

総 説

能動的 Cl⁻ホメオスタシス仮説と 実験的てんかん病態モデル

Active Cl⁻ Homeostasis Hypothesis and the Experimental Models of Epilepsy

福 田 敦 夫¹⁾

要旨 : 「細胞内 Cl⁻濃度 ([Cl⁻]_i) は従来考えられていたほど '静的' でなく、種々の Cl⁻トランスポーターの作用により能動的に変化し、抑制性神経伝達物質 GABA (γ-aminobutyric acid) のシナプス後膜 GABA_A 受容体-Cl⁻チャンネルを介する作用を抑制から興奮までダイナミックに変化させて神経回路の機能と形成に関わる」という新しい概念(能動的 Cl⁻ホメオスタシス仮説)を、実験的てんかん病態モデルで検証してきた。ラット海馬の急性実験では入力線維の高頻度刺激による GABA_A 受容体チャンネルからの急激な Cl⁻流入が [Cl⁻]_i の過剰な上昇を招き、その結果 GABA 作用が抑制から興奮へ逆転して、てんかん発作波様の後発射の引き金となった。慢性のキンドリングモデルでは、海馬や梨状葉皮質で取込型 Cl⁻トランスポーターの NKCC1 が有意に増加し、[Cl⁻]_i が慢性的に上昇することが示唆された。一方、発達初期では NKCC1 によって [Cl⁻]_i が高く維持され、GABA が Cl⁻流出による脱分極で興奮性に作用して神経回路形成に関与するので、[Cl⁻]_i の異常が皮質形成異常を誘発する可能性がある。ラットの限局性皮質形成異常モデルでの microgyrus 形成過程で、NKCC1 の増加と排出型 Cl⁻トランスポーター KCC2 の減少による [Cl⁻]_i 上昇と、GABA の抑制から興奮への変化が見られた。以上から、Cl⁻ホメオスタシスの異常がてんかん発作の機能的な原因や増悪因子となったり、器質的なてんかん原性の成因とも関わる可能性がある。

てんかん研究 2006 ; 24 : 3-17

Key Words : chloride, GABA, epilepsy, inhibition, transporter

はじめに

神経細胞は細胞内と細胞外の様々なイオン濃度を能動的に変化させて特異的なイオンバランスを形成することにより、細胞膜を透過するイオン電流を発生させ、その信号により神経機能を働かせて細胞間の情報伝達を行う。従って、神経回路網が複雑な情報処理を行う我々の脳では、神経細胞

のイオンバランスは脳の機能にとり極めて重要である。脳の細胞外液のイオン組成は Na⁺と Cl⁻が多く K⁺が少ない、そして細胞内ではこれとは逆の関係が維持されている。すなわち、K⁺は電気化学勾配に従って細胞内から細胞外へ持続的に流出することにより細胞膜電位を負に維持し(静止電位)、Na⁺は逆に電気化学勾配に従って細胞外から細胞内に一過性に入ることにより脱分極を起し

1) 浜松医科大学医学部生理学第一講座

(〒 431-3192 静岡県浜松市半田山 1 丁目 20-1)

Atsuo Fukuda

Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine

神経情報伝達のシグナル（活動電位）となる。一方 Cl^- は陰イオンであるので、濃度勾配に従って細胞内に入ると過分極をおこし、神経活動を抑制する。脳はこのようにイオン電流により機能を発揮しているため、細胞内と細胞外のイオン濃度はホメオスタシスが働き、不変性が厳密に保たれているものと従来は考えられてきた。ところが、最近 Cl^- に関しては、想像以上にダイナミックに変化していることが判ってきた。本稿ではこのダイナミックな Cl^- ホメオスタシスとてんかん病態との関連を生理学的見地から考えてみた。

1. 神経細胞内 Cl^- ホメオスタシスの調節因子と能動的 Cl^- ホメオスタシス仮説

脳の最も主要な抑制性神経伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA) は、 GABA_A 受容体- Cl^- チャネルを開口させて電気化学勾配に従った Cl^- の流入による膜電位の過分極によってその抑制機能を発揮するが、そのためには、細胞内 Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) が細胞外よりもかなり低く保たれている必要がある。神経細胞膜には細胞内から細胞外へ Cl^- を運ぶ排出型の Cl^- トランスポーター (K^+ - Cl^- cotransporter, KCC 2) と、逆に細胞外から細胞内に Cl^- を運ぶ取込型の Cl^- トランスポーター (Na^+ , K^+ -2 Cl^- cotransporter, NKCC1) が存在し、 $[\text{Cl}^-]_i$ のホメオスタシスを維持している¹²⁾。そのため、もし $[\text{Cl}^-]_i$ の変化がダイナミックに起こると GABA 作用については神経回路機能を大きく変化させることになる。そこで、 Cl^- トランスポーター (NKCC1 と KCC2) により制御される Cl^- ホメオスタシスの変化が神経回路における GABA 作用の抑制/興奮の調節を行い、神経回路の形成や機能的発達と可塑的变化、さらには病的変化や再生など神経回路の多元的制御に関わると考えたのが、 Cl^- ホメオスタシス制御による神経回路ダイナミクス仮説（能動的 Cl^- ホメオスタシス仮説、Fig. 1）である³⁴⁾。

この、能動的 Cl^- ホメオスタシス制御による神経回路ダイナミクスには時間的に2つの phase を考えている。すなわち、短スパンのものでは回路機能の動的変化が回路結線の変化を伴わずにおこる場合である。例えば、GABA 作動性の抑制性

神経伝達が $[\text{Cl}^-]_i$ 増加によって抑制から興奮へ数十秒単位で逆転するような場合や⁵⁻⁹⁾ サーカディアンリズムを持つような場合である¹⁰⁾。一方、長スパンのものとして回路の結線の変化を伴うものがあり、神経回路の発達（分化、細胞移動、シナプス形成）¹¹⁻¹⁹⁾、傷害・再生（軸索・シナプス再生）²⁰⁻²²⁾、可塑性（回路新生）^{23,24)} などが相当する。この両方の時間的な phase について、てんかん病態との関係をモデル動物の実験データをもとに以下に考察する。

2. $[\text{Cl}^-]_i$ 変化による神経回路機能のダイナミックな変化と特発性てんかんモデル

まず、 $[\text{Cl}^-]_i$ 変化によるダイナミックな神経回路機能の変化、すなわち、回路機能の動的変化が回路結線の変化を伴わずにおこる場合について考えてみる⁵⁻⁹⁾。成熟ラットの海馬スライス標本を作成して CA1 錐体細胞において、パッチクランプによる膜電位記録を行い、錐体細胞の樹状突起へのシナプス入力路であるシェーファー側枝を高頻度（テタヌス）刺激すると、大きなテタヌス後脱分極に続いて seizure-like afterdischarge が記録される⁶⁾。このとき、テタヌス前は過分極性であった GABA 作用が、seizure-like afterdischarge がおこっているあいだは脱分極性かつ興奮性に逆転していることが明らかになった。つまり、seizure-like afterdischarge の引き金はこれら GABA_A 受容体を介した興奮性シナプス伝達であると考えられた。 Cl^- 感受性蛍光色素 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ) による Cl^- イメージング法¹⁵⁾ で $[\text{Cl}^-]_i$ の同時記録を行うと、テタヌス刺激中に $[\text{Cl}^-]_i$ 上昇が始まり、テタヌス後脱分極と seizure-like afterdischarge がおこっている間も持続していることが明らかになった (Fig. 2)。さらに錐体細胞とバスケット細胞のダブルパッチクランプで、この $[\text{Cl}^-]_i$ 上昇の持続中は、バスケット細胞のバースト発火が錐体細胞に興奮性 GABA 作用による後発射を惹起することが明らかになった (Fig. 3)。すなわち、テタヌス刺激によってバスケット細胞から放出された GABA による錐体細胞の GABA_A 受容体の過剰刺激による過剰な Cl^- 流入によって Cl^- が蓄積し、この $[\text{Cl}^-]_i$

