

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06393

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 of occurrence of epilepsy in familial epileptic dogs and epileptic focus in the 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：梨状葉皮質は、ヒトのてんかん患者における新たな二次的発作焦点として注目されている。本研究では、梨状葉における新生神経組織の形成メカニズムおよびその過程に関する因子を明らかにすることを目的とした。ピロカルピンをSDラットに腹腔内投与し、てんかん発作を誘発、剖検後、脳を採材し、病理組織学的検索を実施した。壊死領域における異常な突起を有する未熟神経細胞の出現および壊死領域周囲、特に梨状葉 層に顕著なアストログリオーシスを認めた。免疫組織化学的に、これらアストロサイト(Ast)がBDNFおよびNGF陽性を示した。以上より、新生神経組織の形成にAst由来の増殖因子が関与してい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

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、神経新生が認められ、その形成機序に星状膠細胞由来の増殖因子が関与している可能性が示唆された。この知見は、梨状葉における新たな発作焦点の形成メカニズムの解明に有用である。

研究成果の概要(英文)：The piriform cortex is of interest as a new secondary seizure focus in human epilepsy patients. The aim of this study was to elucidate the mechanism of formation of neostriatum in the piriform lobe and the factors involved in this process. Pilocarpine was administered intraperitoneally to SD rats to induce epileptic seizures, and after autopsy, brains were harvested for histopathological search. We found the appearance of immature neurons with abnormal projections in the necrotic area and marked astrogliosis around the necrotic area, especially in layer I of the piriform lobe. Immunohistochemically, these astrocytes (Ast) were positive for BDNF and NGF. These results suggest that Ast-derived growth factors may be involved in the formation of neostriatum.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：神経病理学

キーワード：てんかん 神経病理

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(飼い主)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

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

ピロカルピンをSDラット(7週齢、雄)に腹腔内投与し、てんかん発作を誘発した。発作症状はRacine's scaleに基づいてStage 1から5に分類した。発作誘発後7、14、16、18、20、22日に脳を採材し、病理組織学的検索および免疫組織化学的検索(Neuronal nuclei; NeuN、Doublecortin; DCX、Iba-1、GFAP、BDNF、神経成長因子; NGF、c-fos)を実施した。

。

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、ヒトのてんかん患者における新たな二次的発作焦点として注目されている。本研究では、梨状葉における新生神経組織の形成メカニズムおよびその過程に關与する因子を明らかにすることを目的とした。ピロカルピンをSDラットに腹腔内投与し、てんかん発作を誘発、剖検後、脳を採材し、病理組織学的検索を実施した。壊死領域における異常な突起を有する未熟神経細胞の出現および壊死領域周囲、特に梨状葉 層に顕著なアストログリオシスを認めた。免疫組織化学的に、これらアストロサイト(Ast)がBDNF および NGF 陽性を示した。以上より、新生神経組織の形成にAst由来の増殖因子が關与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野聖菜、寸田祐嗣、森田剛仁.
2. 発表標題 ピロカルピン投与誘発てんかんラットの梨状葉における発作焦点の形成メカニズムに関する病理学的解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外川史晃、寸田祐嗣、森田剛仁
2. 発表標題 ピロカルピン投与誘発てんかんラットの梨状葉皮質における発作焦点形成メカニズムに関する病理組織学的解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------