

ストレス性情動系障害に関わる糖・脂質関連 分子メカニズムの解明

平成 24 年 5 月 1 日受付

加藤 啓子*

要旨

ヒト難治てんかんの5割を占める側頭葉てんかんのモデルマウスを用いた研究より、てんかん発症後、脳内で成長ホルモンと α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)が著しい発現上昇を示すことを見つけていた。そして α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺伝子を欠損したマウスは、側頭葉てんかんの誘導刺激に反応せず、うつ病や不安障害を示すと共に、脳内の成長ホルモンの発現量を低下していた。下垂体で発現する成長ホルモンは、脂質分解促進・遊離脂肪酸放出作用を持つ事が知られているが、今回我々は、脳内の成長ホルモンシグナル系を介した糖・脂質代謝が、てんかん～うつ病、不安障害等の神経精神疾患に関与する可能性を示唆した。

キーワード：てんかん、情動、シアル酸、ホルモン、脂質

はじめに

てんかんは、ヒト・ネコで1%、イヌで平均2-3%に発症する頻度の高い慢性神経疾患である。その原因は遺伝的素因に起因した突発性の場合と、ガン化・虚血・水頭症等も含めた二次的な素因に起因した症候性の場合によるものが知られているが、根本的な障害は、神経回路網の異常な同期性放電が原因である。てんかんの約2-3割の患者は、てんかん薬に対する抵抗性を獲得する難治てんかんへと進行するが、薬剤耐性の獲得を予防するには、これまで標的とされてきたチャネルや受容体に対する作動薬や拮抗薬ではない、新たな分子システム上の分子を標的とする必要がある。

一方でこれまでも、てんかんが躁うつ病や統合失調症のリスク要因であること、うつ病治療薬服用中にてんかんを発症する事例があること、さらには女性のてんかん発作が性周期に強く左右されることから、てんかんとストレス性情動系障害の発症の間には何らかの関連性のあることが示唆されていた。一方で、ヒトの肥満がうつ病や不安症と相関関係にあることや、ケトン食が難治てんかんに有効である等、脂質代謝が神経精神疾患発症と何らかの関連性のあることも知られていた。しかしながらこうした関連性の分子メカニズムはわかっておらず、分子レベルで解明するには新規のモデル動物が必要であった。我々は、側頭葉てんかんモデルマウスと、 α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)遺

* 京都産業大学総合生命科学部

伝子欠損マウスを用いた研究から、 α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)と成長ホルモンが、てんかん〜うつ病、不安障害等の神経精神疾患の発症に関与する候補分子である事を見つけた。また最近になって、 α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)の制御下にある成長ホルモンの作用が、脳内の脂質代謝に影響する知見を得たので、本項で紹介する。

材料と方法

1. 側頭葉てんかんモデルマウス(扁桃体キンドリングマウス)

動物は成熟マウス(Slc: ddY, 雄, 8週齢, 日本SLC)を購入し, 10日間の輸送ストレス除去期間を設けた。9週齢で手術を行い, さらに1週間の手術ストレス除去期間を設けた後から刺激を開始した。一連の動物実験は, 京都産業大学動物実験計画指針に準拠し, 実施した。

扁桃体キンドリングマウスは, 情動学習の中枢である扁桃体に電極を挿入し, けいれん閾値以下の軽微な電気刺激を一日一度加えていくと, はじめは局所に限局していたけいれん波が次第に増加し, 脳の広範な部位に広がり, ついには大発作を示すてんかんモデルである。扁桃体へのキンドリング刺激電極として, イソフルランによる吸入麻酔下のマウスを脳固定台に固定し, 扁桃体基底外側核(陰極: プレグマより右3mm, 後2mm, 深4.5mm)にタングステン線電極(インターメディカル社, 0.1 ϕ ×200mm コート付き)を挿入し, 硬膜下(陽極: プレグマより左1.5mm, 前1.5mm)に, ϕ 1.0mm ステンレス線を挿入した。脳波計測には, 両側の硬膜下に ϕ 1.0mm ステンレス線を挿入した。術後ストレスを7-10日間除いた後, 電気刺激装置(SEN-3301, 日本光電)とアイソレーター(SS-202J, 日本光電)を用いて1日1回扁桃体にキンドリング刺激(450~650 μ A, 200 μ sec duration, 60Hz, 2 sec)を与えた。