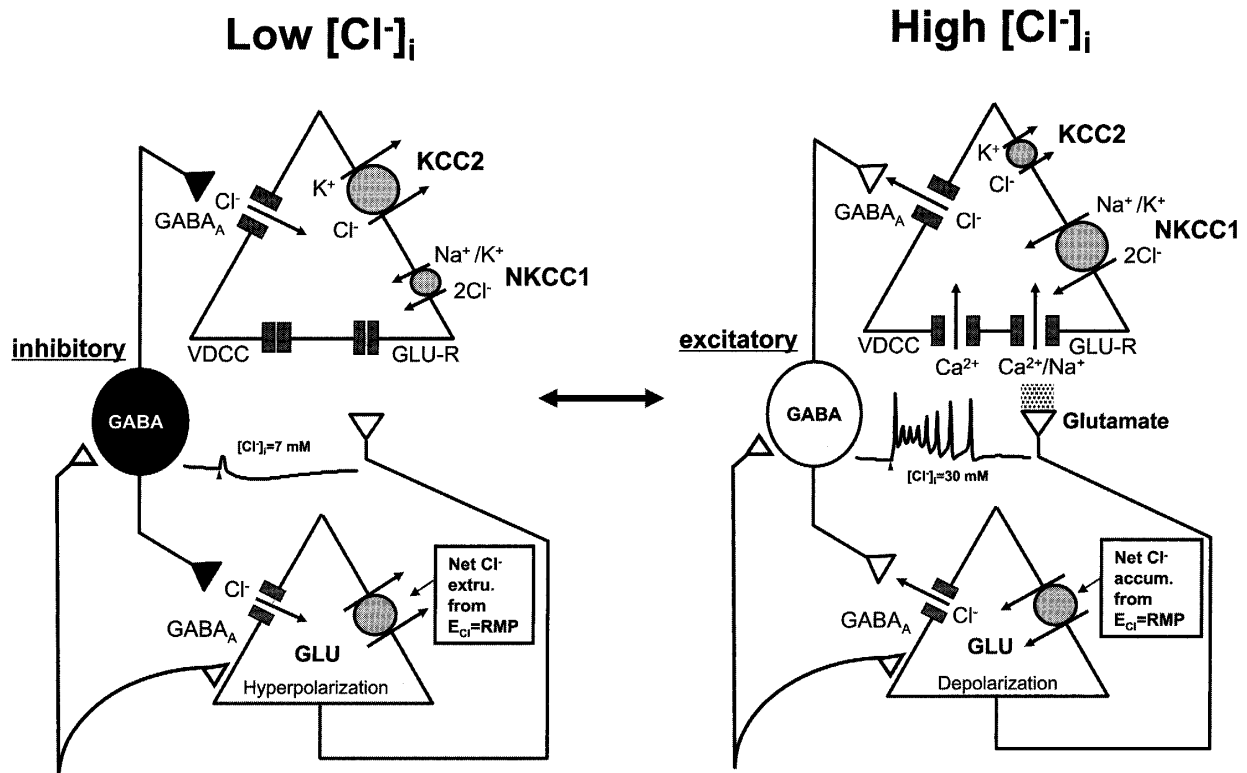


Fig. 1 Model of the active Cl^- homeostasis hypothesis (adapted from ref. 3 with permission). The schematic drawing shows a GABAergic interneuron (ovals) activating synaptic GABA_A receptors on principal neurons (triangles). The principal cells are interconnected, and release glutamate when excited, thus activating postsynaptic glutamate receptors (GLU-R). *Left*: normal conditions with Cl^- extrusion by KCC2 overwhelming Cl^- uptake by NKCC1. GABA hyperpolarizes principal cells by causing an influx of Cl^- through GABA_A receptor-channels. This prevents excitation of the principal neuron and subsequent release of glutamate from their terminals. Thus, GABAergic neurons would play an inhibitory role. *Right*: activated state with Cl^- uptake by NKCC1 overwhelming Cl^- extrusion by KCC2. The Cl^- equilibrium potential is therefore positive to the resting membrane potential, and activation of GABA_A receptor-channels results in Cl^- efflux and depolarization. This depolarization (and excitation) may cause the release of glutamate to induce further excitation by GLU-R activation. GLU: glutamate. VDCC: voltage-dependent Ca^{2+} channel, RMP: resting membrane potential. (●): hyperpolarizing action, (○): depolarizing action.

上昇のために GABA 作用が興奮性に逆転するのである (Fig. 3)⁶⁾。興味深いことに、このような GABA 作用の逆転は過剰興奮の周囲組織への recruitment とてんかん原性獲得にも関与する可能性が示されている²⁵⁾。

動物モデルでは、てんかん発作間歇期から発作への移行で、発作前は正常の GABA 作用が発作時には突然消失し、発作後にはまた元に戻るといったダイナミックな変化も起こりえるが、これは GABA による抑制の「組織学的脱落」では説明できない「機能的脱落」であって未解明の問題であ

る。ところが、上記のように Cl^- ホメオスタシスの動的変化による $[\text{Cl}^-]_i$ 上昇が、GABA 抑制の減弱や興奮への逆転による脱抑制をおこし、その結果、神経回路の過剰興奮をまねいて発作を誘発すると考えると、一応の説明が付く (Fig. 1 参照)^{3,4)}。このような観点に立てば、シナプス入力路の過剰興奮によって細胞内に流入した Cl^- を速やかに汲み出す KCC2 の機能²⁶⁾ は発作抑制に重要である。したがって KCC2 の低下^{20,21,23,27,28)}、あるいは細胞内に Cl^- を取り込み $[\text{Cl}^-]_i$ を高く維持する NKCC1 の過剰^{24,29-31)} がてんかんやその他の発作的な神経

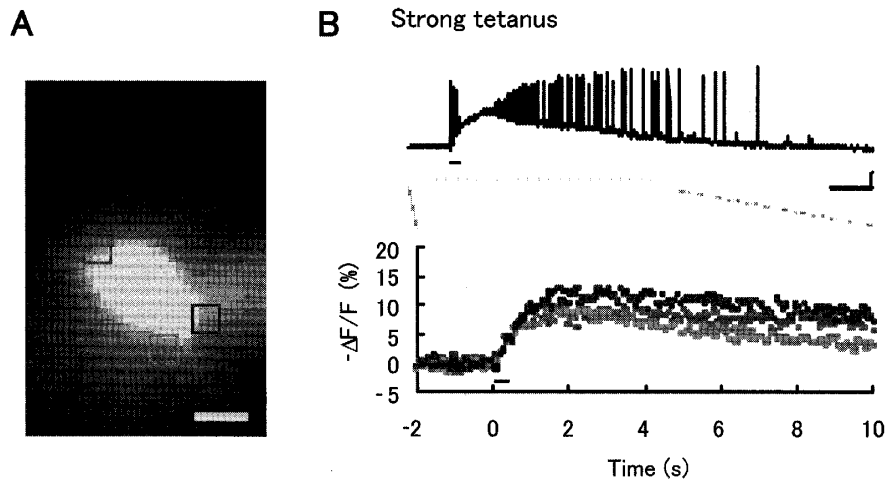


Fig. 2 Optical imaging of Cl^- accumulation during slow posttetanic depolarization in single hippocampal pyramidal cells (adapted from ref. 6. with permission). *A*, fluorescence image of a recorded neuron in which the Cl^- indicator was loaded through a glass patch electrode. Region of interest correspond to traces in *B*. Scale bar: $10 \mu\text{m}$. *B*: membrane potential (*top*, 20 s) and 6-methoxy-*N*-ethylquinolinium iodide (MEQ) fluorescence changes (*bottom*, 10 s) induced by a strong tetanus ($400 \mu\text{s}$). Black and gray underlines represent the timing of tetanization and the image capturing period, respectively. The strong tetanus, which induced a large posttetanic depolarization followed by seizure-like afterdischarge, caused a prominent change in MEQ fluorescence. Scale bars: 2 s, 20 mV.

