

## 学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 薬品作用解析学研究室  
職・氏名 助教・國澤 直史

### 研究テーマ：

てんかん病態における Phf24 の機能メカニズムの解明

### 研究期間：

2020 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日

### 研究担当者：

#### <本学>

研究代表者 國澤 直史 (大阪医科薬科大学・薬学部・助教)  
研究分担者 大野 行弘 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)  
研究分担者 清水 佐紀 (大阪医科薬科大学・薬学部・准教授)

#### <共同研究機関>

研究代表者 芹川 忠夫 (京都疾患モデル研究所)

### 研究目的：

これまで多くの抗てんかん薬が開発されてきたが、既存の抗てんかん薬では効果が不十分な難治性てんかん患者が患者数全体の約 30%を占めること、てんかん原性を抑制する根本治療薬の開発には未だ至っていないことから、新たなてんかん病態メカニズムの解明と新規作用機序を有する治療薬の開発が切望されている。

Phf24 は、3 量体タンパク質の Gai サブユニットに特異的に結合する機能タンパク質であり、Gi/o 共役型 GPCR の機能制御に関与していることが知られているが、その中枢神経系における詳細な機能については未だ不明である。一方、Phf24 はてんかんモデル動物 Noda epileptic rat (NER) の発作原因候補因子として報告されており、また、我々はこれまでに、Phf24 がけいれん感受性およびてんかん原性獲得制御に関与していることを明らかにしてきた (Behav. Brain Res., 369, 111922, 2019)。

本研究では、Phf24 を介したてんかん病態メカニズムの解明ならびに新たなてんかん治療法の提案を目指し、Phf24 欠損ラットを用いた行動薬理学的研究、神経化学的研究、脳波研究を実施した。

### 研究内容および研究成果：

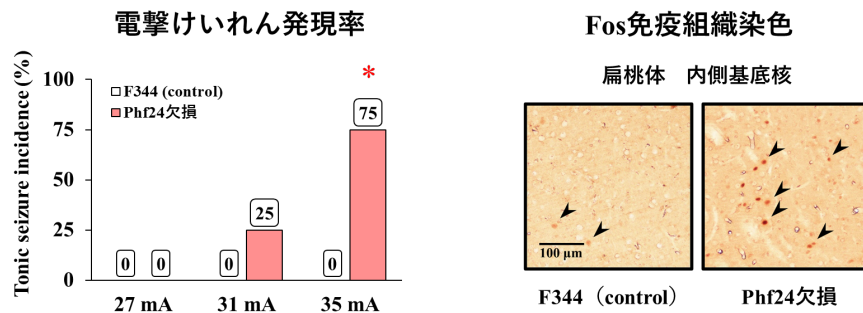
#### ① Phf24 欠損ラットのけいれん感受性亢進に関わる脳内原因部位の同定

[目的] 本研究では、電撃けいれんに対する Phf24 欠損ラットの感受性を評価するとともに、神経興奮マーカーである Fos タンパク質の発現を指標として脳内神経興奮部位の探索を行った。

[方法] 実験には、11-13 週齢の Phf24 欠損ラットと F344 ラット (対照群) を用いた。各動物の耳介に装着した装置から電撃刺激 (電流 : 27-35 mA、周波数 : 200 pulses/sec、パルス間隔 : 0.5 msec、

電撃持続時間：1 sec) を与え、誘発されるけいれん行動を評価した。電撃刺激から 2 時間後、35 mA の電撃刺激を与えた動物から脳を摘出し、後日、Fos タンパク質の免疫組織染色に用いた。

[結果] Phf24 欠損ラットでは、31 mA の電撃刺激によって 25%、35 mA の電撃刺激によって 75% の動物で強直性けいれんが誘発された。一方、F344 ラットでは、27-35 mA の電撃刺激によってけいれんを呈した動物はいなかった。また、脳内 Fos 発現を解析した結果、Phf24 欠損ラットでは F344 ラットと比較して、体性感覚皮質、視床紐傍核、視床室傍核、海馬 CA3、海馬歯状回、扁桃体内側基底核における Fos 陽性細胞数が有意に増加していた。これらの結果は、Phf24 が上記脳領域における神経興奮調節に関与しており、けいれん発現を制御していることを示唆する。

