



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | $\alpha$ 2/3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                  |
| 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                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k16059">https://doi.org/10.14943/doctoral.k16059</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/92789">https://hdl.handle.net/2115/92789</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | NAKAKUBO_Sachiko.pdf, この論文の全文                                                                   |



# 学位論文

$\alpha 2/3$  サブユニット選択的 GABA<sub>A</sub> 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  $\alpha 2/3$  subunit  
containing GABA<sub>A</sub> receptors, in a mouse model of  
Dravet syndrome)

2024 年 6 月

北海道大学

中久保佐千子

# 目 次

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| 発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・      | 1 頁     |
| 要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・   | 2-4 頁   |
| 略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・  | 5 頁     |
| 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・   | 6-8 頁   |
| 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・   | 9-12 頁  |
| 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・   | 13-27 頁 |
| 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・   | 28-32 頁 |
| 結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・   | 33 頁    |
| 謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・   | 34 頁    |
| 利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 34 頁    |
| 引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ | 34-39 頁 |

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Nakakubo S, Hiramatsu Y, Goto T, Kimura S, Narugami M, Nakajima M, Ueda Y, Shiraishi H, Manabe A, Sharmin D, Cook JM, Egawa K.

“Therapeutic effects of KRM-II-81, positive allosteric modulator for  $\alpha 2/3$  subunit containing GABA<sub>A</sub> receptors, in a mouse model of Dravet syndrome”

Front Pharmacol. 2023 Oct 2;14:1273633. Doi: 10.3389/fphar.2023.1273633. PMID: 37849734; PMCID: PMC10577232

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Sachiko Nakakubo

Effects of  $\alpha 2/3$  subunit selective GABA<sub>A</sub> receptor activators in mice model of Dravet syndrome.

第 65 回日本小児神経学会学術集会、2023/5/25-27 岡山開催

## 【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で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  $\alpha$  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  $\alpha 2/3$  サブユニットを有する GABA<sub>A</sub> 受容体 ( $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>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-(pyridine-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<sub>A</sub> 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*<sup>WT/A1783V</sup> 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*<sup>WT/A1783V</sup> 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*<sup>WT/A1783V</sup> 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*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの不安様行動を特異的に改善した。*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> 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*<sup>WT/A1783V</sup> 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<sub>A</sub> 受容体シナプス伝達を増強し、この増強作用は *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> 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*<sup>WT/A1783V</sup> 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、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 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  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R に対する 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増加していること、その代償として  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 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*<sup>WT/A1783V</sup> 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*<sup>WT/A1783V</sup> 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す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  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 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。

## 【略語集】

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

|                                    |                                                                                                              |                 |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| ACSF:                              | Artificial cerebrospinal fluid                                                                               | (人工脳脊髄液)        |
| CGP55845:                          | (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid hydrochloride | -               |
| CNQX:                              | f 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione                                                                      |                 |
| D-AP5:                             | Amino-5-phosphonopentanoic acid                                                                              |                 |
| DS:                                | Dravet syndrome (ドラベ症候群)                                                                                     |                 |
| eIPSC:                             | evoked inhibitory post synaptic currents                                                                     | (誘発抑制性シナプス後電流)  |
| GABA:                              | $\gamma$ - Amino Butyric Acid                                                                                |                 |
| GABA <sub>A</sub> R:               | GABA <sub>A</sub> receptor (GABA <sub>A</sub> 受容体)                                                           |                 |
| $\alpha$ 2/3- GABA <sub>A</sub> R: | $\alpha$ 2 or $\alpha$ 3 subunit-containing GABA <sub>A</sub> receptor                                       |                 |
| KRM-II-81:                         | Imidizodiazepine, 5-(8-ethynyl-6-(5-ylidene-2-yl)-4H-benzo [f])imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-yl)oxazole      |                 |
| Nav1.1:                            | voltage-dependent Na <sup>+</sup> channel 1.1                                                                |                 |
| P:                                 | postnatal days (日齢)                                                                                          |                 |
| PAM:                               | positive allosteric modulator                                                                                | (陽性アロステリック調整因子) |
| PV:                                | parvalbumin                                                                                                  |                 |
| QOL:                               | quality of life                                                                                              |                 |
| sIPSC:                             | spontaneous inhibitory post synaptic currents                                                                | (自発抑制性シナプス後電流)  |
| WT:                                | wild type (野生型)                                                                                              |                 |

## 【緒言】

Dravet syndrome (DS、ドラベ症候群)は、重積となる熱性けいれん、全般けいれん発作、焦点発作、ミオクロニー発作、非定型欠神発作を含む様々な難治性てんかん発作を特徴とする早期発症てんかん性脳症である (Gataullina et al, 2017)。多くは乳児期に発症し、発作発症前は正常な発達を示すが、難治性の発作とともに重度の知的障害や自閉スペクトラム症の症状を示すことが知られている (Sinoo et al, 2019)。

DS の多くは、電位依存性  $\text{Na}^+$ チャネルの  $\alpha$  サブユニット (voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channel 1.1、Nav1.1) をコードする *SCN1A* 遺伝子の機能喪失変異のヘテロ接合体によって引き起こされる (Claes et al, 2001)。熱性けいれん、てんかん、知的障害、自閉的行動などの DS の表現型は、DS の実験モデルとして作製された *Scn1a* 遺伝子のハプロ不全マウスによってよく再現されることが知られている (Ricobaraza et al, 2019)。先行研究では、Nav1.1 は GABA 陽性であるパルブアルブミン (parvalbumin, PV) 陽性介在ニューロン (PV+介在ニューロン) に主に発現していること (Ogiwara et al, 2007)、PV+介在ニューロンは細胞体あるいは近位樹状突起に抑制性投射を行い、強固な興奮抑制作用をきたすことがしめされている (Freund and Katona, 2007)。*SCN1A* 遺伝子は、脳の多くの部位で発現しているが、その分布は均一ではなく、特定の脳領域で高く発現していることが確認されている。例えば、視床、上丘、下丘、延髄、脊髄などの部位で *SCN1A* mRNA および Nav1.1 タンパク質の発現が比較的高い一方で、大脳皮質や海馬では低いことが報告されている (Ogiwara et al, 2007)。また、*SCN1A* 遺伝子は末梢神経や骨格筋にも、中枢神経よりは少ないものの発現が見られており、DS ではチャネロパチーの症状をきたすことが先行研究で知られている (Alexander Bryson, 2023)。

DS のてんかんに対しては、バルプロ酸、クロバザム、スチリペントール、トピラマート、フェンフルラミンなどを含む多剤併用療法が試みられることが多いが、発作の寛解が得られることは少ない。現在の治療法はほとんどの患者にとって不十分であり、複数の抗てんかん薬を服用しているにもかかわらず、月に 3 回以上の強直間代発作を起こす患者が全体の約 45%を占めているといわれている (Luis Miguel Aras et al, 2015)。DS に有効とされるカンナビジオールは新しく日本で認可される抗てんかん薬である。カンナビジオールは内因性カンナビノイド増加作用をもち、DS に有効な抗てんかん作用を呈する反面、傾眠や食欲減退、下痢、クロバザムとの併用で鎮静の副作用が増悪する可能性があることがわかっている (Valentina Satta et al, 2021)。カンナビジオールは 2024 年の大麻取締法の改訂によって使用が可能となったが、現在治験の段階で一般的に使用できるのはあと 2 年ほどかかる予定であり、処方方法など色々と今後の体制を整える必要がある。また治療として非特異的  $\text{GABA}_A\text{R}$  賦活薬 (クロバザムな

ど)の有効性は以前より知られてきた (Hawkins et al, 2017) が、傾眠、めまいの副作用も多く認められており、臨床試験データでは使用した中で実に 40%の患者が軽度から中等度の副作用を経験している (Angela C. Gauthier et al, 2015)。

このように沢山の薬剤が DS の治療に用いられているが、効果には個人差もあり、DS に有効でかつ傾眠作用が少ない新しい治療法の発見が今も非常に待たれている。

DS の治療法としてケトン食や修正アトキンス食などの食事療法の効果も一定数報告されてはいるものの、長期にわたる食事制限が必要となり患者や家族への負担は大きいものとなっている。早期のリハビリテーションや療育は DS の知的障害や自閉スペクトラム症様の行動障害に対して有効であることがわかっており、実施すべき治療法ではある。しかしながらリハビリなどの行動療法を効果的に行うためにも、てんかん発作特に重積発作のコントロールは必要である。

以上より DS 患者の quality of life (QOL) を改善するためには、副作用の少ない、抗けいれん作用に加えてこれらの知的、自閉スペクトラム症様の行動障害をターゲットにした新規薬剤の開発が必要である。

$\gamma$ - Amino Butyric Acid (GABA) 受容体は中枢神経系において主要な抑制性神経伝達物質である GABA の主要な標的であり、イオンチャネル型の GABA<sub>A</sub> 受容体 (GABA<sub>A</sub> receptor: GABA<sub>A</sub>R) と GABA<sub>C</sub> 受容体、代謝調節型の GABA<sub>B</sub> 受容体に分けられる。網膜に存在が限定される GABA<sub>C</sub> 受容体と、GABA<sub>B</sub> 受容体はてんかんの病態での役割がまだ知られておらず、これらの受容体に対する抗てんかん薬も確立されていない

(Robert J et al, 2024)。本研究の対象としている GABA<sub>A</sub>R は  $\alpha$ (1-6)、 $\beta$ (1-3)、 $\gamma$ (1-3)、 $\epsilon$ 、 $\delta$  などのサブユニットから合成されるヘテロ 5 量体であり、通常は 2 つの  $\alpha$  サブユニット、2 つの  $\beta$  サブユニット、1 つの  $\gamma$  または  $\delta$  サブユニットで構成される。サブユニットの分布には偏りがあるとされており、 $\alpha$ 1 サブユニットは特に大脳皮質の III 層と IV 層で高い発現を示している。また、海馬では比較的中程度の発現を見せており、これらの領域での主要な抑制的作用に寄与していると考えられる。主に睡眠調節、鎮静作用、抗不安効果に関与している。 $\alpha$ 2 サブユニットは抗不安作用に多く関与し、大脳皮質の上層 (I-IV 層) で特に強く発現しており、下層 (V-VI 層) ではわずかに発現している。 $\alpha$ 3 サブユニットは、大脳皮質のより深い層、特に前頭皮質や側頭皮質の深部、視床下部で豊富に見られ、抗不安作用や自律神経の調節に重要な役割を果たしていると考えられる (Christoph Redecker et al, 2000; Nina Berggaard et al, 2018)。また、 $\alpha$ 1 サブユニットは遠位樹状突起に、 $\alpha$ 2/3 サブユニットは近位樹状突起あるいは細胞体にそれぞれ優位に発現するとされている (Nomura et al, 2019)。前述のように、Nav1.1 は近位樹状突起あるいは細胞体に投射する PV+ 介在ニューロンに多く発現しており

(Ogiwara et al, 2007)、その機能不全により発症する DS においては、 $\alpha 2/3$  サブユニットを含有する GABA<sub>A</sub> 受容体 ( $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R) を介した抑制性シナプス伝達が主に障害されている可能性が高いといえる。

本研究でも使用している陽性アロステリック調整因子 (positive allosteric modulator、PAM) とは、受容体の活性を増強するが、その作用は受容体に対して直接的なアゴニストとして働くのではなく、受容体に結合する他のリガンドの効果を増幅することで行われる。 $\alpha 1$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的 PAM は鎮静作用、運動障害作用を示す一方、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的 PAM には抗けいれん作用と抗不安作用があることが示されており (Rivas et al, 2009)、 $\alpha 2/3$  サブユニットに選択性の高い賦活薬は鎮静作用の少ない、より効果的な抗けいれん薬として使用できるのではないかと考えた。

本研究で使用する Imidizodiazepine, 5-(8-ethynyl-6-(8-ylidene-2-yl)-4H-benzo[f]imidazo[1,5-a][1,4]diazepin-3-yl)oxazole (KRM-II-81) は、最近開発された  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R に対する選択的 PAM であり (Poe et al, 2016)、その抗てんかん作用はすでにラットのてんかんモデルで示されている (Knutson et al, 2020)。また KRM-II-81 とは異なる  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R に対する選択的 PAM が DS の熱性けいれんの閾値を上昇させる報告もすでに報告されている (Nomura et al, 2019)。今回我々は *Scn1a* 遺伝子欠損マウスを用いて DS に対する KRM-II-81 の有効性を検討し、KRM-II-81 がこれらのマウスにおいて熱性けいれんの閾値および不安様行動を改善することを示した。この結果は、KRM-II-81 による  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R の活性化が、DS のけいれん発作と精神症状両方を改善させる可能性を示すものであった。今後 KRM-II-81 が DS の有効な治療薬となりうる可能性を見出した。