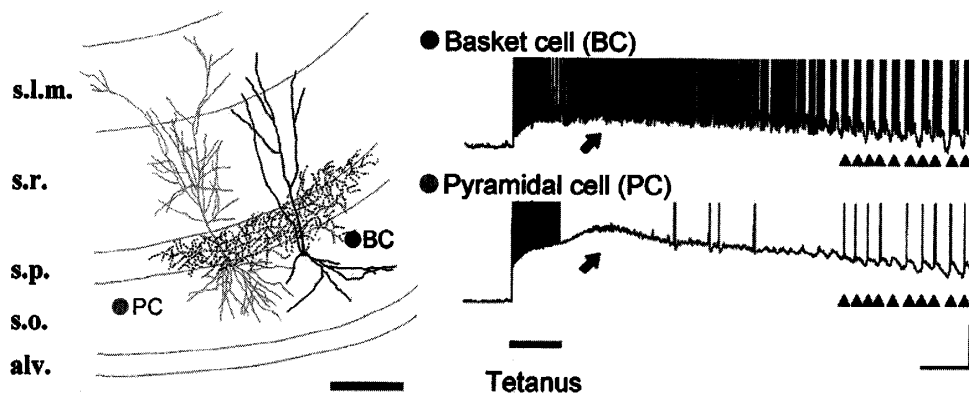


Fig. 3 Posttetanic excitation in hippocampal fast-spiking interneurons (basket cells) (adapted from ref. 6. with permission). *Left*: simultaneously recorded basket cell (BC, black) and pyramidal cell (PC, gray). Note that axonal fibers of the BC densely projected into the s. pyramidale (the pyramidal cell layer). s.l.m., s. lacunosum-moleculare; alv., alveus. Scale bar: $200 \mu\text{m}$. *Right*: high-frequency spiking of this BC evoked by a strong tetanization (thick line). The simultaneously recorded PC was kept depolarizing during the prolonged spiking in the BC (arrows), and oscillatory responses in the PC apparently coincided with the burst discharges of the BC (triangles) during the afterdischarge. Scale bars: 0.5 s, 10 mV.

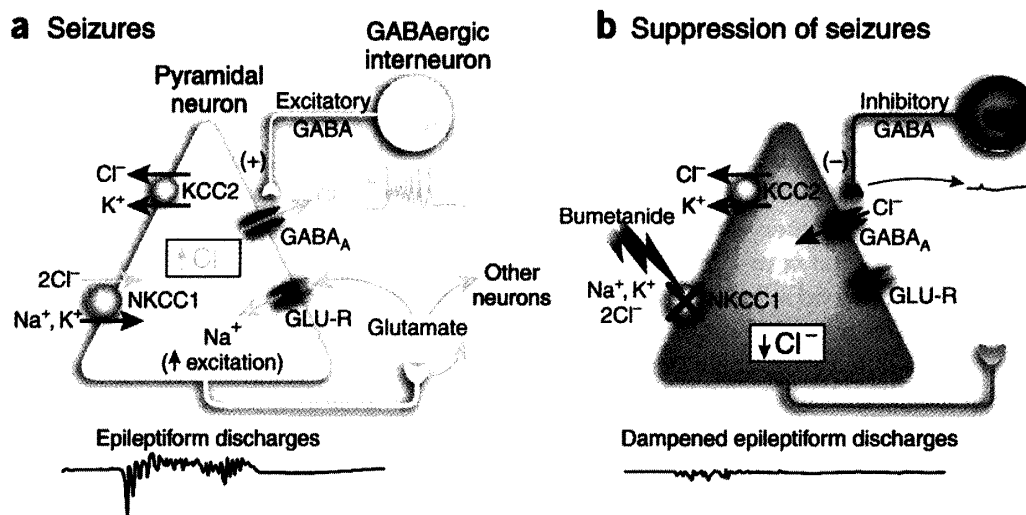


Fig. 4 Model of action of bumetanide on neonatal seizures (adapted from ref. 40 with permission). GABAergic interneurons activate synaptic GABA_A receptors on pyramidal neurons. The pyramidal cells release glutamate when excited, thus activating post-synaptic glutamate receptors (GLU-R). (a) Immature pyramidal neurons have high concentrations of Cl⁻. The neurons take up Cl⁻ by NKCC1, overwhelming Cl⁻ extrusion by KCC2. The Cl⁻ equilibrium potential is therefore positive to the resting membrane potential, and activation of GABA_A receptor-channels results in Cl⁻ efflux and depolarization. This depolarization (and excitation) may cause the release of glutamate, which further induces excitation by activation of GLU-R, rendering neonatal cortex highly susceptible to seizures. Thus, NKCC1 activity facilitates neonatal seizures. (b) Low-dose bumetanide selectively inhibits NKCC1 activity. This inhibition causes intracellular Cl⁻ to fall and reduces or reverses the depolarizing action of GABA—as a result, the cell experiences an influx of Cl⁻ and hyperpolarizes. This prevents excitation of the pyramidal neuron and subsequent release of glutamate from their terminals. Through this mechanism, bumetanide could suppress epileptiform discharges in the developing brain.

回路の機能異常の病態に関わっていても不思議ではない。

そのひとつの例として、新生児けいれんモデルがある。発達過程初期の神経細胞ではNKCC1が強く働く一方でKCC2が殆ど働かず、その結果[Cl⁻]_iが高くなっているためにGABAによってGABA_A受容体-Cl⁻チャネルが開くとCl⁻は通常(成熟後)とは逆に細胞内から細胞外へと流出して脱分極・興奮を惹起する。やがて成熟と共にKCC2が増加してNKCC1が減少するために[Cl⁻]_iは低下し、GABA作用も抑制性に変化する^{13,17~19,32~38}。したがって、幼若期のけいれん発作には成熟期と異なったメカニズムが存在する(Fig. 4)^{39~41}。そのため、成人に有効な抗けいれん

剤、とりわけGABA_A受容体作用薬が新生児に対して無効なのは⁴²、これらがGABA_A受容体作用を増強した場合に[Cl⁻]_iが高い新生児ではかえってCl⁻流出による脱分極・興奮を増強してしまうからと考えられる^{39~41}。

臨床でも用いられる利尿剤のbumetanideは低濃度であればNKCC1に選択性の強い唯一の阻害薬である¹。このようなbumetanideの薬理学的特性と未熟脳の生理学的特性に着目した新生児けいれんモデルラットを用いた実験で、bumetanideが電気生理学的にも症状でもけいれんを抑制することが示された(Fig. 5)³⁹。このbumetanideのけいれん抑制作用はNKCC1のノックアウトマウスでは全く見られず、GABA_A受容体をブロックし

