HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	α2/3サブユニット選択的GABAA受容体陽性アロステリック調整因子KRM-II-81のDravet症候群モデルマウスにおける治療効果の研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	中久保, 佐千子
Description	配架番号：2868
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16059号
Issue Date	2024-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92788
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NAKAKUBO_Sachiko_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　中久保　佐千子

学 位 論 文 題 名

α2/3 サブユニット選択的 $GABA_A$ 受容体陽性アロステリック調整因子 KRM-II-81 の
Dravet 症候群モデルマウスにおける治療効果の研究
（Studies on therapeutic effects of KRM-II-81, positive allosteric modulator for α2/3 subunit containing $GABA_A$ receptors, in a mouse model of Dravet syndrome）

【要旨】

＜背景と目的＞Dravet 症候群（DS）は、乳幼児期に発症する神経発達障害を伴う難治性のてんかん症候群である。およそ 2 万に 1 人の割合で罹患し、症状としては、乳児期から見られるしばしば重積に発展する熱性けいれんや多彩なてんかん発作が特徴的である。年齢を経るごとにてんかん発作は減少する傾向にあるが、その反面、自閉スペクトラム症様の行動障害を呈していくことがわかっている。DS の多くは電位依存性 Na チャネルの α サブユニット(Nav1.1)をコードする *SCN1A* 遺伝子の変異によって発症する。DS の病態生理学的メカニズムとして抑制介在ニューロンの機能不全が考えられているが明確には解明されていない。現在も様々な抗てんかん薬が使用されているが発作や行動障害を改善する有効な治療法は確立されていない。また発作コントロールのために治療薬を多剤併用することで、眠気などの副作用も呈することが知られている。

本研究では、近年開発された α2/3 サブユニットを有する $GABA_A$ 受容体（α2/3-$GABA_A$R）に対して選択的な陽性アロステリック調整因子（Positive allosteric modulator：PAM）、KRM-II-81（5-(8-ethynyl-6-(pyridin-2-yl)-4H-benzo[f]imidazo[1,5- a][1,4]diazepin-3-yl) oxazole）の DS に対する有効性を検証することを目的とした。KRM-II-81 は他モデルマウスにて、てんかん、不安障害、睡眠障害に効果があると既に示されている。一方で、$GABA_A$ 受容体に対する非選択的な PAM が DS モデルマウスの熱性けいれんの閾値上昇に寄与する可能性は先行研究で示されているものの、KRM-II-81 が DS モデルマウスに与える影響についてはこれまで検討されていない。今回我々は KRM-II-81 の DS モデルマウスにおける効果を *in vivo* および神経細胞レベルで評価した。

＜方法＞*Scn1a* ヘテロ接合体変異（A1783V）を有するノックインマウス（$Scn1a^{WT/A1783V}$ マウス、背景系統：C57BL/6J）を DS モデルマウスとして用いた。この $Scn1a^{WT/A1783V}$ マウスは既知の DS モデルマウスと同様に野生型（WT）マウスに比べて熱性けいれんの閾値の低下と発育の不良、生存率の低下を示すことが知られている。本研究では、KRM-II-81 投与下での DS モデルマウスの熱性けいれんの閾値とオープンフィールド試験を使用した行動障害への影響、またオープンフィールド試験と握力検査により鎮静効果を評価した。先行研究に従い熱性けいれんのテストは日齢 21−28 のマウスを使用し、行動試験と握力試験では生後 3 か月のマウスを使用した。不安様行動は、中心領域の移動を回避する割合で評価した。また、鎮静効果は、オープンフィールド試験における総移動距離および握力の変化によって評価した。電気生理学的な評価として、日齢 21−28 のマウスより作成した急性脳スライス標本における海馬 CA1 錐体細胞より、抑制性シナプス後電流（IPSC）を全細胞パッチクランプ法をもちいて記録した。また DS マウスと WT マウスに日齢 14 から日齢 40 まで 1 日 1 回 KRM-II-81 を経口投与した場合の生命予後についても記録した。

＜結果＞KRM-II-81 は温熱刺激による $Scn1a^{WT/A1783V}$ マウスの発作閾値を用量依存的に有意に上昇させた。低用量の KRM-II-81 は $Scn1a^{WT/A1783V}$ マウスの不安様行動を特異的に改善した。$Scn1a^{WT/A1783V}$ マウスでは比較的高用量の KRM-II-81 により鎮静作用が誘導されたが、WT マウスでは鎮静作用は認

められなかった。CA1 錐体細胞における自発 IPSC の頻度は *Scn1a*$^{WT/A1783V}$ マウスにおいて有意に減少していた。KRM-II-81 は IPSC の減衰時間動態を増加させることにより $GABA_AR$ シナプス伝達を増強し、この増強作用は *Scn1a*$^{WT/A1783V}$ マウスでは WT マウスに比べ有意に大きかった。KRM-II-81 の慢性投与では *Scn1a*$^{WT/A1783V}$ マウスにおいてコントロール群との生命予後の有意差を認めなかった。

＜考察＞温熱負荷試験の結果から、α2/3-$GABA_AR$ に対する PAM は DS マウスにおいてけいれんの閾値を上げる効果があることが示された。また不安様行動障害に対しては今回新たに低用量の α2/3-$GABA_AR$ 選択的 PAM の効果が確認され、副作用を最低限に抑えた治療への活用が示唆された。電気生理学検討からは、*SCN1A* 遺伝子機能不全により錐体細胞に対する抑制性入力が減少していること、その代償として α2/3-$GABA_AR$ の機能が亢進している可能性が示唆された。KRM-II-81 に対する DS マウスの感受性の増加は、*Scn1a*$^{WT/A1783V}$ マウスにおける低用量での抗不安効果、高用量での鎮静効果に関連している可能性がある。

KRM-II-81 の慢性投与における生命予後への影響に関しては、本研究では *Scn1a*$^{WT/A1783V}$ マウスの KRM-II-81 投与群と溶媒投与群で有意差を認めなかった。KRM-II-81 の薬剤半減期からは 1 日 1 回投与では薬効を評価するのみ十分な血中濃度が維持できていない可能性が考えられた。薬剤の持続投与が可能となるカプセルを体内に埋め込むことも考えられたが、対象となる DS マウスの体格が小さすぎたため、また観血的侵襲による生存率への影響も考えられ実行できなかった。餌とともに薬剤を経口摂取させることも考えたが、DS マウスの摂食量の安定性が不明だったため施行できなかった。DS マウスの生存率が低いことは様々な論文ですでに証明されており、今後生命予後を改善しうる薬剤かどうかについては実験方法の改善が必要であると考えられた。

＜結論＞KRM-II-81 による α2/3-$GABA_AR$ の選択的活性化は、DS のてんかん発作や行動障害を改善させる可能性がある。特に低用量の KRM-II-81 は副作用としての鎮静効果も少ない上に、DS のてんかん発作と行動異常両方に効果を有する薬剤として今後の臨床応用が期待される。生命予後への影響は本研究では有意差を認めなかったが、更なる実験方法の改善が求められた。