

## 原 著

マウス海馬歯状回における短時間の実験的熱性けいれん  
による興奮性シナプス伝達への長期的影響

獨協医科大学 生理学 (生体情報)

金子堅太郎

**要 旨** 単純型熱性けいれんは良性疾患として認識されているが、その一部では長期間にわたる影響を海馬に及ぼすことが報告されている。そこで、軽度の熱性けいれんによる長期的な影響を明らかにするために、新生マウスに短時間の実験的熱性けいれんを誘発した。その後、Timm染色により、苔状線維の異常な分岐を評価し、パッチクランプ・ホールセル法により、歯状回顆粒細胞の興奮性伝達を解析した。その結果、苔状線維の異常発芽は観察されなかったが、歯状回顆粒細胞でのグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達がシナプス前性に亢進していた。この変化は syntaxin 1A の発現低下も伴っていた。さらに海馬培養ニューロンにおいて、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる syntaxin 1A のノックダウンが、グルタミン酸の開口放出を増加させることを観察した。以上の結果から、軽度の実験的熱性けいれんが長期にわたり、syntaxin1A の発現変化と関連して海馬歯状回の興奮性シナプス伝達を亢進させることが示唆された。

**Key Words** : 単純型熱性けいれん, 興奮性シナプス伝達, パッチクランプ・ホールセル法, syntaxin 1A, 歯状回

## 緒 言

熱性けいれんは生後6ヶ月から5歳の乳幼児に2~5%の罹患率をもつ最も一般的な小児けいれん性疾患である<sup>1,2)</sup>。臨床症状から単純型熱性けいれん(15分以内, 全般性発作, 単発)と複雑型熱性けいれん(15分以上, 部分発作, 多発)に大きく分類される<sup>3)</sup>。

複雑型熱性けいれんは、潜在的な側頭葉てんかんと関連性が示唆されるため、その病態生理が盛んに研究されてきた。側頭葉てんかん患者では、海馬歯状回の苔状線維が内分子層へ異常発芽をすることが知られている<sup>4)</sup>。異常発芽した苔状線維は歯状回顆粒細胞へ反回性の興奮性入力をする<sup>5)</sup>。この変化は遷延した熱性けいれんの動物モデルにおいても誘導されることが実証されている<sup>6)</sup>。さらに近年の研究では、遷延した熱性けいれんがてんかん原生をもつ異所性顆粒細胞を誘導することも明らかにされている<sup>7)</sup>。

複雑型熱性けいれんとは対照的に、単純型熱性けいれん

は良性であると考えられている<sup>8)</sup>。そのため、単純型熱性けいれんの長期的な影響については広範にわたって調べられていない。しかし、ある集団研究では熱性けいれんの既往はその後のてんかん発症のリスクを約5倍に増加させたが、単純型熱性けいれんと複雑型熱性けいれんとの間で有意差はなかったことを報告している<sup>9)</sup>。さらにMRIによる追跡調査では単純型熱性けいれんの既往が海馬硬化症と関連していることや<sup>10)</sup>、複雑型熱性けいれんと同程度の海馬萎縮症を呈することが報告されている<sup>11)</sup>。これらのことは、単純型熱性けいれんが以前から考えられているような良性疾患ではない可能性を示唆している。

Syntaxin 1Aは、SNAREタンパク質の一種であり、主として神経細胞に発現する複合膜タンパク質である<sup>12)</sup>。syntaxin 1Aはv-SNARE (synaptobrevin/VAMP) とt-SNARE (SNAP-25) など、他のSNAREタンパク質との相互作用によって、シナプス小胞と細胞膜の膜融合を行う。そのため、syntaxin 1Aは神経伝達物質の放出において重大な役割を担っている<sup>13,14)</sup>。また、syntaxin 1Aは海馬の機能調節にも関わっている<sup>15,16)</sup>。例えば、syntaxin 1Aが興奮性アミノ酸輸送体の機能に影響し、てんかん原生を誘導することを示唆する報告がある<sup>16)</sup>。

本実験では軽度の熱性けいれんが、海馬歯状回の興奮

平成26年5月15日受付, 平成26年5月29日受理  
別刷請求先: 金子堅太郎

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880  
獨協医科大学 生理学 (生体情報)

性シナプス伝達においてどのような影響を及ぼすか検討した。さらに syntaxin 1A の発現低下がグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達を誘導するという仮説を立てた。我々はこれらを検証するために新生 ICR マウスに短時間の実験的熱性けいれんを誘発させた後、in vivo での電気生理学的検討と、in vitro での組織学的検討を試みた。