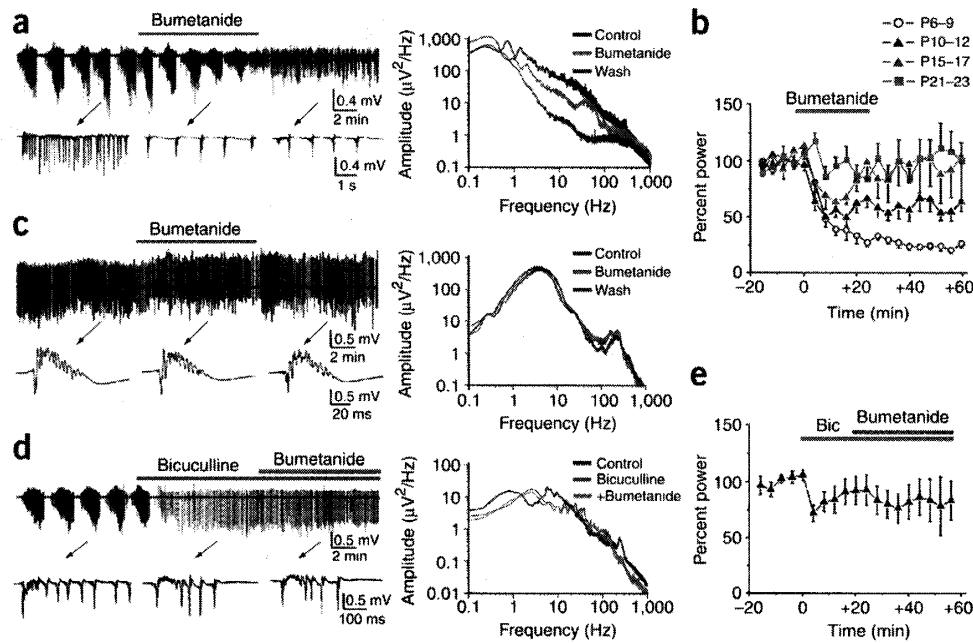


Fig. 5 Age-dependent effect of bumetanide on epileptiform activity (adapted from ref. 39 with permission). (a) Left, extracellular field potential recording from the CA3 pyramidal cell layer of P7 rat hippocampal slices in the presence of 8.5 mM $[K^+]_o$. Inhibition of NKCC1-mediated neuronal Cl^- import by bumetanide (10 μ M) depressed ictal-like epileptiform activity. Expanded sections of the trace show suppression of ictal-tonic discharges by bumetanide. Right, power spectra of epileptiform activity in 10-min windows before, during and after drug application. Bumetanide strongly depressed the power spectra amplitude. (b) Averaged power of epileptiform activity induced by 8.5 mM $[K^+]_o$ before and after bumetanide application. Bumetanide strongly depressed the power of epileptiform activity in P7-9 and P10-12 hippocampal slices but was ineffective in P21-23 slices. (c) Left, bumetanide (10 μ M) did not depress interictal epileptiform discharges (IEDs) in P22 rat hippocampal slices. Examples of IEDs before, during and after bumetanide application are shown on an expanded time scale. Right, power spectra of epileptiform activity in 10-min windows before, during and after drug application. (d) Left, in a P10 hippocampal slice, the GABA_A-R antagonist bicuculline (10 μ M) blocked ictal-like activity and abolished the anticonvulsant effect of bumetanide. Bumetanide (10 μ M) was applied in the presence of bicuculline. Examples of ictal-tonic discharges before bicuculline application and interictal epileptiform discharges before and after bumetanide application are shown on an expanded time scale. Right, power spectra of epileptiform activity in 10-min windows before and during drug applications. (e) Power of 8.5 mM $[K^+]_o$ induced epileptiform activity is not affected by bumetanide in the presence of bicuculline (Bic).

た状態でも見られなかったことから、NKCC1による Cl^- 取込が $[Cl^-]_i$ を高く維持して GABA を興奮性に作用させているために、bumetanide が GABA 作用を抑制したと考えられた (Fig. 4)⁴⁰⁾。すなわち、NKCC1 は発達過程の脳ではけいれん

発作の促進因子なのである³⁹⁻⁴¹⁾。

いて記録された interictal-like discharge には脱分極性の GABA 作用が関与していた。とくに ictal-like discharge が見られる時期に一致して GABA の逆転電位が上昇 ($= [Cl^-]_i$ 上昇) し、このときの GABA は興奮性に作用していた⁴³⁾。この結果は、急性スライス実験での我々の所見とよくにており (Figs. 2, 3)⁶⁾、ヒトの内側側頭葉てんかんにおいても Cl^- ホメオスタシス異常 ($[Cl^-]_i$ 上昇) が起っていることを示している。つまり、キンドリングモデル同様に、NKCC1 の増加あるいは KCC2 の減少が関与している可能性がある (Fig. 6 参照)。最近 Munoz らが内側側頭葉てんかん患者の外科手術で得られた組織を用いて NKCC1 と KCC2 の蛋白量を調べたところ、正常な海馬の錐体細胞では成長に伴い著しく減少するはずの NKCC1⁴⁴⁾ が強く発現していた³¹⁾。KCC2 の発現も認められたが、てんかん原性組織では正常の成熟海馬にくらべると NKCC1 優位の幼若脳に似たバランスであるということがいえる。この結果はてんかん原性を有する部位で $[Cl^-]_i$ が上昇して GABA が興奮性に作用していることを示した Cohen らの報告⁴³⁾ と矛盾しないものであった。

2) 能動的 Cl^- ホメオスタシスによる神経回路の発達・再生・可塑性の調節

以上のように器質的てんかん原性組織における GABA と Cl^- ホメオスタシスの所見は発達初期のそれと似ている⁴⁵⁾。すなわち、神経細胞の発生前には GABA はシナプスを介さない傍分泌的な作用で脱分極と Ca^{2+} 流入を惹起して神経細胞への分化¹¹⁾ や細胞移動¹²⁾ を促したり、その後の神経回路形成期には興奮性伝達物質としてシナプスの形成や強化に関与するが³⁴⁾、その機序として前述のごとく発達初期の回路形成期には $[Cl^-]_i$ が高く維持されていて、GABA が Cl^- 流出による脱分極・興奮を惹起することがあげられる^{2,4,17,18)}。この GABA 作動性興奮は、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを開口させたり、興奮性伝達物質である glutamate の NMDA 受容体-チャンネルの Mg^{2+} によるブロックを解除することにより、 Ca^{2+} を細胞内に流入させて $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ (Fig. 1 右参照)³⁾、さらに $[Ca^{2+}]_i$ の振動 (Fig. 7)^{20,46)} を引き起こして神経系の分化、細胞移動、シナプス形成な

ど、神経回路の発達過程に重要な役割を果たすと考えられている^{2,4,17,18)}。

このようにして GABA 作動性シナプスが興奮性として形成されると、やがて発達と共に KCC2 の発現が増加し NKCC1 の発現が減少してくるために $[Cl^-]_i$ は次第に低下していき、やがて GABA の作用も本来の抑制性になってくる (Fig. 1 左参照)。このように Cl^- トランスポーターは $[Cl^-]_i$ を変化させることにより GABA 作用の興奮から抑制への切替を行い、神経回路機能の幼若型から成熟型への発達を促している^{1,19,32-34)}。すなわち、glutamate 作動性興奮性回路と同様に GABA 作動性の神経回路もまずは興奮性回路として構築しておき (神経回路の形成には Ca^{2+} が必要なので興奮性の方が有利である)、発達過程のあるタイミングでそれを抑制性に変換すれば、興奮性回路とそれを抑制する抑制性神経回路が適切に配置された完成品の神経回路が一気に出来上がる。この場合、脳は抑制性シナプスを形成するメカニズムを別個に持たなくてすむので、実に巧妙な戦略であるといえる。そして、神経が再生する場合もじつはこれと同じようなメカニズムで再生する。たとえば、正常の顔面運動神経細胞では KCC2 が強く発現して $[Cl^-]_i$ が低いため、GABA は Cl^- 流入による過分極をおこす。ところが軸索を切断すると KCC2 発現が著しく低下して $[Cl^-]_i$ が上昇することにより、GABA による Cl^- 流入は流出へと逆転して GABA は脱分極・興奮性に作用ようになる。そして、この GABA 作用の抑制から興奮への逆転は神経回路の同期性を高めて、NMDA 受容体を介した $[Ca^{2+}]_i$ 振動を誘発する (Fig. 7)²⁰⁾。このように軸索伸長やシナプス形成に重要な $[Ca^{2+}]_i$ 振動が軸索切断により誘発されることも、 Cl^- ホメオスタシスにより制御されているのである。

3) 皮質形成異常モデルの Cl^- ホメオスタシス変化

もし、上で述べたように新生/再生を問わず回路形成のメカニズムが普遍的なものであるならば、器質的なてんかん原性が獲得される過程の神経回路の再構築も、回路形成と同様のメカニズムで行われるはずである。言い換えると、成熟型神経回