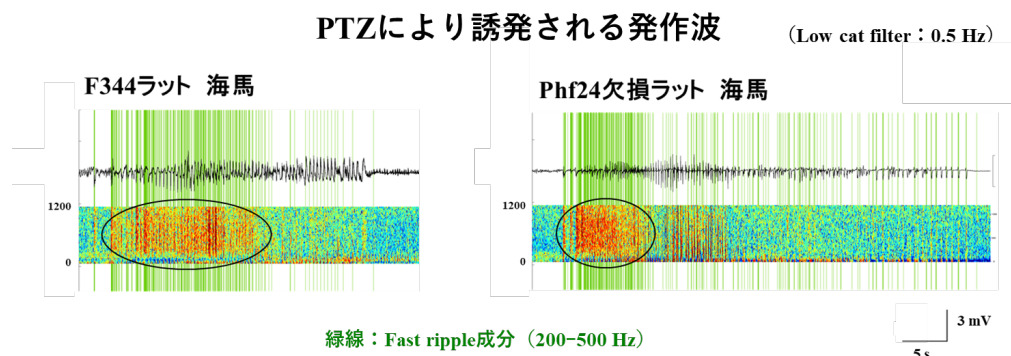


## ② Phf24 欠損ラットの PTZ 誘発発作時脳波解析

[目的] 本研究では、Phf24 の欠損が発作時脳波に与える影響を明らかにする目的で、ペンチレンテトラゾール (PTZ) により誘発される発作時の広域周波数脳波解析を行った。特に、神経細胞の異常な同期発火を反映していると考えられている高周波数成分 (High frequency oscillations: HFOs, 80-500 Hz) の発現特性について評価した。

[方法] 実験には、15-16 週齢の Phf24 欠損ラットと F344 ラットを用いた。各動物の皮質 (前頭葉硬膜下)、海馬、扁桃体に慢性的に電極を留置し、2-4 日間の回復期間の後、PTZ (40 mg/kg, i.p.) 誘発けいれん発作時の広域周波数脳波を記録した。実験終了後、発作波持続時間の計測、HFOs の発現解析を行った。HFOs の発現解析では、1 つの発作波内に発現する HFOs 数を計測するとともに、発作波内における HFOs の時間的な発現分布を算出した。

[結果] F344 ラットと比較し、Phf24 欠損ラットの皮質、海馬、扁桃体では、PTZ による発作波持続時間が有意に長かった。また、発作波内での HFOs 発現数は Phf24 欠損ラットで増加しており、特に海馬では F344 ラットと比較して統計学的に有意な差が認められた。さらに、HFOs の時間的な発現分布を解析した結果、Phf24 欠損ラットでは PTZ による発作初期に HFOs の発現が集中していることが明らかになった。これらの結果から、Phf24 の欠損は、皮質、海馬、扁桃体における異常な神経同期活動をもたらすことが示唆された。

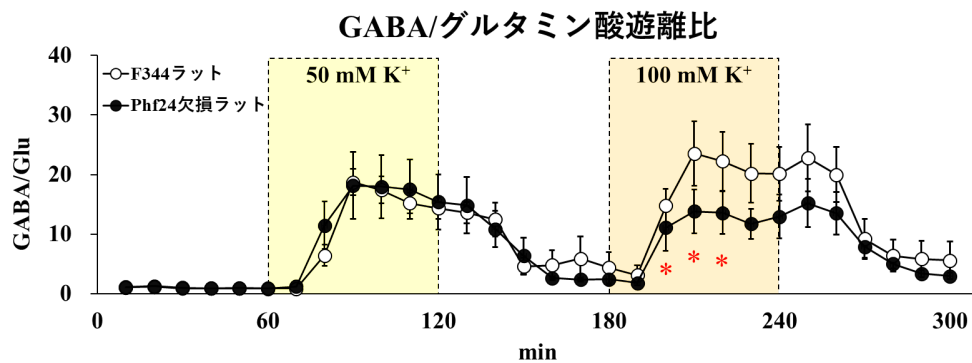


### ③ Phf24 欠損による神経伝達物質遊離機能変化の評価

[目的] 本研究では、*in vivo* microdialysis 法を用いて、Phf24 の欠損が興奮性神経伝達物質グルタミン酸および抑制性神経伝達物質 GABA の遊離機能に与える影響を評価した。