## 方 法

本研究は獨協医科大学実験動物委員会の承認を得て行った。

### 1. 対 象

本研究では日本クレア株式会社から購入した妊娠 ICR マウスを使用した。出生日を日齢 0 日とした。

### 2. 実験的熱性けいれんの誘導

短時間の実験的熱性けいれん (brief experimental febrile seizure, BEFS) は、現在最も頻用されているヘアドライヤーモデルを改変して誘導した<sup>17,18)</sup>。日齢 14~15 日のマウスを 3L のビーカー内に入れ、直腸温プローブで体幹温をモニターした。上方 50 cm からドライヤーの温風で毎分 2°C ずつ体温を上昇させ、41~43°C に体温を維持した。高体温 (38°C 以上) の誘導は 5 分間とした。この方法により全てのマウスで強直性間代性けいれんが誘発された。けいれんが誘導されたら速やかに冷却槽に移し、平熱 (33~36°C) に戻るのを確認した後、ホームゲージに戻した。対照群は体温を変動させないように冷風を用い、同様の処置を行った。

### 3. 組織学的検討

#### 1) Timm 染色

BEFS 誘発後 6 週目のマウスをケタミン 100 mg/kg とキシラジン 10 mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下に 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を溶媒とした 0.37% 硫酸ナトリウムを経心的に灌流させ、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した。次に 4°C の 4% パラホルムアルデヒドに浸し、一晩かけて後固定した。スライサー (DTK-3000; Dozaka EM, Kyoto, Japan) を用い、厚さ 30 μm の冠状断スライスを作製し、1 日乾燥させた。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 3 回洗った後、クエン酸 5.1 g、クエン酸ナトリウム 4.7 g、ヒドロキノン 3.4 g、硝酸銀 0.17 g を含有する 50% アラビアゴム溶液で暗室、室温の状態でおよそ 1 時間反応させた。反応後、蒸留水で洗い、クレオシルバイオレットで対比染色させ、マンニトールで脱水した。染色されたスライスは CCD カメラ (DP72) が

搭載されたシステム顕微鏡 BX53 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

#### 2) 苔状線維発芽の定量

Timm 染色後、得られた切片の歯状回の顆粒細胞上層に分岐する苔状線維の解析を行った<sup>19)</sup>。苔状線維の異常発芽の定量は、すでに確立された方法で実施した。スコア付けは以下の通りである。スコア 0, Timm 顆粒はみられない; スコア 1, 顆粒細胞上層に Timm 顆粒が広がる; スコア 2, Timm 顆粒が顆粒細胞上層から内分子層へ連続的に分布する; スコア 3, ほとんどの Timm 顆粒が顆粒細胞上層から内分子層に帯をつくる; スコア 4, 全ての Timm 顆粒が顆粒細胞上層から内分子層に帯をつくる; スコア 5, 内分子層が Timm 顆粒の帯でできた濃い薄膜で覆われる<sup>19)</sup>。本実験では十字縫合から後方 1.46~2.06 mm の範囲における海馬スライスを左右 5 枚ずつ評価した。Timm スコアの定量は実験条件を盲検化して実施した。

### 4. リアルタイム RT-PCR

Syntaxin 1A の発現低下がグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達をシナプス前性に亢進させるという仮説を検証するため、我々は海馬歯状回の syntaxin 1A 発現を調べた。BEFS 誘発後 4 週目のマウスを、ケタミン 100 mg/kg とキシラジン 10 mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下に脳を摘出し、海馬歯状回を分離した。ISOGEN 試薬 (Nippongene, Japan) を用いて、全 RNA を単離した。逆転写反応は Super Script cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用い、ランダムヘキサマーで行った。逆転写反応で得られた鋳型 DNA を、Mastercycler ep realplex 2 system (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いてリアルタイム PCR にかけて。Syntaxin 1A とグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の鋳型 DNA の増幅は市販されている TaqMan gene アッセイ (それぞれ Mm00444008 と Mm99999915; Applied Biosystems) を用いて行った。Syntaxin 1A の発現量を GAPDH で標準化し、比較 Ct 法 (Applied Biosystems) によって相対的に定量した。

### 5. 電気生理学的評価

#### 1) スライス標本の作製

BEFS 誘発後 4~6 週目の雄性マウスをケタミン 100 mg/kg とキシラジン 10 mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下に左海馬を摘出した。取り出した海馬は直ちに 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> で飽和した氷冷リンゲル液 (組成: NaCl 113 mM; KCl 3 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 mM ; CaCl<sub>2</sub> 2 mM ; MgCl<sub>2</sub> 1 mM ; D-glucose 11 mM ; pH : 7.4) に浸し, スライサー (DTK-3000, Dozaka EM, Japan) を用いて 400 μm の海馬スライス標本を作製した。

