

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592173

研究課題名(和文) 海馬神経細胞新生よりてんかん原性獲得へシナプス小胞たんぱく質2Aの関与

研究課題名(英文) Role of synaptic vesicle 2A protein to obtain epileptogenesis through neurogenesis in 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんの予防を目的にsynaptic vesicle protein 2A(SV2A)の影響を検証した。てんかん重積発作後にSV2Aと結合するlevetiracetam (LEV)を予防投与した際の新生神経細胞の発現を対照群と比較した。未治療群では海馬歯状回において新生細胞が増加したが、LEV群では有意に抑制されていた。パッチクランプによる検討の結果、早期に認められた新生神経細胞は易興奮性をもつ未熟なものであったが、重積後28日まで残存した細胞は成熟神経細胞と同等の興奮性を示した。これらより、LEVにより早期に出現する未熟な神経細胞を抑制することがてんかんの予防になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigate our hypothesis that inhibition of SV2A can stabilize the neurogenesis and consequently prevent the epileptogenesis. We evaluated an appearance and electrical characteristics of newborn cells in the hippocampus after initial seizure insult in this study. We counted and observed its morphology of newborn cells among Levetiracetam (LEV) (SV2A stabilizer) treatment and non-treatment groups. The number of newborn neurons in the LEV group was significantly less than that of the non-treatment group. Furthermore, LEV made normalized the cell appearance. In the results of patch-clamp method, early appeared newborn neurons were immature with easily excitable characteristics, however survived neuron for 28 days from initial seizure insult showed the same electrical characteristics as that of matured neuron. From these results, stabilization of SV2A after an initial incentive has a possibility to prevent inducing epileptogenicity through neurogenesis.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経細胞新生 海馬 てんかん SV2A

1. 研究開始当初の背景

軽微な脳への侵襲や初回けいれん発作が後のてんかんに進展する事が知られている。しかしながら、現在のてんかん治療ガイドラインではてんかん発作への予防的抗てんかん薬投与は推奨されてはいない。今後は、ただ単にてんかん発作を抑制するのではなく、てんかん原性を獲得させない治療、すなわちてんかんの予防治療が求められる。その為にはてんかん原性獲得のメカニズムを明らかにすることが必須である。

我々は海馬における新生神経細胞がてんかん発作を惹起している可能性について研究を行ってきた。その先行研究の結果からは、初回てんかん発作により海馬歯状回において神経細胞新生が惹起されるが、初期の未熟な神経細胞による興奮性と異常回路の形成がてんかん原性獲得機序の一つであることが考えられた。

一方、シナプス前膜のシナプス小胞に存在する Synaptic vesicle protein 2A (SV2A) は、シナプス間隙の神経伝達物質の調整を行う蛋白であり、SV2A のノックアウトマウスではてんかん発作が増強することが知られており、また SV2A の発現がてんかん発作後に海馬歯状回門で増強している事も報告されている。

それらより、初期てんかん発作時に SV2A を抑制することが未熟な神経細胞新生を抑え、てんかん原性獲得に至らしめない可能性が考えられた。

現在までてんかん原性解明のために積極的な研究がなされてきているが、神経細胞新生が SV2A を介して生じているという知見は多くない。てんかん原性獲得機序の一つでも解明出来れば、海馬に限らず他部位でのてんかん原性獲得の解明にも応用が可能になると思われる。また、既存の抗てんかん薬の作用機序である SV2A 抑制により予防的治療が可能になれば、てんかん患者の減少につながれると期待される。

2. 研究の目的

初回発作後に SV2A に結合をする levetiracetam (LEV) を投与する事で、未熟な神経細胞の新生を抑制できる可能性があり、そのことがてんかん原性獲得に抗するという仮説の元に、新生神経細胞の数と形状および機能について検討を行うことを本研究の目的とした。更には、新生細胞の特徴を免疫組織学的に検討することで、細胞新生のメカニズムを解明する一助にすることも目的の一つとした。

3. 研究の方法

- ① ピロカルピン腹腔内注入による側頭葉てんかんモデルを本研究に用いた。週齢

8週、体重 25g 前後のオス C57BL6J マウスにピロカルピンを腹腔内注射することでけいれん重積をおこさせ、ジアゼパムによる鎮痙後に LEV を 5 日間投与した群 (LEV 群) と生理食塩水を 5 日間投与した発作対象群を作成、さらには、ピロカルピンを使用しない非発作群で検討を行った。

