

令和元年6月13日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08020

研究課題名(和文) てんかん家系犬のてんかん発生機序および梨状葉の発作焦点に関する分子病理学的研究

研究課題名(英文) Molecular pathological study for mechanism for epilepsy in familial epileptic dog and epileptic focus in piriform lobe

研究代表者

森田 剛仁 (MORITA, Takehito)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：70273901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん発作は海馬に神経新生や異常なシナプス再構築を誘発するとされているが、海馬以外の領域における神経新生に関する知見は乏しい。梨状葉皮質は近年ヒトのてんかん患者の新たな発作焦点として注目されているが、発作焦点の形成機序は不明である。本研究では、ピロカルピン投与誘発てんかんモデルラットの梨状葉皮質の形態学的変化について検討した。発作が確認された梨状葉皮質に、神経細胞壊死や多数のダブルコルチン陽性細胞が認められた。また、同部位にPSD-95の陽性像およびシナプトフィジン陽性像が認められた。以上より、発作誘発後、梨状葉に神経新生およびシナプスの再構築が生じ、新たな発作焦点となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

梨状葉皮質はヒトのてんかん患者において新たな発作焦点として注目されている領域であり、その発作焦点の形成機序を解明することは、新たな発作焦点の形成抑制、さらに二次的なてんかん発作に対する治療に貢献できると考えられる。本研究ではピロカルピン投与によるてんかんモデルラットの発作後の梨状葉皮質に神経細胞壊死に引き続き、神経新生およびシナプスの再構築が生じる可能性を見出した。今後は、これらの組織改変にどのような分子が関わっているか明らかにすることが重要である。

研究成果の概要(英文)：Epileptic seizure has been reported to enhance adult neurogenesis and induce aberrant synaptic reorganization in the human dentate gyrus in the hippocampal formation. However, adult neurogenesis in the extrahippocampal regions has not been well studied. To investigate seizure-enhanced neurogenesis in the extrahippocampal regions, we performed histological and immunohistochemical studies on the cerebrum of Sprague-Dawley rat treated with intraperitoneal injection of pilocarpine (PL) to induce status epilepticus. Even though severe neuronal damage was found in the piriform cortex of rat having SE, immunohistochemistry for doublecortin (DCX) revealed an increase in number of immature neurons in the piriform cortex. Immunohistochemistry revealed increased expressions of synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the piriform cortex of rat having SE. These results suggested the enhanced neurogenesis and possible synaptic reorganization in the piriform cortex of the PL-treated rat.

研究分野：神経病理、てんかん

キーワード：epilepsy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獣医臨床現場において犬などの伴侶動物のてんかん発作の発生率が高いことから、てんかん発作の診断、治療に対する社会(飼主)並びに獣医師の関心は高い。特に特発性てんかんは、その原因が未だ不明であることから画期的な治療方法が無いのが現状であり(織間博光ら、獣医神経病、2001)その原因の特定が急務である。一方、てんかん発作による二次的な脳組織傷害は、脳機能の減退あるいは新たな発作焦点になりうるという点で重要とされている。申請者は、特発性てんかんシェルティー犬の家系犬を解析し、(1)発作の初期の焦点が前頭葉内側皮質であること、(2)脳脊髄液中に、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸(Glu)、アスパラギン酸(Asp)が高値の傾向があること、などが示された。さらに、(3)マイクロダイアリシス法により、異常脳波(鋭波および棘波)出現時にGluおよびAspが上昇すること、(4)本家系犬では発作を繰り返すうちに、帯状回、梨状葉などの特定の領域に神経細胞死が生じること、その病理発生にミクログリアの活性化(サイトカインの放出)が関連していること、(5)大脳皮質のシナプスにおけるGluの取り込みの異常を示唆する所見、すなわち免疫組織学的に神経細胞周囲(シナプス)にGlu陽性像(集積像)およびアストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーター(GLT-1)陽性像の低下が認められること、(6)てんかん発症前の家系犬(脳波検査では鋭波を確認)の大脳皮質(脳溝深部)および視床のアストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーター(GLT-1)陽性像の低下が認められること、すなわち、本家系犬のてんかんの一次的原因としてアストロサイトのGLT-1の形成(機能)に異常があり、Gluがシナプスに集積し易い状態にある可能性が示唆された。一方、近年、ヒトのてんかん患者が発作を繰り返すうちに「梨状葉に神経細胞の興奮」を示唆する所見が認められるようになり、それが新たな発作焦点になることが注目されている。しかしながら、梨状葉における新たに発作焦点の形成機序については全く不明である。本家系犬では発作を繰り返すうちに梨状葉などの特定の領域に神経細胞死が生じること、カイニン酸(KA)およびピロカルピン投与によるてんかんモデルラットの梨状葉において神経細胞死が好発し、次いで神経新生を示唆する所見、すなわちdoublecortin陽性細胞の増加、synaptophysinおよびPSD-95の陽性像の増強を組織学的あるいは分子生物学的手法で明らかにし、高い評価を得た(特に、PSD 95はグルタミン酸作動性ニューロンの足場蛋白)(日本神経病理学会発表、日本獣医学会発表、2015)さらに、脳波解析により、本モデルラットの梨状葉の神経細胞の興奮を示唆する鋭波および棘波が確認された。このような「梨状葉における神経新生」の形成機序を明らかにし、それを防ぐことができれば、てんかん発作による新たな発作焦点の形成を防ぐことが可能となる。このことはヒトのてんかん後に続発する「さらなる二次的発作」の治療に貢献する可能性がある。

