

氏名	りゅう とうう 劉 冬雨
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	2022年9月26日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	The characteristics and generation mechanism of spike-wave discharge in Gad1 knock-out rats (グルタミン酸デカルボキシラーゼ Gad1 遺伝子ノックアウトラットにおける棘徐波発射の特徴および発生機序の解明)
論文審査委員	主査 教授 虫明 元 教授 中里 信和 教授 永富 良一

論文内容要旨

氏名：劉 冬雨

本文：

An inhibitory neurotransmitter, gamma-aminobutyric acid (GABA), is synthesized from glutamate by two iso-enzymes, glutamate decarboxylase (GAD) 1 (67 KDa) and GAD2 (65 KDa) in mammals. GAD2 is localized primarily in the inhibitory synapse, and therefore, plays an important role in synaptic inhibition depending on the excitation of the inhibitory neurons. Gad2 knock-out mice or rats are viable but suffer from spontaneous convulsive seizures. On the other hand, GAD1 is primarily localized in the cytoplasm of the GABAergic inhibitory neurons. Gad1 knock-out rats have recently been created utilizing CRISPR/Cas9 mediated gene-editing and found to show schizophrenia-like symptoms. It has not been demonstrated yet whether these Gad1 rats show any other neurological symptoms, such as seizures.

In this study, I examined that Gad1 knockout homozygous (Gad1^{-/-}) rats show a train of the spike-wave discharges (SWDs) in EEG, whose primary source is the cortico-thalamic loop, as early as in their infancy, although the control group (Gad1 heterozygous (Gad1^{+/-}) rats and even wild-type (Gad1^{+/+}) rats) develop similar SWDs after their adulthood. Then the SWDs in the three genotypes after 2 months old were compared and found that Gad1^{-/-} rats exhibited severe SWDs in lengths and occurrence frequency, but there was not much difference between Gad1^{+/-} and even Gad1^{+/+} rats.

The SWDs are typically observed in human patients during absence seizure, characterized by a brief loss of consciousness. Human patients would not respond to acoustic disturbances such as calls during the absence seizure. Therefore, I tested whether these rats respond to acoustic stimulations when they were showing SWDs, while I live-monitored their EEG and behavior. The result showed that most SWDs could be interrupted by the stimulations, while it was more resistance to interruption in Gad1^{-/-} rats. However, the rats, irrespective of genotypes, could give responses to the sensory cues during the SWDs which was pas facile to interrupt.

In the progress of clarifying if the SWD is the phenotype of absence epilepsy or not in rats, two famous anti-epileptic drugs, ethosuximide (ETX) and valproate (VPA) were tested. ETX could suppress the SWDs in both Gad1^{-/-} and Gad1^{+/+} rats by blocking the T-type Ca²⁺ channel. VPA is a GABA trans-aminase inhibitor, which suppressed the SWDs in Gad1^{+/+} rats, but showed opposite effects in Gad1^{-/-} rats.

Last, to examine the effects of valproate and the change of GABA level in the thalamocortical

(書式 1 2)

system of Gad1^{-/-} rats, GABA immunostaining was performed, which showed that GABA intensity was significantly decreased in Gad1^{-/-} GABAergic neuronal somata but not in axons, and significantly increased by valproate.

To sum up, GAD1-generated GABA seems to have an inhibitory function on SWDs, but it remains to be clarified in future studies whether these SWDs correspond to a true epileptic activity confused with regular brain rhythms, due to modest numbers of SWDs were resistant to the interruption. Furthermore, a hypothesis is proposed with the remarkable change in GABA levels in Gad1^{-/-} rats with and without valproate administration, that GAD1 should be involved in extrasynaptic GABA production in RTN neurons to prevent SWD generation.

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 The characteristics and generation mechanism of spike-wave discharge in *Gad1* knock-out rats
(グルタミン酸デカルボキシラーゼ *Gad1* 遺伝子ノックアウトラットにおける棘徐波発射の特徴および発生機
序の解明)

所属専攻・分野名 医科学 専攻 ・ 生体システム生理学 分野

学籍番号 B8 MD 5118 氏名 劉 冬雨

てんかんや神経疾患の中には、中枢神経系における γ -アミノ酪酸（GABA）作動性抑制の機能障害に関連するものがある。GABA合成酵素は2つのタイプ *Gad1*, *Gad2* があり *Gad2* 遺伝子をノックアウトしたラットは重篤な痙攣発作を起すことが知られているが、*Gad1* 遺伝子をノックアウト（KO）したラットのてんかんに関しては不明な点が多い。そこで脳波を解析するとスパイク波放電（SWD）が多く見られた。SWDは野生型動物でも観察されるが、*Gad1* KO ラットのてんかん放電は生後早い時期に出現し、発生頻度も高く、持続時間も対照動物より長かった。発作性てんかんの脳活動が神経学的障害を引き起こすかどうかを調べるために、感覚遮断試験を実施した。対照動物では、感覚刺激（ブザー音）はほとんどのSWDを容易に中断させ、行動反応（耳の痙攣など）を誘発したことから、脳波にSWDが現れている間に聴覚の感覚信号が大脳皮質に到達していることが示唆された。一方、*Gad1* KO ラットでは、SWDは感覚遮断に鈍感なことが多く、ヒトで見られる欠神発作のように、SWD中に意識を失っていることが示唆された。SWDの発生機構を明らかにするために、薬理学的実験を行い、①ヒトの欠神てんかんの第一選択薬であるエトスクシミドを投与すると、*Gad1* KO ラットと対照ラットの両方でSWDの出現が完全に抑制され、これらの動物ではSWD発生にT型Ca²⁺チャンネルの関与が示唆された。また、②GABAトランスアミナーゼの阻害剤であり、GABAの分解を抑制することでGABA濃度を上昇させると考えられているバルプロ酸の投与は、*Gad1* KO ラットのSWDの持続時間を予想外に延長し、むしろ症状を増悪させることが明らかとなった。さらに、③脳内のGABA量を免疫組織化学的に定量したところ、*Gad1* KO ラットでは、バルプロ酸投与により視床興奮性ニューロンを標的とするGABA作動性網様視床ニューロンの軸索末端のGABA量が顕著に増加することが示された。①～③の結果と文献報告のある他の生理学的証拠に基づいて考察すると、このGABAの著しい増加は、視床興奮性ニューロンのより深い過分極を誘発し、その結果、T型Ca²⁺チャンネルを介した視床ニューロンのリバウンド、バースト的Ca²⁺電流を引き起こすメカニズム可能性が示唆された。今回の結果は、GABA作動性抑制がラットのSWDの生成・抑制に重要な役割を果たすという生理学的・分子生物学的証拠を明らかにした。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。