## 2) パッチクランプ・ホールセル記録

リング液を持続的に灌流させた顕微鏡のステージ上でパッチクランプ・ホールセル記録を行った。顕微鏡には近赤外線微分干渉顕微鏡 (Axioskop2 ; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用い, 光学 CCD カメラ (IR-CCD 2741 ; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を接続して, 海馬スライス標本を映像化した。マイクロピペット作製装置 (P-97 ; Sutter Instrument, USA) により作製したマイクロピペット電極管に, KOH により pH を 7.4 とした電極液 (K gluconate 123 mM ; KCl 14 mM ; Na gluconate 2 mM ; EGTA 1 mM ; HEPES 10 mM) を充填した。パッチクランプ・ホールセル記録は海馬歯状回の顆粒細胞から行った。本研究では灌流液に bicuculline (10 μM) と strychnine (2.0 μM) を含有させ, 自発的な活動電位非依存性の興奮性シナプス後電流 (EPSCs) を微小興奮性シナプス後電流 (mEPSCs) とした。mEPSCs はパッチクランプ増幅器 (Axopatch 200B ; Axon Instrument, USA) を用いた voltage-clamp 法で膜電位を -70 mV に固定し, デジタル変換記録装置 (Digidata 1230 interface ; Molecular Devices, USA) を使用して 10.0 kHz の頻度でコンピュータに記録した。

## 3) syntaxin ノックダウン海馬細胞の興奮性シナプス伝達

興奮性シナプス伝達における syntaxin 1A の発現減少の効果を検討するため, アンチセンスデオキシヌクレオチド (antisense oligodeoxynucleotide, antisense ODN) による syntaxin 1A ノックダウン海馬培養細胞を作製した。初代培養ニューロンは胎生 17 日のマウスの海馬から分離した<sup>20)</sup>。Syntaxin 1A のモルフォリノアンチセンスデオキシヌクレオチド (Gene Tools, Philomath, OR, USA) の配列を以下に示す。Syntaxin 1A ノックダウン, 5'-AGCTCCTGGGTT-CGGTCCTTCATGC-3' ; 対照群, 5'-CCTCTTACCTCAGTTA-CAATTTATA-3'。遺伝子導入にはリポフェクタミン 2000 (Life Technologies) を使用した。遺伝子導入の 2 日後 (in vitro での培養日数 16-23 日頃) にパッチクランプ・ホールセル法による mEPSCs の記録を行った。海馬培養細胞における mEPSCs の記録と解析は上述した方法と同様に実施した。

## 6. 統計解析

断りのない限り, 全ての結果は平均値 ± 標準偏差で示した。歯状回における syntaxin 1A の発現と, 歯状回顆粒細胞における mEPSCs の各パラメーターの平均値間の比較は Student の t 検定を用いて行った。海馬歯状回における Timm スコアの平均値の比較はマン・ホイットニーの U 検定を用いて行った。

## 結 果

### 1. 苔状線維の異常分岐と syntaxin 1A 発現への影響

対照群 (図 1A) と BEFS 群 (図 1B) における Timm 染色後の顕微鏡写真一例を図 1 に示す。対照群と BEFS 群の両者でわずかに歯状回の内分子層に Timm 顆粒が分布していた (図 1C-D)。対照群 (n=7, 1.54 ± 0.18) における Timm スコアは BEFS 群 (n=7, 1.63 ± 0.19, p=0.46) と比べ, 有意差はなかった (図 1E)。

定量的リアルタイム RT-PCR により, 歯状回での相対的な syntaxin 1A 発現レベルを解析した。対照群 (n=8) と比較して BEFS 群 (n=8) で syntaxin 1A の発現量が 81.8 ± 0.74% (p<0.05 ; 図 1F) に減少していた。

### 2. 興奮性シナプス伝達への影響

歯状回における BEFS のグルタミン酸作動性興奮性シナプス伝達への影響を確認するために, 歯状回顆粒細胞の mEPSCs を記録した。図 2 に対照群 (図 2A) と BEFS 群 (図 2B) の歯状回顆粒細胞における mEPSCs の一例を示す。mEPSCs のイベント間隔 (図 2C) がその振幅の大きさ (図 2D) を変化させることなく, BEFS 群で短縮していた。さらにそのイベント間隔と振幅の平均値を比較したところ, BEFS 群のイベント間隔の平均値は対照群の 45 ± 3.0% (対照群 n=12, BEFS 群 n=14 ; p<0.00001) であり, 振幅の平均値は 96.2 ± 2.0% であった (対照群 n=12, BEFS 群 n=14 ; P=0.327 ; 図 2E-F)。

### 3. 海馬培養細胞における syntaxin 1A ノックダウンの影響

Syntaxin 1A の発現低下がグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達にどのような影響を及ぼすか, アンチセンス ODN によって syntaxin 1A をノックダウンさせた海馬培養細胞で検証した。その一例の結果において, syntaxin 1A のノックダウンが mEPSCs のイベント間隔をその振幅に影響することなく, 短縮させていた (図 3A-D)。