## 【方法】

### 1. 対象マウス

全ての実験は北海道大学動物実験に関する規程にのっとり承認を得て行われた（承認番号 20-0170）。マウスはすべて温度 23°C-25°C、湿度 45%-55%に保ち 12 時間の昼夜サイクルで管理された。今回の研究では B6(Cg)-Scn1atm1.1Dsf/J マウス (JAX # 026133) と B6.C-Tg (CMV-Cre) 1Cgn/J マウス (JAX # 006054) を交配して得られた Scn1a<sup>WT/A1783V</sup> マウスを使用した。このマウスは、てんかん発作や熱誘発痙攣発作の閾値の低下、発育不良、生存率の低下、行動異常など DS の表現型をよく表していることが知られている (Ricobaraza et al, 2019)。DS マウスは生存率が低く繁殖効率が劣るため、今回は先行研究でも使用されている上記のコンディショナルマウスを繁殖させ使用した。

すべての実験において雌雄両方のマウスを用いた。また、すべての行動実験は、飼育部屋とはことなる部屋で行い、実験 1 時間前に移動し環境に馴化させ使用した。

日齢 21-28 日 (Postnatal days、P21-28) の幼若期マウスは、熱負荷試験および電気生理学的実験に使用され、行動実験（オープンフィールド試験および握力試験）は P60-90 の成年期マウスで実施した。

生存率を調べるために行われた薬剤の慢性投与実験では P14-40 のマウスを使用した。

### 2. 使用薬剤

KRM-II-81 は、共同研究者ウィスコンシン大学ミルウォーキー校 Dr James Cook らのグループによって合成された新規の  $\alpha 2/3$  サブユニット選択的 GABA<sub>A</sub> 受容体 PAM である (Poe et al, 2016)。In vivo の実験では、KRM-II-81 を 1% ヒドロキシエチルセルロース、0.05% Tween 80、0.25% 消泡剤を含む水溶液に 1 mL/kg の投与量で所定の投与量となるよう調整懸濁し、腹腔内（オープンフィールド試験および握力試験）または皮下（熱負荷試験）に投与した。熱負荷試験では若年マウス (P21-28) を使用しており、この日齢の DS マウスは WT の 2/3 程度の体重を示すことから (Ricobaraza et al, 2019)、侵襲性を考慮して皮下投与を選択した。また慢性投与ではゾンデ（げっ歯類用経口ゾンデ FTP-20-30 プライムテック社）を使用して経口投与とした。使用量は、0、1.0、5.0 または 10.0 mg/kg のいずれかを選択した。最大投与量 10.0 mg/kg でも  $\alpha 2/3$  サブユニット選択性が維持される脳内濃度となることが先行研究で示されている (Poe et al, 2016)。また電気生理学的記録では、KRM-II-81 をジメチルスルホキシドで懸濁し、最終濃度 600 nM の灌流液を介して適用した。この濃度はげっ歯類において 10 mg/kg の全身投与で得られる脳内血中濃度を示した先行研究 (644 nM, Witkin et al, 2018) に準

じて選択した。

### 3. 温熱負荷試験

温熱負荷試験は、温熱誘発発作の閾値を調べるために先行研究に従った (Hawkins et al, 2017; Ricobaraza et al, 2019)。P21-28 のマウスに、熱負荷を開始する 30 分前に薬剤を皮下投与し、開始 5 分前に直腸温度プローブ (RET-3、World Precision Instruments) を直腸に挿入して環境に適応させた。その後、マウスをアクリルシリンダーに入れ、シリンダー上部から赤外線ランプ (EXO TERRA heat glow 赤外線照射スポットランプ、150W) で加熱した (図 1)。シリンダーの下には断熱のため発泡スチロールを敷き開放された空間で行った。

直腸温を連続的にモニターし、2 分ごとに 0.3-0.5℃ずつ体温が上昇するように加熱パワーを調整した。記録は、全身の間代発作が起こるか、もしくはマウスの直腸温が 45.0℃に達するまで続け、けいれんを起こした際の直腸温を解析した。



図 1 温熱負荷試験の様子

### 4. オープンフィールド試験

P60-90 のマウスは、実験開始 30 分前に薬剤を腹腔内投与され、30 分間防音された実験室に適応させた。その後、各マウスを空のアリーナ (40×40×40 cm) の中央に置き、30 分間自由に探索させ記録した。マウスの移動はビデオカメラで記録しトラッキングソフトウェア (ANY-maze) をもちいて総移動距離と中央領域 (アリーナの中央 25 cm×25 cm) での相対移動距離、滞在時間について分析した。

## 5. 握力試験

P60-90 マウスの前肢の握力を、薬剤の腹腔内投与 30 分後に握力計（GPM-101B、メルクスト社製）を用いて測定した。握力試験は防音室で行い、薬剤投与後 30 分は環境に馴化させた。握力計に設置したマウス四肢用網（120 mm×150 mm）に両前肢で捕まらせ、尾を引いて測定した。尾を引いた瞬間に前肢を離した場合は再検とし、各々体重当たりの握力を算出して比較した。

## 6. 電気生理学的試験

P21-28 の *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスまたは同腹仔の野生型（wild type ; WT）を用いた深麻酔下で断頭し、海馬を含む脳冠状スライス（厚さ 350  $\mu$ m）を、氷冷したスライス作成用人工脳脊髄液（Artificial cerebrospinal fluid: ACSF、220 スクロース、2.5KCl、1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、12.0 MgSO<sub>4</sub>、0.5 CaCl<sub>2</sub>、26.0 NaHCO<sub>3</sub>、30.0 Glucose（すべて単位は mM）、pH 7.4、95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>）中のマイクロスライサー（VF-300-0Z、Precisionary）にて作成した。作成したスライスは、標準 ACSF 溶液（126 NaCl、2.5 KCl、1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.0 MgSO<sub>4</sub>、2.0 CaCl<sub>2</sub>、26.0 NaHCO<sub>3</sub>、20.0 Glucose、95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>、pH7.4）に室温で 1 時間以上浸漬し実験に使用した。スライスを正立微分干渉顕微鏡（Axioskop2、Zeiss）のステージ上の記録チャンバーに移し、30°Cで 2 mL/分の流速で標準 ACSF を連続的に灌流した。CA1 錐体ニューロンは、赤外微分干渉コントラストフィルターを装着した 40 倍の水浸対物レンズを用いてモニター上で視覚的に同定した。パッチ電極は、直径 1.5 mm のキャピラリーチューブ（GD-1.5 ; Narishige）から水平プーラー（P-97、Sutter Instruments）を用いて電極抵抗は 4~6 M $\Omega$  となるよう調整し作成した。Axopatch 200 B(Molecular Devices)、Digidata 1332A(Molecular Devices)を用いて記録し、サンプリングレートは 6-10 kHz、ローパスフィルターは 2 kHz とした。全細胞電位クランプ記録では、f 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 20  $\mu$ M), D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5; 50  $\mu$ M), CGP55845 (3  $\mu$ M)（いずれも Cayman chemical より購入）を ACSF 溶液に添加し、シナプス後電流としては GABA<sub>A</sub> 受容体由来のもののみを記録するよう調整し、-60 mV の保持電位で電圧クランプした。電極内液組成は 130 CsCl、1 CaCl<sub>2</sub>、2 MgCl<sub>2</sub>、10 HEPES-NaOH、0.5 EGTA-KOH、1.5 Mg-ATP、0.5 Na<sub>2</sub>-GTP、2.5 QX314（pH7.3）とした。電極内液の主たる陽イオンをセシウムとし K<sup>+</sup>チャネルを阻害することで、ポタシウムを主たる陽イオンとする場合に比してより精度の高い電位クランプをはかった。液間電位差は pCLAMP10 内のソフトウェアをもちいて+5.2 mV と算出し、電極電位を補正した。ギガオームシール形成後手で陰圧をかけホールセル記録とし、5 分以上経過し安定させた状態でコマンドパルス

(+10 mV) による細胞の状態評価をおこなった。静止膜電位 -45.0 mV 以下、膜抵抗 100 M $\Omega$  以上、直列抵抗 50 M $\Omega$  以下、前後での直列抵抗変化 20% 以下の記録を解析に採用した。CA1 錐体細胞の自発抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory post synaptic currents: sIPSC) 5 分間以上の記録から、1 エポック 30 秒、3 エポックを切り出し、pClamp 10 (Molecular Device) のテンプレートサーチを用いて、個々の sIPSC の周波数、ピーク振幅、10%-90% の減衰時間を解析、細胞毎の平均をもとめた。sIPSC のイベント間隔については、すべてのイベントの累積確率曲線を導出し比較した。誘発抑制性シナプス後電流 (evoked inhibitory post synaptic currents: eIPSC) の記録では、電気刺激電極として単極性ガラスピペット (ACSF で充填) を錐体層に設置し、細胞体近傍に入力する誘発性抑制性シナプス応答を記録した。誘発刺激として 30 秒毎に 200  $\mu$ s の持続時間、最大振幅を誘発する強度 (100-400 pA) で単発電気刺激を加えた。連続する 3 回の eIPSC を平均し、ピーク振幅、10%-90% の減衰時間を解析した。

## 7. KRM-II-81 の慢性投与

P10 の時にジェノタイピングした P14-40 の *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスに 10 mg/kg の KRM-II-81 を 1 日 1 回経口ゾンデにて投与した。同様の方法で同量の溶媒を与えた群と生存率を比較した。

## 8. データ解析

熱負荷試験における比較には、ボンフェローニの補正を用いた Log-rank 検定を用いた。*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおける熱誘発発作の閾値体温は、One-way ANOVA および Tukey 検定により、各 KRM-II-81 投与量間で比較した。オープンフィールド試験および握力試験で得られたデータの解析には、シダック補正した Two-way ANOVA を用いた。電気生理学的実験から得られたデータは、累積確率の比較 (Kolmogorov-Smirnov 検定) および各遺伝子型間の減衰時間の相対変化 (unpaired t 検定) を除き、シダック補正した Two-way ANOVA により解析した。慢性投与に関しては Log-rank 検定を使用した。 $p < 0.05$  のとき有意と判定した。データは平均値  $\pm$  平均値の標準誤差で示した。統計解析は Prism 9.0 (GraphPad software) を用いて行った。

## 9. 倫理規定

すべての実験手順は、北海道大学の動物実験指針が示す方針およびプロトコールに従って実施された (承認番号 20-0170)。遺伝子組換え実験の承認を得て実施された (承認番号 2020-044)。

## 【結果】

### 1. KRM-II-81 は *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおける熱誘発性発作閾値を上昇させる。

*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスは、同腹仔の WT マウス ( $44.1 \pm 0.2$  °C、10 匹中 7 匹が痙攣) と比較して体温が低い ( $38.4 \pm 0.2$  °C、10 匹中 10 匹が痙攣) 段階で、熱誘発発作を起こした。また、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでは全例が発作を起こしたが、WT マウスでは 10 匹中 3 匹が測定最高体温の  $45.0^{\circ}\text{C}$  に達しても発作を起こさなかった。発作誘発確率は *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスで有意に高い ( $p=0.038$ 、 $\chi^2$  検定) ことがわかった。中～高用量の KRM-II-81 の投与は、体温に対する発作累積曲線の右方シフトによって示されるように、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの発作閾値を有意に上昇させた (5 mg/kg:  $p=0.019$ 、10 mg/kg :  $p<0.001$ 、Log-rank 検定、図 2A、表 1)。発作を誘発する体温は、KRM-II-81 5 mg/kg ( $38.4 \pm 0.3$  °C、 $n=8$ 、 $p=0.008$ ) または 10 mg/kg ( $39.8 \pm 0.2$  °C、 $n=7$ 、 $p<0.001$ ) によって有意に上昇した (図 2B、表 1)。KRM-II-81 5 mg/kg と 10 mg/kg の間に有意差はなかった ( $p=0.456$ )。WT マウスでは、KRM-II-81 はいずれの用量においても発作累積曲線を変化させなかった (1 mg/kg :  $p>0.90$ 、5 mg/kg :  $p=0.140$ 、10 mg/kg :  $p=0.144$ 、表 1)。しかし、総発作確率は 5 mg/kg (14.2%、7 匹中 1 匹、 $p<0.0001$ ) または 10 mg/kg (28.6%、7 匹中 2 匹、 $p<0.001$ 、 $\chi^2$  検定) でコントロールと比較し有意に減少しており、1 mg/kg では減少は認められなかった (71.4%、7 匹中 2 匹、 $p=0.763$ )。このことから、KRM-II-81 の抗痙攣作用は、先行研究と同様に遺伝子型に限定されないことが示唆された。

