

てんかん時に細胞外カリウムイオン除去機能が破綻するメカニズムの解明

松井 広

東北大学大学院生命科学研究科超回路脳機能分野

概要 脳の中には、神経細胞の他にグリア細胞がある。本研究では、神経細胞の過剰な興奮によって脳内グリア細胞の一種であるアストロサイトの機能に可塑的な変化が誘導され、脳内イオンバランス機構が乱れることで、てんかんの重篤化が進むことを明らかにした。神経細胞が興奮すると、神経細胞の細胞内から細胞外に K^+ イオンが排出されることが知られている。この K^+ は、神経細胞に興奮性の作用を及ぼすので、 K^+ がいつまでも細胞外に停留したままだと、神経細胞の過度な興奮状態が持続する。脳内アストロサイトには、細胞外 K^+ を除去する機能(K^+ クリアランス)が備わっており、健全な脳内環境を保持するのに役立っている。この K^+ クリアランス機構により、増加した細胞外の K^+ は、まずはアストロサイトに取り込まれる。隣り合うアストロサイト同士の細胞質はギャップ結合で繋がっている。アストロサイトに取り込まれた K^+ は、アストロサイト同士のネットワーク内部を濃度勾配に従って移動して除去される。 K^+ クリアランス機構が破綻した状態で、神経細胞がいったん過度に興奮すると、この興奮を止めることができなくなると考えられる。てんかん病態が増悪する要因のひとつとして、 K^+ クリアランス機構の破綻が想定されていたが、アストロサイトの何がどのように変化して K^+ クリアランス機構が破綻するのか、そのメカニズムは不明であった。

本研究では、実験動物のマウスの脳の細胞内外のイオン動態を、電気生理学的手法やイメージング法を用いて計測した。実験的に、てんかん様の過剰興奮を誘導すると、(1)アストロサイトに発現する Na^+/HCO_3^- 共輸送体(NBC)が働いて、細胞内にアルカリ性のイオンの HCO_3^- が取り込まれることで、細胞内の pH がアルカリ化することが示された。また、(2)この細胞内のアルカリ化に伴って、アストロサイト同士を結ぶギャップ結合が閉鎖され、それにより、(3) K^+ クリアランスが障害されることが明らかになった。さらに、細胞内がアルカリ化するメカニズム(1)を薬理的に阻止すると、(4)てんかん様の神経過剰興奮を防ぐことができることが細胞・組織レベルの研究で明らかにすることができ、また、生きたマウスの脳内に薬物を投与する実験においてはてんかん発作の重篤化を防止することも確認された。本研究では、NBC を特異的に障害する薬物を用いることで、てんかんの重篤化における NBC とアルカリ化の役割を探った。将来的には、アストロサイトを標的とした新規てんかん治療戦略が確立されることが期待される。

はじめに

生体の機能の多くは、細胞内外のイオンバランスによって支えられている。脳の中のグリア細胞には、脳内のイオンバランスを保つ役割があることが知られている。本研究では、このグリア細胞の働きかけによって、神経細胞の過活動が増幅されることを示した。グリア細胞には、細胞外の興奮性イオンであるカリウム(K^+)イオンを除去する機能がある。この K^+ 除去機能が破綻すると、てんかん病態が

悪化することが明らかになった。グリア細胞とグリア細胞の間では、細胞内をつなぐギャップ結合があることが知られている。このギャップ結合を通して K^+ の除去は進むと考えられているが、本研究では、周囲の神経細胞の過活動に応じて、ギャップ結合が可塑的に変化して閉塞することを発見した。このことによって、脳内 K^+ 除去機能は破綻する。ギャップ結合閉塞までに至るシグナル経路に介入することで、てんかんが増悪することを抑えられることも示された。

個々のてんかん発作を抑えるのではなく、てんかん発作を重ねる毎に病態が悪化するという悪循環を防ぐ、新たな治療戦略を提唱するに至った。

I. グリア伝達物質

脳内の細胞は、神経細胞とグリア細胞に分類される。神経細胞は活動電位で情報を表現し、神経細胞同士をシナプス結合でつなぐネットワークで脳内情報処理が進むと考えられている。一方、グリア細胞は脳の高次機能に関わるとは想定されておらず、ただ、神経細胞を囲い、栄養補給などのサポートをするに過ぎない存在だと考えられてきた。グリア細胞自身、周囲の環境の変化に応じて鋭敏に反応すること自体は分かっていたが¹⁾²⁾³⁾、グリア細胞から神経細胞に対する働きかけの存在は明らかにされていなかった。というのも、グリア細胞だけを選択的に刺激して、グリア細胞からの働きかけを露わにする方法がなかったからである。電気で細胞を刺激するといった従来の手法では、神経細胞の働きとグリア細胞の働きを区別できてなかったのである。

