

新型コロナウイルス流行期におけるてんかん基礎研究留学

金星 匡人

大阪医科薬科大学薬品作用解析学研究室 客員研究員

現：国立病院機構兵庫中央病院脳神経内科

日本神経学会海外派遣プログラム 2020 年度フェロー

留学先：Fondazione IRCCS Istituto Neurologico *Carlo Besta*

留学期間：2021 年 10 月 18 日～2021 年 12 月 23 日

留学期間中の研究について

はじめに

我々の研究室は、てんかんモデル動物や培養細胞を用いた薬理学的な研究で、アストロサイトの空間的カリウム緩衝機構を仲介する内向き整流性カリウム (inwardly rectifying potassium, 以下 Kir と略記) チャネル, 特に Kir4.1 チャネルがてんかん病態に深く関連していることを明らかにしてきた¹⁾. 具体的には、常染色体優性外側側頭葉てんかんのモデル動物である *Leucine-rich glioma-inactivated 1 (Lgi1)* 変異ラットでのてんかん原性過程において、アストロサイトの Kir4.1 チャネル発現低下によるカリウムホメオスタシスの障害が起こることを明らかにした²⁾. また、アストロサイト初代培養細胞を用いて、てんかん原性を促進する脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, 以下 BDNF と略記) の分泌は、Kir4.1 チャネルの阻害によって促進されることを明らかにした³⁾. 今回の留学は、てんかん病態における Kir4.1 チャネルを介したカリウムホメオスタシスの薬理学的な知見を、留学先との共同研究で新しい観点から検証することを目的とした。

留学先について

今回の留学先である Fondazione IRCCS Istituto Neurologico *Carlo Besta* は、イタリアのミラノにある病院を有する研究機関で、神経疾患を中心とした研究で世界的に有名な施設である。てんかん研究グループのトップである Marco de Curtis 先生は、病院でてんかん患者の診療を行いながら、動物を用いた電気生理学的実験を中心としたてんかん基礎研究を進める高名な研究者である。特に、モルモット全脳を用いた電気生理学的記録は十分な経験があり、てんかん病態におけるカリウムホメオスタシスの役割を明らかにしてきた⁴⁾.

研究計画では、既報告³⁾ で使用した抗うつ薬などの Kir4.1 チャネルを阻害する作用の薬剤を灌流して、モルモット全脳の電気生理学的記録と BDNF の発現変化を評価する予定であった。しかし、新型コロナウイルスによるパンデミックの影響で、留学の開始が 1 年半程度の延期となっていた。そのため、実験試薬の調達や予備実験などの時間的猶予がなかったため、留学先で進行中であった脱髄とカリウムホメオスタシスの関連を検証する研究計画に参加して、モルモット全脳の電気生理学的記録の手法を学んだ (Fig. 1)。

梨状皮質 (piriform cortex) において、髄鞘が比較的乏しい表層での細胞外カリウム濃度上昇がてんかん様活動電位の誘発に関与していることが示唆されていた⁵⁾. 今回の実験では、

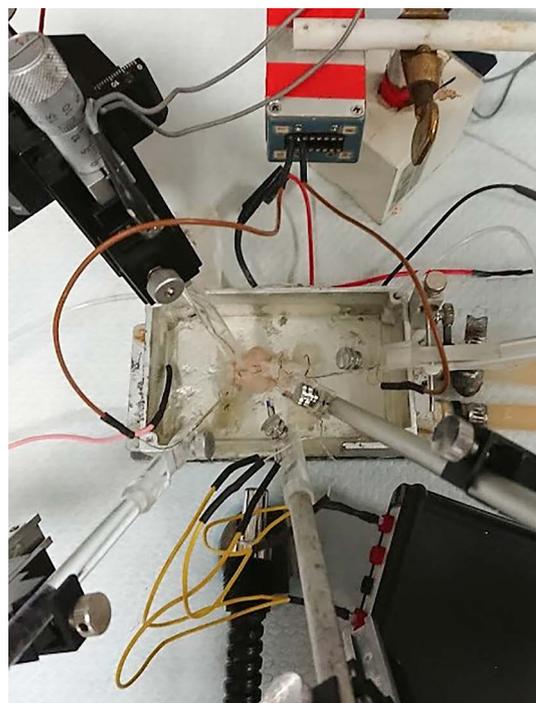


Fig. 1 Electrophysiological recordings from *in vitro* isolated guinea pig brains.

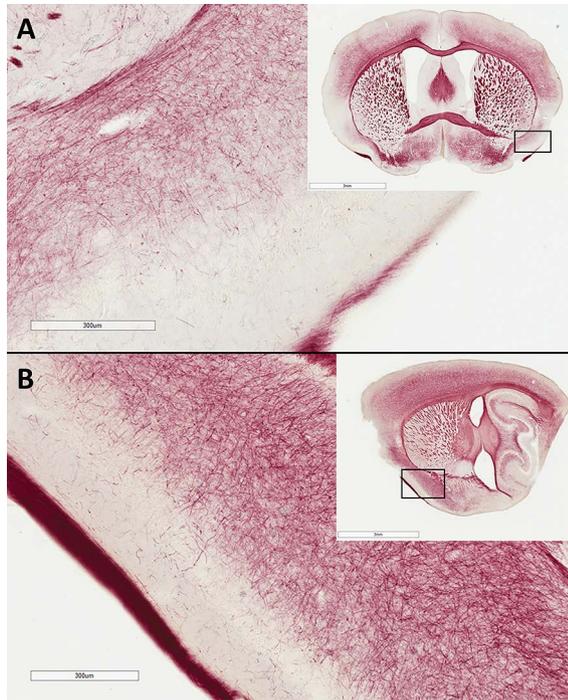


Fig. 2 Black-Gold II staining.