キンドリング形成過程の評価基準はRacineの評価法変法により評価した[1]: ステージ1, 5秒以下のすくみ, 顔面の痙攣; ステージ2, 5~15秒のすくみ; ステージ3, 15秒以上のすくみ; ステージ4: フリーズ後全身の軽度痙攣及び尾の緊張による挙上; ステージ5, 全身の痙攣, 大発作。

マウス海馬へ薬液を投与するため, マイクロインジェクションカニューレ(ϕ 0.2mm)を海馬(プレグマより左1.5mm, 後2.0mm, 深2.5mm)に挿入した。

2. 行動学的解析

オープンフィールド試験では, AUTOMEX II (東海医理科)の床(25cm×45cm)を12マスに分割したオープンフィールドにマウスを入れ, 10分間の総移動距離, グルーミング総時間, 立ち上がり回数, 糞の数を計測した。活動量は, 赤外線センサー(BAI-2012, Biotex kyoto)を用いて, ケージ内における24時間の行動量を計測した。行動量は1分毎に自動計測し24時間あたりの平均行動量/minを測定した。測定は12時間の明暗周期維持, 音量100db, 光量150-200luxを維持した閉鎖空間でおこなった。

3. mRNA 発現量の計測

大脳皮質前部(ブレグマから前 5.2~0.9mm)、海馬・扁桃体を含む大脳皮質後部(ブレグマから前 0.9~後 4.0mm)、視床から total RNA を抽出後、逆転写酵素により、ランダムプライマー存在下で cDNA を合成し、以下のプローブあるいは、プライマーを用いて RT-PCR を行った。

成長ホルモン mRNA の発現量は、TaqMan プローブ (Applied Biosystems) と Premix Ex Taq (Takara Bio Inc.) を用い、7400 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) により RT-PCR を行い、GAPDH 発現量をコントロールとして計測した。プライマーは以下のものをデザインした：成長ホルモンプライマー、5'-GGC TGC TGA CAC CTA CAA AGA GTT-3' / 5'-AGA AAG CAG CCT GGG CAT T-3' / 5'-FAM-CCC GAG GGA CAG CG-3' (86 bp, 208-293^{bp} in NM008117) ; GAPDH プライマー 5'-GGA GCG AGA CCC CAC TAA CA-3' / 5'-GGC GGA GAT GAT GAC CCT TT-3' / 5'-VIC-CCA CGA CAT ACT CAG CAC-3' (136 bp, 278-413^{bp} in NM008084)。一方 Arc mRNA の発現量は、SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) を用いて反応させた後、1.4% アガロースゲル電気泳動によりバンドが 1 本であることを確認した。SYBR Green を用いた場合も、GAPDH 発現量をコントロールとして計測した。Arc プライマー 5'-GCC GCC AAA CCC AAT GT-3' / 5'-GCT CTC GCT CCA CCT GCT T-3' (118 bp, 262-379^{bp} in NM018790) ; GAPDH プライマー 5'-GGA GCG AGA CCC CAC TAA CA-3' / 5'-GGC GGA GAT GAT GAC CCT TT-3' (GAPDH, 136 bp, 278-413^{bp} in NM008084)。

4. 糖脂質及びリン脂質の検出

海馬・扁桃体を含む大脳皮質後部から、Folch 変法により脂質粗画分を抽出した。具体的には、クロロホルム：メタノール (2:1) 溶媒下超音波処理 (10 分) 後、クロロホルム：メタノール：水 (5:8:3) 溶媒下超音波処理 (10 分) を行った。その後窒素ガス存在下で乾燥後、クロロホルム：メタノール (2:1) により脂質粗画分を溶解した (1mg/1 μ l)。