- ② 新生細胞をマーキングする目的で、発作誘発 48 時間後に定位的手法を用いて海馬歯状回を穿刺し、レトロウィルスベクターを介し Green fluorescent protein (GFP) を導入した。

- ③ 発作後 7 日、14 日、28 日にマウスより脳を摘出し、冠状断スライスを作成した後に免疫組織染色を行い検討した。海馬歯状回を関心領域とし、GFP 陽性新生細胞の出現部位、細胞数、細胞の形状、突起の伸長および形態、免疫組織学的特徴を比較検討した。

- 1) 免疫組織染色に用いた抗体
 - A) doublecortin (DCX) : 未熟な神経細胞の検出
 - B) NeuN : 成熟神経細胞の検出
 - C) GFAP : Glia 細胞の検出
 - D) NG2 : Oligodendrocyte の検出
 - E) ssDNA : アポトーシスの検出

- 2) 新生神経細胞の細胞数計測
歯状回を顆粒細胞層および下顆粒層 (Granular cell layer/ subgranular cell zone: GCL/SGZ) と海馬門 (hilus) に分けて計測を行った。GFP と DCX に共陽性を示した細胞を未熟新生神経細胞とし、GFP と NeuN に染色される細胞を成熟新生神経細胞と判断した。また、GFP と NG2 に共陽性所見を示す細胞を Oligodendrocyte 前駆細胞 (OPC) と考えた。一頭につき 20 の冠状断スライスを用いて細胞数を計測し、ANOVA より各群の比較を行った。P<0.05 を統計学的に有意とした。

- ④ 発作後 7 日、14 日、28 日の時点で摘出した海馬スライス (300 μm) において、海馬内 GFP 陽性新生神経細胞をパッチクランプ法にて静止膜電位 (RMP) および細胞膜抵抗 (IR) を測定した。また、電気刺激に対する神経細胞細胞の発火形態を観察した。

4. 研究成果

① 新生神経細胞の細胞数計測

非発作群と比較して、発作対照群では GCL/SGZ と hilus において GFP/DCX 陽性細胞数はいずれも有意に増加していた。LEV 群では発作対照群と比較して有意に GFP 陽性細胞数が減少していた。LEV 群は非発作群よりも新生細胞数は増加したが、両者の間に有意差はみられなかった (図 1)。また、これらの新生神経細胞は SE からの日数に従い有意に減少した。発作後 28 日まで残存した神経細胞は DCX には陰性で、NeuN に陽性となり成熟神経細胞に分化していることが考えられた。

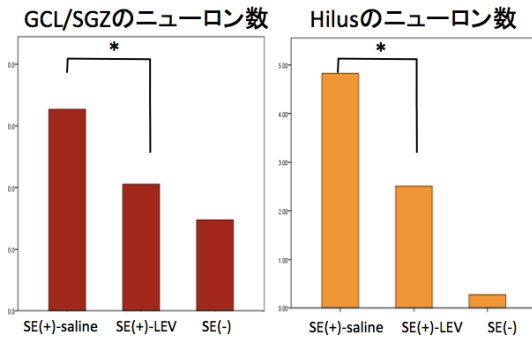


図 1 : 海馬歯状回における新生神経細胞数
14 日目における計測で、LEV 群では、発作対照群に比べ、有意に新生神経細胞の抑制が見られた。SE (+)-saline: 発作対照群、SE (+)-LEV: LEV 群、SE (-): 非発作群

② 新生神経細胞の形態学的考察

GCL/SGZ において、発作対照群の新生細胞は非発作群と比較し、細胞体の大きさが不整であり、特に巨大な細胞体を有する神経細胞が多く見られた。Hilus にも新生神経細胞が散在しており、dispersion とよばれる初期の海馬硬化症に見られる病理所見に類似していた。また、非発作群においては新生神経細胞の突起は細胞体から GCL 内へほぼ垂直に伸展するのに対し、発作対照群では著しく蛇行または SGZ と平行に伸びているものも見られ、神経細胞と突起の異形成が確認できた。

これに対し LEV 群では、非発作群とほぼ同様の形態を維持しており、GCL/SGZ にほぼ均一に同程度の細胞体の大きさを持つ新生神経細胞が並び、GCL 内にまっすぐ突起を伸ばしている形態が観察された (図 2)。Hilus においては散在する新生神経細胞も見られたが、発作対照群に比べ、細胞数は有意に減少していた。