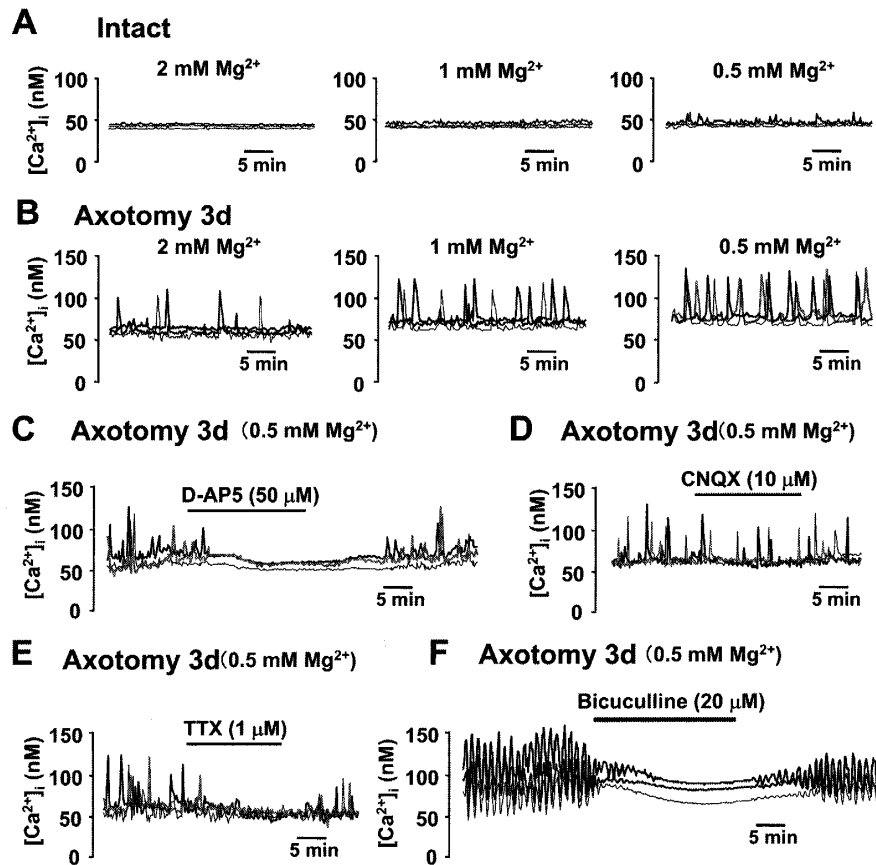


Fig. 7 Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations occurred in axotomized facial motoneurons (adapted from ref. 20 with permission). **A**: spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations hardly occur at all in intact neurons even in low (1 or 0.5 mM) $[Mg^{2+}]_o$. **B**: in axotomized neurons, spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations occur, their amplitude and frequency increasing as $[Mg^{2+}]_o$ is progressively reduced. **C**: these effects of low- Mg^{2+} ACSF, on resting $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ oscillations, were blocked by the addition of D-AP5. **D**: application of CNQX did not block these $[Ca^{2+}]_i$ oscillations. **E**: addition of TTX blocked these $[Ca^{2+}]_i$ oscillations reversibly. **F**: among axotomized neurons, synchronous spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations were occasionally seen during superfusion with medium containing 0.5 mM $[Mg^{2+}]_o$. These $[Ca^{2+}]_i$ oscillations were reversibly abolished by bicuculline. Results illustrated in A-F were from 6 different slices. Note that baseline $[Ca^{2+}]_i$ rose progressively as $[Mg^{2+}]_o$ was lowered in axotomized neurons but not in intact neurons.

路が一旦幼若型へ回帰して、抑制性であった GABA 作用が興奮性に逆戻りするはずである。そこで、神経発生や細胞移動の異常が原因と考えられている皮質形成異常の成因やそのてんかん原性に Cl^- ホメオスタシス異常による GABA 作用の過分極/脱分極の逆転が関わっている可能性を検討する目的で、皮質形成異常のひとつである

polymicrogyria のモデルとされる限局性皮質形成異常を作成した^{47,48}。P0 ラット新生仔の頭蓋骨上から液体窒素で冷却した金属棒で focal freeze-lesion (FFL) を行い、実験的異常皮質である microgyrus の形成過程の移動細胞の病態生理学的特性、すなわち、電気生理学的膜特性、GABA やグリシンの作用と受容体発現、 $[Cl^-]_i$ と Cl^- トラ

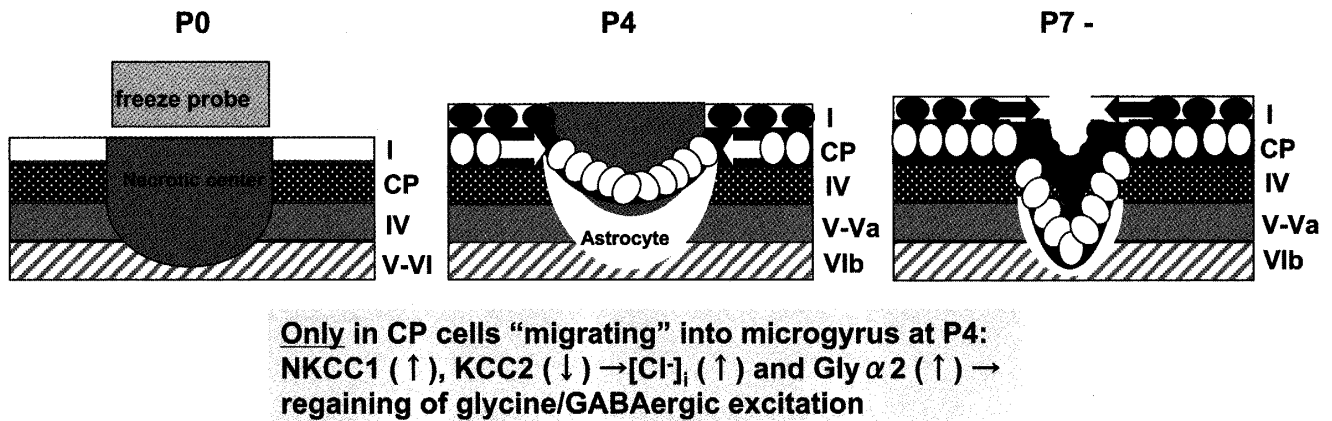


Fig. 8 Schematic drawing of a possible mechanism underlying GABA/glycinergic depolarization in migrating cells in the dysplastic cortex⁵⁰. Most of intrinsic membrane properties in migrating cells in the dysplastic cortex, except for the input resistance, were comparable to those in exofocal cortex. [Cl⁻]_i were increased in cortical plate (CP) cells migrating into necrotic center from the intact upper cortical plate. Up- and down-regulations of NKCC1 and KCC2, respectively, and up-regulation of glycine receptor α2 subunit were observed in dysplastic cortex. [Ca²⁺]_i increases induced by GABA/glycine were localized in upper but not in deeper layer adjacent to freeze-lesion, being attributable to GABA/glycinergic depolarization due to elevated [Cl⁻]_i. These results indicate that emergence of GABA/glycinergic depolarizations caused by elevated [Cl⁻]_i due to Cl⁻ transporter regulation could be involved in the abnormal migration and the resultant microgyrus formation.