2. 研究の目的

(1)特発性てんかん家系犬の大脳の神経細胞の易興奮性(てんかん原性)を解明する。特に、アストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーターの形成のどの過程に異常があるかに関して検討する。

(2)ピロカルピン投与によるてんかんモデルラットを使用し、本家系犬およびヒトのてんかん患者において検出されている「大脳の梨状葉における二次的発作焦点」の形成機序に関して解明する。

3. 研究の方法

(1)てんかん家系犬の大脳のアストロサイトにおけるGLT-1蛋白の形成過程(転写、mRNAの輸送、翻訳)に関する解析を、in situ hybridization法および免疫電子顕微鏡的手法を用いて

実施する。次いで、本家系犬のアストロサイトのグルタミン酸の取り込みの能に関して培養細胞を用いた負荷試験により解析する（機能的解析）。

(2)ピロカルピン投与によるてんかんモデルラットの大脳の新たな発作焦点である「梨状葉における新生神経細胞」の由来の特定および神経新生に関わる蛋白につて、ウエスタンブロット、リアルタイム PCR 等の分子病理学的手法、および免疫組織学的・免疫電子顕微鏡学的手法を用いた解析を実施する。

4．研究成果

てんかん発作は海馬に神経新生や異常なシナプス再構築を誘発するとされているが、海馬以外の領域における神経新生に関する知見は乏しい。梨状葉皮質は近年ヒトのてんかん患者の新たな発作焦点として注目されているが、発作焦点の形成機序は不明である。本研究では、ピロカルピン投与誘発てんかんモデルラットの梨状葉皮質の形態学的変化について検討した。発作が確認された梨状葉皮質に、神経細胞壊死や多数のダブルコルチン陽性細胞が認められた。また、同部位に PSD-95 の陽性像およびシナプトフィジン陽性像が認められた。以上より、発作誘発後、梨状葉に神経新生およびシナプスの再構築が生じ、新たな発作焦点となる可能性が示唆された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Sakurai M., Suzuki H., Tomita N., Sunden Y., Shimada A., Miyata H., Morita T.:

Enhanced neurogenesis and possible synaptic reorganization in the piriform cortex of adult rat following kainic acid-induced status epilepticus. *Neuropathology*. 38:135-143, 2018 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 富田凧、岸大貴、寸田祐嗣、櫻井優、竹内崇、森田剛仁．リチウムピロカルピン投与てんかんモデルラットの梨状葉皮質における神経新生に関する病理学的研究．第4回日本獣医病理学専門家協会学術集会、2017.3.30 - 31．東京．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。