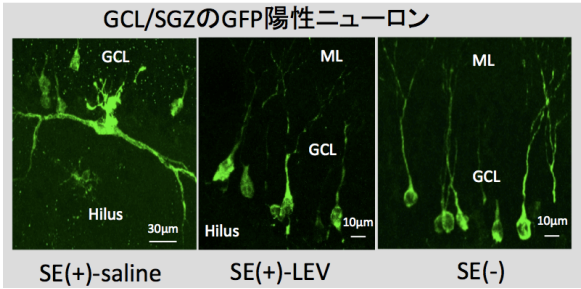


図 2 : GCL/SGZ の GFP 陽性新生神経細胞の形態

発作対照群では大小様々の細胞体をもつ新生神経細胞が見られ、不規則が突起を伸ばしていたのに対し、LEV 群は非発作対照群と同様に均一した神経細胞が並び、GCL に向かい垂直に伸びる突起を認めた。

SE (+)-saline: 発作対照群、SE (+)-LEV: LEV 群、SE (-): 非発作群

③ オリゴデンドロサイト前駆細胞の観察と計測

発作対照群の歯状回には典型的な新生神経細胞の他に、放射状の線維を持つ GFP 陽性細胞が観察された。これらは DCX や GFAP には共染色を示さず、NG2 に共陽性となった。このことより、放射状突起の NG2 陽性新生細胞は幼若なオリゴデンドロサイト前駆細胞 oligodendrocyte precursor cell (OPC) と判断した (図 3)。

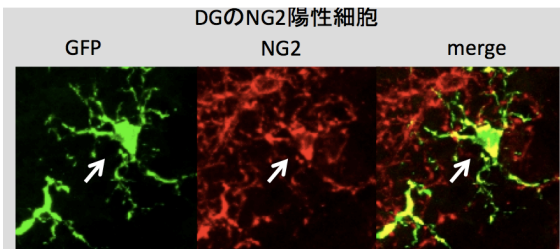


図 3 : Oligodendrocyte precursor cell (OPC) の形態

発作対照群において、GCL/SGZ および Hilus に NG2 陽性 OPC が見られ、放射状の突起を有していた。この細胞は GFAP 陰性、DCX 陰性であった。

発作対照群において、OPC は GCL/SGZ、hilus のいずれにも存在していたが、非発作群ではいずれの部位にも少数見られるのみだった。このことより、OPC がてんかん発作の重症度やてんかん原性獲得に何らかの影響を有しているのではないかと推察された。

LEV 群においても発現が認められたが、その細胞数は発作対照群のものと比較して有意に少なく、非発作対照群と比較すると統計学的有意差がないものであった (図 4)。

GFP/DCX に染色される新生神経細胞と GFP/NG2 に染色される OPC を合わせた新生細胞数を図 4 に示す。各々の計測と同様に発作

対照群では新生細胞数が増加をするのに対し、新生神経細胞も OPC も LEV 群では非発作対照群と同程度で抑制されていることが分かる。

このことより LEV は未熟な神経細胞および OPC の新生を抑制していることが示された。

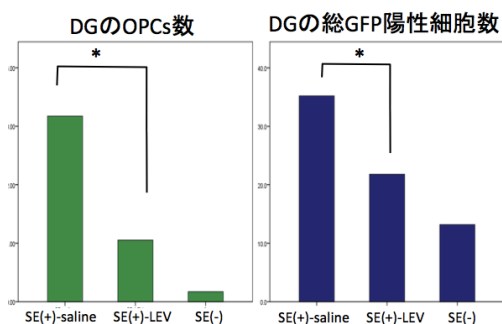


図4: DGのOPC数と総GFP陽性細胞数
左にGCL/SGZとHilusにおける(DG)新生OPCの細胞数を示す。14日目における計測で、発作対照群で見られた細胞数の増加がLEV群では抑制されていた。また、DGでのGFP陽性細胞全体においても同等の傾向が認められた。SE(+)-saline: 発作対照群、SE(+)-LEV: LEV群、SE(-): 非発作群

④ 海馬のパッチクランプ

新生された神経細胞は、SE後28日までに徐々に脱落をした。7日および14日で認められていたGFP陽性神経細胞はssDNA陰性、NeuN陰性であったのに対し、28日で見られたGFP陽性神経細胞はssDNA陰性、NeuN陽性であった。これらより28日まで残存した新生細胞はより成熟神経細胞に類似した形態を有していることが示された。

パッチクランプによる検討において、7日目に見られたGFP陽性神経細胞のRMP、IRは各々-55mV~-70mV、1.2GΩ~2.0GΩであるのに対し、28日目のものは-70mV~-80mV、300MΩ~1000MΩであった。刺激電極からの電気刺激に対し、7日目および14日目のGFP陽性細胞は単発または稀発の発火を示したのに対し、28日目まで残存したGFP陽性細胞は、正常対照群と類似する成熟した神経発火パターンを示した(図5)。