そこで、近年、爆発的に応用研究に広がりを見せるオプトジェネティクス技術をグリア細胞に対して適用する実験が行われた。オプトジェネティクスとは、クラミドモナス等の藻から発見された光に反応する分子(channelrhodopsin-2;ChR2 等)を、マウスの脳細胞などに遺伝子発現させて、光を照射することで、その細胞活動を選択的に光操作する技術である。従来は、特定の神経細胞に発現させることで、脳内神経回路における情報処理のメカニズムを明らかにするツールとして使われてきたが、これをグリア細胞のうち、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア等にも選択的に発現させる遺伝子工学的な技術が確立した⁴⁾。グリア・オプトジェネティクスの方法では、生きたままのマウスの脳の中に、光を照らすだけで、グリア細胞だけを選び分けて刺激することが可能になった。このマウスを使って、脳の中の小脳という場所にあるグリア細胞(バークマングリア細胞)を光によって刺激したところ、刺激に応じて、そのグリア細胞からグルタミン酸が放出されることが示された⁵⁾。

脳内の興奮性神経細胞の多くは、伝達物質としてグルタミン酸を使う。神経細胞の出力末端のシナプス前部には、グルタミン酸の詰まったシナプス小胞が集積していて、神経細胞が興奮すると、細胞内に Ca^{2+} が流入し、これが引き金となって、シナプス小胞の中身が細胞外空間に開口放

出される。細胞外に放出されたグルタミン酸は、シナプス後部まで拡散し、グルタミン酸に特異的に反応する受容体に結合し、細胞内に陽イオンが流入することで、この神経細胞は興奮する。細胞外に放出されたグルタミン酸は、拡散して薄まり、最終的にはグリア細胞のグルタミン酸トランスポーター(GluT)を介して、グリア細胞内に取り込まれて除去されると考えられている。グリア・オプトジェネティクスを通じて、興奮性神経細胞が伝達物質として使うグルタミン酸が、グリア細胞からも放出されることが示されたわけである。

同じグルタミン酸が放出されるわけであるが、その放出メカニズムは神経細胞の開口放出メカニズムとは全く異なることも明らかになった。ちなみに、ChR2 は光に反応する非選択的陽イオンチャネルであることは知られていて、ChR2 が活性化されると、主に Na^{+} イオンが流入することで、細胞の膜電位が脱分極する。神経細胞では、脱分極にともない、膜電位依存性の Ca^{2+} チャネルが開くことで細胞内に Ca^{2+} イオンが流入する。あまり広く認識されていないのは、ChR2 活性化にともない H^{+} イオンも流入する事実であり、ChR2 の光活性化にともない、細胞内のpHは酸性化することである。グリア細胞には、膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルはほとんど発現していないことが示されているが、それにもかかわらず、グリア細胞に発現させたChR2の光刺激によって、グリア細胞からグルタミン酸が放出されたということは、グリア細胞からの放出は Ca^{2+} イオンではなくpHに依存することが示唆された。いくつかの実験を重ねることで、グリア細胞内の酸性化にともない、陰イオンチャネルの一種であるVolume Regulated Anion Channel(VRAC)が活性化して、細胞内から細胞外へと陰イオンであるグルタミン酸が放出されることが示された⁶⁾⁷⁾。細胞質内には定常的にある程度の濃度のグルタミン酸が存在するため、陰イオンチャネルが開けば、陰イオンであるグルタミン酸は細胞内から細胞外へと放出されると考えられる。なお、神経細胞の場合は、神経と神経とをつなげているシナプスというごく狭い場所でグルタミン酸の放出が起こる。それに対し、グリア細胞からの放出の場合は、付近一帯にグルタミン酸が広がることで、その辺りの神経回路の状態を変化させると考えられる。

