細胞内ローディングまでは可能であったが、落射蛍光をニューロンに照射した直後に電位感受性色素の毒性によってニューロンが即時に細胞死を起こす問題に直面し、残念ながら電圧イメージングを行うまでには至らなかった。本実験は di-2-AN(F)EPPTEA の濃度や落射蛍光の強度に改善の余地があり、適切な条件を探索してから実験に取り掛かる必要がある。現在は Goldberg 研究室の一員が引き継いで実験を行っているところである。

上記の実験結果を考察すると、*Kcnc1* モデルマウスにおいてシナプス前細胞である PV 陽性ニューロンの活動電位発生頻度依存的に uIPSCs の Failure rate が増加する傾向がある。このことは、活動電位の連続的な生成に関わる電位依存性 K⁺チャネルのサブタイプの一つである Kv3.1 が機能障害になることで活動電位の伝達が障害される可能性を示唆している。

さらに、Kv3.1 に選択的に作用し外向き電流を増加させる作用のある AUT-6 の灌流投与では、単一シナプスレベルではほとんど効果がないことがわかった。PPR と Failure rate に対して有意な効果は示さなかったが、振幅を有意に減少させた。これは、AUT-6 が single cell レベルで K⁺電流を増加させ活動電位の発生頻度を増加させる一方で、代償的に軸索終末での Ca²⁺の流入が減少するために神経伝達物質の放出レベルが下がり、振幅の減少に寄与している可能性が示唆される。また、AUT-6 が sIPSCs の振幅を減少させた結果については上記と同様の考察で説明がつく一方で、発生頻度を減少させたことについては申請者の予想に反する結果となった。sIPSCs は単一シナプスレベルで評価することは難しく、複雑な神経回路メカニズムによりこの結果が得られた可能性が考えられる。

本研究の一部は SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE 誌へ投稿中の論文に含まれており、一次査読が終了している。今後は追加データの必要性について検討し、3 カ月以内に再投稿する予定である。既存のデータのサンプル数の追加や追加実験が行われる可能性が高く、アクセプトされるまでは公表することができないため、本報告書に係る図やデータの公表は割愛する。

以 上