

てんかんの新たな分子基盤としてのアダプター複合体の役割 — μ 3B遺伝子ノックアウトマウスによる研究—

The possible role of adaptor protein complex in the basic mechanisms of epilepsy; Behavioral and electroencephalographical analysis of epileptogenesis in μ 3B gene knockout mouse

岩佐博人¹⁾ 中津史^{2,3)} 笠置泰史⁴⁾ 岡田元宏¹⁾ 峯清一郎⁵⁾
金井数明¹⁾ 大野博司^{2,3)} 兼子直¹⁾

要旨：アダプター複合体(AP)はシナプス小胞の生合成を担う機能蛋白質であるが、そのサブタイプのひとつであるAP-3Bは神経系に特異的な分布を示す。てんかんの分子基盤におけるAP-3Bの役割を検討するため、 μ 3B遺伝子ノックアウトマウス(μ 3BKO)を用い、キンドリングによる行動学的、脳波学的解析を行った。 μ 3BKOではキンドリング完成までの期間の著明な短縮、および後発射持続時間の延長が認められた。キンドリングによって誘発された発作型は、無動状態と引き続く全般性強直間代発作であった。また、後発射の相関次元および高次スペクトル解析の結果から、きわめて複雑かつランダムな神経活動の発現と、神経回路網における相互作用の消失が引き起こされていることが予想された。以上より、 μ 3BKOのけいれん準備性の著明な亢進はキンドリングによって獲得されたものでなく、geneticな因子等によって内在的に惹起されている神経機能不全に帰因する可能性が推察された。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2003;15:31-38

Key Words: kindling, adaptor protein complex, μ 3B knockout mouse, correlation dimension, higher order spectra

はじめに

近年、アダプター複合体(adaptor protein complex, AP複合体)と呼ばれる機能蛋白質が、細胞内蛋白質輸送機構において重要な役割を担っていることが明らかとなってきた^{15, 16)}。AP複合体は、いわゆるtrans-Golgi

networkを介するエンドサイトーシス機構やシナプス顆粒の形成などに関与していることが報告されているが^{2, 3, 19)}、いくつかのサブクラスが知られている。そのひとつであるAP-3には、全ての組織に発現が認められるAP-3Aと神経細胞特異的に発現するAP-3Bがあ

¹⁾ 弘前大学医学部神経精神医学講座、

²⁾ 金沢大学 がん研究所 分子薬理学研究分野、

³⁾ 理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター

⁴⁾ 千葉大学大学院医学研究院 神経情報統合生理学、

⁵⁾ 千葉大学大学院医学研究院 脳神経外科学

Hiroto Iwasa¹⁾, Fubito Nakatsu^{2, 3)}, Yasufumi Kasagi⁴⁾, Motohiro Okada¹⁾, Seichiro Mine⁵⁾, Kazuaki Kanai¹⁾, Hiroshi Ohno^{2, 3)}, Sunao Kaneko¹⁾

¹⁾ Department of Neuropsychiatry, Hirosaki University School of Medicine, Japan

²⁾ Division of Molecular Membrane Biology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Japan

³⁾ Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, Japan

⁴⁾ Department of Integrative Neurophysiology, Chiba University Graduate School of Medicine, Japan

⁵⁾ Department of Neurosurgery, Chiba University Graduate School of Medicine, Japan

る。このためAP-3Bは中枢神経系において情報伝達機構や高次神経機能の発現に何らかの重要な役割を担っていることが予想されている。例えば、AP-3の自然変異マウスである mocha mouse では、hyperactivityなどの行動異常やてんかん性脳波異常などが発現することが報告されており、AP-3の異常はてんかんの分子基盤としても重要である可能性が考えられる¹³⁾。

大野、中津らによって樹立された μ 3B遺伝子ノックアウトマウス (μ 3B knockout mouse, μ 3BKO) は¹⁴⁾、AP-3B特異的な μ 3Bサブユニット遺伝子をノックアウトしたものであり、中枢神経系におけるAP-3Bの役割を検討するのにきわめて有意義である⁹⁾。さらに μ 3BKOは、生後3ヶ月前後から自発発作が発現することも確認されており、てんかんの病態基盤を探る上でも優れたモデルとなり得る。

周知のようにキンドリングモデルは、けいれん準備性の獲得機構を経時的に行動学的かつ脳波学的に把握できる利点がある⁵⁾。本研究はてんかんの病態基盤におけるアダプター複合体、特にAP-3Bの役割を明らかにするため、 μ 3BKOにおけるてんかん原生の特性をキンドリングによって検討した。またいくつかの脳波学的解析も加え、神経生理学的側面についても分析を試みた。