このように、同じグルタミン酸であっても、放出の引き金(Ca^{2+} vs pH)、放出の方法(開口放出 vs チャネル放出)、グルタミン酸の広がり(シナプス局所 vs 付近一帯)等に

違いがあり、神経細胞とは異なる特性をもって、グリア細胞は脳内情報回路に関わりを持ち得ることが示された。ここでは、実験的に ChR2 を光刺激するという人工的なグリア刺激法が用いられたため、このようなグリア細胞からのグルタミン酸放出の経路が存在することは明らかにされた。しかし、いつ、どのような条件で、この経路が使われるのかはまだ不明であった。

II. グリア細胞による信号増幅

神経細胞から放出されたグルタミン酸は、最終的には、グリア細胞の GluT によって取り込まれることで、細胞外のグルタミン酸は除去されて、興奮性信号は収束する。しかし、この GluT の意外な機能が明らかにされた。GluT の活性化にともなって、細胞内に H^+ イオンが流入するとともに、GluT 自身が陰イオンチャネルの役割を帯びることは、以前から知られていた。GluT 活性化にともない、細胞外 Na^+ イオンが流入し、細胞内 K^+ イオンが流出する理由は理解できる。通常、 Na^+/K^+ ATPase 等が定常的に働くことで、細胞内では細胞外に比べて K^+ 濃度が高く Na^+ 濃度が低く保たれている。これらのイオン濃度の不均等な勾配が均等に返ろうとするエネルギーを使って、GluT は、細胞外のグルタミン酸を取り込むわけである。しかし、この時になぜ H^+ イオンも同時に連れてこないといけないのかが謎であった。また、本来、GluT はトランスポーターであるはずなのに、グルタミン酸が結合した時に、陰イオンチャネルとして性質を帯びる理由も不明であった^{9,10}。当研究室では、この GluT 陰イオンチャネルを介して、細胞内 HCO_3^- イオンが細胞外に流出することを明らかにした。 HCO_3^- イオンはアルカリのイオンなので、 H^+ の流入と HCO_3^- の流出は、いずれも細胞内の酸性化をもたらす。今回、この酸性化が引き金となって、グリア細胞の GluT とは別の陰イオンチャネルである VRAC が開いて、グリアの細胞質のグルタミン酸が細胞外に放出されることが示された。これも非常に不思議な現象で、本来、細胞外のグルタミン酸を取り込む役割のある GluT が活性化されると、少なくとも、短期的には、逆にグルタミン酸を細胞外に放出する刺激となることが示されたわけである。

このように放出されたグリア細胞のグルタミン酸は、小脳のプルキンエ細胞のイオン透過型グルタミン酸受容体 (AMPA) とともに代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) を活性化することが示された。プルキンエ細胞に発現する

mGluR1 は AMPAR とは異なり、シナプス結合部位からわずかに離れた場所に存在すると考えられている。これまで、この mGluR1 がグルタミン酸によって活性化すると、シナプス直下の AMPAR が除去されて、シナプス伝達の強さが下がることを示されてきた。このような小脳の神経回路の可塑的な変化こそが運動学習につながるということが知られている¹¹。シナプス伝達の強度が増えることが学習と記憶につながると考えがちだが、シナプス伝達の強度が下がることが学習につながることは不思議なことではない。誤ったエラー信号を伝える回路を抑えることで相対的に学習が成立することも有り得るし、信号が伝わる経路のどこかで抑制性のシナプスが介在すれば、その神経細胞への入力の減弱は、その次の細胞の興奮性の増大につながる。現に、小脳からの唯一の出力神経細胞であるプルキンエ細胞は、抑制性の GABA を神経伝達物質として出力することが知られている。これまで、特定の平行線維で立て続けに活動電位が発生すると、平行線維とプルキンエ細胞間のシナプスで放出されたグルタミン酸がシナプス間隙からあふれ出て (spillover)、プルキンエ細胞の少し離れた mGluR1 を活性化すると考えられてきた。