4-1. イヤトロビーズによる脂質画分の検出

イヤトロビーズ (三菱化学ヤترون, Cat, No, 915086) により、脂質を極性により分離した。具体的には、クロロホルム：メタノール比率を、9:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1 と徐々に極性を上げることで、糖脂質、リン脂質、酸性糖脂質の粗画分を得た (1mg/1 μ l)。【9:1 (中性糖脂質と単純脂質を主に回収) ; 4:1 (中性糖脂質とリン脂質を主に回収) ; 2:1 (リン脂質を主に回収) ; 1:1 (リン脂質と酸性糖脂質を主に回収)】

イヤトロビーズ粗精製脂質の薄層クロマトグラフィーでの展開系 (Forch 粗画分の場合、4 μ l, イヤトロビーズ粗精製の場合、1 μ l 展開) を以下に記す。

●一次元展開の場合。

- ① クロロホルム：メタノール (9:1 & 4:1) 溶出画分の展開溶媒として 1-プロパノール：クロロ

ホルム：メタノール：0.25%KCl(25:25:25:10:9)を使用した。

② クロロホルム：メタノール(2:1 & 1:1)溶出画分の展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：酢酸(65:35:8)を使用した。

③ クロロホルム：メタノール(1:1)溶出画分の展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：2.5Nアンモニア水(5:4:1)→クロロホルム：メタノール：水(65:25:4)二重展開を実施した。

②の展開後、ディットマー染色により、リン脂質を青色に呈色した(図 3B)。③の展開後は、レゾルシノール染色により、ガングリオシドを紫色に呈色した。

●二次元展開の場合。

④ クロロホルム：メタノール：水(60:40:9)二重展開→メチル酢酸：1-プロパノール：クロロホルム：メタノール：0.25%KCl(25:25:25:20:9)二次元展開を実施した。

Forch 粗画分を④で展開後、オルシノール染色(糖脂質)により呈色した(図 3C)。

4-2. ガングリオシドの検出[2]

Folch 変法により脂質粗画分を抽出後、DEAE-Sepharose カラムを用いて、ガングリオシド画分を精製した。クロロホルム：メタノール(1:1)中に溶解した Forch 粗画分をカラムに添加後、クロロホルム：メタノール(1:1)、メタノールにより順次洗浄し、0.3M メチル酢酸-メタノールにより酸性糖脂質を抽出し、エバポレーターにて乾燥した。水に溶解後、水で透析、超音波処理後、トルエンを滴下しエバポレーターにて乾燥した。クロロホルム：メタノール(1:1)で溶解後、再度 freeze-thaw-超音波処理を行った。最終産物内のシアル酸含量は、NANA を標準にレゾルシノールを用いて測定した。15 μ g シアル酸含脂質画分中のガングリオシドを薄層クロマトグラフィーにて二次元展開した。以下の⑤で展開後、レゾルシノール染色により紫色に呈色した(図 3A)。

⑤ クロロホルム：メタノール：0.2% CaCl₂(50:40:10)二重展開→1-プロパノール：28% アンモニア水：水(75:5:25)二次元展開を実施した。

結果と考察

α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)は側頭葉てんかんモデルである扁桃体キンドリングマウスの海馬と視床前核で著しい発現上昇を示す[3]。そこで次に α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)の遺伝子欠損モデルマウスを作成したところ、このマウスは、てんかん誘導刺激に反応しない、てんかんを発症しないモデルマウスであった。と同時にこのマウスはうつ病、不安障害、睡眠障害を示すモデルマウスでもあった。このマウス脳から total RNA を抽出し、ジーンチップアレイによる発現解析を実施したところ、大脳皮質前頭葉において、成長ホルモンの発現が著しく減少していることがわかった。そこで、扁桃体キンドリングマウスの脳から total RNA を抽出し、ジーンチップアレイによる発現解析を実施したところ、てんかん発作を示したマウス脳において、成長ホルモンの著しい発現上昇を観察した[4]。以上の事から、脳で発現する α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)と成長ホルモン

は、てんかん-正常-うつ・不安障害のバランスに関与している事が考えられた。成長ホルモンは下垂体から分泌され、血中を介して全身に運ばれ、抗インスリン作用を示すことが知られており、特に脂質分解に関与することがわかってきた。そこで本研究では脳内の成長ホルモンによる、マウス行動への作用と脳内の脂質変化を解析した。