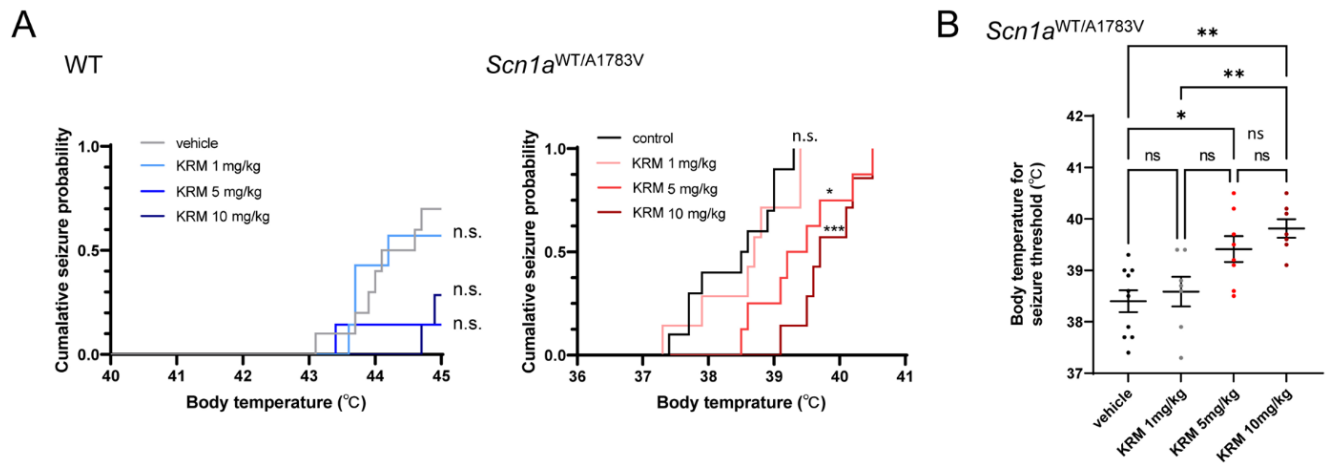


図2 熱負荷試験における KRM-II-81 の効果。

A: WT マウス (左) と *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス (右) の体温に対する累積発作確率を示す。n.s.: 有意ではない、\*:  $p < 0.05$ 、\*\*\*:  $p < 0.001$  (ボンフェローニ補正を用いた Log-rank 検定によるコントロールとの比較)

B: *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおける KRM-II-81 の投与量の違いによる発作閾値の体温比較を示す。n.s.: 有意ではない、\*:  $p < 0.05$ 、\*: Tukey の post-hoc test による  $p < 0.01$ 。各群  $N = 7-10$ 。

| WT      |             |             |              | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |             |             |              |
|---------|-------------|-------------|--------------|-----------------------------------|-------------|-------------|--------------|
| control | KRM 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg | control                           | KRM 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg |
| 43.1    | 43.6        | 43.4        | 44.7         | 37.4                              | 38.8        | 38.5        | 39.1         |
| 43.7    | 43.7        | 45.0        | 44.9         | 37.7                              | 39.4        | 38.6        | 39.5         |
| 43.9    | 43.7        | 45.0        | 45.0         | 37.7                              | 37.9        | 39.1        | 39.6         |
| 44.0    | 44.2        | 45.1        | 45.0         | 37.9                              | 38.7        | 39.2        | 39.7         |
| 44.1    | 45.0        | 45.1        | 45.0         | 38.5                              | 38.6        | 39.5        | 40.1         |
| 44.6    | 45.0        | 45.1        | 45.0         | 38.6                              | 37.3        | 39.7        | 40.2         |
| 44.7    | 45.0        | 45.2        | 45.0         | 38.9                              | 39.4        | 40.2        | 40.5         |
| 45.0    |             |             |              | 39.0                              |             | 40.5        |              |
| 45.0    |             |             |              | 39.0                              |             |             |              |
| 45.0    |             |             |              | 39.3                              |             |             |              |

表1 温熱刺激による痙攣閾値 (°C)。45.0 °Cは記録終了温度であり、痙攣にいたってはいない。

## 2. 低用量の KRM-II-81 は *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの不安障害を改善する。

これまでの研究で、 $\alpha 2/3$  サブユニット選択的 GABA<sub>A</sub> 受容体 PAM は、鎮静作用を伴わずに抗不安薬として作用することが示されている (Attack et al, 2006)。そこで次に、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスに対して KRM-II-81 が抗不安薬作用を示すかをオープンフィールド試験により評価した。KRM-II-81 は、解析の 30 分前に 1、5 および 10 mg/kg の用

量で腹腔内投与した。

*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスは WT マウスと比較して、中心領域に滞在する時間が短かった (WT 283.3 ± 48.6 秒、n = 8 対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> 82.7 ± 15.7 秒、n = 15、F [1, 74] = 87.04、p < 0.001、図 3A および B、表 2)。また、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでは、同様に中心領域の移動距離が短かった (WT 22.1 ± 3.4 m、n = 8 対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> 8.5 ± 1.5 m、n = 15、F [1, 74] = 85.49、p < 0.0001、図 3A および C、表 3)。これらの結果は先行研究と一致しており、DS モデルマウスの不安様行動を表していた (Han et al, 2012 ; Bahceci et al, 2020)。KRM-II-81 の投与は、中心領域の移動時間と移動距離の両方に有意な改善を示したが (それぞれ、F [3, 74] = 9.688, p < 0.0001 および F [3, 74] = 9.655, p < 0.0001)、投与量と遺伝子型の間には有意な交互作用は認められなかった (時間 : F [3, 74] = 1.065, p = 0.369、距離 : F [3, 74] = 1.803、p = 0.154)。 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでは、低用量の KRM-II-81 (1 mg/kg) 投与のみ、中心領域の移動時間と移動距離が特異的に増加した。中心領域の移動時間については、対照群対 KRM-II-81 1 mg/kg 投与群 (199.9 ± 54.7 秒、n = 9) : p = 0.007、対照群対 KRM-II-81 5 mg/kg 投与群 (40.4 ± 6.7 秒、n = 8) : p = 0.565、対照群対 KRM-II-81 10 mg/kg 投与群 (42.7 ± 13.6 秒、n = 12) : p = 0.511、中心領域の移動距離については対照群対 KRM-II-81 1 mg/kg 投与群 (17.7 ± 3.4 m、n = 9) : p = 0.003、対照群対 KRM-II-81 5 mg/kg 投与群 (7.2 ± 1.3 m、n = 8) : p = 0.939、対照群対 KRM-II-81 10 mg/kg 投与群 (3.0 ± 0.9 m、n = 12) : p = 0.073 であった (図 3A-C、表 2 および 3)。WT マウスにおいては KRM-II-81 投与によってこれらのパラメータに有意差はみられなかった。中心領域の時間比較については、対照群対 KRM-II-81 1 mg/kg 投与群 (395.8 ± 38.6 秒、n = 10) : p = 0.124、対照群対 KRM-II-81 5 mg/kg 投与群 (324.4 ± 37.7 秒、n = 10) : p = 0.791、対照群対 KRM-II-81 10 mg/kg 投与群 (216.1 ± 29.1 秒、n = 10) : p = 0.480、中心領域の移動距離については、対照群対 KRM-II-81 1 mg/kg 投与群 (30.4 ± 3.1 m、n = 10) : p = 0.180、対照群対 KRM-II-81 5 mg/kg 投与群 (30.9 ± 2.9 m、n = 10) : p = 0.152、対照群対 KRM-II-81 10 mg/kg 投与群 (19.2 ± 3.1 m、n = 10) : p = 0.853 であった (図 3A-C、表 2 および 3)。これらの結果から、低用量 KRM-II-81 の投与は、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの不安様行動の改善に特異的に有効であることが示された。

| WT      |             |             |              | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |             |             |              |  |
|---------|-------------|-------------|--------------|-----------------------------------|-------------|-------------|--------------|--|
| control | KRM 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg | control                           | KRM 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg |  |
| 252.1   | 453.0       | 199.1       | 334.4        | 142.6                             | 134         | 45          | 1.5          |  |
| 232.6   | 588.3       | 275.0       | 213.3        | 164.8                             | 68.5        | 66.7        | 11           |  |
| 456.2   | 438.0       | 304.8       | 78.4         | 85.5                              | 214.4       | 63.7        | 27.3         |  |
| 362.1   | 515.6       | 184.1       | 293.3        | 129.9                             | 35.6        | 38.9        | 9.2          |  |
| 313.4   | 157.1       | 600.4       | 374.7        | 37.6                              | 506.3       | 19.1        | 1.5          |  |
| 15.3    | 409.0       | 335.4       | 169.0        | 51.3                              | 332.4       | 28.3        | 8.4          |  |
| 411.0   | 261.6       | 277.6       | 207.5        | 131.4                             | 353.4       | 45.9        | 106.7        |  |
| 223.3   | 363.2       | 283.4       | 187.8        | 30.9                              | 50.6        | 15.9        | 62.8         |  |
|         | 406.7       | 403.4       | 128.9        | 223.3                             | 104.1       |             | 32.6         |  |
|         | 365.0       | 380.9       | 174.0        | 36.5                              |             |             | 41.7         |  |
|         |             |             |              | 29                                |             |             | 53.7         |  |
|         |             |             |              | 43.6                              |             |             | 155.4        |  |
|         |             |             |              | 42.3                              |             |             |              |  |
|         |             |             |              | 58.6                              |             |             |              |  |
|         |             |             |              | 33.6                              |             |             |              |  |

表 2 オープンフィールド試験における中央ゾーン滞在時間（秒）

| WT      |             |             |              | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |             |             |              |  |
|---------|-------------|-------------|--------------|-----------------------------------|-------------|-------------|--------------|--|
| control | KRM 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg | control                           | KRM 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg |  |
| 18.5    | 40.6        | 15.9        | 23.7         | 19.7                              | 15.5        | 9.5         | 0.2          |  |
| 21.9    | 37.5        | 25.5        | 19.3         | 18.1                              | 11.0        | 13.0        | 0.5          |  |
| 29.5    | 37.8        | 36.8        | 3.0          | 12.9                              | 29.8        | 9.9         | 3.0          |  |
| 33.4    | 34.0        | 22.1        | 17.2         | 12.2                              | 6.6         | 8.8         | 0.6          |  |
| 29.3    | 11.3        | 41.0        | 41.9         | 2.4                               | 33.5        | 3.1         | 9.9          |  |
| 2.8     | 23.8        | 39.3        | 18.6         | 7.1                               | 22.1        | 4.5         | 6.8          |  |
| 22.5    | 18.5        | 26.7        | 24.2         | 7.8                               | 25.3        | 5.5         | 0.2          |  |
| 18.6    | 31.0        | 22.6        | 14.2         | 13.7                              | 6.2         | 3.0         | 0.2          |  |
|         | 29.6        | 40.9        | 13.3         | 2.9                               | 9.0         |             | 1.9          |  |
|         | 39.8        | 37.8        | 16.4         | 4.4                               |             |             | 2.1          |  |
|         |             |             |              | 1.9                               |             |             | 5.4          |  |
|         |             |             |              | 6.8                               |             |             | 5.0          |  |
|         |             |             |              | 4.6                               |             |             |              |  |
|         |             |             |              | 9.3                               |             |             |              |  |
|         |             |             |              | 2.8                               |             |             |              |  |

表 3 オープンフィールド試験における中央ゾーン移動距離（m）

### 3. KRM-II-81 は *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスに対し WT に比して高い鎮静作用を示す。

KRM-II-81 は、オープンフィールド試験における総移動距離に対して有意な主効果（F [3, 73] = 8.102,  $p < 0.0001$ ）を示し、投与量と遺伝子型の間に有意な交互作用（F [3, 73] = 5.358,  $p = 0.002$ ）が認められた。コントロール投与での総移動距離は WT マウスと *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスで有意な差をみとめなかった（WT 109.9 ± 6.8 m、 $n = 8$  対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> 124.2 ± 9.3 m、 $n = 14$ 、 $p = 0.40$ ）。 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでは、1 mg/kg

