

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20591722

研究課題名(和文) てんかんによって惹起される海馬神経細胞新生は、てんかん原生となるか

研究課題名(英文) Dentate neurogenesis and neural maturation in animal models of epilepsy

研究代表者

中島 円 (NAKAJIMA MADOKA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号： 50317450

研究成果の概要(和文)：

【研究目的】 神経細胞新生は、虚血やてんかん発作などの刺激で誘発され、侵襲による神経細胞壊死やアポトシスなどの神経細胞の減少を補うと考えられている。しかしながら一方では、海馬のてんかん原性獲得に神経細胞新生が原因をなしているともいわれ、新生による神経細胞のターンオーバーの機構や意義については未だ不明な点が多い。我々は、ピロカルピンによるてんかん発作を誘発させた動物モデルを用いて、てんかんによって惹起される海馬新生神経細胞の経時的変化を免疫染色および Patch-clamp 法による電気生理学的に検討し、海馬神経細胞新生のてんかん原生獲得への関与について研究した。

【方法】 C57/BL マウスをピロカルピン腹注によるてんかん発作誘発 24 時間後に、レトロウイルスにより green fluorescent protein(GFP)を海馬に injection し感染させ、てんかんによって誘発された新生細胞を GFP によりマーキングした。てんかん重積後 7 日(1 週)、14 日(2 週)、28 日(4 週) に海馬をスライスし免疫染色を行い、正常神経細胞への成熟度(NeuN の染色性)、apoptosis の割合(ssDNA の染色性)について検討した。GFP でマーキングされた細胞に対し、Patch-clamp 法により新生された神経細胞の発火パターンを直接記録し細胞興奮性を検討した。

【観察結果】 てんかん発作により新生細胞は subgranule zone に数多く惹起されるが形態も小さく脆弱であり、惹起されるほとんどの未熟な GFP 陽性細胞は成熟過程に入ることなく発作後 1 週~4 週の期間内に消退した。早期に消失がみられる GFP 陽性細胞の免疫染色結果は ssDNA に negative、NeuN negative であった。また神経生理学的には、発作後 1~2 週の GFP 陽性細胞は input resistances (IR)  $1.2\text{G}\Omega \sim 2.0\text{G}\Omega$ 、resting membrane potential (RMP)は  $-55\text{mV} \sim -70\text{mV}$ 。発作後 4 週の GFP 陽性細胞では  $IR 300\text{M}\Omega \sim 1000\text{M}\Omega$ 、 $RMP -70 \sim -80\text{mV}$  であった。てんかんによって惹起された新生神経細胞は未熟な細胞であるほど膜抵抗性が高く、発火頻度が少なく、成熟度とともに徐々に発火頻度が多い傾向を示した。

研究成果の概要(英文)：

【Purpose】 Neuronal regeneration is thought to be induced by stimulation from ischemia or epileptic seizures, as well as to compensate for neuronal necrosis or apoptosis from such insults. It is also said that neuronal regeneration is a cause of hippocampal epileptogenesis, although much is unknown about the turnover mechanism or significance of newly formed neurons. Using an animal model in which epileptic seizures were induced by pilocarpine, changes in hippocampal neurogenesis with time brought about by epilepsy

were investigated using immunostaining and electrophysiological (patch-clamp) techniques. The role of hippocampal neurogenesis in epileptogenesis was then examined.

**【Methods】** Forty-eight hours after epileptic seizures were induced by intraperitoneal injection of pilocarpine in C57/BL mice, the hippocampus was injected with a green fluorescent protein (GFP) using a retrovirus. Thus, new nerves induced by the epileptic seizure were marked with GFP. Immunostaining was done 7 days (1 week), 14 days (2 weeks), and 28 days (4 weeks), 6 months after status epilepticus, and the degree of maturation of normal neurons (NeuN staining), DCX, NeuroD, PSA, BrdU and the proportion of apoptosis (ssDNA staining) were investigated. With the patch-clamp, the firing pattern in the cells marked with GFP was directly recorded to investigate cell excitability.