しかし、今回、グリア細胞から放出されるグルタミン酸こそが、プルキンエ細胞の効率的に mGluR1 を活性化することが明らかになった。そして、グリア細胞が、どの程度、興奮性神経信号を増幅して、グルタミン酸を放出するのかは、グリア細胞内の pH に依存することが示されている。ChR2 を光刺激すると、細胞内の H^+ が流入することで細胞内は酸性化することは紹介した。一方、本来、古細菌に発現する archaerhodopsin-T (ArchT) は光活性化外向キプロトンポンプであるので、ArchT の活性化によって細胞の膜電位は過分極するが、同時に細胞質はアルカリ化する。光操作技術を使ってグリア細胞内をアルカリ化 (ArchT) すると、グリアからのグルタミン酸放出は抑制され、グリア細胞内を酸性化 (ChR2) すると、放出は亢進された。したがって、学習時のグリア細胞の状態 (pH) 次第で、記憶が容易に成立したり、成立しなかったりすることが示唆された。つまり、グリア細胞内の pH が、たまたま、酸性かアルカリ性かに傾いていると、グリア細胞からの放出は増えたり、減ったりする。このことから、グリア細胞からの作用の多寡次第で、学習・記憶の成立のしやすさ、すなわち、メタ可塑性が左右されることが予想された。

これらの一連の実験では、グリア細胞の pH を人工的に操作することで、グリア細胞の状態と神経機能の変化を観察した。引き続いて、どのような時にグリア細胞の pH が酸性化したり、アルカリ化したりすることがあるのかを明らかにする必要があるであろう。上述したように、GluT が活性化すれば、 H^+ 流入と HCO_3^- 流出によって細胞内は酸性化することが予想される。この他にも、非選択的陽イオンチャネルの多くは、実は H^+ を透過することがあり、一般的に Cl^- イオンを主に通すと考えられている陰イオンチャネルの多くは、実は HCO_3^- イオンを通す可能性が高い。これらのイオンの流出入によって pH が変化するとしたら、pH の変化は、細胞膜のごく近傍に限られる可能性も高いため、膜近傍に配置した pH センサーで計測する必要が出てくるであろう。一方、代謝性アシドーシスのように乳酸等の酸性の代謝産物が蓄積したり、産生されたりすることで、細胞内 pH が変化することも有り得る。細胞内には、ミトコンドリアのようなアルカリ性、リソソームのような酸性のコンパートメントも存在するため、これらの区画内外でのイオンや分子の移動に伴っても、細胞質内 pH は変化するであろう。今回、細胞内 pH がグリア細胞等の細胞機能に効果をもたらすシグナル因子として働くことが分かったため、細胞内 pH も脳内情報を担う因子として捉えることができることが明らかになった。もっと古典的な Ca^{2+} も当然ながら情報を担うことができる。したがって、ひとつの細胞は、電気、 Ca^{2+} 、pH など、複数の因子を操りながら情報表現をしている可能性が示唆された。

III. 脳梗塞時のグリア暴走

脳疾患の中には、神経細胞の異常だけでは説明できないものも見つかってきている。例えば、脳梗塞時には、グリア細胞が異常な反応をすることは知られていたが、グリア細胞の反応こそが、興奮性神経毒性につながるものが新たに示された⁶⁾。血流が滞る原因としては、脳の血管が詰まるような脳梗塞や心停止などがある。脳虚血時には、脳組織が酸性化することや、どこからか大量のグルタミン酸が出てくることは、これまでも知られていた。大量のグルタミン酸は興奮性神経毒性を生み、脳細胞死へと至る不可逆的な過程を引き起こす。従来は、平行して起こる二つの現象と考えられてきた、酸性化とグルタミン酸放出の間に、因果関係があることが新たに見出された。