または 5 mg/kg の KRM-II-81 は総距離を減少させなかったが(それぞれ  $108.9 \pm 8.8$  m、 $n = 9$ 、 $p = 0.611$  および  $150.5 \pm 10.9$  m、 $n = 8$ 、 $p = 0.215$ )、10 mg/kg の KRM-II-81 は対照群と比較して有意に総距離を減少させた ( $59.1 \pm 15.3$  m、 $n = 12$ 、 $p < 0.0001$ 、図 3A および D、表 4)。一方 WT では、KRM-II-81 はいずれの用量でも WT マウスの総距離を減少させなかった(対照群と比較して 1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg でそれぞれ  $114.1 \pm 5.7$  m、 $n = 10$ 、 $p = 0.987$ 、 $129.9 \pm 5.7$  m、 $n = 10$ 、 $p = 0.454$ 、 $114.9 \pm 13.8$  m、 $n = 10$ 、 $p = 0.978$ 、図 3A および D、表 4)。KRM-II-81 の高用量投与による運動の低下量は、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおける鎮静作用によって引き起こされた可能性がある。そこで、次に握力に対する KRM-II-81 投与の影響を評価した。Two-way ANOVA で解析したところ、遺伝子型と薬剤との間に有意な交互作用は認められなかった ( $F [3, 56] = 0.286$ 、 $p = 0.835$ ) が、握力に対する KRM-II-81 の有意な主効果が認められた ( $F [3, 56] = 9.119$ 、 $p < 0.0001$ )。オープンフィールド試験での総距離の結果と同様に、KRM-II-81 の 10 mg/kg は *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおいて有意に握力を低下させたが(対象群  $6.1 \pm 0.4$  kg/kg、 $n = 8$  対 KRM-II-81 10 mg/kg 投与群  $4.5 \pm 0.3$  kg/kg、 $n = 10$ 、 $p = 0.042$ )、WT マウスでは低下しなかった( $6.7 \pm 0.9$  kg/kg、 $n = 9$  対  $5.7 \pm 0.4$  kg/kg、 $n = 8$ 、 $p = 0.3973$ 、図 3E、表 5)。KRM-II-81 の 1 mg/kg または 5 mg/kg 投与は、WT マウス(それぞれ 1 mg/kg:  $7.8 \pm 0.4$  kg/kg、 $n = 7$ 、 $p = 0.321$  および 5 mg/kg:  $7.4 \pm 0.4$  kg/kg、 $n = 8$ 、 $p = 0.730$ ) および *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス(同様に  $7.0 \pm 0.5$  kg/kg、 $n = 7$ 、 $p = 0.477$  および  $6.8 \pm 0.4$  kg/kg、 $n = 7$ 、 $p = 0.656$ 、図 3E、表 5) の両方で握力を変化させなかった。これらオープンフィールド試験と握力試験の結果により、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおける KRM-II-81 の鎮静作用を示す用量が WT マウスよりも低いことが示唆された。

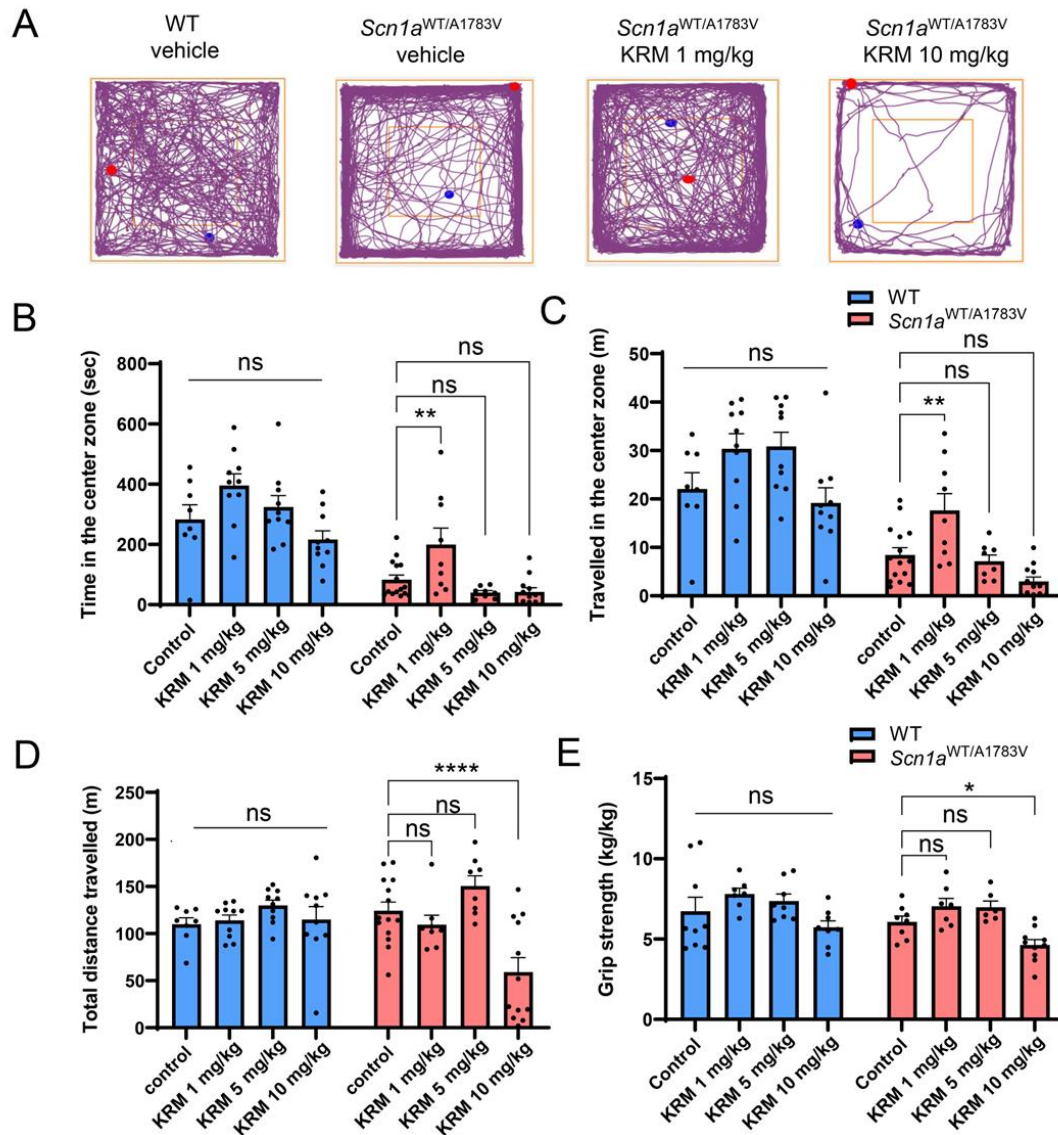


図 3 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおけるオープンフィールド試験および握力に対する KRM-II-81 投与の効果。

A : WT マウスに vehicle を、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスに vehicle を、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスに KRM-II-81 1 mg/kg または 10 mg/kg を投与したときのオープンフィールド試験の代表的な軌跡マップ。赤と青の点はそれぞれ追跡の開始点と終了点を示す。

B-D : KRM-II-81 のオープンフィールド試験における移動距離 (B), 中央ゾーンでの時間 (C) および総移動距離 (D) に対する効果を示す。

E : WT および *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおける KRM-II-81 の投与量の違いによる握力の比較をしめす。

n.s.: 有意ではない, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*\*: 二元配置分散分析の後の Šidák の多重比較検定による  $p < 0.0001$

| WT | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |             |             |              |             |         |             |              |
|----|-----------------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------|-------------|--------------|
|    | control                           | KRM 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg | control KRM | 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg |
|    | 113.9                             | 124.0       | 124.1       | 112.0        | 157.0       | 102.0   | 177.1       | 19.4         |
|    | 113.3                             | 125.1       | 138.4       | 137.9        | 174.0       | 107.5   | 165.4       | 7.9          |
|    | 108.4                             | 134.3       | 145.3       | 15.8         | 175.5       | 173.7   | 197.3       | 118.3        |
|    | 127.7                             | 103.8       | 131.2       | 94.5         | 111.6       | 116.2   | 167.8       | 18.6         |
|    | 123.4                             | 97.2        | 117.2       | 180.5        | 100.6       | 103.5   | 110.1       | 146.9        |
|    | 68.7                              | 87.5        | 152.0       | 141.1        | 115.0       | 105.4   | 121.8       | 120.7        |
|    | 98.0                              | 88.7        | 111.9       | 140.4        | 145.9       | 103.4   | 127.0       | 10.3         |
|    | 125.9                             | 123.9       | 94.3        | 129.6        | 135.2       | 83.2    | 137.1       | 2.0          |
|    |                                   | 123.8       | 147.1       | 99.2         | 85.8        | 85.1    |             | 22.4         |
|    |                                   | 132.7       | 137.1       | 98.2         | 56.2        |         |             | 52.0         |
|    |                                   |             |             |              | 114.2       |         |             | 111.8        |
|    |                                   |             |             |              | 93.8        |         |             | 79.1         |
|    |                                   |             |             |              | 157.0       |         |             |              |
|    |                                   |             |             |              | 116.7       |         |             |              |
|    |                                   |             |             |              | 89.8        |         |             |              |

表 4 オープンフィールド試験における総移動距離 (m)

| WT | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |             |             |              |             |         |             |              |
|----|-----------------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------|-------------|--------------|
|    | control                           | KRM 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg | control KRM | 1 mg/kg | KRM 5 mg/kg | KRM 10 mg/kg |
|    | 8.3                               | 9.3         | 7.1         | 5.6          | 6.5         | 5.6     | 6.3         | 4.9          |
|    | 5.5                               | 7.8         | 6.2         | 7.6          | 4.6         | 7.1     | 6.5         | 2.6          |
|    | 4.5                               | 8.3         | 6.3         | 6.6          | 4.9         | 8.1     | 6.1         | 4.5          |
|    | 5.7                               | 8.1         | 7.0         | 5.5          | 5.4         | 9.2     | 6.7         | 3.7          |
|    | 5.8                               | 6.3         | 6.4         | 4.0          | 6.1         | 5.8     | 7.7         | 4.0          |
|    | 4.4                               | 7.7         | 7.8         | 5.7          | 6.3         | 7.2     | 8.6         | 4.6          |
|    | 4.6                               | 7.1         | 9.3         | 4.5          | 7.7         | 6.2     | 6.1         | 4.9          |
|    | 10.8                              |             | 9.1         | 6.3          | 6.9         |         |             | 5.1          |
|    | 11.0                              |             |             |              |             |         |             | 4.8          |

表 5 握力試験 (kg/kg)

4. *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでは KRM-II-81 の抑制性シナプス反応増強作用が亢進している。

*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスで観察された KRM-II-81 の用量依存的な鎮静作用は、WT マウスと *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスで KRM-II-81 による GABA<sub>A</sub> 受容体の修飾が異なる可能性を示唆している。この可能性を検討するため、我々は、急性脳スライス内の CA1 錐体ニューロンから全細胞パッチクランプ法を適応して、抑制性シナプス後電流 (IPSC) を解析した。この実験では幼若マウス (P21-28) 由来の海馬スライス標本を用いた。グルタミン酸受容体、GABA<sub>B</sub> 受容体を遮断した状態で GABA<sub>A</sub> 受容体を介した sIPSC を記

録した。記録した神経細胞の静止膜電位、膜抵抗に WT マウスと *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスで有意な差をみとめなかった（静止膜電位:  $-52.7 \pm 1.0$  mV、 $n = 14$  対  $-51.5 \pm 1.2$  mV、 $n = 12$ 、 $p = 0.44$ 、膜抵抗:  $157.3 \pm 12.3$  M $\Omega$ 、 $n = 14$  対  $157.7 \pm 17.3$  M $\Omega$ 、 $n = 12$ 、 $p = 0.99$ 、表 6）。静止膜電位が生理的な静止膜電位より高い値を示したのは、電極内液にセシウムをもちいたためと考えられる。次に、灌流液に KRM-II-81 を 600 nM 添加しその増強作用を検証した。この濃度はげっ歯類における約 10 mg/kg の KRM-II-81 の投与によって得られる脳内濃度に相当する（Witkin et al, 2018）。

解析した全ての sIPSC イベント（WT マウス: 14 細胞から 3638 イベント、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス 12 細胞から 2345 イベント）について、イベント感覚時間の累積分布曲線をプロットすると、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでは、WT マウスに比べて有意に右方シフトしており（Kolmogorov-Smirnov 検定による  $p < 0.0001$ 、図 4A,B）sIPSC の出現頻度が有意に減少していることが示された。細胞毎の sIPSC 平均出現頻度に対する Two-way ANOVA 解析でも、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでは WT に比し減少していることが示された（WT  $5.39 \pm 0.54$  Hz、 $n = 14$  対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $3.14 \pm 0.41$  Hz、 $n = 12$ 、 $F [1, 24] = 9.739$ 、 $p = 0.005$ 、図 4D、表 7）。sIPSC の平均減衰時間とピークの振幅（図 4C）は、WT マウス（減衰時間  $31.3 \pm 0.7$  ms、振幅  $27.4 \pm 2.0$  pA）、と *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス（減衰時間  $32.7 \pm 0.9$  ms、振幅  $29.1 \pm 1.3$  pA）で同等であった（減衰:  $F [1, 24] = 0.482$ 、 $p = 0.494$ 、振幅:  $F [1, 24] = 0.045$ 、 $p = 0.884$ 、図 4D、表 8 および 9）。*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスとは異なる *Scn1a* 変異マウスをもちいた先行研究でも同様の sIPSC 出現頻度の減少が示されており（Yu et al, 2006; Han et al, 2012; Beretta et al, 2022）、*Scn1a* 遺伝子の機能喪失による GABA 作動性ニューロンの機能障害を反映している可能性が示唆される。KRM-II-81 の投与は sIPSC の頻度や振幅を変化させなかった（頻度: WT  $5.86 \pm 0.63$  Hz 対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $3.49 \pm 0.39$  Hz、 $F [1, 18] = 0.638$ 、 $p = 0.435$ 、振幅: WT  $27.3 \pm 1.0$  pA 対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $29.2 \pm 1.3$  pA、 $F [1, 18] = 0.3028$ 、 $p = 0.589$ 、図 4D、表 7 および 9）が、WT マウスと *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの両方で減衰時間が有意に延長した（WT  $30.1 \pm 1.2$  ms、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $31.9 \pm 1.1$  ms、 $F [1, 18] = 20.22$ 、 $p < 0.001$ 、事後検定: WT  $p = 0.009$ 、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス  $p = 0.013$ 、図 4D、表 8）。