1. てんかん発症に関わる成長ホルモンについて

てんかん発症後のマウス大脳皮質前頭葉において成長ホルモン mRNA は 120 倍の発現上昇を示した。5'RACE 解析をおこなったところ、脳と下垂体との間で、成長ホルモンのスプライシングに差のないことがわかった。また成長ホルモンタンパク量も亢進したが、下垂体とは異なり、前駆体(23kDa)の分子量を示したことから、成熟型(19.5kDa)へのプロセッシングが脳と下垂体とで異なる可能性を示唆した。

次に、てんかん誘導(扁桃体キンドリング)刺激中に、成長ホルモンを海馬へ微量注入した。その結果、てんかん発作誘導の閾値を下げることで、てんかん発症を早めると共に、発作発現後のてんかん後発射の棘波数を亢進した。また、成長ホルモン分泌抑制剤であるオクトレオチドを海馬へ微量注入した場合は、てんかん発作誘導の閾値を上げ、てんかん発症を遅らせた。以上のことから、成長ホルモンはてんかん発作の引き金には作用しないが、引き金の高さを調節することがわかった[4]。

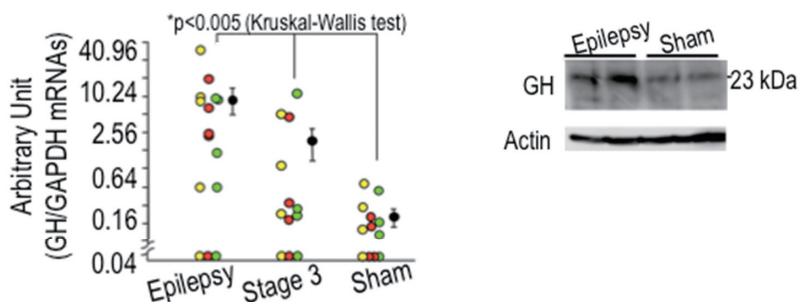


図 1：成長ホルモン mRNA 量とタンパク量

(左図)大脳皮質前頭葉(黄)、海馬扁桃体大脳皮質(赤)、視床(緑)から total RNA を抽出し、real time RT-PCR により発現量を計測し、GAPDH との発現比較により定量した。

(右図)海馬扁桃体大脳皮質から 1%TritonX-100 画分を抽出し、5-15% SDS-PAGE 後ウエスタンブロッティングを行った。Epilepsy, てんかん発作獲得後; Stage 3, 発作発現までの中期; Sham, 手術後未刺激コントロール[4]。

2. 成長ホルモンによる脳内シグナル系の発動について

成長ホルモンは、下垂体で発現することが知られている一方で、脳内での神経細胞で発現することはこれまで知られていなかった。図 2 は成長ホルモン mRNA の発現を見た *in situ* hybridization を示している。下垂体に比べて脳での発現は弱いものの、海馬 CA3 領域、視床前核、梨状皮質における神経細胞が成長ホルモン mRNA を発現することを観察した。