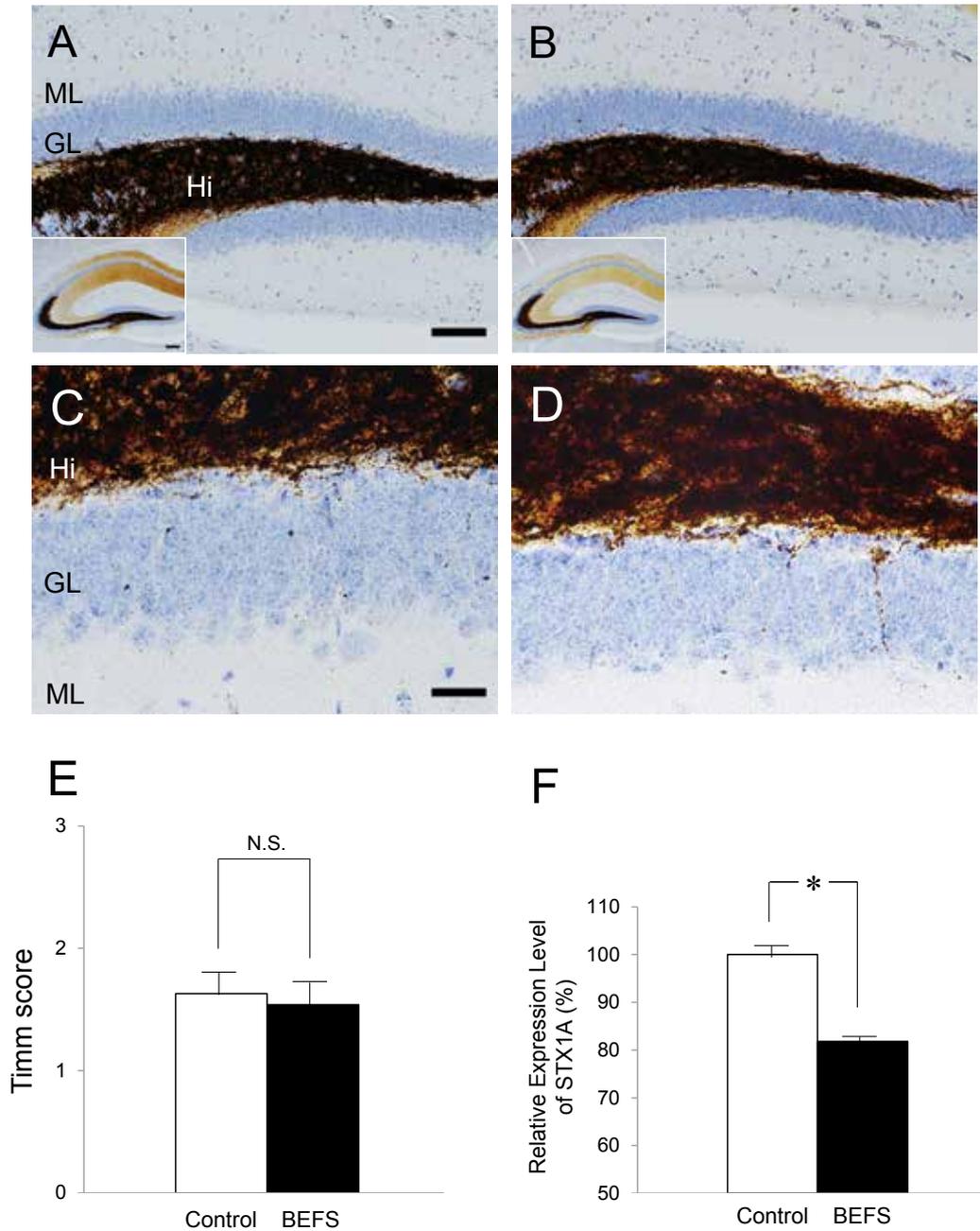


図1 2群間における Timm 染色と定量 PCR の結果

BEFS 群 (図 1A と C) と対照群 (図 1B と D) における海馬歯状回の Timm 染色の顕微鏡写真の一例を示す。挿入図は海馬全体を高倍率で示したものである。それぞれ海馬歯状回 (図 1A と B) と、錐体細胞層下方にある顆粒細胞層 (図 1C と D) を示している。歯状回の Timm スコアの定量結果を図 1E に示し、定量リアルタイム RT-PCR による海馬歯状回の syntaxin 1A 発現量を図 1F に示した。GL: 顆粒細胞層, Hi: 歯状回門, ML: 分子細胞層, スケールバー: 100 $\mu$ m (A), 200 $\mu$ m (A 挿入図), 25 $\mu$ m (C)。

## 考 察

我々は、新生 ICR マウスに実験的熱性けいれんの誘発させた後の長期的影響を検討した。我々の短時間の実験的熱性けいれんでは歯状回の苔状線維の異常分岐を誘導しなかった。本実験の主な所見は以下の通りであった。