減衰時間の累積分布曲線は、WT マウスと *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスいずれも KRM-II-81 によって右方向にシフトした（Kolmogorov-Smirnov 検定による  $p < 0.0001$ 、図 4E）。先行研究では、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R は細胞体近位に優位に分布し（Prenosil et al, 2006a）、その活性化は振幅を増加させるのではなく、減衰時間動態を増加させることによって IPSC を増強することが示されている（Nomura et al, 2019）。我々の結果は先行研究と一致しており、KRM-II-81 が GABA<sub>A</sub> 受容体の PAM として作用することが確認された。各ニ

ニューロンの平均減衰時間について、遺伝子型と薬剤の間に有意な交互作用は見られなかった ( $p = 0.699$ )。しかしながら、累積分布曲線 (図 4E) では、KRM-II-81 は短い減衰速度から中間の減衰速度を持つ sIPSC により明らかに影響を与え、その増加は *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでより強い傾向が示唆された。

そこで  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R の機能をより効率的に評価するために、錐体細胞層に設置した単極電極を介して電気刺激を与えることによって誘発される IPSC (eIPSC) を解析した (Nomura et al, 2019)。sIPSC と同様に、eIPSC の減衰時間と振幅は、WT マウスと *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの間で同等であった (減衰時間: WT  $99.4 \pm 8.5$  ms、 $n = 17$  対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $108.6 \pm 9.0$  ms、 $n = 14$ 、 $F [1, 23] = 2.482$ 、 $p = 0.129$ 、振幅: WT  $983.2 \pm 138.3$  対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $1001.0 \pm 144.1$  pA、 $F [1, 23] = 0.097$ 、 $p = 0.758$ )。KRM-II-81 は振幅を変化させなかったが (WT:  $1009.0 \pm 125.9$  pA、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $967.9 \pm 115.3$  pA、 $F [1, 23] = 0.737$ 、 $p = 0.400$ 、図 4G、表 11)、WT マウスと *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの両方で減衰時間を延長した (WT  $77.4 \pm 6.4$  ms、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $96.5 \pm 9.3$  ms、 $F [1, 23] = 42.64$ 、 $p < 0.0001$ 、事後検定: WT マウス:  $p = 0.015$ 、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス  $p < 0.0001$ 、表 10)。また、遺伝子型と薬剤の間の有意な交互作用 ( $F [1, 23] = 7.905$ 、 $p = 0.010$ 、図 4F、G) が認められた。KRM-II-81 による減衰時間の相対的な変化は、WT マウスと比較して *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスで有意に高かった (WT  $126.2 \pm 4.6$  %、 $n = 17$  対 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup>  $110.0 \pm 4.6$  %、 $n = 14$ 、 $p = 0.007$ 、unpaired t 検定、図 4H)。これらの結果は、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおいて、KRM-II-81 が WT マウスと比較し CA1 錐体細胞への細胞体周囲の抑制性入力をより効率的に増強することを示している。

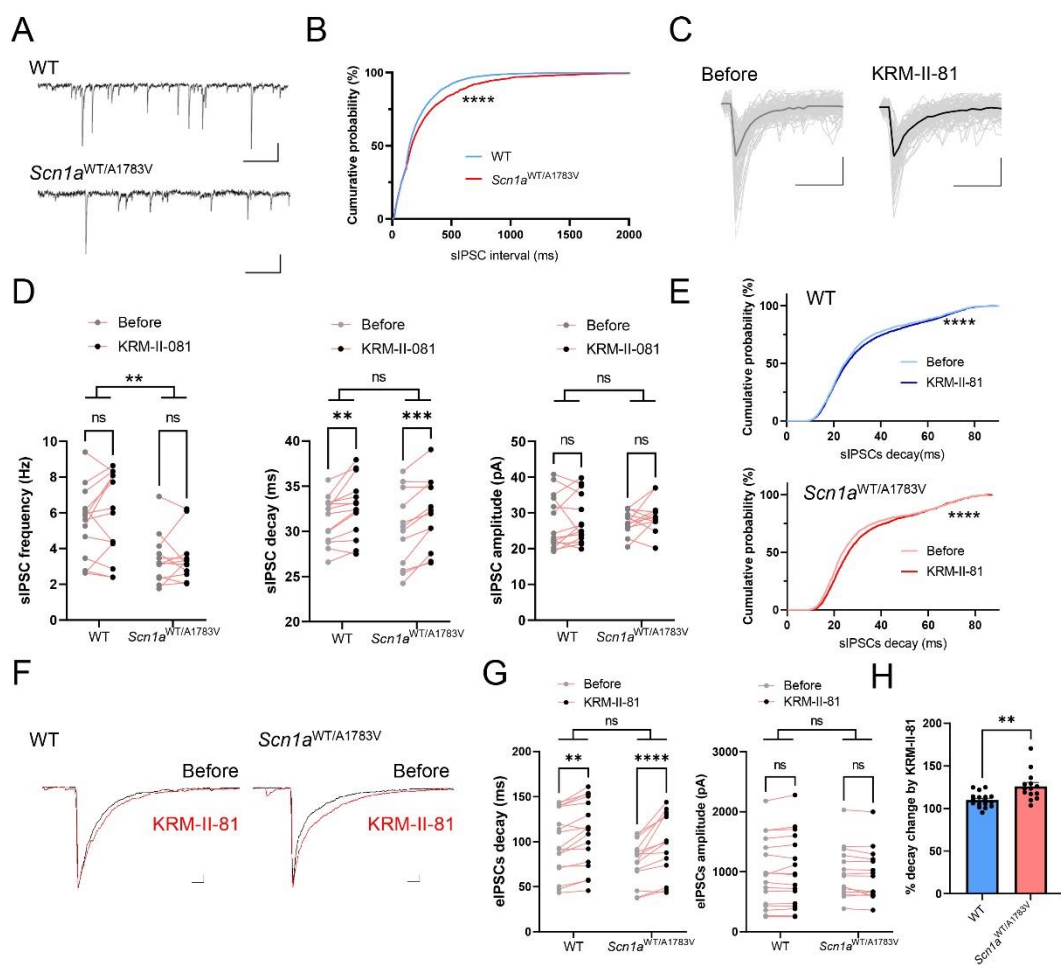


図4 CA1 錐体ニューロンにおける抑制性シナプス後電流 (IPSC) に対する KRM-II-81 の効果。

A : WT マウス (上段) と *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス(下段)の CA1 錐体ニューロンから記録された自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) の代表的なトレース。キャリブレーション : 500 ms、40 pA

B : WT マウス 14 ニューロン、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス 11 ニューロンから解析した各 sIPSCs のインターバル時間の累積確率曲線。\*\*\*\* :  $p < 0.0001$  (Kolmogorov-Smirnov 検定)

C: WT の急性スライスに KRM-II-81 を投与する前後で得られた代表的な個々の sIPSCs トレース (細い灰色の線) とその平均トレース (太い線) を示す。キャリブレーション : 20 ms、20 pA

D : WT および *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおける sIPSCs の周波数 (左パネル)、減衰 (中パネル)、振幅 (右パネル) に対する KRM-II-81 の効果。\*:  $p < 0.05$ 、\*\*:  $p < 0.01$  (二元配置分散分析およびそれに続く *post-hoc* 分析による)

E : WT マウス（上段）と *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス（下段）における KRM-II-81 投与前後の sIPSCs の減衰時間の累積確率曲線。\*\*\*\* :  $p < 0.01$  (Kolmogorov-Smirnov 検定)

F : WT マウス（左パネル）と *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウス（右パネル）における KRM-II-81 投与前（黒トレース）と投与後（赤トレース）の代表的な誘発 IPSC (eIPSC) トレース。

キャリブレーション : 25 ms、200 pA

G : WT および *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおける eIPSC の周波数（左パネル）、減衰（右パネル）に対する KRM-II-81 の効果。\*:  $p < 0.05$ 、\*\*\*\*:  $p < 0.0001$  (二元配置分散分析およびそれに続く *post-hoc* 分析による)

H : WT マウスと *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの KRM-II-81 による %減衰時間変化の比較。\*\*:  $p < 0.01$  (unpaired t 検定)

| 静止膜電位 (mV) |                                   | 膜抵抗 (MΩ) |                              |
|------------|-----------------------------------|----------|------------------------------|
| WT         | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> | WT       | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A</sup> |
| -56.4      | -49.2                             | 158.0    | 266.5                        |
| -48.8      | -51.5                             | 160.0    | 100.9                        |
| -49.9      | -58.7                             | 206.9    | 279.3                        |
| -49.5      | -48.2                             | 101.5    | 172.2                        |
| -51.6      | -49.1                             | 115.0    | 108.1                        |
| -53        | -51.7                             | 234.9    | 107.5                        |
| -49.8      | -47.7                             | 103.3    | 161.0                        |
| -50.1      | -46.8                             | 101.6    | 170.4                        |
| -56        | -49.3                             | 236.4    | 137.4                        |
| -59.5      | -58.6                             | 172.4    | 159.2                        |
| -53.8      | -54.7                             | 175.8    | 107.1                        |
| -59.6      | -52.6                             | 164.2    | 122.9                        |
| -47.5      |                                   | 147.9    |                              |
| -52.5      |                                   | 124.7    |                              |

表 6 自発抑制性シナプス後電流を記録した細胞の静止膜電位 (mV) および膜抵抗 (MΩ)

| WT     |           | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |           |
|--------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| Before | KRM-II-81 | Before                            | KRM-II-81 |
| 4.67   | 4.38      | 3.20                              | 3.10      |
| 2.63   | 4.28      | 6.91                              | 6.22      |
| 2.63   | 2.40      | 2.41                              | 2.04      |
| 5.97   | 6.26      | 3.72                              | 2.74      |
| 9.39   | 8.31      | 2.34                              | 2.57      |
| 6.23   | 4.38      | 3.47                              | 3.45      |
| 3.46   | 2.86      | 1.76                              | 3.33      |
| 2.75   | 2.39      | 4.13                              | 6.10      |
| 7.69   | 8.64      | 4.82                              | 3.14      |
| 5.26   | 8.08      | 1.96                              | 2.09      |
| 7.20   | 8.32      | 3.11                              | 3.34      |
| 5.61   | 5.99      | 3.13                              | 3.71      |
| 6.18   | 7.72      |                                   |           |
| 5.83   | 8.06      |                                   |           |

表 7 自発抑制性シナプス後電流の細胞毎平均頻度 (Hz)

| WT     |           | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |           |
|--------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| Before | KRM-II-81 | Before                            | KRM-II-81 |
| 31.9   | 34.9      | 32.4                              | 34.9      |
| 30.0   | 31.0      | 32.1                              | 32.0      |
| 33.8   | 35.5      | 37.9                              | 35.4      |
| 29.0   | 26.5      | 30.2                              | 30.3      |
| 30.1   | 30.5      | 32.3                              | 32.7      |
| 32.5   | 32.8      | 36.8                              | 35.4      |
| 33.1   | 36.6      | 34.4                              | 39.1      |
| 28.1   | 29.1      | 27.5                              | 30.3      |
| 28.8   | 24.2      | 29.0                              | 27.5      |
| 33.2   | 25.4      | 33.8                              | 26.7      |
| 33.0   | 30.1      | 33.1                              | 32.3      |
| 32.5   | 25.7      | 33.2                              | 26.5      |
| 35.7   |           | 37.0                              |           |
| 26.6   |           | 27.8                              |           |