Coronal sections (A) and sagittal sections (B) of the piriform cortex stained for the myelin marker Black-Gold II at different magnifications.

けいれん誘発薬を灌流したモルモット全脳を用いて、梨状皮質の細胞外記録と同時に、髄鞘が乏しい表層と豊富な深層の細胞外カリウム濃度を測定して比較した。既報告⁵⁾のように、4-aminopyridine で誘発されたてんかん様活動電位と同時に表層の細胞外カリウム濃度は急激に上昇することが観察された。しかし、深層のカリウム濃度との差が顕著でなかったため、カリウム電極の深度を調整して再実験を行う方針とした。

梨状皮質における髄鞘の程度を評価するため、脳組織を冠状断と矢状断の両方で Black Gold II 試薬を用いて髄鞘を染色した。正常マウス脳組織を用いた染色で、梨状皮質の表層は深層と比較して髄鞘が乏しいことが、冠状断と矢状断の両方において確認できた (Fig. 2)。追加実験を行って、定量的に髄鞘の程度を評価する方針とした。

その他に、グルタミン酸受容体の選択的アゴニストであるカイニン酸を海馬に局所投与した非けいれん性てんかん重積モデル動物を用いて、長時間ビデオ脳波記録を行った。さらに、非けいれん性てんかん重積モデル動物が自発的にてんかん発作を起こす慢性状態において、海馬スライス標本を作成して電気生理学的記録を行った。実験条件を変更して複数回の記録を試みたが、4-aminopyridine や bicuculline などのけいれん誘発薬で十分にてんかん様活動電位が誘発されなかった。今後、実験条件についてさらに検討する方針とした。

臨床において、留学先にてんかんカンファレンスに参加して、手術予定の難治性てんかん患者の精査と治療方針について積極的に議論した。

留学して感じたこと

留学を開始する前に、Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta に 1 週間程度の研究室訪問をしていた。その際に、Marco de Curtis 先生および研究員のメンバー達と、お互いの研究内容を紹介して、今後の研究計画について十分に議論した。また、モルモット全脳を用いた電気生理学的な実験を見学していた。事前の準備があったため、短期間の内に実験手法を効率よく学ぶことができた。留学先が発表している論文の研究内容を予め十分に理解しておくことは基本ではあるが、直接訪問して現在進行中の研究内容や実験について話し合うと、留学中の研究計画を立てる際に役立つと思われる。

家族を大事にするイタリア人の研究室メンバーは、実験などで研究室にいる必要性がなければ、すぐに帰宅して家族と過ごしていた。それでも、それぞれのメンバーが得意とする実験を分担して効率よく進めるので、全体として実験結果が十分に得られていた。プライベートを大事にしながら、仕事を効率よく進める姿勢は日本人が学ぶべきであると思われる。

イタリアのミラノでは、公共交通機関が発達しているため、市内のどこでも安価で移動が可能であった。ただし、コロナウイルスの影響で、ほとんどの公共施設やレストランなどに入る際にワクチンパスポートが必要であった。日本で発行された接種証明書 (紙媒体で、日本語と英語の記載のみ) は通用しないことがあり、現地の日本大使館に相談して、早急にデジタルのワクチンパスポートを発行して頂いた。また、現地の生活でわからないことは、研究室のメンバー達が親切に教えてくれたので、気軽に相談してみるといいかもしれない。

まとめ

今回の留学は短期間であったが、最新にてんかん病態に関する知見を学びながら、様々な電気生理学的手法を習得することができた。さらに、非けいれん性てんかん重積モデル動物の作成方法や組織染色方法などの手技も新たに習得することができた。今後は、留学先と定期的に連絡をとって、アストロサイトの Kir4.1 チャネルの発現低下によるカリウムホメオスタシスの障害がてんかん病態に与える影響について検討する予定である。

謝辞：留学を受け入れて頂いた Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta の Marco de Curtis 先生に深く感謝申し上げます。また、留学する機会を与えて頂いた京都大学臨床神経学の高橋良輔教授と京都大学てんかん・運動異常生理学講座の池田昭夫教授に厚く御礼申し上げます。今回の留学において多大なご支援を賜りました日本神経学会に深謝いたします。

文 献

- 1) Kinboshi M, Ikeda A, Ohno Y. Role of astrocytic inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels in epileptogenesis. *Front Neurol* 2020;11:626658.

- 2) Kinboshi M, Shimizu S, Mashimo T, et al. Down-regulation of astrocytic Kir4.1 channels during the audiogenic epileptogenesis in *Leucine-rich glioma-Inactivated 1 (Lgi1)* mutant rats. *Int J Mol Sci* 2019;20:1013.
- 3) Kinboshi M, Mukai T, Nagao Y, et al. Inhibition of inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels facilitates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in astrocytes. *Front Mol Biol* 2017;10:408.
- 4) de Curtis M, Uva L, Gnatkovsky V, et al. Potassium dynamics and seizures: Why is potassium ictogenic? *Epilepsy Res* 2018;143:50-59.
- 5) Uva L, Saccucci S, Chikhladze M, et al. A novel focal seizure pattern generated in superficial layers of the olfactory cortex. *J Neurosci* 2017;37:3544-3554.

日本神経学会では40歳以下の学会員を対象に、神経領域の基礎研究または臨床研究を目的とした海外留学研修を推進するため、毎年11月より「日本神経学会海外派遣プログラム」の募集を行っています。支援の決定者には旅費・滞在費として100万円が給付されます。