これまで紹介してきたように、グリア細胞に発現させた

ChR2 を光刺激すると、細胞内は酸性化して、グリア細胞から興奮性の伝達物質であるグルタミン酸が放出される。ところで、脳梗塞などの脳虚血時にはグリア細胞は酸性化する。血管からの酸素とグルコースの供給が止まると、グリコーゲンという形で貯蔵されていたエネルギー分子がグルコース、ピルビン酸へと分解されていくが、酸素がないのでクエン酸回路が働かず、ピルビン酸は、さらに乳酸へと分解が進む。乳酸は酸性の分子なので、乳酸の蓄積にともない細胞内は酸性化する。脳の中では、グリコーゲンを蓄えられる細胞はグリア細胞だけなので、血流が止まれば、グリア細胞での酸性化が、まずは顕著になると考えられる。これまで、このような代謝性アシドーシスにともない、どこから大量のグルタミン酸が放出されるのか、また、どんな仕組みで放出されるのか、不明のままであった。そこで、細胞内 pH を光計測する手法や、細胞内 pH 緩衝能力を薬理的な操作する方法を用いて、脳内の酸性化がグリア細胞内で特に速く進行すること、そして、その酸性化そのものがグリア細胞のグルタミン酸放出を促していることが示された。さらに、光に反応して細胞内をアルカリ化することができる ArchT をグリア細胞に発現させ、人工的に脳梗塞を起こした後、光によって細胞をアルカリ化したところ、グルタミン酸放出が抑制され、脳虚血に伴う脳組織の破壊を食い止めることができた⁶⁾。興味深いのは、グリア細胞からの過剰なグルタミン酸放出を止めるだけで脳組織の破壊を防げた点である。ArchT を照射していたところで、血流が再開するわけではないので、脳組織には相変わらず、グルコースも酸素も供給されるわけではない。したがって、脳虚血時に脳が破壊されるのは、エネルギー不足や酸素不足によるものではなく、もっぱら、グリア細胞からのグルタミン酸放出が引き起こす過剰興奮によるものであることが明らかになった。

もちろん、予め、ヒトの脳に ArchT 等のタンパク質を発現させておき、虚血に伴う酸性化を食い止めるといった介入をすることは現実的ではない。したがって、この研究結果をそのまま脳梗塞などの治療に使えるわけではない。しかし、一連の研究を通して、グリア細胞の pH を安定化させることが一番の鍵であることが分かった。細胞内 pH を緩衝させる治療法や、細胞内水素イオンを細胞外へと汲み出す生来の仕組みを賦活化させる薬剤の開発など、いくつかの応用可能性が考えられる。

IV. てんかんにおけるグリア可塑性

てんかんとは、脳の神経細胞が過剰に興奮し、発作をおこす病気である。てんかん発作を繰り返すことで、より重篤なてんかんに発展することも知られている。全人口の約1%がてんかんを患い、患者の約30%は、神経細胞を標的とする既存の薬が効かない難治性てんかんに苦しんでいる。そのため、新しい作用標的を持つてんかん薬の開発は喫緊の課題となっている。今回、神経細胞の過剰な興奮によって脳内グリア細胞の一種であるアストロサイトの機能に可塑的な変化が誘導され、脳内イオンバランス機構が乱れることで、てんかんの重篤化が進むことを明らかにした。また、アストロサイトの機能的な変化を薬理的に抑制することにより、てんかん発作の重篤化を阻止できることが示された⁸⁾。

生体の細胞内ではカリウム(K^+)、細胞外ではナトリウム(Na^+)イオン濃度が高い。このイオンバランスによって脳細胞の膜電位は過分極状態に保たれている。神経細胞に興奮性のシナプス入力が入ると、細胞は脱分極し、0 mV を越えて正の電位に変化し、その後、-60 mV 付近まで 1 ms 程度で戻る。これを活動電位と呼び、この時、細胞内に Na^+ が流入して、細胞外に K^+ が流出するが、通常ならば、生体内のイオン調節機構が働いてイオンバランスは瞬時に回復する。ところが、神経細胞にとって興奮性信号となる細胞外 K^+ が、速やかに除去されないと、神経細胞は、いつまでも興奮しっぱなしとなる。過剰な興奮が持続するてんかん発作には、 K^+ 除去機構の破綻が密接に関わっていると考えられる。 K^+ の除去は神経細胞を取り囲むグリア細胞が担っており、このグリア細胞は、細胞外の K^+ を取り込み、グリア細胞同士をつなぐギャップ結合を通して K^+ を遠くに拡散させて薄めていると考えられている。

そこで、てんかん時に、脳内にグリア細胞間のギャップ結合を閉ざすようなメカニズムが発生している可能性を検証した。神経細胞が過興奮すると、グルタミン酸が大量に放出され、これがグリア細胞のグルタミン酸トランスポーターに働きかけ、細胞内が酸性化する。この酸性化が、グリア細胞の陰イオンチャネル(VRAC)を開き、このチャネルを通して、さらにグルタミン酸がグリア細胞から放出されるというポジティブ・フィードバック回路が働くと、脳内過興奮と神経発振が止まらなくなり、てんかん発作が発展する可能性がある。また、過剰なグルタミン酸放出、また、エネル