- 1) BEFS は歯状回顆粒細胞においてグルタミン酸作動性の興奮性伝達をシナプス前性に亢進させた。
- 2) BEFS 群の海馬歯状回において syntaxin 1A の発現が減少した。
- 3) 海馬培養細胞における syntaxin 1A のノックダウンは mEPSCs の頻度を増加させた。

Timm 染色の結果は BEFS が海馬歯状回において、反

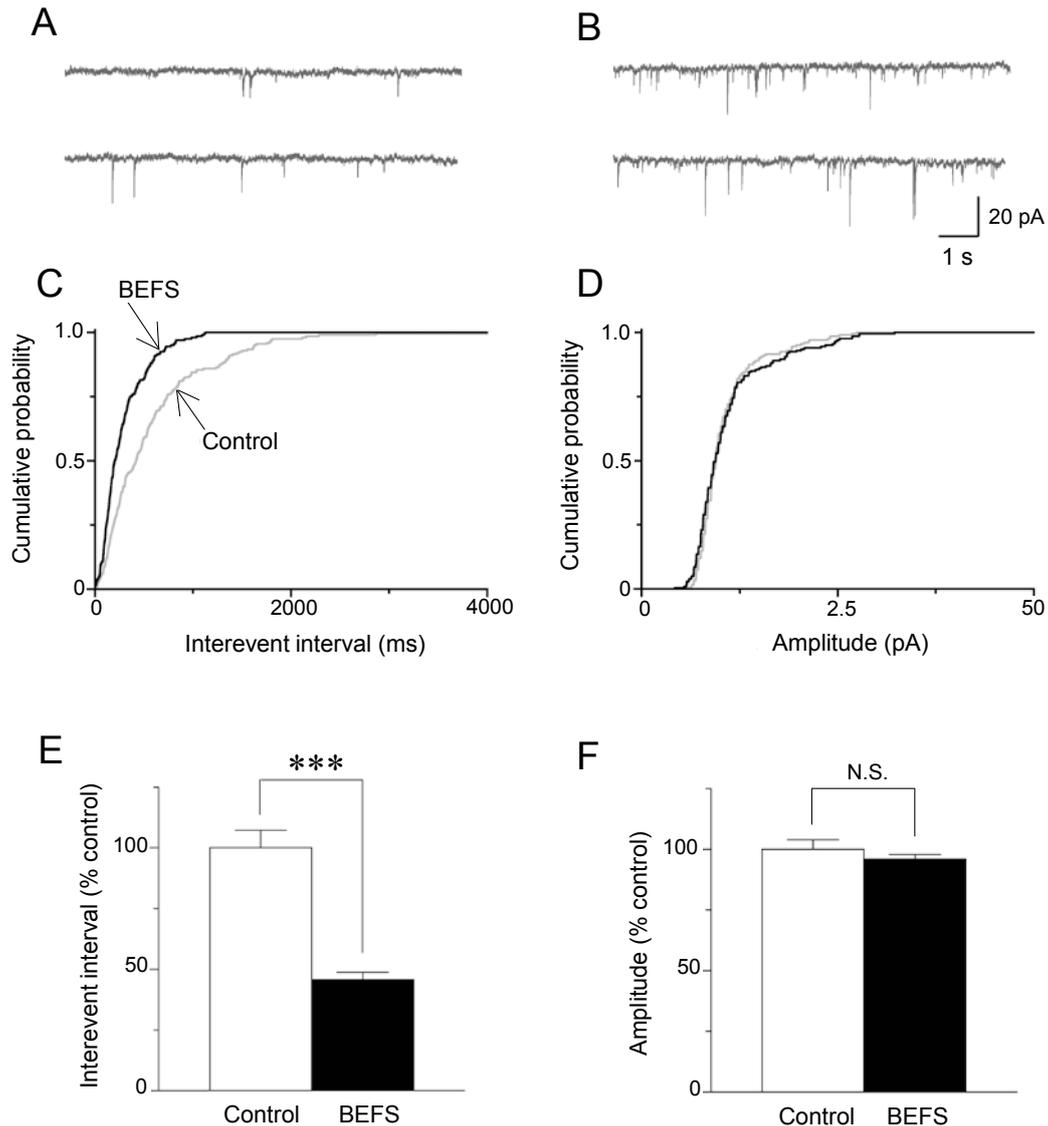


図2 2群間における歯状回顆粒細胞の微小興奮性シナプス後電流(mEPSCs)の記録とその解析  
 対照群(図2A)とBEFS群(図2B)の歯状回顆粒細胞におけるmEPSCsのトレースの一例を示す。  
 mEPSCsのイベント間隔(図2C)と振幅(図2D)の累積ヒストグラムを示す。図2Eと図2Fに  
 それぞれの平均値を示した。