対象・方法

1. μ 3BKO

μ 3BKOは、 μ 3B遺伝子の開始コドンATG以下をGFP遺伝子およびloxP配列を両端に付加したneo耐性遺伝子で置き換えた変移ES細胞を樹立し、このマウスを卵母細胞特異的にCre遺伝子を発現するトランスジェニックマウスと交配することにより作成された。この μ 3BKOは、共同研究者の大野、中津らによって樹立・維持されている¹⁴⁾。

2. 行動観察および扁桃核キンドリング

全てのマウスは12時間昼夜サイクルの環境下で一匹ずつケージで飼育し、餌と水は自由

に摂取させた。行動観察は2人以上の観察者が一日2時間直接観察し、さらに赤外線カメラにて24時間モニターした。

μ 3BKO (n=6) および対照群 (C57BL/6J, n=7) とともに、以下の手順で慢性深部電極挿入および扁桃核キンドリングを施行した。

Pentobarbital (40mg/kg, 腹腔内投与) による麻酔下にて、マウス用脳定位固定装置 (Kopf社製) にマウス頭部を固定した。Franklin & Paxinosの図譜に従い⁴⁾、左扁桃核外側核にステンレス製双極電極を脳定位的に刺入し、マイクロコネクタに接続後、頭蓋骨上にデンタルセメントで固定した。

術後10日前後の回復期間をおいた後、50 Hz, 2相性矩形波を用い後発射誘発閾値の刺激強度の定電流刺激にて、電気キンドリングを行った。

発作発展段階は基本的にはRacineの分類に従って評価した¹⁸⁾。

3. 脳波学的特性の解析

キンドリング刺激時に出現した後発射 (afterdischarge, AD) を、帯域濾過0.5-250Hzで記録し、12bit, 500サンプル/secにてアナログ/デジタル変換した。

脳波学的解析はoff lineで行い、一般的な周波数解析に加え、脳全体の電気活動の複雑性を推定する指標として相関次元 (correlation dimension, CD) の解析を行った。CD解析では、脳波時系列の相互情報量関数の値に基づくdelayを基にして埋め込み空間 (embedding space) を再構成し、Grasberger-Procaccia法に従って次元推定を行ない^{6, 23)}、surrogate法により推定された次元の有意性を検証した^{12, 23)}。

さらに、脳内に推定される多数の電気活動部位間の相互作用を検出する指標として高次スペクトル (higher order spectra, HS) 解析を試みた。なお、HS解析では、後発射を250ms毎の解析区間に分割し、Welch法に準じてperiodogramを平滑化した後、4-60Hzの各周波数成分間のバイコーレンス (bicoherence) を求めた。

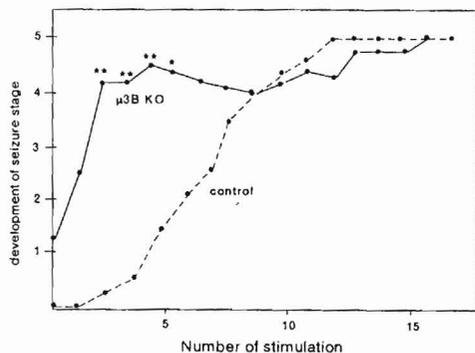


Fig.1 Seizure development in μ 3B knock-out mouse. Values represent mean \pm S.E.M. (Student's t-test, μ 3B; $n=6$; control; $n=7$. ** $p < 0.01$, * $p < 0.02$)

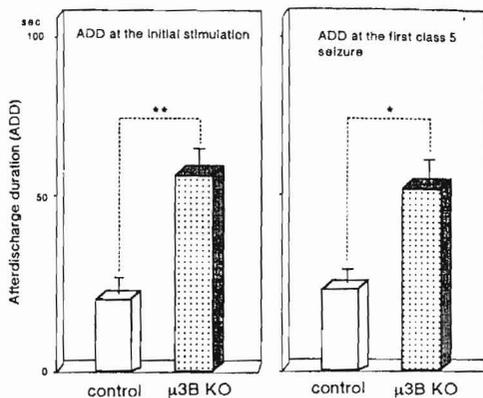


Fig.4 The changes in afterdischarge duration. Values represent mean \pm S.E.M. (Student's t-test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.02$)