ギーの大量消費による代謝性アシドーシスが加わって、グリア細胞がますます酸性化し、これこそがギャップ結合を閉じることにもつながるとも考えられる。このようなメカニズムがてんかん病態を悪化させている、という仮説を検証するために、てんかん発作前後にグリア細胞間ギャップ結合がどのように可塑的に変化するのか、ギャップ結合が閉じることによって細胞外 K^+ 濃度の動態がどう変化するのか、ギャップ結合の開閉はどうやって制御されているのかを調べた。

脳内アストロサイトには、細胞外カリウムイオンを除去する機能(K^+ クリアランス)が備わっており、健全な脳内環境を保持するのに役立っている。この K^+ クリアランス機構により、増加した細胞外のカリウムイオンは、まずはアストロサイトに取り込まれる。隣り合うアストロサイト同士の細胞質はギャップ結合で繋がっている。ギャップ結合とは、隣接するアストロサイトの細胞質同士を繋ぐトンネル状の構造である。ギャップ結合による細胞間連絡により、アストロサイトは脳内に広大なネットワークを形成している。ギャップ結合は、膜タンパク質コネクシン(connexin)が6個円状に並んだ構造体が互いに接することで形成される。ギャップ結合を介して、イオンや代謝産物、神経伝達物質等、1 kD 以下の物質が行き来し、細胞間でのコミュニケーションが行われていることが知られている。アストロサイトに取り込まれたカリウムイオンは、アストロサイト同士のネットワーク内部を濃度勾配に従って移動して除去される。 K^+ クリアランス機構が破綻した状態で、神経細胞がいったん過度に興奮すると、この興奮を止めることができなくなると考えられる。てんかん病態が増悪する要因のひとつとして、 K^+ クリアランス機構の破綻が想定されていたが、アストロサイトの何がどのように変化して K^+ クリアランス機構が破綻するのか、そのメカニズムは不明であった。

この実験では、実験動物のマウスの脳の細胞内外のイオン動態を、電気生理学的手法やイメージング法を用いて計測した。実験的に、てんかん様の過剰興奮を誘導すると、(1)アストロサイトに発現する Na^+/HCO_3^- 共輸送体(NBC)が活性化される。NBC が活性化されると、内向きのイオン輸送により、 Na^+ イオンと 2~3 つの HCO_3^- イオンを細胞内に取り込む。アルカリ性のイオンの HCO_3^- の増加はアルカリ化を引き起こすことから、てんかん様の過剰興奮に対してアストロサイトの細胞内の pH がアルカリ化するこ

とが示された。また、(2)この細胞内のアルカリ化に伴って、アストロサイト同士を結ぶギャップ結合が閉鎖され、それにより、(3)K⁺クリアランスが障害されることが明らかになった。細胞外 K⁺の蓄積は、細胞の脱分極による過興奮状態を作り出す。したがって、このようなアストロサイトの可塑的な変化はてんかん重篤化の要因であると考えられる。そこで、てんかん様発火に誘発される NBC の活動を阻害することにより、アストロサイト細胞内のアルカリ化、及び、ギャップ結合閉塞の防止に繋がる。アストロサイト間のイオン輸送が維持されることで、細胞外 K⁺クリアランス機能も保持される。したがって、有害なアストロサイトの可塑的変化の抑制は、てんかんの発展と重篤化を未然に防ぐ新しい治療戦略に繋がると考えられる。実際に NBC 阻害剤を投与する

と、(4)てんかん様の神経過剰興奮を防ぐことができることが細胞・組織レベルの研究で明らかにすることができ、また、生きたマウスの脳内に薬物を投与する実験においては、てんかん発作の重篤化を防止できることも確認された(図1)。

この研究では、NBC を特異的に阻害する薬物を用いることで、てんかんの重篤化における NBC とアルカリ化の役割が探索された。しかしながら、同様の作用を持つ薬物をヒト臨床で使う上には、血管脳関門を通過できる薬物の開発、安全性の確認、標的分子特異性を高めるなど詳細な検討が必要となる。将来的には、アストロサイトを標的とした新規てんかん治療戦略が確立されることが期待される。