回性の興奮性回路を誘導しないことを示唆している。以前の研究でも新生期における単回の短時間のけいれん誘発は、その後のけいれんの閾値や記憶障害などに影響をあたえないことを報告している<sup>21)</sup>。これらの結果は単純型熱性けいれんが良性疾患であることに矛盾しない<sup>1)</sup>。臨床上においても、単純型熱性けいれんは通常、長期にわたる後遺症を残さない<sup>1)</sup>。また、単純型熱性けいれんの診断と治療において脳波・CT・MRIなどの精査は不要とされている<sup>8)</sup>。

BEFSは明らかな組織学的変化を誘導しなかったが、我々はBEFS群のマウスで歯状回顆粒細胞のmEPSCsの頻度が有意に増加していることを明らかにした。この

変化はその振幅の変化を伴っていなかった。これらの電気生理学的所見からBEFSが歯状回顆粒細胞において、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達をシナプス前性に亢進させていると考えられた。

定量的リアルタイムRT-PCRによる解析で、我々はBEFS群の海馬歯状回でsyntaxin 1Aの発現が有意に減少していることを明らかにした。さらに、この遺伝子発現の変化がグルタミン酸作動性興奮性シナプス伝達を亢進させるという仮説を検証するために、我々は海馬培養細胞を用いてアンチセンスODNによる実験を試みた。その結果、アンチセンスODNによるsyntaxin 1AのノックダウンはmEPSCsの振幅に影響することなく、その

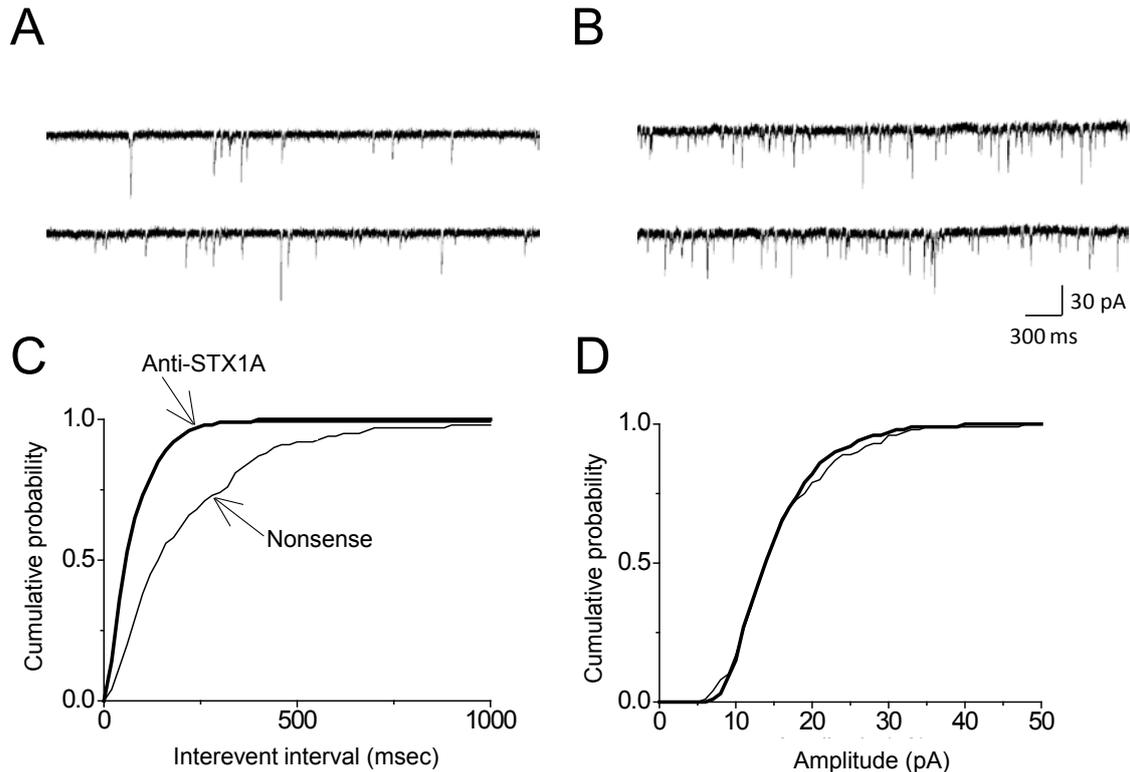


図3 Syntaxin 1A ノックダウン海馬培養細胞の微小興奮性シナプス後電流 (mEPSCs) の記録とその解析  
 対照ニューロン群 (図3A) と syntaxin 1A ノックダウンニューロン群 (図3B) から記録した mEPSCs の一例  
 を示す。累積ヒストグラムは対照ニューロン群 (Nonsense) と syntaxin 1A ノックダウンニューロン群  
 (Anti-STX1A) mEPSCs のイベント間間隔 (図3C) と振幅 (図3D) を示している。