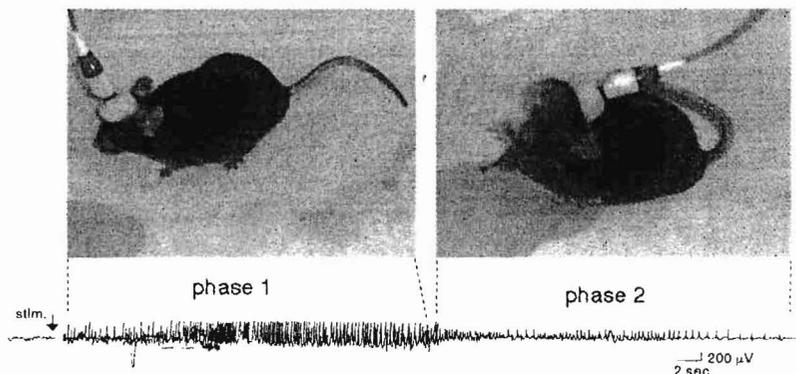


Fig.2 Afterdischarge and behavioural seizure in the μ 3B KO induced by kindling.

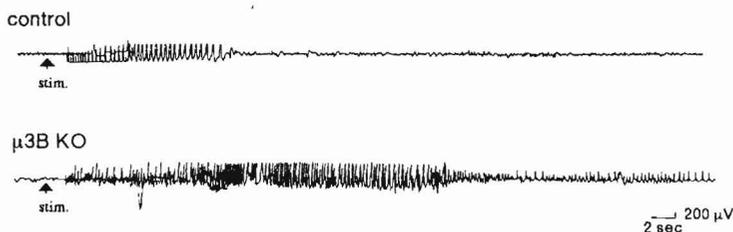


Fig.3 Afterdischarge in the μ 3B KO and control mice. Afterdischarges at the third stimulation for kindling. (Kindling site; left basolateral amygdala)

結 果

キンドリング実験では、 μ 3BKOは全例初回ないし2回目の刺激で全般発作が誘発され、対照群と比較してキンドリング完成までの期

間が著明に短縮していた (Fig.1)。キンドリングによって誘発された μ 3BKOの発作は、無動状態が先行し、引き続き全般性強直間代発作が出現するというパターンを示した (Fig.2)。

control

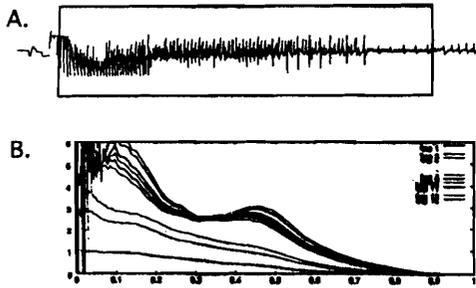
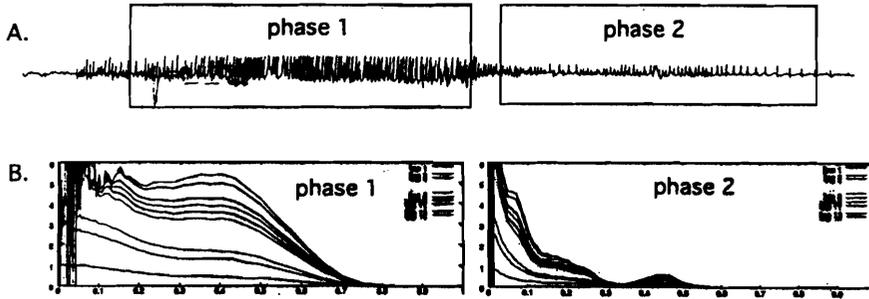


Fig.5 The estimation of correlation dimension (CD) of Afterdischarge
 A: afterdischarge induced by kindling.
 B: results of CD analysis.