これらの所見より、新生神経細胞は成熟過程でアポトーシスにより脱落し、残存した神経細胞は形態学的にも電気生理学的にも成熟していくことが考えられた。一方、14日目までに見られた神経細胞は未熟であり、より強い興奮性を有していると言える。一過性の興奮によりてんかん発作を惹起し、その後脱落すると考えられた。

⑤ まとめ

SV2Aの抑制(LEV)は14日目までの未熟な新生細胞の新生を抑制していると思われ、てんかん原性の獲得抑制に関与していることが示唆された。

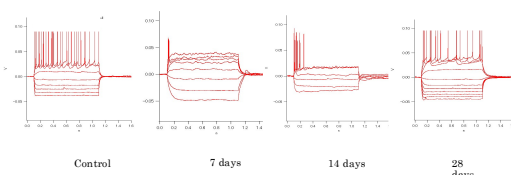


図5. パッチクランプ

7日目および14日目に観察された新生神経細胞は誘発電気刺激に対し稀発の発火パターンを示すのに対し、28日目まで残存した神経細胞は正常コントロールと類似した発火パターンを示した。

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3件)

- 1) Sugano H, Nakanishi H, Nakajima M, Higo T, Iimura Y, Tanaka K, Hosozawa M, Nijima S, Arai H. Posterior quadrant disconnection surgery for Sturge-Weber syndrome. : *Epilepsia* 55, 2015, 683-689(査読有り) DOI: 10.1111/epi.12547
- 2) Nakajima M, Sugano H, Iimura Y, Higo T, Nakanishi H, Shimoji K, Karagiozov K, Miyajima M, Arai H. Sturge-Weber syndrome with spontaneous intracerebral hemorrhage in childhood. : *J Neurosurg Pediat.* 13, 2014, 90-93 (査読有り) DOI: 10.3171/2013.9.PEDS133
- 3) Nakashima M, Miyajima M, Sugano H, Iimura Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitus H, Arai H, Matsumoto N. The somatic GNAQ mutation c.548G>A (p.R183Q) is consistently found in Sturge-Weber syndrome. : *J Hum Genet.* 59, 2014, 691-693 (査読有り) DOI: 10.1038/jhg2014.95

[学会発表] (計6件)

- 1) 菅野秀宣、肥後拓磨、中島円、飯村康司、新井一、レベチラセタムが側頭葉てんかんモデルマウスの海馬歯状回における病理学変化に与える影響について。第38回日本てんかん外科学会、2015.1.15-1.16, 東京
- 2) Sugano H, Higo T, Nakajima M, Iimura Y, Arai H. Preventive treatment with levetiracetam on hippocampal

dentate gyrus in mouse model of temporal lobe epilepsy. 68th Annual meeting of American Epilepsy Society. 2014. 12. 8, Seattle.

- 3) 菅野秀宣、肥後拓磨、中島 円、飯村康司、新井 一、レベチラセタムが側頭葉てんかんモデルマウスの海馬歯状回における病理学的変化に与える影響. 第73 回日本脳神経外科学会学術集会, 2014. 10. 9 東京
- 4) 菅野秀宣、肥後拓磨、中島円、飯村康司、新井一、levetiracetam の予防的投与がてんかんモデルマウスの海馬歯状回に及ぼす影響について. 第48 回日本てんかん学会, 2014. 10. 2-10. 3, 東京
- 5) Sugano H, Nakajima M, Higo T, Arai H, Preventive effect with levetiracetam against the pathological changes in hippocampus of temporal lobe epilepsy model mouse. 10th Asian & Oceanian Epilepsy Congress, 2014. 8. 7-10, Singapore.
- 6) 菅野秀宣、中島円、肥後拓磨、新井一、レベチラセタムが側頭葉てんかんモデルマウスの海馬歯状回における病理学変化に与える影響について. 第47 回日本てんかん学会, 2013. 10. 1 東京

[その他]

ホームページ等

順天堂大学医学部附属順天堂医院 てんかんセンター、
<http://www.juntendo.ac.jp/hospital/epilepsy/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

中島 円 (NAKAJIMA Madoka)

順天堂大学医学部 准教授

研究者番号：50317450

新井 一 (ARAI Hajime)

順天堂大学医学部 教授

研究者番号：70167229

西村 欣也 (NISHIMURA Kinya)

順天堂大学医学部 教授

研究者番号：80164581