**【Observation results】** Many new cells were produced in the subgranule zone after the epileptic seizures, but they were small and fragile, and almost none of the immature GFP-positive cells entered the maturation process. They disappeared by 1-4 weeks after the seizure. The GFP-positive cells that disappeared at an early stage were negative for both ssDNA and NeuN. The GFP-positive cells at 1-2 weeks after the seizure had input resistances (IRs) of 1.2 GΩ-2.0 GΩ and resting membrane potentials (RMPs) of -55 mV to -70 mV. The GFP-positive cells at 4 weeks had IRs of 300 MΩ-1000 MΩ and RMPs of -70 mV to -80 mV. The membrane resistance in the new neurons induced by epilepsy was higher in the less mature cells, and they had a low firing rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 脳神経外科学

キーワード：①再生医学, ②神経科学

### 1. 研究開始当初の背景

難治性側頭葉てんかんは、原因が十分解明されておらずまた抗てんかん薬による治療が困難な疾患である。適切な治療のためには、原因究明が急務である疾患である。我々は本研究で海馬で生じている神経細胞新生がもつ生理および病理機能を解明し側頭葉てんかんの治療に役立てることを目標とする。

### 2. 研究の目的

海馬歯状回で、神経細胞の新生が生じていることは、動物実験のみならず、ヒト検体を用いた研究でも証明されている。神経細胞新生は、虚血やてんかん発作などの刺激で誘発され、それらの侵襲による神経細胞壊死やアポトーシスを補っていると考えられている。一方、海馬のてんかん原性獲得に神経細胞新生が原因をなしているともいわれ、新生による神経細胞のターンオーバーの機構や意義については未だ不明な点が多い。現在ヒト難治性側頭葉てんかんでは、てんかん発作の重症度とともに記憶力障害が問題となっている。

てんかん発作の影響を受けた新生神経細胞が正常機能をもつもの、つまり記憶を補完するものであれば、この実験系を進展させ新生を促進する因子を解明することが、記憶力障害の治療につながる。一方、てんかん発作により影響を受けた新生細胞が成熟していくことなく未熟なままの状態でてんかん原性に働くのであれば、新生を抑制すること、または不適切なイオントランスポーターをブロックすることが直接てんかん発作の治療につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

生理状態下とてんかん発作によって誘発される神経細胞新生の違いを以下に示す2つの実験系で検証する。新生細胞をGFPでマーキングし慢性期に至って細胞興奮性をパッチクランプ法により直接記録を行なう。

実験1：生理的状态下での神経細胞新生に対するてんかん発作の影響

正常の生理的状态で海馬歯状回に生じている神経細胞新生が、てんかん重積発作で影響

を受け、後に生じてくる自発的てんかん発作に関与するかを検討する実験系である。

てんかん発作誘発前2日にレトロウイルスによりGFPを感染させておく。てんかん重積後7日、14日、28日で図内に示す免疫染色を行う。正常神経細胞への成熟度(NeuNの染色性増強)、機能的成熟度(NKCC1→KCC2への染色性の変化)、apoptosisの割合(ssDNAの染色性)を免疫染色によって理解する。28日後においては、実際に自発的てんかん発作を生じた動物での染色性を見るとき、パッチクランプ法による細胞内電位及び発火パターンを測定する。新生神経細胞内自然電位とともにGABAに対する反応性を見ることで、上記に示したイオントランスポーター発現との関連を組織学的、電気生理学的に検討しようとするものである。

実験2: てんかん発作に誘発される神経細胞の新生と成熟

てんかん発作により誘発される神経細胞新生のみを検討しようとする実験系である。てんかん発作を誘発させた後にGFPを導入する。ピロカルピンによるてんかん重積後の観察期間、免疫染色、パッチクランプ法も実験1と同様である。実験1と実験2を比較検討し、てんかん発作に誘発された神経細胞の新生と、生理的に生じている神経細胞新生に対するてんかん発作の影響を検証した。