μ 3B KO



A: Control

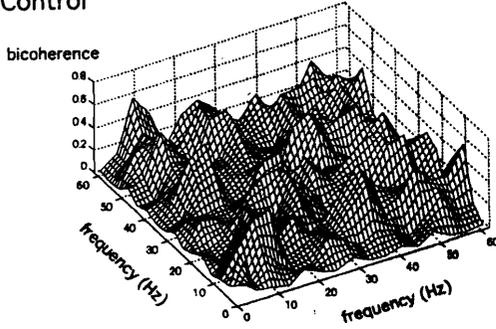
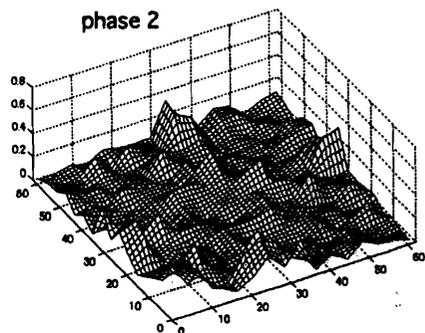
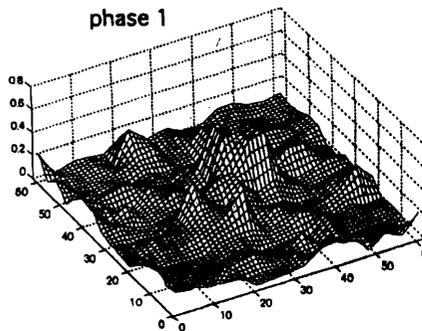


Fig.6 Results of HS analysis.
 Phase coupling of the activities of neuronal population is indicated by the level of bicoherence at every combination of frequency components.
 A: results in the control, B: results in phase 1 & phase 2 of μ 3BKO.

B: μ 3BKO



さらに、Fig.2, 3に示したように μ 3BKOの脳波上のADは視察的に2つのパターンから構成されており、刺激直後から出現する不規則、高振幅の棘波を主成分とする相(phase 1)と、それに引き続く律動的な棘波または棘徐波複合の群発から成る相が認められた(phase 2)。さらに、phase 1に相当する時期には行動上の無動状態が、また全般性強直間代発作はphase 2に相当する時期にはほぼ一致して認められた。

一方、対照群のキンドリングでは部分発作から段階的に全般発作へと発展する経過が認められ(Fig.2)、キンドリング完成時の発作は明らかな2次性全般発作であった。また、対照群のADは棘波の群発から成る単一のパターンを示し、 μ 3BKOのADのphase 1のようなパターンは出現しなかった(Fig.3)。

Fig. 4にAD持続時間について比較検討した結果を示した。 μ 3BKOのAD持続時間は対照群と比較して、初回刺激時および、初回全般発作(class 5)出現時ともに対照群と比較して著明に延長していた。

ADのCD解析では、 μ 3BKOのphase 1において、埋め込み次元の増加に伴う相関次元の収束がみられなかったが、Phase 2では、極めて低い水準(2未満)に収束する相関次元が推定され、phase 1に比較して複雑性の著明な低下が見られた(Fig.5)。対照群のADの分析では、AD全域にわたって低水準(2以上4以下)の相関次元が推定された(Fig.5)。

HS解析の結果をFig.6に示した。対照群のADに対するHS解析では、4-60Hzのほぼ全範囲にわたって有意なbicoherenceが推定される周波数成分の組合せが認められた。一方 μ 3BKOのADでは、phase 1, phase 2両相において、有意なbicoherenceが推定される周波数成分の組合せが著明に減少していた。

考 察

今回の研究結果から、 μ 3BKOのてんかん原生の特徴について若干の考察を加えた。

キンドリング実験では、 μ 3BKOにおいて、無動状態が先行し、引き続いて全般性の強直

間代発作が出現した。この発作出現様態は対照群のキンドリングで誘発された発作型とは異なるものであった。行動学的には μ 3BKOの自発発作と、キンドリングによって誘発された発作はほぼ同様のものと思われた。また、1-2回目の刺激でキンドリングによる全般発作が出現し、キンドリング完成までに要する期間も短縮していた。これらのキンドリングにおけるいくつかの指標からみると、 μ 3BKOのけいれん準備性は著明に亢進していると考えられる。キンドリング完成期間の著明な短縮がひきおこされるメカニズムは不明の点が多いが、おそらく、すでに μ 3BKOに内在していたてんかん原性が、キンドリングの際の高頻度電気刺激がトリガーとなって発現した結果である可能性が高い。このことは、行動学的に μ 3BKOのキンドリングによって出現した発作型と自発発作がほぼ同様のパターンであったことから推察される⁹⁾。

さらに今回の研究で試みたADの脳波学的解析結果からも、興味深い知見が得られた。CD解析の前提となる脳のモデリングでは、系により生成される時系列信号を系全体のふるまいを代表するシステム・パラメーターと考える²⁰⁾。すなわち、一对の電極から記録された脳波パターンを、脳全体の電気活動を代表する指標として解析する。この解析により推定された次元は脳の神経回路網全体のニューロン群の電氣的活動の複雑性の指標として推定される^{10, 20)}。