表 8 自発抑制性シナプス後電流の細胞毎平均減衰時間 (ms)

| WT     |           | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |           |
|--------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| Before | KRM-II-81 | Before                            | KRM-II-81 |
| 19.7   | 27.1      | 21.3                              | 28.8      |
| 34.1   | 28.7      | 23.8                              | 24.9      |
| 20.3   | 29.5      | 26.8                              | 27.5      |
| 40.8   | 31.0      | 38.2                              | 30.2      |
| 39.3   | 25.5      | 35.3                              | 30.0      |
| 23.0   | 31.2      | 24.0                              | 28.1      |
| 21.5   | 25.9      | 21.7                              | 27.7      |
| 22.2   | 27.2      | 19.9                              | 37.0      |
| 22.3   | 26.7      | 24.9                              | 30.7      |
| 24.3   | 20.5      | 26.6                              | 28.0      |
| 29.9   | 31.3      | 37.6                              | 36.9      |
| 31.7   | 22.7      | 30.9                              | 20.1      |
| 19.2   |           | 23.0                              |           |
| 35.0   |           | 39.8                              |           |

表 9 自発抑制性シナプス後電流の細胞毎平均振幅 (pA)

| WT     |           | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |           |
|--------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| Before | KRM-II-81 | Before                            | KRM-II-81 |
| 139.8  | 150.4     | 109.1                             | 127.6     |
| 143.7  | 152.7     | 105.0                             | 129.4     |
| 113.7  | 129.7     | 84.9                              | 101.0     |
| 119.3  | 113.6     | 38.1                              | 48.9      |
| 141.9  | 161.0     | 91.5                              | 136.2     |
| 139.1  | 143.0     | 105.7                             | 143.9     |
| 110.5  | 116.1     | 77.5                              | 132.2     |
| 139.6  | 153.8     | 67.2                              | 73.9      |
| 86.7   | 108.4     | 69.3                              | 81.4      |
| 43.3   | 45.7      | 37.4                              | 46.2      |
| 72.3   | 73.3      | 76.8                              | 99.3      |
| 70.8   | 77.5      | 88.8                              | 99.2      |
| 92.7   | 115.7     | 45.5                              | 43.6      |
| 86.7   | 99.0      | 86.2                              | 87.7      |
| 91.5   | 92.1      |                                   |           |
| 47.2   | 57.5      |                                   |           |
| 50.3   | 56.9      |                                   |           |

表 10 誘発抑制性シナプス後電流の減衰時間 (ms)

| WT     |           | <i>Scn1a</i> <sup>WT/A1783V</sup> |           |
|--------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| Before | KRM-II-81 | Before                            | KRM-II-81 |
| 251.4  | 250.7     | 662.1                             | 663.3     |
| 948.2  | 1117.4    | 1417.6                            | 1426.2    |
| 824.1  | 780.7     | 2228.9                            | 1996.9    |
| 982.1  | 947.1     | 1271.6                            | 1206.5    |
| 272.4  | 262.1     | 1167.8                            | 1172.6    |
| 2180.1 | 2277.6    | 1037.9                            | 1025.1    |
| 978.6  | 965.9     | 959.5                             | 978.6     |
| 734.5  | 720.7     | 616.9                             | 608.1     |
| 671.9  | 680.3     | 753.2                             | 594.3     |
| 434.4  | 428.7     | 593.5                             | 624.8     |
| 1688.3 | 1750.1    | 1381.2                            | 1296.1    |
| 1686.1 | 1707.6    | 717.8                             | 668.2     |
| 360.7  | 382.5     | 385.5                             | 360.9     |
| 1553.1 | 1602.8    | 932.0                             | 929.6     |
| 1284.7 | 1219.8    |                                   |           |
| 1401.2 | 1447.9    |                                   |           |
| 462.8  | 472.6     |                                   |           |

表 11 誘発抑制性シナプス後電流の振幅 (pA)

5. 10 mg/kg の KRM-II-81 の慢性投与は *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの生命予後に影響をあたえなかった。

P14-40 まで 10 mg/kg の KRM-II-81 を *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスに 1 日 1 回ゾンデ挿入し経口投与したところ、溶媒投与群との生存率に有意差を認めなかった。(図 5、Log-rank 検定による、p=0.5447、いずれも N=7)

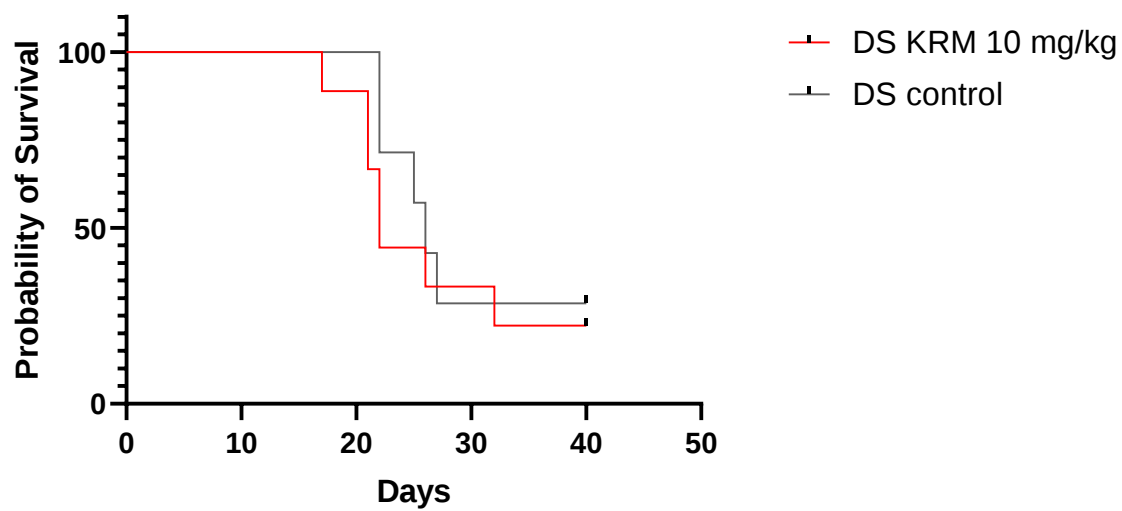


図 5 *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスの生存率への KRM-II-81 の効果。Log-rank 検定において有意差を認めなかった。

## 【考察】

本研究では、DS の主な病態として PV+ 介在ニューロンの機能障害が提唱されている (Kaneko et al, 2020) ことから、GABA シナプス伝達を増強する治療戦略について考察した。KRM-II-81 は近年開発された imidazobenzodiazepine の誘導体のひとつであり、GABA の PAM として作用する。Witkin らは、そのサブユニット選択性を、 $\alpha 1 \sim \alpha 6$  いずれかの  $\alpha$  サブユニットを  $\beta 3$  および  $\gamma 2$  と組み合わせて強制発現させた HEK-293T 細胞をもちいて電気生理学的に評価し、 $\alpha 1$ 、 $2$ 、 $3$  サブユニットの GABA 最大応答に対する  $EC_{50}$  はそれぞれ  $\alpha 1$ :  $1.73 \mu M$ ,  $\alpha 2$ :  $101.9 nM$ ,  $\alpha 3$ :  $60.9 nM$  と報告した (Witkin et al, 2017)。この報告からは KRM-II-81 の  $\alpha 1$  に対する選択性は  $\alpha 2$  で 17 倍、 $\alpha 3$  で 28 倍と見積もられる。GABA 受容体ベンゾジアゼピン結合部位のサブユニット毎の相同性は高く (Atack et al, 2011)、サブユニット選択性の高い PAM の開発は困難なこと、10 倍をこえると選択性が高いと評価されることが一般的とされることから (Muramai et al, 2020)、KRM-II-81 は  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R に選択性を有するといえる。高いバイオアベイラビリティを示す点に優位性があり、その経口内服により、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R を選択的に賦活するために十分な濃度 ( $EC_{50}$ :  $101.9 nM$ ) が脳・血漿いずれでも得られることが示されている (Witkin et al, 2017)。

てんかんや不安を含む精神神経疾患に対する KRM-II-81 の有効性は、野生型げっ歯類の実験モデルを用いた先行研究ですでに示唆されている (Poe et al, 2016 ; Witkin et al, 2018 ; Knutson et al, 2020)。たとえば Knutson らは、KRM-II-81 がこれまでに臨床応用されている非選択的 GABA<sub>A</sub>R の PAM と比べて、より少ない副作用 (鎮静作用など) で同等の抗けいれん作用を示すことが、薬剤慢性投与によって作成された実験てんかんモデルマウスをもちいて明らかにしている (Knutson et al, 2020)。また、他の  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的 PAM においても、げっ歯類実験てんかんモデルにおける発作に有効で、従来のベンゾジアゼピンに見られる副作用 (鎮静や筋弛緩) が少ないことが先行研究で示唆された (Rivas, 2009)。しかしながら、てんかんは多様な原因によって引き起こされる疾患群であり、実験的に作成されたモデルがどこまで、あるいはどのような、ヒトのてんかんを反映するかについては議論がのこされている。遺伝学的背景が明らかでないてんかん症候群モデルマウスにおける KRM-II-81 の効果を検証した研究はこれまでになく、今回私は、単一遺伝子の変異により発症する難治てんかん性脳症である DS を研究のテーマとし、患者由来の遺伝子変異を発現されたモデルマウスを用いることで、DS における KRM-II-81 の有効性と疾患病態生理との相関を評価することとした。他の  $2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的 PAM の DS モデルマウスに対する有用性は、我々が調べ得た限りでは唯一、Nomura らが 2019 年に AZD7325 を用いて検証した結

果を報告されており、今回の研究との比較については後述する。

KRM-II-81 のてんかんに対する治療効果については、発熱によるてんかん発作の誘発が DS の特徴的な病態の一つであることから、熱負荷試験にて評価した。*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスは、先行研究のとおり (Ricobaraza et al, 2019)、WT マウスと比較して熱負荷による発作閾値体温が有意に低く、KRM-II-81 は用量依存的にその発作閾値体温を上昇させた (図 2A)。WT マウスの一部は最大測定値の体温まで上昇しても発作を示さなかったため、発作誘発体温における遺伝子型と KRM-II-81 の相互作用は解析できなかった。しかしながら、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスでは累積発作確率曲線が有意に右方シフトし、WT マウスでは右方シフトしなかったことから、DS では KRM-II-81 の抗てんかん作用が用量依存性であることが示唆された。DS モデルマウスのてんかんに対する KRM-II-81 の有効性を明らかにするためには、今後脳波とビデオを用いた発作回数の確認等さらなる研究が必要であろう。

今回の私が示した DS マウスにおける温熱誘発けいれん閾値上昇は、他の  $\alpha 2/3$  サブユニット選択的 GABA<sub>A</sub>R の PAM である AZD7325 の DS マウスへの単回投与による抗けいれん効果を示した先行研究 (Nomura et al, 2019) でも示されている。AZD7325 は  $\alpha 1$  サブユニットに対してはむしろ弱いアンタゴニストとして作用することが示されており (Muramai et al, 2020) と同等であるかそれ以上の可能性がある。2 種の  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的 PAM により同様の抗けいれん作用が示されたことで、DS のてんかん発作に対する  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的 PAM の治療的価値がより確かなものとなったといえる。一方で、Nomura らの先行研究では、私が今回示した低用量での抗不安作用や、DS における濃度依存的な鎮静作用については検証されていない。私の研究は、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的 PAM が DS に対して単に抗けいれん作用を示すのみならず行動面や精神面で様々な変化をきたす可能性を示している点に先行研究との大きな違いがある。私の結果が、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的活性によるものなのか、検証されていない何らかのメカニズムによる KRM-II-81 特異的な作用なのかについて、AZD7325 を含めた KRM-II-81 以外の  $2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的での結果が待たれると考えられた。

最近の電気生理学的研究では、成人期の DS マウスでは PV+抑制介在ニューロンの発火は異常となっていないことが示され、DS の病態生理は単なる PV+介在ニューロンの機能障害であるとする従来の考え方よりもさらに複雑な仮説が提唱されている (Favero et al, 2018)。その研究によれば、私が熱負荷実験に用いたマウスの年齢 (P21-28) は、PV+介在ニューロンの発火低下から正常発火への移行期に相当する。一方で他の先行研究では、この年齢では PV+介在ニューロンの発火が確かに障害されることが示されている (Ogiwara et al, 2007)。したがって、KRM-II-81 が成人期においても同

様に有効であるかどうかを明らかにするためには、追加研究が必要であると考えられる。発作時の神経細胞の活動を *in vivo* で観察した研究では、成体 DS マウスでは発作に先行して PV+介在ニューロンの同期活動が障害されていることが示されており、PV+介在ニューロンの機能障害が成熟マウスの発作においても寄与していることが示されている (Tran et al, 2020)。高速発火する調節ニューロンによる  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R の活性化はネットワーク振動に重要であるといわれており (Heistek et al, 2013)、将来的な KRM-II-81 の慢性投与によるてんかん発作の軽減を今後の研究で検証したい。一方、DS 患者のてんかん発作は通常小児期に顕著である (Gataullina and Dulac et al, 2017)。したがって、本研究の KRM-II-81 の抗けいれん作用は幼若マウスに限定されたものではあっても、その知見を将来の臨床応用への可能性として考慮する価値は十分にあると思われる。