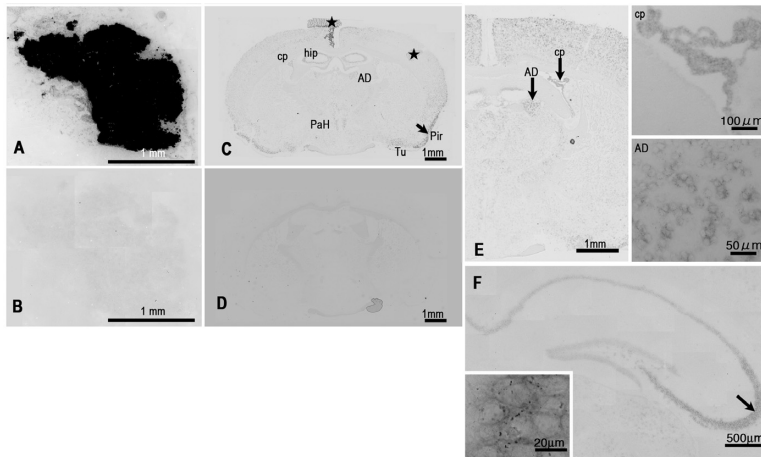


図2：マウス脳における成長ホルモン mRNA の発現

アルカリフォスファターゼによる BCIP-NBT 基質を発色させることで、アンチセンス cRNA の発現分布を見た。基質発色時間を 72 時間に増やすことで、脳における成長ホルモンの発現を見た。アンチセンス cRNA (A, C, E, F), センス cRNA (コントロール: B, D), 下垂体 (A, B), 海馬と視床前核を含む脳前顎断 (C, D), 視床前核 (AD), 脈絡叢 (cp), 海馬 (hip), 視床下部室傍核 (PaH), 梨状皮質 (Pir), 嗅結節 (Tu)。海馬 (F, 矢印は CA3 領域の成長ホルモン陽性・錐体細胞) [4]。

次に、成長ホルモンが、てんかん発作誘導時に発現亢進を示す分子の発現に影響するのか、また行動様式に作用するのかについて検討を試みた。

9 週齢のマウス海馬へ、ヒト成長ホルモンレコンビナント (90 pmol/μl) と成長ホルモン受容体拮抗薬 (90 pmol/μl) を注入し、その後、海馬扁桃体大脳皮質から total RNA を抽出し、real time RT-PCR により、ARC mRNA の発現を検出した。ARC mRNA はてんかん発作後に発現上昇を示す前初期遺伝子であるが、成長ホルモン投与により、ARC は発現上昇を示し、拮抗薬投与により発現減少を示した。これまで ARC が成長ホルモンに反応することは知られていなかったことから、本研究により、脳内にも成長ホルモンシグナル系が存在し、そのシグナルの下流に ARC の存在することが明らかとなった。

次に、成長ホルモン及び、拮抗薬を投与したマウスのオープンフィールド試験及び、飼育ケージ内行動量を計測した。その結果、飼育ケージ内及びオープンフィールドボックス内共に行動量に変化が現れ、成長ホルモンの投与により行動量が亢進し、拮抗薬投与により行動量が減衰した。そしてこの行動量と ARC mRNA の発現量の交点は、多項式回帰曲線上に乗り、行動量と発現量間で相関性のあることが明らかとなった。以上のことから、成長ホルモンの脳内での発現変動は、シグナル系を介した行動に影響することがわかった。

3. 成長ホルモンシグナル系と脳内脂質組成の変化

てんかん発症後に、 α 2,3-シアル酸転移酵素が発現上昇を示したことから、シアル酸修飾を受ける

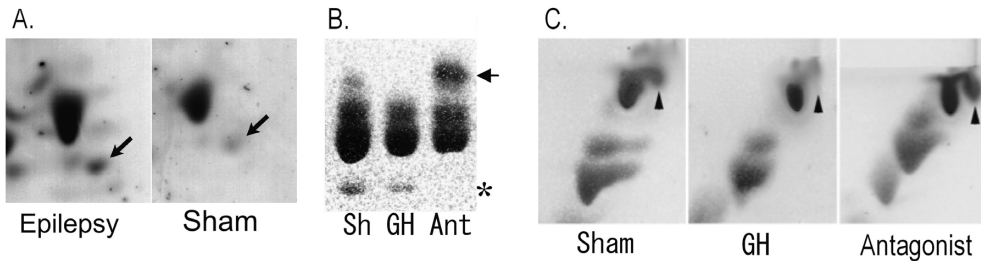


図3：成長ホルモンと脳内脂質組成・量

A：てんかん発症後のGQ1b(矢印)の発現上昇を示す[2]。B,C：てんかん誘導は行わない正常マウス海馬に、緩衝液(Sh, Sham, 手術後緩衝液投与)、ヒト成長ホルモンレコンビナント(GH投与)、成長ホルモン受容体拮抗薬(Ant, Antagonist投与)を投与した後、海馬扁桃体大脳皮質から脂質を抽出した。