すでにいくつかの研究で、キンドリングモデルやヒトのてんかんの発作時脳波においてもCD解析行われているが、いずれも発作時には低レベルに収束する次元が推定されている^{1, 7, 17)}。本研究の結果でも、対照群においては同様の結果が得られたが、 μ 3BKOのphase 1のAD成分のCD解析では相関次元の収束が認められなかった。この結果は、 μ 3BKOの発作発現に、通常のキンドリングにおける発作発現機構とは異なるきわめて複雑かつ多様な要因が強く関与していることを示すものであると考えられる^{8, 17)}。いずれにせよ、この結果は μ 3BKOの発作発現あるいはAD出現

の病態生理学的基盤が、対照群と質的にことなるものであることを予想させる。

さらにHS解析の結果からも μ 3BKOにおける同様の神経生理学的な特性が推察された。HS解析では、線型分解された周波数成分は、複数の原信号のみを反映するのではなく、原信号間の相互作用ないし干渉によって新たに生成された非線型成分を含むという前提に立っている²¹⁾。今回検討したbicoherenceは、こうした原信号間に見られる相互作用を、位相結合 (phase coupling) として統計的に検出したものといえる。実験的な研究からも、周波数成分間に有意なbicoherenceが推定された場合、それが脳の神経回路網における独立した信号源間にある相互作用ないし機能的連携の様態を推定する指標となり得ることが示唆されている²¹⁾。このようなHS解析の前提となる原理を踏まえて今回のデータを解釈した場合、 μ 3BKOの脳では対照群において認められた神経回路網における相互作用ないし機能的な連関が著明に障害されていることが推定される。

以上の結果をまとめて考えると、 μ 3BKOのてんかん原生の基盤として、きわめて複雑かつランダムな神経活動の発現と、神経回路網における相互作用の消失が重要な要因であることが予想される。さらに、このような特性は、通常のkindling engramの獲得によるものではなく、geneticな因子等によって内在的に惹起されている複雑かつ広範な神経機能不全に帰因する可能性が推察された。

先述したようにAP-3のミュータントであるmocha mouseでは行動異常や海馬における聴覚誘発電位異常およびてんかん性棘波の出現などが認められている¹³⁾。しかし、このマウスはAP-3Aおよび3B共通のサブユニットである δ サブユニットの自然変異マウスであり¹¹⁾、病態 (phenotype) と遺伝子異常との関連が不明確である。今回用いた μ 3BKOは、AP-3Bに特異的なサブユニットの欠損が分子基盤として存在する個体であり、発現したphenotypeとAP-3Bの異常が直接的に関連している可能性が高い。したがって、本研究で

示した μ 3BKOのきれん準備性の特性は、てんかん原生獲得の分子基盤にAP-3Bがきわめて重大な意義を有していることを示唆するものと考えられる。また、てんかんの分子機構におけるAP-3Bの役割についてのさらなる解明は、根源的治療法開発という側面においても新たな切り口となることが期待されよう。

文 献

- 1) Andrzejak RG, Widman G, Lehnertz K, Rieke C, David P, Elger CE. The epileptic process as nonlinear deterministic dynamics in a stochastic environment: an evaluation on mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2001; 44, 129-40.
- 2) Blumstein J, Faundez V, Nakatsu F, Saito T, Ohno H, Kelly RB. The neuronal form of adaptor protein-3 is required for synaptic vesicle formation from endosomes. *J Neurosci* 2001; 21, 8034-8042.
- 3) Faúndez V, Horng J-T, Kelly RB. A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* 1998; 93, 423-432.
- 4) Franklin KB, Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 2001, San Diego.
- 5) Goddard GV, McIntyer DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from electrical stimulation. *Exp. Neurol* 1969; 25, 295-330.
- 6) Grassberger P, Procaccia I. Measuring the strangeness of strange attractors. *Physica D*, 1983; 9, 189-208.
- 7) Hornero R, Espino P, Alonso A, Lopez M. Estimating complexity from EEG background activity of epileptic patients. *IEEE Engineering in Medicine and Biology* 1999; 18, 73-79.
- 8) Ivanov DK, Posch HA, Stumpf C. Statistical measures derived from the correlation integrals of physiological time series. *Chaos* 1996; 6, 243-253.