ンスポーター発現を, *in situ* hybridization 法、グラミシジンスライスパッチクランプ法、Ca²⁺イメージング法を用いて検討した。

FFL 後 4~7 日にかけて necrotic center に周囲から皮質板細胞が移動してきたが、FFL から遠い exofocal cortex や、FFL に接していても V/VI 層の錐体細胞は移入しなかった。その結果、周囲の皮質との連続性が障害された 3~4 層構造の microgyrus が形成された (Fig. 8)。まずこれらの移入細胞の電気生理学的膜特性を解析したが、膜抵抗の増大を除いて exofocal cortex の皮質板細胞と同様であった。しかし、[Cl⁻]_i を GABA の逆転電位から推定すると移入細胞で上昇しており、それに伴い GABA 作用も exofocal cortex では過分極であったものが移入細胞では脱分極に逆転していた⁴⁹。Cl⁻ トランスポーター mRNA の発現は FFL 後 4~7 日目の移入細胞で NKCC1 が増加、逆に KCC2 が減少しており、[Cl⁻]_i 上昇の原因と考えられた⁵⁰。興味深いことに、これらの変化は細胞移入時期に一過性のもので、通常は生後 4 日で無くなる皮質板細胞での GABA/グリシン誘発性 [Ca²⁺]_i 上昇も、FFL への移入細胞では生後 1

週間まで認められた⁴⁹。また正常ではグリシン受容体 α2 subunit は発達と共に減少するが、FFL への移入細胞では逆に著明に増強しており、発達と共に増加する GABA_A 受容体サブユニットは、逆に減少傾向にあった⁵¹。

これら microgyrus 形成過程の移動細胞にのみ見られた NKCC1 の増加、KCC2 の減少による [Cl⁻]_i 上昇と興奮性 GABA/グリシン作用は、まさに皮質板を移動中の未熟細胞にみられる特性である^{13,14,19,52}。すなわち、Cl⁻ ホメオスタシスと GABA/グリシン作用に関するある種の脱分化が、分化後間もない皮質板細胞に誘導されたため FFL に移動したが、4~6 層の細胞はそれより発生が早いため脱分化が起こらず、そのため移動も起こらずに、結果としてこれらの層を欠いた microgyrus が形成されたと考えられた。

実際のヒト皮質形成異常組織からの記録でも上記と矛盾しないデータが報告されている。Avoli らのグループは難治てんかん患者の外科手術で得られた focal cortical dysplasia (FCD) の組織で集合電位記録と細胞外 K⁺ 濃度 ([K⁺]_o) 測定を行ったが、興味深いことに FCD で記録される ictal-

like discharge、interictal-like discharge はいずれも GABA_A 受容体の活性化が誘因となっていた⁵³。この GABA_A 受容体を介する interictal-like discharge によって [K⁺]_o が上昇し、これに一致して ictal-like discharge が発生した。つまり、興奮性 GABA 作用とその結果起る [K⁺]_o が発作の誘因となっていると考えられた⁵³。彼らはこの [K⁺]_o 上昇の原因のひとつとして KCC2 による K⁺ 排出を考えているが、これは次に述べる我々の結果とは、必ずしも一致しない。

我々は外科手術により摘出された FCD 組織を用いて *in situ* hybridization 法と免疫組織化学法を行い、Cl⁻ トランスポーターの発現変化を検討した。コントロールとして FCD と連続した形態異常のない部位を用いて比較した。FCD 組織では皮質は層構造を呈さず、NKCC1 の発現は周囲組織と同程度で特に増加はしていなかった。一方 FCD に特徴的な巨大細胞での KCC2 の発現も正常部位と同程度であったが、その周囲の相対的に小型で一見正常に見える大多数の神経細胞では KCC2 の発現が顕著に減少していた⁵⁴。以上の結果から、FCD における Cl⁻ 調節の異常による [Cl⁻]_i の上昇が示唆されたが、これは GABA の興奮性作用への逆転を示唆した Avoli らの報告の分子的基盤として矛盾しない。今後は [Cl⁻]_i の上昇が小型の神経細胞で実際におこっていることを証明する必要があるが、いずれにせよ、Cl⁻ トランスポーターの発現パターンは未熟細胞に近いものであった。以上のように、再生プログラムは発達プログラムを再現するものと考えられる。なかでも、我々は Cl⁻ ホメオスタシスの制御が重要だと考えている⁴。

4. Cl⁻ ホメオスタシス仮説によるてんかん治療法への展望

以上述べてきたように最も主要な抑制性神経伝達物質である GABA は、実は常に抑制性とは限らず、時として興奮性にも働く。GABA は通常、興奮性伝達を feed-forward あるいは feed-back 抑制によって制御しているので、GABA 作用の興奮への逆転の影響は神経回路レベルではさらに増幅される。このような興奮性 GABA 作用による回路

機能異常を伴う場合のてんかんの根本的な治療ストラテジーとしては GABA 作用そのものよりもむしろ Cl⁻ ホメオスタシスをターゲットとした方が有効なことも考えられる。今後、てんかん病態の解明から、さらに治療法の開発も視野に入れて能動的 Cl⁻ ホメオスタシス仮説を考えていく必要がある。

例えば [Cl⁻]_i 高値による興奮性 GABA 作用^{14,16,46} が背景にある新生児けいれんの治療には、一般的な抗けいれん剤のように GABA 作用を増強するものはむしろ逆効果で⁴¹、GABA_A 受容体をブロックするか、あるいは [Cl⁻]_i を低下させて GABA 作用を興奮性から抑制性に転じさせることのほうが有効である可能性がある。Cl⁻ トランスポーターの阻害剤は一般的には利尿剤として臨床でも用いられているが、いずれの薬剤も選択性に乏しいため、[Cl⁻]_i に対する作用が全く逆の排出型と取込型の Cl⁻ トランスポーターが共存する神経系^{1,2,4,40} では [Cl⁻]_i を低下させる目的では使いづらい。しかし Dzhala らの実験で NKCC1 を選択的に抑制した bumetanide の有効濃度は³⁹ ヒトの浮腫治療で実際に用いられている程度であり⁵⁵、ヒトでの NKCC1 と KCC2 の発達変化も³⁹ これまでげっ歯類で知られている^{13,19,32-34,36,38,56} のと同様であったことから、bumetanide による新生児けいれんの治療は臨床試験の対象になりえるかもしれない。

また、成人においてもヒト内側側頭葉てんかんの症例において、てんかん原性を有する部位の [Cl⁻]_i 上昇による興奮性 GABA 作用⁴³ や NKCC1 の増加³¹ を示唆する所見が得られており、NKCC1 機能を抑制する bumetanide が一部の内側側頭葉てんかんの治療に有効な可能性もある。てんかん原性をしめすヒト cortical dysplasia 組織でも [Cl⁻]_i 調節の異常によって興奮性に逆転した GABA_A 受容体活性化が ictal discharge に関与していることが示唆された⁵³。我々が Cl⁻ トランスポーターの発現を検討した結果では、KCC2 が有意に減少しており、NKCC1 は正常組織と同様に極めて少なかった⁵⁴。したがって、こうした組織では NKCC1 の機能を遮断する薬剤の効果は余り期待できないかもしれない。一方、FCD⁵⁴ でも内側

側頭葉てんかん焦点³¹⁾でも一部の神経細胞で KCC2 の減少が示された。最近のトピックとして、KCC2 は転写^{20,21,23,28,57-59)}、翻訳⁶⁰⁾あるいは蛋白レベル⁶¹⁻⁶⁴⁾でさまざまな調節を受けることが明らかになりつつある。特に、活動依存的に発現が抑制されることも明らかになったので⁵⁹⁾、過剰興奮を示すてんかんでは原因としてだけでなく結果として KCC2 が減少して、けいれん性の異常興奮を増悪している可能性もある。したがって、これらの組織では低下した KCC2 機能をブーストしてやるのが有効かもしれない。最近我々は Na⁺、K⁺-ATPase α 2 subunit⁶¹⁾ と脳型 creatine kinase^{62,64)} が、いずれも KCC2 と蛋白レベルで協関をもち KCC2 機能を促進することを見出したので、これらの調節機構の研究がさらにすすめば、能動的 Cl⁻ ホメオスタシス仮説にもとづいた新しいてんかん治療法開発の糸口として期待できる。