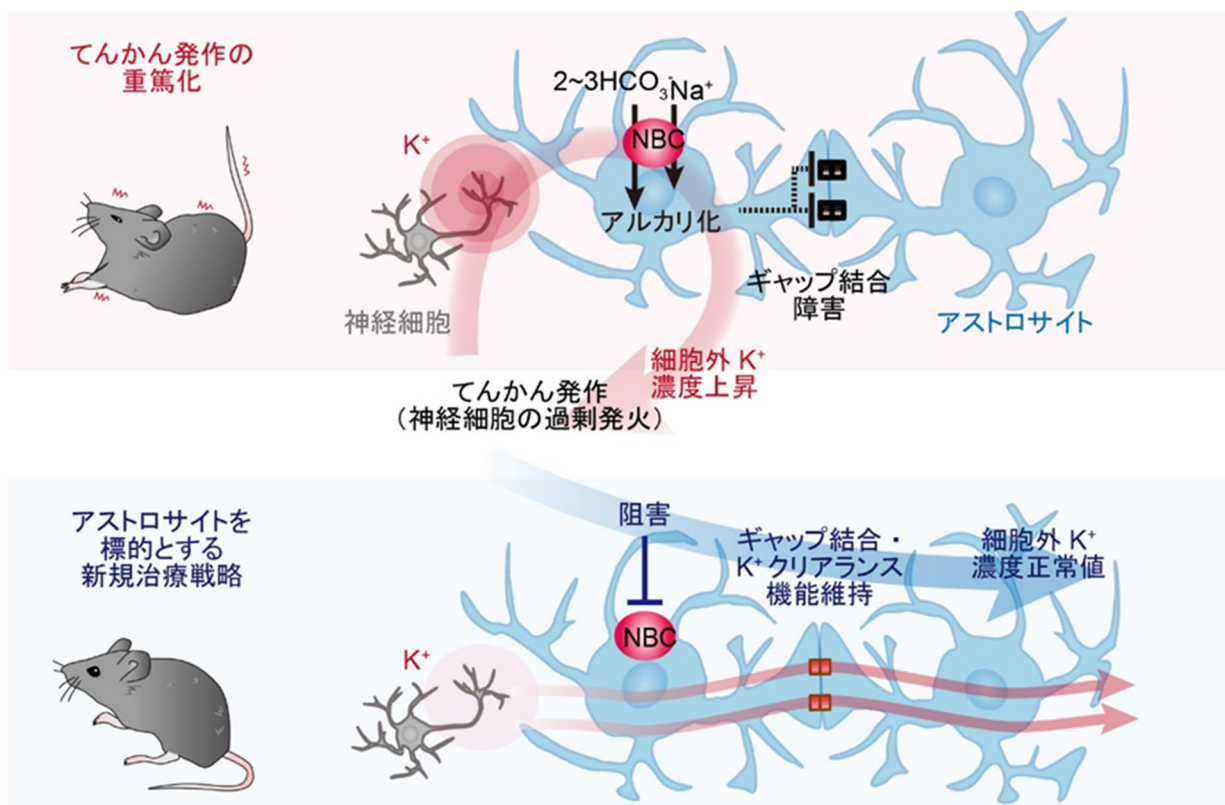


図1 てんかん重篤化メカニズムとその治療戦略。神経細胞のてんかん様発火により、細胞内から細胞外へと K⁺ が排出される。この細胞外 K⁺ の蓄積により、アストロサイトが脱分極し、NBC が活性化され、HCO₃⁻ がアストロサイト細胞内へと流入する。HCO₃⁻ は細胞内をアルカリ化させる。ギャップ結合の透過性は、細胞内 pH の変動に反応し、大きく変化することが知られている。そのため、HCO₃⁻ 流入による細胞内の pH 変化に伴いアストロサイト間を繋ぐギャップ結合透過性が減少する。ギャップ結合の閉塞によりアストロサイト間のイオン輸送は阻害されるため、細胞外 K⁺ クリアランス機能が障害される。細胞外 K⁺ の蓄積は、細胞の脱分極による過興奮状態を作り出します。したがって、このようなアストロサイトの可塑的な変化はてんかん重篤化の要因であると考えられる。一方、てんかん様発火に誘発される NBC の活動を阻害することにより、アストロサイト細胞内のアルカリ化、及びギャップ結合閉塞の防止に繋がる。アストロサイト間のイオン輸送が維持されることで、細胞外 K⁺ クリアランス機能も保持される。したがって、有害なアストロサイトの可塑的変化の抑制は、てんかんの発展と重篤化を未然に防ぐ新しい治療戦略に繋がると考えられる (Onodera et al., 2021)。