- 9) Iwasa H, Nakatsu F, Kasagi Y et al. The possible contribution of adaptor protein complex in the basic mechanisms of epilepsy; Experimental studies of seizure susceptibility in μ 3B gene knockout mice. *Epilepsia* 2004, in press.
- 10) Jansen BH. Nonlinear dynamics and quantitative EEG analysis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1996; **45**, 39–56.
- 11) Kantheti P, Qiao X, Diaz ME, Penden A, Meyyer GE, Carskadon S et al. Mutation in AP-3d in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* 1998; **21**, 111–122.
- 12) Kantz H and Schreiber, T *Nonlinear Time Series Analysis*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- 13) Miller CL, Burmeister M, Stevens KE. Hippocampal auditory gating in the hyperactive mocha mouse. *Neurosci Lett* 1999; **276**, 57–60.
- 14) Nakatsu, F., Okada, M., Kamiya, H., Iwasa, H., Harada, A., Manabe, T., Kaneko, S., Yuasa, S., Saito, T., Ohno, H.: Establishment of neuron-specific μ 3B-deficient mice. Abstract of 41th Society for Neuroscience Annual Meeting, Orlando, 2002.
- 15) Ohno, H., Aguilar, R. C., Yeh, D., Taura, D., Saito, T., Bonifacino, J. S. The Medium Subunits of Clathrin Adaptor Complexes Recognize Distinct but Overlapping Sets of Tyrosine-based Sorting Signals. *J Biol Chem* 1998; **273**, 25915–25921.
- 16) 大野博司. 分泌系およびエンドサイトーシスにおける蛋白質輸送機構. *蛋白質 核酸 酵素* 1997; **42**, 2072–2080.
- 17) Pijn JP, Neerven JV, Noest A, Lopes da Silva FH. Chaos or noise in EEG signals; dependence on state and brain site. *Electroencephal Clin Neurophysiol* 1991; **79**, 371–381.
- 18) Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1972; **32**, 281–294.
- 19) Salem S, Faundez V, Horng JT, Kelly RB. A v-SNARE particulates in synaptic vesicle formation mediated by the AP3 adaptor complex. *Nature Neurosci* 1998; **1**, 551–556.
- 20) Sarbadhikari SN, Chakrabarty K. Chaos in the brain: a short review alluding to epilepsy, depression, exercise and lateralization. *Med Eng Phys* 2001; **23**, 445-55.
- 21) Schanze T, Eckhorn R. Phase correlation among rhythms present at different frequencies: spectral methods; application to microelectrode recordings from visual cortex and functional implications. *Int J Psychophysiol* 1997; **26**, 171–189.
- 22) Takens F. Detecting strange attractors in turbulence. In: *Dynamical systems and turbulence*, Warwick 1980 (Lecture notes in math 898). Berlin: Springer, 1981; 366–381.
- 23) Theiler J, Eubank St, Longtin A, Galdrikian B, Farmer JD. Testing for non-linearity in time series: the method of surrogate data. *Physica D* 1992; **58**, 77–94

Summary

The possible role of adaptor protein complex in the basic mechanisms of epilepsy; Behavioral and electroencephalographical analysis of epileptogenesis in μ 3B gene knockout mouse

Hiroto Iwasa, Fubito Nakatsu, Yasufumi Kasagi,

Motohiro Okada, Seiichiro Mine, Kazuaki Kanai, Hiroshi Ohno, Sunao Kaneko

Adaptor protein complex (AP) is associated with the molecular mechanism of coated vesicles

budding from trans-Golgi network. AP-3B, a subclass of AP, predominately expressed in the brain and is suggested to play a role in the basic mechanisms of neural function. We evaluated the behavioral and electrophysiological features of epileptogenesis in the μ 3B gene knockout mice (μ 3BKO) by kindling to clarify the contribution of AP-3B in the basic mechanisms of epilepsy. The remarkable facilitation of development of kindling and prolonged afterdischarge (AD) were observed in μ 3B KO. μ 3B KO showed behavioral arrest followed by severe generalized tonic clonic convulsion by the first or second kindling stimulation. Correlation dimension and higher order spectra analysis of AD showed that the brain of the kindling in the control mice had modestly complex discharge activities with functional interconnection among the multiple source generators. In contrast, quite complex and random-like discharge activities and abolishment of interaction among the source generators in μ 3BKO point to a possibly complex pathogenesis. These findings suggest that the epileptogenesis in μ 3BKO, rather than being derived from the acquisition of a kindling engram, might be responsible for severe brain dysfunction induced by intrinsic and/or genetic factors.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found.2003;15:31-38