頻度を増加させた。これらの結果は、我々のマウスの熱性けいれんの *in vivo* の実験で観察された所見と同様の結果であった。

以上の結果から、BEFS は海馬歯状回における syntaxin 1A の発現レベルを減少させ、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達をシナプス前性に亢進させることを示唆している。この結果は、新生期の単回のけいれん誘発がグルタミン酸作動性シナプス伝達を変化させるといふ報告と一致している<sup>22)</sup>。さらに、MRI による追跡調査では、海馬萎縮症の発症リスクにおいて単純型熱性けいれんと複雑型熱性けいれんで相違はみられなかった<sup>11)</sup>。これらの知見は単純型熱性けいれんが必ずしも良性疾患ではないことを示唆している。

本実験において我々は歯状回顆粒細胞の mEPSCs の源は同定していない。顆粒細胞は苔状細胞、苔状線維の側枝、嗅内皮質からの投射など複数のグルタミン酸作動性の興奮性入力を受けている<sup>23)</sup>。また本実験で歯状回における syntaxin 1A の発現減少を観察した。Syntaxin 1A は海馬において神経伝達物質の放出を抑制的に制御している<sup>24)</sup>、Timm 染色において苔状線維の側枝に

形態学的変化はなかったが、その終末でグルタミン酸の開口放出が増加している可能性がある。さらに、少なくとも部分的には、苔状細胞での syntaxin 1A の減少が、本実験で観察されたグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達の増強に寄与しているかもしれない。

苔状細胞は顆粒細胞と、抑制性介在ニューロンの両方に興奮性に単シナプスを形成している<sup>25)</sup>。抑制性介在ニューロンは、顆粒細胞とシナプス結合を形成している<sup>26)</sup>。生理的条件下では、苔状細胞は顆粒細胞に対して抑制性的影響を与える<sup>27)</sup>。側頭葉てんかんにおいて、苔状細胞の減少が顆粒細胞への脱抑制に影響していることが示唆されている<sup>28)</sup>。これらの機能的な変化は遷延した熱性けいれん患者においても観察されている<sup>28)</sup>。そのため、BEFS のような軽度の発作では苔状細胞の減少を誘導しなかったが、苔状細胞における syntaxin 1A の減少が顆粒細胞への興奮性出力に影響した可能性が考えられる。ただし、本実験において BEFS が、歯状回顆粒細胞の微小抑制性シナプス後電流 (mIPSCs) にどのような影響を与えたのかはまだ明らかにされていない。

## 結 論

本研究の結果は新生期の単純型熱性けいれんが海馬歯状回において組織学的な影響を及ぼさないにもかかわらず、興奮性シナプス伝達を成人期まで継続して増強させることを示唆している。しかし、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達の亢進がてんかん発生に関連しているかどうかはまだ明らかにされていない。本研究結果と今後のさらなる科学的検討はけいれん性疾患の病態生理のさらなる理解と新生児期の熱性けいれんの管理の一助となるだろう。

**謝 辞** 本研究は Dokkyo Medical University, Young Investigator Award (No.2013-14) の助成を受けたものである。稿を終えるにあたり、本研究と論文報告のご指導を賜った獨協大学医科大学（生体情報）教室の先生方一同に心から感謝申し上げます。