脂質である ganglioside にも着目し、その発現変動を調べた。その結果、GQ1bが海馬において著しく発現上昇を示すことがわかった(図3A) [2]。

先に述べたように、てんかん発症後に成長ホルモンの発現も著しく上昇することから、GQ1bを含む脳内脂質が、成長ホルモンシグナル系による制御を受ける可能性を調べた。9週齢のマウス海馬へ、ヒト成長ホルモンレコンビナント(90 pmol/μl)と成長ホルモン受容体拮抗薬(90 pmol/μl)を注入し、その後、海馬扁桃体大脳皮質から、糖脂質、リン脂質を粗精製し、薄層クロマトグラフィーにより、脂質組成と量を解析した。

成長ホルモン投与により減少し、拮抗薬投与により増加するリン脂質が検出され(図3B, 矢印)、標準リン脂質との比較により、スフィンゴミエリンである事が示唆された。一方で、拮抗薬投与により消失したバンド(図3B, 星)は、未知であったことから、質量分析により決定する必要がある。糖脂質画分においても、成長ホルモン投与により減少し、拮抗薬投与により増加する糖脂質を検出した(図3C, 矢頭)。この糖脂質については、二次元薄層クロマトグラフィーの原点に近いため、展開条件をさらに検討することで分離を高め、再度変化を確認する必要がある。さらに、リン脂質・糖脂質共に、薄層クロマトグラフィー上のスポット数及びスポットシグナル強度が成長ホルモン投与により減少し、拮抗薬投与により増加することがわかった。

今回我々は、脳における $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素・成長ホルモンシグナル系が、脳内の脂質代謝系に関与している可能性を明らかにした。今後は、図3で差の見られたリン脂質及び糖脂質を明らかにする必要がある。今後も引き続き、てんかん～うつ病・不安障害に関わる脳内の脂質代謝を解明することにより、これら神経精神疾患の発症機構を明らかにすることを目指す。

参考文献

[1] Kato, K., Masa, T., Tawara, Y., Kobayashi, K., Oka, T., Okabe, A., Shiosaka, S. (2001) Dendritic aberrations in the hippocampal granular layer and the amygdalohippocampal area following kindled-seizures. Brain Res. 901, 281-295.

- [2] Kato K., Iwamori M., Hirabayashi Y. (2008) Increase of GQ1b in the hippocampus of mice following kindled-seizures. *Neurosci Lett.* 441, 286-290.
- [3] Matsuhashi H., Horii Y. and Kato K. (2003) Region-specific and epileptogenic-dependent expression of six subtypes of α 2, 3-sialyltransferase in the adult mouse brain. *J Neurochem.* 84, 53-66.
- [4] Kato, K., Suzuki, M., Kanno, H., Sekino, S., Kusakabe, K., Okada, T., Mori, T., Yoshida, K., and Hirabayashi, Y. (2009) Distinct Role of Growth Hormone on Epilepsy Progression in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J. Neurochem.* 110, 509-519.

Analysis of the carbohydrate and lipid-related molecular mechanisms involved in emotional limbic system

Keiko KATO

Abstract

About one-half of patients with refractory epilepsy are characterized as having mesial temporal lobe epilepsy with foci in the amygdaloid complex, hippocampus, and surrounding cortex. We found up-regulations of alpha 2,3-sialyltransferase (ST3Gal IV) mRNA in the hippocampus and anterior thalamus and of growth hormone mRNA in the anterior cerebral cortex following epileptogenesis, respectively. Furthermore, alpha 2,3-sialyltransferase gene deficient mice indicated both depression and anxiety and were not reactive to the kindling stimulations for inducing kindled seizures. On the other hand, the ST3 Gal IV deficient mice showed decrease of growth hormone mRNA in the anterior cerebral cortex. In the peripheral tissues, growth hormone has been known to be involved in carbohydrate and lipid metabolism. The present study presents the possibility that carbohydrate and lipid metabolisms that are regulated by growth hormone signaling also affect functions of brain, such as epilepsy, depression, and anxiety.

Keywords : Epilepsy, Anxiety, Sialic acid, Hormone, Lipids