難治性てんかんに加えて、DS 患者は注意欠陥障害だけでなく不安障害を含む様々な行動上の問題を示すことが知られている (Sinoo et al, 2019)。DS モデルマウスにおいて、不安障害は運動試験で中心領域を回避することによって再現され (Han et al, 2012 ; Bahceci et al, 2020) (図 3A)、私は、この不安様行動が KRM-II-81 の低用量 (1 mg/kg) で改善されることを示した。KRM-II-81 の抗不安作用は、本研究で用いたものと同じ系統の WT マウスで以前に示されているが、それはより高用量 (30 mg/kg) で得られたものであった (Biggerstaff et al, 2020)。実際今回 KRM-II-81 を 10 mg/kg まで投与しても、WT マウスでは不安様行動に変化を及ぼさなかった。このことから、*Scn1a* 遺伝子変異マウスにおける不安様行動のメカニズムには、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R を介した抑制性伝達の調節障害が関与している可能性が示唆された。KRM-II-81 の不安様行動に対する効果は本研究では低用量投与時のみ得られた。同様の逆 U 字型の容量効果曲線は、他の抗不安薬でも以前に示されていた (Bruhwyler et al, 1990; Dielenberg et al, 1999; Smith et al, 2004)。その理由は明らかにされていないが、不安の制御に関する抑制性信号処理ネットワークの複雑さ (Babaev et al, 2018) が、本研究における低用量特異的抗不安作用の原因かもしれない。Nav1.1 および GABA  $\alpha 2/3$  サブユニットは発現に多少はあっても基本的には中枢神経に広く発現している。今回の研究では、薬剤は全身投与にされており、抗不安作用や抗てんかん作用が、それぞれの脳領域に主に作用して効果を示したのかは検証できていない。抗不安作用と抗けいれん作用で有効投与量が異なっていたことはそれぞれの責任領域が異なっている可能性を示唆しており、その解明には特定の脳領域特異的に *Scn1a* を機能欠失させる実験が必要と考えられる。

比較的高用量 (10 mg/kg) の KRM-II-81 は、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスに鎮静作用を誘導した。 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 選択的 PAM は、非選択的 PAM と比較して低い鎮静作用をしめす

ことがげっ歯類においてこれまで既に表示されているため (Poe et al, 2016 ; Witkin et al, 2019)、この結果は予想外であった。実際、以前の研究では、KRM-II-81 の鎮静効果はジアゼパムよりも相対的に低いことが示されているが、鎮静効果が皆無であるわけではないとも報告されている (Witkin et al, 2019)。その潜在的なメカニズムとして、私は、KRM-II-81 による GABA<sub>A</sub>R に対する陽性変力作用が、WT マウスと比較して *Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスで増幅されることを示した。これは、sIPSC 頻度の減少 (図 4B) (Yu et al, 2006; Han et al, 2012; Beretta et al, 2022)、あるいは PV+ニューロン発火の障害 (Ogiwara et al, 2007) に対する代償的メカニズムによると考えられる。抑制活性の障害下で GABA<sub>A</sub> 受容体の発現が同様に代償的に上昇することは、成体期の中樞神経系の様々な障害 (Benes et al, 1992 ; Waldvogel and Faull et al, 2015 ; Pomares et al, 2020) においてしばしば示唆されている。今回の結果は、*Scn1a*<sup>WT/A1783V</sup> マウスにおいて KRM-II-81 に対する感受性が亢進していることを示しており、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R に対する PAM の少量投与が、今後 DS に対する投与プロトコルを計画する上で特に重要であることを示唆している。GABA<sub>A</sub>R の機能亢進が代償機構であるとすれば、KRM-II-81 の慢性投与により消失する可能性がある。今後の慢性投与による検討で、この点は明らかにされるものと思われる。今回生理学的実験で選択した KRM-II-81 投与量 (600 nM) は、WT と DS マウスの間での鎮静効果に差がみられた全身投与量 (10 mg/kg) によって得られる脳内 KRM-II-81 濃度を先行研究から参照し (Witkin et al, 2018) 設定した。KRM-II-81 の  $\alpha 1$  サブユニットの EC<sub>50</sub> は前述のとおり 1.73  $\mu$ M と報告され、600 nM の投与では一部 (約 25%) は  $\alpha 1$  サブユニットに作用すると見積もられる。神経細胞体近傍の刺激による GABA 作動性シナプス入力には  $\alpha 2/\alpha 3$  サブユニット由来が優位とされていること (Nomura et al, 2019)、今回の投与量でも一定のサブユニット選択性はあるところから、今回観察された GABA<sub>A</sub>R の機能亢進が  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R 優位に生じていると考察することは可能と思われるが、特異的とは決していえない。濃度依存性についての検証が望まれるが、記録感度の限界があり、予備実験の限りでは検証が困難であると判断された。免疫組織学的手法など、他の実験手法を組み合わせた研究が、より正確な理解に必要と考えられる。今回、細胞神経生理学的検討は海馬にておこなっているが、これは神経細胞の種類や分布が視覚的に同定されやすいという実験手法的理由から選択されたものであり、各症状の責任病変で同様な変化が同様に変化しているかは確認できていない。今後研究の進展により責任病変の同定がすすめば、その領域でも検証をおこなってみたい。

現在までに、 $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R PAM を利用した不安障害の治療に関する臨床試験が数多く実施されているが、そのほとんどは明確な治療効果が得られないか、予期せぬ副

作用のために中止されている (Chen et al, 2019)。KRM-II-81 は現在、難治性てんかんおよび不安障害に対する有効性を検証すべく、将来の臨床試験に向けて準備中である (Witkin et al, 2022)。私の本研究は、KRM-II-81 の DS におけるてんかんおよび不安様行動の改善に対する治療価値を示しており、現在進行中である KRM-II-81 の臨床前研究を後押しするものと考えられる。

また GABA<sub>A</sub> 受容体は GABA<sub>B</sub> 受容体と共に末梢神経にも発現していることが確認されているが (Valerio Magnaghi et al, 2006)、 $\alpha 2/3$  サブユニットの発現について触れられている研究は現段階では確認できなかった。今回 KRM-II-81 を 10 mg/kg で投与した際の握力に DS でのみ有意差が見られたものの、一般には GABA<sub>A</sub> 受容体を介したシグナル伝達は中枢神経において主要であることといわれているが、末梢神経筋接合部において作用した可能性も行動実験のみからは否定できない。今後脳波記録をもちいた検討をおこないたい。

また DS では生存率が低下することは今までの研究で知られており (Ogiwara et al, 2017)、今回使用したマウスでも同様の結果であった。今回使用した KRM-II-81 を長期間投与することで生存率の向上が見られないかを検証したが、今回の実験では明らかな効果を認めなかった。1 日 1 回の投与であったため必要な薬剤濃度が維持されなかった可能性が考えられる。1 日 2 回、もしくは持続投与など、投与量のみではなく投与回数や方法も検討する必要がある。慢性投与の方法として Alzet 浸透圧ポンプを埋め込む方法を検討したが、DS マウスは先行研究と同様に小さく、同じ日齢の WT の 2/3 程度の体重で (Ricobaraza et al, 2019)、侵襲行為を行うこと自体が生存率に影響を与える可能性が高く今回はこれ以上の研究をすることが出来なかった。飲水に薬剤を混合するなど、今後他の方法を検討したい。

本研究では知的障害や予期せぬ突然死など、他の臨床的問題に対する効果については評価しなかった。また本研究で行われた急性期のプロトコールでは、抗けいれん効果と抗不安効果の効率的な用量が異なっていたため、更なる最適な用量の追求が重要である。今回の知見は、DS の新規で実用的な治療戦略につながる可能性があり、これらを含めた今後のさらなる検証が必要である。

当初、本研究を行う目標として多剤併用しても重積発作を頻回に繰り返し、頻回の入院管理を要する DS 患者の QOL を上げる効果のある治療法を模索するということを掲げていたが、本薬剤が DS の熱性けいれんだけでなく行動障害に関しても一定の効果を見出すことが確認できた。

## 【結論】

- ① KRM-II-81 は *Scn1a* 遺伝子異常を呈する DS マウスにおいて、温熱刺激による痙攣発作の閾値を上げた。
- ② KRM-II-81 は少量の投与で DS マウスの不安障害を改善させた。
- ③ KRM-II-81 は WT マウスに比べて低用量で DS マウスにおいて鎮静作用を示した。
- ④ そのメカニズムとして電気生理学的実験において、KRM-II-81 が WT マウスよりも DS マウスにおける CA1 錐体ニューロンへの体細胞周囲の抑制性入力をより効率的に増強することを示した。

以上の結果はすべて新たな知見であり、特に  $\alpha 2/3$ -GABA<sub>A</sub>R PAM において②、③、④のように行動障害への作用と副作用としての鎮静作用について関係を明らかにしたのは知りうる限りで本研究が初めてである。

これらの結果により KRM-II-81 が DS の患者の痙攣発作のみならず行動障害の治療薬となる可能性が考えられた。

研究における問題点としては、DS マウスは全体に体重増加不良かつ侵襲に弱いことが多く、腹腔内投与など侵襲を伴う検査が、生存率などの結果に影響を与える可能性が考えられた。今後はいかにして侵襲を最低限にして研究していくかも課題の一つである。その課題をクリアして1日複数回慢性投与した場合の生存率の変化や行動障害の改善、副作用の軽減を調べていく必要があると思われた。また痙攣発作や行動障害に有効で、かつ副作用としての鎮静作用がより少なくなる用量について、更なる研究で突き詰めることが有意であると考えた。

このように本研究に制限が存在するものの、KRM-II-81 は DS の患者のより良い QOL を充分実現しうる薬剤と考えられた。今後も多くの研究がなされ実用化されることが期待される。

### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究の立ち上げから数多くのご指導・ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院医学研究院小児科学教室・江川潔助教に感謝申し上げます。研究手技に際して直接のご指導賜りました三好陵子様に心から感謝申し上げます。

本研究で使用した薬剤をご提供頂き、ご助言いただきました Wisconsin-Milwaukee 大学生化学教室の James M.Cook 先生、Dishary Sharmin 先生に陳謝申し上げます。

また、研究の機会を頂き、温かい励ましを賜りました北海道大学大学院医学研究院小児科学教室・真部淳教授に感謝申し上げます。

日々の診療と研究において、たくさんのご協力を賜りました北海道大学病院小児科・白石秀明講師、同科神経グループの皆様に深く感謝申し上げます。

### 【利益相反】

本研究において、筆頭著者に開示すべき COI はない。

### 【参考文献】

Alexander B., Steven P. (2023). *SCN1A* channelopathies: Navigating from genotype to neural circuit dysfunction. *Front. Neurol.* 14:1173460.

Almog, Y., Fadila, S., Brusel, M., Mavashov, A., Anderson, K., and Rubinstein, M.

(2021). Developmental alterations in firing properties of hippocampal CA1 inhibitory and excitatory neurons in a mouse model of Dravet syndrome. *Neurobiol. Dis.* 148,105209.

Angela C. Gauthier, and Richard H. Mattson. (2015). Clobazam: A Safe, Efficacious, and Newly Rediscovered Therapeutic for Epilepsy. *CNS Neurosci Ther.* 2015 Jul; 21(7): 543–548.

Aras, L. M., Isla, J., and Mingorance-Le Meur, A. (2015). The European patient with Dravet syndrome: Results from a parent-reported survey on antiepileptic drug use in the European population with Dravet syndrome. *Epilepsy Behav.* 44, pp. 104-109.

Atack, J. R. (2011). GABA<sub>A</sub> receptor subtype-selective modulators. I.  $\alpha 2/\alpha 3$ -selective agonists as non-sedating anxiolytics. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 1176–1202.

Atack, J. R., Wafford, K. A., Tye, S. J., Cook, S. M., Sohal, B., and Pike, A. (2006). TPA023 [7-(1,1-dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazine], an agonist selective for  $\alpha 2$ -and  $\alpha 3$ -containing GABA<sub>A</sub> receptors, is a nonsedating anxiolytic in rodents and primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 410–422.

Babaev, O., Piletti Chatain, C., and Krueger-Burg, D. (2018). Inhibition in the amygdala

anxiety circuitry. *Exp. Mol. Med.* 50, 18–16.

Bahceci, D., Anderson, L. L., Ocelli Hanbury Brown, C. V., Zhou, C., and Arnold, J. C. (2020). Adolescent behavioral abnormalities in a *Scn1a*<sup>+/-</sup> mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsy and Behav.* 103, 106842.

Benes, F. M., Vincent, S. L., Alsterberg, G., Bird, E. D., and Sangiovanni, J. P. (1992). Increased GABA<sub>A</sub> receptor binding in superficial layers of cingulate cortex in schizophrenics. *J. Neurosci.* 12, 924–929.

