

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591882

研究課題名（和文）海馬神経細胞新生を促し生着させる遺伝子導入の効果

研究課題名（英文）Transduction of neurogenesis inducing gene to the hippocampus..

研究代表者

菅野 秀宣 (SUGANO Hidenori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90265992

研究成果の概要（和文）：

【目的】 PEDFとVEGFを新生神経細胞に遺伝子導入することで成熟せしめる。

【方法】 てんかん実験マウスにレトロウィルスをベクターとしてPEDF、VEGFを導入する。新生神経細胞の成熟度を免疫染色及び膜電位測定により検討した。

【結果】 海馬での新生神経細胞の多くは NeuN に陰性であり、膜の抵抗は高く、静止膜電位は $-55\text{mV} \sim -70\text{mV}$ と幼弱であった。PEDF および VEGF を導入しても、変化は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：

【Purpose】 Purpose is inducing maturation of newborn neurons by transduction of PEDF and VEGF.

【Methods】 We transduce PEDF and VEGF using retrovirus vector to epilepsy mice. We observe the maturation of newborn neurons by immuno-histology and patch-clamp technique.

【Observation results】 Many newborn neurons were immature that were characterized as follows; negative for NeuN, high input resistance and -55 mV to -70 mV of resting membrane potentials. Transduction of PEDF and VEGF did not induce the maturation of newborn neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22年度	900,000	270,000	1,170,000
23年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：機能脳神経外科学

1. 研究開始当初の背景

海馬を焦点とする側頭葉てんかんは、複雑部分発作を主症状とするが、合併する記銘力障害も臨床上の問題点となっている。一方、海馬歯状回では成体になっても神経細胞の新生が続いている。しかしながら、その新生が記憶を補っているかは依然不明であり、記憶障害の治療に応用出来ないかということが重要な研究課題である。

2. 研究の目的

新生された神経細胞の脱落とアポトーシスを阻害することで新生細胞の成熟を促すメカニズムを解明することが本研究の目的である。レトロウィルスをベクターとし、神経細胞の新生を促す因子として注目される PEDF と VEGF の遺伝子導入をてんかんモデルマウスに行う。急性期から慢性期にわたる観察で新生神経細胞が増加しアポトーシスにより脱落しないことを目標にする。

3. 研究の方法

PEDF, VEGF を導入する前にてんかんマウスでの神経細胞新生を確認した。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、レトロウィルスにより green fluorescent protein(GFP)を海馬に導入し、てんかんによって誘発された新生細胞を GFP でマーキングした。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 法にて発火パターンを直接記録し細胞興奮性を検討した。同様の検討を PEDF, VEGF を導入した群で行った。

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、ほとんどの GFP 陽性細胞は成熟過程に入ることなく発作後 1 週~4 週にて消退した。早期に消失がみられる GFP 陽性細胞は ssDNA に陰性、NeuN 陰性であった。後期にまで残る GFP 陽性細胞は ssDNA 陰性、NeuN 陽性であった。発作後 1 - 2 週の早期 GFP 陽性細胞は input resistances (IR) $1.2G \Omega - 2.0G \Omega$ 、resting membrane potential (RMP)は $-55mV \sim -70mV$ であるのに対し、4 週の GFP 陽性細胞では $IR300M \Omega - 1000M \Omega$ 、 $RMP-70 \sim -80mV$ であった。PEDF および VEGF を導入しても、上記の結果に変化はみられなかった。

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 4 件)

1. Hidenori Sugano, Hajime Nakanishi, Madoka Nakajima, Kyoko Tanaka, Kazuaki Shimoji, Konstandin 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
2. 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
3. 菅野秀宣, 中西肇, 中島円, 肥後琢磨, 飯村康司, 下地一彰, 新井一: Sturge-Weber syndrome. No Shinkei Geka. Neurological surgery. 38(7) :p613-20, 2010
4. 菅野秀宣, 新井一: てんかんの予防手術は是か否か. 小児の脳神経 35, 376-382, 2010

[学会発表] (計 7 件)

1. 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.
2. 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, 8-10th, Jan. 2009

3. 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

4. M. Nakajima, H. Sugano, H. Arai: Electrophysiological investigation of hippocampal neurogenesis induced by epilepsy. American Epilepsy Society, San Antonio, Dec. 2010

5. Sugano H, Nakajima M, Okura H, Higo T, Arai H: Immature large newborn neurons in human hippocampal dentate gyrus from patients with temporal lobe epilepsy. Annual meeting of American epilepsy society, Sanantonio, USA, Dec, 2010

6. Sugano H, Nakanihsi H, Nakajima M, Higo T, Arai H: Posterior quadrantectomy for patient with Sturge-Weber syndrome. Asian epilepsy surgery congress, Hong Kong, November, 2011

7. Sugano H, Nakanihsi H, Nakajima M, Higo T, Arai H: Posterior quadrantectomy for patient with Sturge-Weber syndrome. Annual meeting of American epilepsy society, Boltimore, USA, Dec, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 秀宣 (SAUGANO Hidenori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90265992

(2) 研究分担者

中島 円 (NAKAJIMA Madoka)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50317450

新井 一 (ARAI Hjime)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70167450

西村 欣也 (NISHIMURA Kinya)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80164581