一方、本稿で述べた能動的 Cl⁻ ホメオスタシス仮説 (Fig. 1) とは違った観点ではあるが、難治性てんかん患者の術中に、Cl⁻ トランスポーターを非選択的に抑制する利尿剤の furosemide を投与すると epileptic activity が有意に減少することが報告された⁶⁵⁾。機序として、アストロサイトの Cl⁻ トランスポーターに作用して、アストロサイトの容積を減少させることによって神経細胞周囲の細胞外スペースを逆に増加させて、ephaptic な興奮の伝播を抑制したと著者らは考察している^{66,67)}。いずれにせよ、グリアの Cl⁻ トランスポーターの持つ役割についても今後検討していく必要がある⁴⁰⁾。

おわりに

[Cl⁻]_i 上昇によって GABA 作動性抑制が減弱することによって、てんかん発作が誘発されると考えると、NKCC1 による Cl⁻ 取込の抑制や KCC2 による Cl⁻ 排出の増強による [Cl⁻]_i 低下は、GABA 作動性抑制性を回復させて発作を防止できるかもしれない。このように、本稿で述べた能動的 Cl⁻ ホメオスタシス仮説が、新発想の治療法の開発へ繋がることを期待したい。

本稿は第 38 回日本てんかん学会の教育講演の内容を中心にまとめたものである。発表の機会をいただいた八木

和一会長に感謝いたします。また、浜松医科大学生理学第一講座で行った本研究に多大な貢献をした各氏 (岡部明仁、清水千草、杉本昌弘、山田順子、井上浩一、豊田博紀、磯村宜和) とヒト focal cortical dysplasia 組織を用いた共同研究をしてくださった国立静岡神経医療センターの各氏 (田中正樹、松田一己、三原忠紘、井上有史、藤原建樹) に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 2003; 26: 199-206.
- 2) 福田敦夫. 脳における細胞内 Cl⁻ の調節と神経機能. *脳の科学* 2000; 22: 219-223.
- 3) Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, et al. Changes in intracellular Ca²⁺ induced by GABA_A receptor activation and reduction in Cl⁻ gradient in neonatal rat neocortex. *J Neurophysiol* 1998; 79: 439-446.
- 4) 福田敦夫. 脳機能における Cl⁻ ホメオスタシスの役割についての新しい考え方. *医学のあゆみ* 2005; 214: 965-966.
- 5) Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science* 1995; 269: 977-981.
- 6) Isomura Y, Sugimoto M, Fujiwara-Tsukamoto Y, Yamamoto-Muraki S, Yamada J, Fukuda A. Synaptically activated Cl⁻ accumulation responsible for depolarizing GABAergic responses in mature hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 2003; 90: 2752-2756.
- 7) Ling DSF, Benardo LS. Activity-dependent depression of monosynaptic fast IPSCs in hippocampus: contributions from reductions in chloride driving force and conductance. *Brain Res* 1995; 670: 142-146.
- 8) Yamada Y, Fukuda A, Tanaka M, Shimano Y, Nishino H, Muramatsu K, et al. Optical imaging reveals cation-Cl⁻ cotransporter-mediated transient rapid decrease in intracellular Cl⁻ concentration induced by oxygen-glucose deprivation in immature rat neocortical slices. *Neurosci Res* 2001; 39: 269-280.
- 9) Katchman AN, Vicini S, Hershkowitz N. Mechanism of early anoxia-induced suppression of the GABA_A-mediated inhibitory postsynaptic current. *J Neurophysiol* 1994; 71: 1128-1138.
- 10) Wagner S, Castel M, Gainer H, Yarom Y. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 1997; 387: 598-603.
- 11) LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*

- 1995 ; 15 : 1287-1298.
- 12) Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, et al. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 1996 ; 16 : 1808-1818.
 - 13) Shimizu-Okabe C, Yokokura M, Okabe A, Ikeda M, Sato K, Kilb W, et al. Layer-specific expression of Cl⁻ transporters and differential [Cl⁻]_i in newborn rat cortex. *Neuroreport* 2002 ; 13 : 2433-2437.
 - 14) Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 1996 ; 16 : 6414-6423.
 - 15) Fukuda A, Tanaka M, Yamada Y, Muramatsu K, Shimano Y, Nishino H. Simultaneous optical imaging of intracellular Cl⁻ in neurons in different layers of rat neocortical slices : advantages and limitations. *Neurosci Res* 1998 ; 32 : 15-23.
 - 16) Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 1989 ; 416 : 303-325.
 - 17) Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development : the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 2002 ; 3 : 728-739.
 - 18) Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 2002 ; 3 : 715-727.
 - 19) Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* 2004 ; 557 : 829-841.
 - 20) Toyoda H, Ohno K, Yamada J, Ikeda M, Okabe A, Sato K, et al. Induction of NMDA and GABA_A receptor-mediated Ca²⁺ oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured facial motoneurons. *J Neurophysiol* 2003 ; 89 : 1353-1362.
 - 21) Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, Shimizu-Okabe C, et al. Reduction of KCC2 expression and GABA_A receptor-mediated excitation after *in vivo* axonal injury. *J Neurosci* 2002 ; 22 : 4412-4417.
 - 22) van den Pol AN, Obrietan K, Chen G. Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *J Neurosci* 1996 ; 16 : 4283-4292.
 - 23) Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 2003 ; 424 : 938-942.
 - 24) Cervero F, Laird JMA, Garcia-Nicas E. Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition : an update. *Eur J Pain* 2003 ; 7 : 345-351.
 - 25) Khalilov I, Holmes GL, Ben-Ari Y. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci* 2003 ; 6 : 1079-1085.
 - 26) Ueno T, Okabe A, Akaike N, Fukuda A, Nabekura J. Diversity of neuron-specific K⁺-Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory postsynaptic potential depression in rat motoneurons. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 4945-4950.
 - 27) Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 2001 ; 30 : 515-524.
 - 28) Jin X, Huguenard JR, Prince DA. Impaired Cl⁻ extrusion in layer V pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex. *J Neurophysiol* 2005 ; 93 : 2117-2126.
 - 29) Okabe A, Yokokura M, Toyoda H, Shimizu-Okabe C, Ohno K, Sato K, et al. Changes in chloride homeostasis-regulating gene expressions in the rat hippocampus following amygdala kindling. *Brain Res* 2003 ; 990 : 221-226.
 - 30) Okabe A, Ohno K, Toyoda H, Yokokura M, Sato K, Fukuda A. Amygdala kindling induces upregulation of mRNA for NKCC1, a Na⁺, K⁺-2Cl⁻ cotransporter, in the rat piriform cortex. *Neurosci Res* 2002 ; 44 : 225-229.
 - 31) Munoz A, Mendez P, Alvarez-Leefmans F, DeFelipe J. Altered expression of NKCC and KCC2 transporters and GABAergic innervation in human epileptic hippocampus. *Soc Neurosci Abstr* 2004 ; 567 : 6.
 - 32) Lu J, Karadsheh M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform of K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J Neurobiol* 1999 ; 39 : 558-568.
 - 33) Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains : a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* 1997 ; 33 : 781-795.
 - 34) Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999 ; 397 : 251-255.
 - 35) Sun D, Murali SG. Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in immature cortical neurons : a role in intracellular Cl⁻ regulation. *J Neurophysiol* 1999 ; 81 : 1939-1948.
 - 36) Ikeda M, Toyoda H, Yamada J, Okabe A, Sato K, Hotta Y, et al. Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl⁻ homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res* 2003 ; 984 : 149-159.
 - 37) Wang C, Ohno K, Furukawa T, Ueki T, Ikeda M, Fukuda A, et al. Differential expression of KCC2 accounts for the differential GABA responses between relay and intrinsic neurons in the early postnatal rat

- olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 2005 ; 21 : 1449-1455.
- 38) Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C. Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci* 2002 ; 16 : 2358-2370.
- 39) Dzhalal VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, et al. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 2005 ; 11 : 1205-1213.
- 40) Fukuda A. Diuretic soothes seizures in newborns. *Nat Med* 2005 ; 11 : 1153-1154.
- 41) Ben-Ari Y, Holmes GL. The multiple facets of γ -aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. *Curr Opin Neurol* 2005 ; 18 : 141-145.
- 42) Sankar R, Painter MJ. Neonatal seizures : after all these years we still love what doesn't work. *Neurology* 2005 ; 64 : 776-777.
- 43) Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 2002 ; 298 : 1418-1421.
- 44) Marty S, Wehrle R, Alvarez Leefmans FJ, Gasnier B, Sotelo C. Postnatal maturation of Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus : an immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci* 2002 ; 15 : 233-245.
- 45) Cohen I, Navarro V, Le Duigou C, Miles R. Mesial temporal lobe epilepsy : a pathological replay of developmental mechanisms? *Biol Cell* 2003 ; 95 : 329-333.
- 46) Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R. Ca^{2+} oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA_A and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 1997 ; 18 : 243-255.
- 47) Chevassus-an-Louis N, Baraban SC, Gaiarsa J-L, Ben-Ari Y. Cortical malformations and epilepsy : new insights from animal models. *Epilepsia* 1999 ; 40 : 811-821.
- 48) Jacobs KM, Hwang BJ, Prince DA. Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria. *J Neurophysiol* 1999 ; 81 : 159-173.
- 49) Sugimoto M, Yamada J, Kilb W, Ueno S, Luhmann HJ, Fukuda A. Regaining of GABA^- and glycine-induced calcium influxes during formation of the microgyrus in an experimental model of cortical malformations. *Soc Neurosci Abstr* 2003 ; 888 : 9.
- 50) Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann HJ, Fukuda A. Ontogeny of the mRNAs for NKCC1 & KCC2 in a model of cortical malformations. *Soc Neurosci Abstr* 2003 ; 679 : 13.
- 51) Okabe A, Shimizu-Okabe C, Kilb W, Kobayashi K, Kawashima Y, Takayama Y, et al. Changes in the expression of mRNAs for glycine and GABA_A receptor subunits in the rat freeze-lesion model of cortical malformation. *Soc Neurosci Abstr* 2004 ; 272 : 10.
- 52) Flint AC, Liu XL, Kriegstein AR. Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 1998 ; 20 : 43-53.
- 53) D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Mattia D, Bernasconi A, Olivier A, et al. GABA_A receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex. *Brain* 2004 ; 127 : 1626-1640.
- 54) Shimizu-Okabe C, Tanaka M, Matsuda K, Okabe A, Sugimura N, Sato K, et al. KCC2 expression is down-regulated in human epileptogenic cortical dysplasia. *Soc Neurosci Abstr* 2004 ; 272 : 22.
- 55) Lopez-Sambblas AM, Adams JA, Goldbreg RN, Modi MW. The pharmacokinetics of bumetanide in the newborn infant. *Biol Neonate* 1997 ; 72 : 265-272.
- 56) Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, et al. Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Dev Brain Res* 2002 ; 139 : 59-66.
- 57) Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M-M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 2001 ; 105 : 521-532.
- 58) Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguilo A, Martinez-Guijarro FJ, Alcantara S, et al. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K^+/Cl^- cotransporter KCC2. *Development* 2003 ; 130 : 1267-1280.
- 59) Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, et al. Mechanism of activity-dependent down-regulation of the neuron-specific K^+/Cl^- cotransporter KCC2. *J Neurosci* 2004 ; 24 : 4683-4691.
- 60) Kelsch W, Hormuzdi S, Straube E, Lewen A, Monyer H, Misgeld U. Insulin-like growth factor 1 and a cytosolic tyrosine kinase activate chloride outward transport during maturation of hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001 ; 21 : 8339-8347.
- 61) Ikeda K, Onimaru H, Yamada J, Inoue K, Ueno S, Onaka T, et al. Malfunction of respiratory related neuronal activity in Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 2$ subunit-deficient mice is due to abnormal Cl^- homeostasis in brainstem neurons. *J Neurosci* 2004 ; 24 : 10693-10701.
- 62) Inoue K, Ueno S, Fukuda A. Interaction of neuron-specific K^+/Cl^- cotransporter, KCC2, with brain-type creatine kinase. *FEBS Lett* 2004 ; 564 : 131-135.
- 63) Khirug S, Huttu K, Ludwig A, Smirnov S, Voipio J, Rivera C, et al. Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. *Eur J Neurosci* 2005 ; 21 : 899-904.
- 64) Inoue K, Yamada J, Ueno S, Fukuda A. Brain-type creatine kinase activates neuron-specific K^+/Cl^- cotransporter KCC2. *J Neurochem* 2006 ; 96 : 598-608.

- 65) Haglund MM, Hochman DW. Furosemide and mannitol suppression of epileptic activity in the human brain. *J Neurophysiol* 2005 ; 94 : 907-918.
- 66) Hochman DW, Baraban SC, Owens JW, Schwartzkroin PA. Dissociation of synchronization and excitability in furosemide blockade of epileptiform activity. *Science* 1995 ; 270 : 99-102.
- 67) Hochman DW, Schwartzkroin PA. Chloride-cotransport blockade desynchronizes neuronal discharge in the "epileptic" hippocampal slice. *J Neurophysiol* 2000 ; 83 : 406-417.

Summary

Active Cl⁻ Homeostasis Hypothesis and the Experimental Models of Epilepsy

Atsuo Fukuda¹⁾

¹⁾Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine

One of the recent topics in neuroscience is that the major inhibitory neurotransmitter GABA necessarily evokes excitation in immature brain, in contrast to inhibition in normal adult brain. Such excitatory GABA actions may be involved in neural circuitry development promoted by neuronal differentiation, migration, and synaptogenesis. On the other hand, a conversion of GABA response from inhibition to excitation could also be induced by certain pathological condition even in adult. Since GABA_A receptor is a Cl⁻ channel, such a developmental or a pathological switch of GABA action between inhibition (Cl⁻ influx) and excitation (Cl⁻ efflux) is induced by changes in Cl⁻ gradient. We have been investigating the dynamics of neural functions modulated by such active Cl⁻ homeostasis in the experimental models of epilepsy.

Tetanic stimulation induced post-tetanic depolarization followed by seizure-like afterdischarge in hippocampal CA1 neurons in brain slices. Massive Cl⁻ influx during tetanic stimulation was responsible for [Cl⁻]_i increases lasting for the period of afterdischarge. This acute postsynaptic Cl⁻ accumulation through GABA_A receptor channels via feed-forward inhibition resulted in reversal of its own action to excitation. This feed-forward excitation induced a seizure-like afterdischarge, implicating a relation with epileptogenesis. The neuronal Cl⁻ homeostasis is regulated by cation-Cl⁻ cotransporters, so that the active shift of Cl⁻ homeostasis could be generated by the dynamic balance of Cl⁻ importer (NKCC1) and exporter (KCC2). In a rat kindling model, there was an activity-dependent increase in NKCC1 mRNA in the dentate gyrus and the pyriform cortex. Thus an increase in [Cl⁻]_i and a reduction in GABAergic inhibition may occur in those epileptic rats. In a rat neonatal cortical freeze-lesion model of human polymicrogyria, GABA-induced depolarizations associated with increases in [Cl⁻]_i were observed in cortical plate neurons migrating into the dysplastic lesion. NKCC1 mRNA was upregulated whereas KCC2 mRNA was downregulated in those migrating neurons. These characteristics were similar to the known characteristics of migrating cortical plate cells. Thus, cortical plate cells locating adjacent to the necrotic center of the freeze-lesion might regain or preserve the excitatory GABA actions, so that they could migrate into the dysplastic lesion to form microgyrus. Thus a collapse of active Cl⁻ homeostasis may be responsible for a pathogenesis of both idiopathic and organic epilepsies.

J. Jpn. Epil. Soc. 2006 ; 24 : 3-17