Beretta, S., Gritti, L., Ponzoni, L., Scalmani, P., Mantegazza, M., Sala, M., Verpelli, C and Sala, C. (2022). Rescuing epileptic and behavioral alterations in a Dravet syndrome mouse model by inhibiting eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K). *Mol. Autism* 13, 1.

Biggerstaff, A., Kivell, B., Smith, J. L., Mian, M. Y., Golani, L. K., Rashid, F., Sharmin, D., Knutson, Cerne, R., and Cook, J. M. (2020). The  $\alpha$ 2,3-selective potentiators of GABA<sub>A</sub> receptors, KRM-II-81 and MP-III80, produce anxiolytic-like effects and block chemotherapy-induced hyperalgesia in mice without tolerance development. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 196, 172996.

Berggaard, N., Seifi, M., Jacobus Van Der Want, J., Swinny, J. D. (2018) Spatiotemporal Distribution of GABA<sub>A</sub> Receptor Subunits Within Layer II of Mouse Medial Entorhinal Cortex: Implications for Grid Cell Excitability. *Front. Neuroanat.* 12.

Bruhwyler, J. (1990). Anxiolytic potential of a microgram dose of chlordiazepoxide in the open-field test. *Eur. J. Pharmacol.* 187, 547–549. doi:10.1016/0014-2999(90) 90385-j

Cardenal-Muñoz, E., Auvin, S., Villanueva, V., Cross, J. H., Zuberi, S. M., Lagae, L., and Ángel Aibar, J. (2022). Guidance on Dravet syndrome from infant to adult care: road map for treatment planning in Europe. *Epilepsia Open* 7, 11–26.

Chen, X., Van Gerven, J., Cohen, A., and Jacobs, G. (2019). Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. *Acta Pharmacol. Sin.* 40, 571–582.

Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C., and De Jonghe, P. (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene *SCN1A* cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1327–1332.

Devinsky, O., Cross, J. H., and Wright, S. (2017). Trial of cannabidiol for drugresistant seizures in the Dravet syndrome. *N. Engl. J. Med.* 377, 699–700.

Dielenberg, R. A., Arnold, J. C., and McGregor, I. S. (1999). Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62, 197–201.

Egawa, K., Watanabe, M., Shiraishi, H., Sato, D., Takahashi, Y., Nishio, S., and Fukuda, A. (2023). Imbalanced expression of cation-chloride cotransporters as a potential therapeutic target in an Angelman syndrome mouse model. *Sci. Rep.* 13, 5685.

Favero, M., Sotuyo, N. P., Lopez, E., Kearney, J. A., and Goldberg, E. M. (2018). A transient developmental window of fast-spiking interneuron dysfunction in a mouse model of Dravet syndrome. *J. Neurosci.* 38, 7912–7927.

Freund, T. F., and Katona, I. (2007). Perisomatic inhibition. *Neuron* 56, 33–42.

Gataullina, S., and Dulac, O. (2017). From genotype to phenotype in Dravet disease. *Seizure* 44, 58–64.

Gu, C., Artelsmair, M., Charles S. Elmore, Richard J. Lewis, Davis, P., Hall, J. E., Dembofsky, B. T., Christoph, G., Smith, M. A., and Chapdelaine, M. (2018). Late-occurring and Long-circulating Metabolites of GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 2,3 Receptor Modulator AZD7325 Involving Metabolic Cyclization and Aromatization: Relevance to MIST Analysis and Application for Patient Compliance. *Drug Metab Dispos.* 46(3):303-315.

Han, S., Tai, C., Westenbroek, R. E., Yu, F. H., Cheah, C. S., Potter, G. B., Rubenstein, J. L., Scheuer, T., Horacio O. de la Iglesia and Catterall, W. A. (2012). Autistic-like behaviour in *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 489, 385–390.

Hawkins, N. A., Anderson, L. L., Gertler, T. S., Laux, L., George, A. L., Jr., and Kearney, J. A. (2017). Screening of conventional anticonvulsants in a genetic mouse model of epilepsy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 4, 326–339.

Heistek, T. S., Ruiperez-Alonso, M., Timmerman, A. J., Brussaard, A. B., and Mansvelder, H. D. (2013).  $\alpha$ 2-containing GABA<sub>A</sub> receptors expressed in hippocampal region CA3 control fast network oscillations. *J. Pharmacol.* 591, 845–858.

Kasugai, Y., Swinny, J. D., Roberts, J. D. B., Dalezios, Y., Fukazawa, Y., and Sieghart, W. (2010). Quantitative localisation of synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabelling. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1868–1888.

Kaneko, K., Christopher B. Currin, and Kevin M. Goff. (2020). Developmentally regulated impairment of parvalbumin interneuron synaptic transmission in an experimental model of Dravet syndrome. *Cell Rep.* 29; 38(13): 110580.

Kerti-Szigeti, K., and Nusser, Z. (2016). Similar GABA<sub>A</sub> receptor subunit composition in somatic and axon initial segment synapses of hippocampal pyramidal cells. *Elife* 5, e18426.

Klausberger, T., Roberts, J. D., and Somogyi, P. (2002). Cell type- and input-specific differences in the number and subtypes of synaptic GABA(A) receptors in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 2513–2521.

Knutson, D. E., Smith, J. L., Ping, X., Jin, X., Golani, L. K., and Li, G. (2020). Imidazodiazepine anticonvulsant, KRM-II-81, produces novel, non-diazepam-like antiseizure effects. *ACS Chem. Neurosci.* 11, 2624–2637.

Lewter, L. A., Fisher, J. L., Siemian, J. N., Methuku, K. R., Poe, M. M., and Cook, J. M. (2017). Antinociceptive effects of a novel  $\alpha 2/\alpha 3$ -Subtype selective GABA<sub>A</sub> receptor positive allosteric modulator. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 1305–1312.

Lorincz, A., and Nusser, Z. (2008). Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J. Neurosci.* 28, 14329–14340.

Löw, K., Crestani, F., Keist, R., Benke, D., Brünig, I., and Benson, J. A. (2000). Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290, 131–134.

Luscher, B., Fuchs, T., and Kilpatrick, C. L. (2011). GABA<sub>A</sub> receptor trafficking mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70, 385–409.

Magnaghi, V., Ballabio, M., and Consoli, A. (2006). GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: A cross-interaction with neuroactive steroids. *J Mol Neurosci.* 28(1):89-102.

Maramai, S., Benchekroun, M., Simon S.W., and Atack J.R. (2020). Subtype Selective  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A Receptor (GABA<sub>A</sub>R) Modulators Acting at the Benzodiazepine Binding Site: An Update. *J. Med. Chem.* 2020, 63, 7, 3425–3446

Nomura, T., Hawkins, N. A., Kearney, J. A., George, A. L., Jr., and Contractor, A (2019). Potentiating  $\alpha 2$  subunit containing perisomatic GABA<sub>A</sub> receptors protects against seizures in a mouse model of Dravet syndrome. *J. Physiol.* 597, 4293–4307.

Nyíri, G., Freund, T. F., and Somogyi, P. (2001). Input-dependent synaptic targeting of alpha(2)-subunit-containing GABA(A) receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 13, 428–442.

Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., and Inoue, I. (2007). Nav1. 1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: A circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *J. Neurosci.* 27, 5903–5914.

Olsen, R. W., and Sieghart, W. (2008). International union of pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.* 60, 243–260.

- Poe, M. M., Methuku, K. R., Li, G., Verma, A. R., Teske, K. A., and Stafford, D. C. (2016). Synthesis and characterization of a novel  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptor ligand that combines outstanding metabolic stability, pharmacokinetics, and anxiolytic efficacy. *J. Med. Chem.* 59, 10800–10806.
- Pomares, F. B., Roy, S., Funck, T., Feier, N. A., Thiel, A., and Fitzcharles, M. A. (2020). Upregulation of cortical GABA<sub>A</sub> receptor concentration in fibromyalgia. *Pain* 161, 74–82.
- Prenosil, G. A., Gasser, E. M. S., Rudolph, U., Keist, R., Fritschy, J.-M., and Vogt, K. E. (2006a). Specific subtypes of GABA<sub>A</sub> receptors mediate phasic and tonic forms of inhibition in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurophysiology* 96, 846–857.
- Quinn, S., Brusel, M., Ovadia, M., and Rubinstein, M. (2023). Acute effect of antiseizure drugs on background oscillations in *Scn1a* (A1783V) Dravet syndrome mouse model. *Front. Pharmacol.* 14, 1118216.
- Redecker, C., Luhmann, H. J., Hagemann, G., Fritschy, J. M., and Witte, O. W. (2000). Differential Downregulation of GABA<sub>A</sub> Receptor Subunits in Widespread Brain Regions in the Freeze-Lesion Model of Focal Cortical Malformations. *J. Neurosci.* 20 (13) 5045-5053
- Ricobaraza, A., Mora-Jimenez, L., Puerta, E., Sanchez-Carpintero, R., Mingorance, A., and Artieda, J. (2019). Epilepsy and neuropsychiatric comorbidities in mice carrying a recurrent Dravet syndrome *SCN1A* missense mutation. *Sci. Rep.* 9, 14172.
- Rivas, F. M., Stables, J. P., Murphree, L., Edwankar, R. V., Edwankar, C. R., and Huang, S. (2009). Antiseizure activity of novel gamma-aminobutyric acid (A) receptor subtype-selective benzodiazepine analogues in mice and rat models. *J. Med. Chem.* 52, 1795–1798.
- Richardson, R. J., Petrou, S., and Bryson, A. (2024). Established and emerging GABA<sub>A</sub> receptor pharmacotherapy for epilepsy. *Front. Pharmacol.*, 15 – 2024.
- Rudolph, U., and Knoflach, F. (2011). Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 685–697.
- Sinoo, C., De Lange, I. M., Westers, P., Gunning, W. B., Jongmans, M. J., and Brilstra, E. H. (2019). Behavior problems and health-related quality of life in Dravet syndrome. *Epilepsy Behav.* 90, 217–227.
- Skolnick, P. (2012). Anxiolytic anxiolytics: on a quest for the holy grail. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 611–620.
- Smith, S. S., Ruderman, Y., Hua Gong, Q., and Gulinello, M. (2004). Effects of a low dose of ethanol in an animal model of premenstrual anxiety. *Alcohol* 33, 41–49.
- Tran, C. H., Vaiana, M., Nakuci, J., Somarowthu, A., Goff, K. M., and Goldstein, N. (2020).

Interneuron desynchronization precedes seizures in a mouse model of Dravet syndrome. *J. Neurosci.* 40, 2764–2775.

Satta, V., Alonso, C., Díez, P., and Martín-Suárez, S. (2021). Neuropathological Characterization of a Dravet Syndrome Knock-In Mouse Model Useful for Investigating Cannabinoid Treatments. *Front. Mol. Neurosci., Sec. Brain Disease Mechanisms* Volume 13.

Waldvogel, H. J., and Faull, R. L. (2015). The diversity of GABA(A) receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain. *Adv. Pharmacol.* 73, 223–264.

Wijnen, B., Witlox, W., Wolff, R., Fayter, D., Ramaekers, B., and Otten, T. (2023). Fenfluramine for treating Dravet syndrome: an evidence review group perspective of a NICE single technology appraisal. *Pharmacoeconomics* 41, 33–42.

Wirrell, E. C., Hood, V., Knupp, K. G., Meskis, M. A., Nabbout, R., and Scheffer, I. E. (2022). International consensus on diagnosis and management of Dravet syndrome. *Epilepsia* 63, 1761–1777.

Witkin, J. M., Cerne, R., Davis, P., Freeman, K., Do Carmo, J., and Rowlett, J. (2019). The  $\alpha$ 2,3-selective potentiator of GABA<sub>A</sub> receptors, KRM-II-81, reduces nociceptive-associated behaviors induced by formalin and spinal nerve ligation in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 180, 22–31.

Witkin, J. M., Lippa, A., Smith, J. L., Jin, X., Ping, X., and Biggerstaff, A. (2022). The imidazodiazepine, KRM-II-81: an example of a newly emerging generation of GABA<sub>A</sub> agonists for neurological and psychiatric disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 213, 173321.

Witkin, J. M., Smith, J. L., Ping, X., Gleason, S. D., Poe, M. M., and Li, G. (2018). Bioisosteres of ethyl 8-ethynyl-6-(pyridin-2-yl)-4H-benzo[f]imidazo [1,5-a] [1,4] diazepine-3-carboxylate (HZ-166) as novel  $\alpha$  2,3 selective potentiators of GABA(A) receptors: improved bioavailability enhances anticonvulsant efficacy. *Neuropharmacology* 137, 332–343.

Yu, F. H., Mantegazza, M., Westenbroek, R. E., Robbins, C. A., Kalume, F., and Burton, K. A. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat. Neurosci.* 9, 1142–1149.