#### 4. 研究成果

てんかん発作により新生細胞はsubgranule zoneに数多く惹起されるが形態も小さく脆弱であり、惹起されるほとんどの未熟なGFP陽性細胞は成熟過程に入ることなく発作後1週~4週の期間内に消退した。早期に消失がみられるGFP陽性細胞の免疫染色結果はssDNAにnegative、NeuN negativeであった。また神経生理学的には、発作後1-2週のGFP陽性細胞はinput resistances (IR)  $1.2G\ \Omega \sim 2.0G\ \Omega$ 、resting membrane potential (RMP)は $-55mV \sim -70mV$ 。発作後4週のGFP陽性細胞では $IR300M\ \Omega - 1000M\ \Omega$ 、 $RMP-70 \sim -80mV$ であった。てんかんによって惹起された新生神経細胞は未熟な細胞であるほど膜抵抗性が高く、発火頻度が少なく、成熟度とともに徐々に発火頻度が多い傾向を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5件)

菅野 秀宣、中島 円、荻野 郁子、新井 一: ヒト側頭葉てんかんにおける海馬神経細胞新生。てんかん研究 (2008) 26: 16-25  
中島 円、菅野 秀宣、荻野 郁子、新井

一: GFPの遺伝子導入による海馬神経細胞の新生とてんかん原生との関連 順天堂医学 54巻4号, 2008

Hidenori Sugano, Hajime Nakanishi, Madoka Nakajima, Kyoko Tanaka, Kazuaki Shimoji, Konstantin Karagiozov, Hajime Arai: Seizures continue even after prompt anti-epileptic drug medication in Sturge-Weber syndrome-study from prolonged video electrocorticography, a case report. Childs Nerv Syst (2009) 25:143-146

中島 円、菅野 秀宣: てんかんによって惹起される海馬新生神経細胞の電気生理学的検討 Dentate neurogenesis and neural maturation in animal models of epilepsy. 順天堂医学 56巻6号 p498

菅野 秀宣、中島 円ら Sturge-Weber syndrome

No Shinkei Geka. Neurological surgery. 38(7) :p613-20, 2010

[学会発表] (計 8件)

中島 円、菅野 秀宣、荻野 郁子、新井 一: ヒト側頭葉てんかん患者海馬で生じている神経細胞新生の検討. 第31回日本てんかんの外科学会, 浜松, Jan. 24-25. 2008

中島 円、菅野 秀宣、荻野 郁子、新井 一: ヒト側頭葉てんかんにおける海馬神経細胞新生と成熟 第42回日本てんかん学会, 東京, Oct 18-19. 2008

Madoka Nakajima, Hidenori Sugano, Ikuko Ogino, Arai Hajime: Neurogenesis and neural maturation in human epileptic hippocampus. American Epilepsy Society 2008 Annual Meeting, Seattle, Dec. 5-9.

Nakajima M, Reorganization by Neurogenesis is Restricted in the Sclerotic Hippocampus- An Immunohistochemical Analysis of Human Epileptic Hippocampus, Asian Australasian Society of Stereotactic and Functional Neurosurgery, Hong Kong, 8-10<sup>th</sup>, Jan. 2009

中島 円、菅野 秀宣、大倉 英浩、新井 一: 頭蓋内硬膜下電極留置術における開頭の工夫. 第32回日本てんかんの外科学会, 東京, Jan. 22-23. 2009

中島 円、菅野 秀宣、大倉 英浩、新井 一: てんかんによって惹起される海馬神経細胞新生の電気生理学的検討, 第43回日本てんかん学会, 東京, Oct. 22-23. 2009

中島 円、菅野 秀宣、新井 一: 発作残存てんかん手術例に対する新規抗てんかん薬の効果 Effects of new antiepileptic agents, topiramate and lamotrigine, in patients with residual epilepsy following epilepsy surgery. 第44回日本てんかん学

会, 岡山, Oct. 2010

M. Nakajima, H. Sugano, H. Arai:

Electrophysiological investigation of hippocampal neurogenesis induced by epilepsy. American Epilepsy Society, San Antonio, Dec. 2010

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 円 (NAKAJIMA MADOKA)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 50317450

### (2) 研究分担者

菅野 秀宣

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 90265992

西村 欣也

順天堂大学・医学部・前任准教授

研究者番号: 80164581

新井 一

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 70167229