## 学会発表

本研究の成果は、第41回獨協医学会（栃木、2013年12月7日）において発表した。

## 文 献

- 1) Berg AT, Shinnar S, Hauser WA, et al : Predictors of recurrent febrile seizures : a metaanalytic review. *J Pediatr* **116** : 329-337, 1990.
- 2) Steering Committee on Quality Improvement and Management, Subcommittee on Febrile Seizures American Academy of Pediatrics : Febrile seizures : clinical practice guideline for the long-term management of the child with simple febrile seizures. *Pediatrics* **121** : 1281-1286, 2008.
- 3) Waruiru C, Appleton R : Febrile seizures : an update. *Arch Dis Child* **89** : 751-756, 2004.
- 4) El Bahh B, Lespinet V, Lurton D, et al : Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **40** : 1393-1401, 1999.
- 5) Buckmaster PS, Zhang GF, Yamawaki R : Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *J Neurosci* **22** : 6650-6658, 2002.
- 6) Bender RA, Dube C, Gonzalez-Vega R, et al : Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* **13** : 399-412, 2003.
- 7) Koyama R, Tao K, Sasaki T, et al : GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy. *Nat Med* **18** : 1271-1278, 2012.
- 8) Subcommittee on Febrile Seizures, American Academy of Pediatrics : Neurodiagnostic evaluation of the child with a simple febrile seizure. *Pediatrics* **127** : 389-394, 2011.
- 9) Vestergaard M, Pedersen CB, Sidenius P, et al : The long-term risk of epilepsy after febrile seizures in susceptible subgroups. *Am J Epidemiol* **165** : 911-918, 2007.
- 10) Auer T, Barsi P, Bone B, et al : History of simple febrile seizures is associated with hippocampal abnormalities in adults. *Epilepsia* **49** : 1562-1569, 2008.
- 11) Bower SP, Kilpatrick CJ, Vogrin SJ, et al : Degree of hippocampal atrophy is not related to a history of febrile seizures in patients with proved hippocampal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69** : 733-738, 2000.
- 12) Inoue A, Akagawa K : Neuron-specific antigen HPC-1 from bovine brain reveals strong homology to epimorphin, an essential factor involved in epithelial morphogenesis : identification of a novel protein family. *Biochem Biophys Res Commun* **187** : 1144-1150, 1992.
- 13) Jahn R, Scheller RH : SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7** : 631-643, 2006.
- 14) Khvotchev M, Sudhof TC : Proteolytic processing of amyloid-beta precursor protein by secretases does not require cell surface transport. *J Biol Chem* **279** : 47101-47108, 2004
- 15) Fujino I, Fujiwara T, Akagawa K : Transient decrease of HPC-1/syntaxin-1A mRNA in the rat hippocampus by kainic acid. *Neurosci Res* **28** : 243-247, 1997.
- 16) Yu YX, Shen L, Xia P, et al : Syntaxin 1A promotes the endocytic sorting of EAAC1 leading to inhibition of glutamate transport. *J Cell Sci* **119** : 3776-3787, 2006.
- 17) Baram TZ, Gerth A, Schultz L : Febrile seizures : an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Brain Res Dev Brain Res* **98** : 265-270, 1997.
- 18) van Gassen KL, Hessel EV, Ramakers GM, et al : Characterization of febrile seizures and febrile seizure susceptibility in mouse inbred strains. *Genes Brain Behav* **7** : 578-586, 2008.
- 19) Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP : Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling : time course of

- development, progression, and permanence. *J Neurosci* **11** : 2795-2803, 1991.
- 20) Zarei MM, Dani JA : Ionic permeability characteristics of the N-methyl-D-aspartate receptor channel. **103** : 231-248, 1994.
- 21) Chang YC, Huang AM, Kuo YM, et al : Febrile seizures impair memory and cAMP response-element binding protein activation. *Ann Neurol* **54** : 706-718, 2003.
- 22) Baumann RJ : Technical report : treatment of the child with simple febrile seizures. *Pediatrics* **103** : e86, 1999.
- 23) Cornejo BJ, Mesches MH, Coultrap S, et al : A single episode of neonatal seizures permanently alters glutamatergic synapses. *Ann Neurol* **61** : 411-426, 2007.
- 24) Vivar C, Potter MC, Choi J, et al : Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nat Commun* **3** : 1-11, 2012.
- 25) Yamaguchi K, Takada M, Fujimori K, et al : Enhancement of synaptic transmission by HPC-1 antibody in the cultured hippocampal neuron. *Neuroreport* **8** : 3641-3644, 1997.
- 26) Scharfman HE : Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons. *J Neurophysiol* **74** : 179-194, 1995.
- 27) Henze DA, Buzsaki G : Hilar mossy cells : functional identification and activity in vivo. *Prog Brain Res* **163** : 199-216, 2007.
- 28) Sloviter RS : The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* **35** : 640-654, 1994.

## Long-term Effects of Brief Experimental Febrile Seizures on Excitatory Synaptic Transmission in the Mouse Hippocampal Dentate Gyrus

Kentaro Kaneko

*Department of Physiology and Biological Information, Dokkyo Medical University School of Medicine*

Simple febrile seizures (FS) are generally believed to constitute a benign disease. However, previous studies report that simple FS show subtle, but long-lasting, effects in the hippocampus. We subjected neonatal mice to brief experimental FS. Using Timm staining and tight-seal whole-recordings, we examined whether such mild FS exerts long-lasting influences on mossy fiber sprouting and excitatory synaptic transmission in the dentate gyrus (DG) of the hippocampal slices. Although brief experimental FS did not induce apparent mossy fiber sprouting in the hippocampal DG, it led to presynaptic enhancement of glutamatergic excitatory synaptic transmission in the DG. This was accompanied by down-regulation of syntaxin 1A, a member

of the presynaptic SNARE proteins, in the DG. Furthermore, we observed in cultured hippocampal neurons that antisense oligodeoxynucleotide-induced knock-down of syntaxin 1A increased the probability of synaptic release of glutamate. These findings suggest that simple FS during the neonatal period may exert a trace of an augmentative effect on excitatory synaptic transmission in the DG in adulthood.

**Key words** : Simple febrile seizures, Excitatory synaptic transmission, Tight-seal whole-cell recording, Syntaxin 1A, Dentate gyrus