おわりに

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団からの研究助成を得て、てんかんの重篤化に寄与する K^+ 除去機能の破綻のメカニズムを解明する研究を実施した。本稿では、この発見に至るまで、当研究室で実施してきたグリア細胞研究の背景も含めて解説した。グリア細胞による K^+ 除去機能の破綻のメカニズムの研究に関しては、下記、学術誌に論文として発表し、ソルト・サイエンス研究財団からの研究支援を受けたことを謝辞に掲載した。この場でも改めて本研究の支援に深く感謝申し上げる。

Onodera M, Meyer J, Furukawa K, Hiraoka Y, Aida T, Tanaka K, Tanaka KF, Rose CR, Matsui K (2021) Exacerbation of epilepsy by astrocyte alkalization and gap junction uncoupling. *Journal of Neuroscience*, **41**: 2106-2118

文献

- 1) Matsui K, Jahr CE: Ectopic release of synaptic vesicles. *Neuron* 40: 1173–1183, 2003.
- 2) Matsui K, Jahr CE: Differential control of synaptic and ectopic vesicular release of glutamate. *J Neurosci* 24: 8932–8939, 2004.
- 3) Matsui K, Jahr CE, Rubio ME: High concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glia communication via ectopic release. *J Neurosci* 25: 7538–7547, 2005.
- 4) Tanaka KF, Matsui K, et al.: Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep* 2: 397–406, 2012.
- 5) Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K: Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 20720–20725, 2012.
- 6) Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K: Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron* 81: 314–320, 2014.
- 7) Beppu K, Kubo N, Matsui K: Glial amplification of synaptic signals. *J Physiol* 599: 2085–2102, 2021.
- 8) Onodera M, Meyer J, Furukawa K, Hiraoka Y, Aida T, Tanaka K, Tanaka KF, Rose CR, Matsui K: Exacerbation of epilepsy by astrocyte alkalization and gap junction uncoupling. *J Neurosci* 41: 2106–2118, 2021.
- 9) Wadiche JI, Amara SG, Kavanaugh MP: Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* 15: 721–728, 1995.
- 10) Wadiche JI, Tzingounis AV, Jahr CE: Intrinsic kinetics determine the time course of neuronal synaptic transporter currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1083–1087, 2006.
- 11) Ito M: Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78: 272–303, 2006.

Collapse of Extracellular Potassium Ion Extrusion Mechanisms upon Epilepsy

Ko Matsui

Super-network Brain Physiology, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

Summary

We have revealed that a first-time exposure to only a brief period of brain hyperactivity resulted in an acute breakdown of the inter-cellular network of glial cells. Pharmacological intervention of the glial plasticity may provide a new preventative strategy for fighting epilepsy. The findings were detailed in the *Journal of Neuroscience* with acknowledgment to the funding by the Salt Science Research Foundation.

Epilepsy is a disorder characterized by neuronal hyper-excitation and a progression of seizures with each episode. Anti-epileptic drugs are mostly aimed at suppressing hyperactivity, but approximately 30% of patients worldwide show drug-resistance. Half of the brain is occupied by non-neuronal glial cells. Astrocytes are star-shaped glial cells that are connected to each other via gap junctions. Neuronal excitation leads to potassium extrusion from neurons. The excess potassium is picked up by astrocytes and diluted in the astrocyte network. Efficacy of the potassium clearance can affect neuronal signal processing.

Astrocytes apparently have a strong control over neuronal activity. Plasticity of the neuronal network underlies learning and memory but apparently astrocyte function is also susceptible to plastic change. We studied the plastic change of astrocytes associated with epileptogenesis in mice. In response to hyperactivity of the surrounding neurons, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ co-transporter (NBC) in astrocytes was activated. The resulting intracellular alkalization led to gap junction uncoupling and impairment of prompt potassium clearance. Pharmacological blockade of the NBC suppressed the plastic change of the astrocyte network and prevented intensification of epileptiform activity.

Astrocytes play a crucial role in taking control of neuronal activity in healthy brains as well. This research reveals the presence of glial plasticity and suggests a future therapeutic strategy can be aimed to control the glial function for treating disease.