[方法] 実験には、11-12 週齢の Phf24 欠損ラットと F344 ラットを用いた。予め各動物の扁桃体にガイドカニューレを留置し、4-7 日間の回復期間を設けた。実験当日、ガイドカニューレを介して透析プローブを挿入し、人工脳脊髄液 (aCSF) を灌流することで脳組織中の細胞外液を回収した。脱分極刺激による神経伝達物質遊離機能の評価では、高カリウム濃度 (50, 100 mM) の aCSF を用いた。サンプルを回収後、グルタミン酸および GABA 濃度を HPLC-ECD システムを用いて解析した。

[結果] 定常時の細胞外グルタミン酸および GABA 濃度に両群間で差はなかったが、100 mM の高カリウム刺激によるグルタミン酸遊離および GABA 遊離は、F344 ラットと比較して Phf24 欠損ラットで有意に促進された。また、高カリウム刺激時のグルタミン酸遊離に対する GABA 遊離の割合 (GABA/グルタミン酸比) は、Phf24 欠損ラットで有意に低かった。これらの結果より、Phf24 の欠損はグルタミン酸および GABA の遊離機能を亢進させ、興奮性/抑制性のバランスを興奮性に傾けることが明らかになった。



本研究結果より、Phf24 は皮質、海馬、扁桃体領域における神経興奮調節や興奮性/抑制性バランスの維持に関与しており、けいれん発現を制御していることが示唆された。

成果発表：

<原著論文>

<学会発表>

- NER の行動異常における Phf24 遺伝子の関与についての検討., 芹川忠夫、中西聡、吉原亨、浅野雅秀、清水佐紀、國澤直史、大野行弘、笹 征史., 第 67 回日本実験動物学会総会, 2020/5/23-25 (大阪、誌上開催)
- Phf24 欠損ラットのけいれん感受性亢進に関する薬理および脳波研究., 國澤直史、久積博明、加藤将貴、清水佐紀、佐藤和明、金星匡人、松橋眞生、池田昭夫、芹川忠夫、大野行弘., 第 16 回日本てんかん学会近畿地方会, 2021/1/17 (大阪、オンライン)
- Phf24 欠損ラットにおける PTZ 誘発けいれん発現時の広域周波数脳波解析., 國澤直史、久積博明、加藤将貴、清水佐紀、佐藤和明、金星匡人、松橋眞生、池田昭夫、芹川忠夫、大野行弘., 日本薬学会第 141 年会, 2021/3/26-29 (広島、オンライン)

- Phf24 欠損ラットのけいれん感受性評価および発作原因部位の探索., 國澤直史、久積博明、加藤将貴、清水佐紀、佐藤和明、金星匡人、松橋眞生、池田昭夫、芹川忠夫、大野行弘., 第 94 回日本薬理学会年会、2021/3/8-10 (北海道、オンライン)
- Phf24 欠損ラット扁桃核における神経伝達物質遊離の変化., 加藤将貴、國澤直史、清水佐紀、中尾宏有介、松村光紗、山下窓、山田裕己、芹川忠夫、大野行弘., 日本薬学会第 142 年会、3/25-28 (名古屋、オンライン)

#### <その他>

- 新規てんかん原性因子 Gai-interacting protein (GINIP)の機能解析研究., 大野行弘、國澤直史、清水佐紀、芹川忠夫., てんかん治療研究振興財団研究年報, 31:1-8, 2020.
- 新規てんかん関連因子 Phf24 の機能解析., 國澤直史、芹川忠夫、清水佐紀、大野行弘., BIO Clinica, 36: 55-59, 2021.