

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18781

研究課題名(和文) てんかんモデルラットの海馬に生じる異所性顆粒細胞の形成機序に関する病理学的研究

研究課題名(英文) Pathological study on the formation of ectopic granule cells in the hippocampus of rat model of epilepsy

研究代表者

櫻井 優 (SAKURAI, Masashi)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：00747967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん患者の海馬には異所性顆粒細胞が形成されることが知られ、この異所性顆粒細胞による異常な神経ネットワークの形成が、てんかんの発症および病態の悪化に関連すると考えられている。しかし、異所性顆粒細胞の形成機序はよくわかっていない。本研究では異所性顆粒細胞における細胞死、およびグリア細胞と異所性顆粒細胞形成の関連性に注目し、ピロカルピン投与てんかんモデルラットの脳を免疫組織学的に解析した。その結果、異所性顆粒細胞の形成には、ミクログリアが活性化および未成熟神経細胞におけるSurvivin発現が重要な役割を持つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Ectopic granule cells, which is observed in the hilus of the hippocampus, is considered to relate the epileptogenesis or progression of epileptic signs due to the formation of aberrant neural network. However, the mechanisms of ectopic granule cell formation are not well known. In this study, we immunohistochemically examined the brain of pilocarpine-treated rat of epilepsy model. From our results, it is suggested that microglial activation and survivin expression in the immature neurons are involved in the mechanisms of ectopic granule cell formation.

研究分野：獣医病理

キーワード：神経病理 脳 てんかん 海馬

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、その病理発生に不明な点が多く未だ根本的治療のない脳疾患である。近年、てんかんの脳では海馬歯状回に生じる神経新生に異常が生じることが明らかとなった。また、この異常な神経新生の際には、本来海馬歯状回に遊走すべき未成熟神経細胞が、海馬門部へ遊走し、異所性顆粒細胞を形成することが知られている。この異所性顆粒細胞は異常な神経ネットワークの構築に関連すると考えられており、異所性顆粒細胞がてんかんの発症および病態の悪化に深く関わることが示唆されている。しかし、異所性顆粒細胞の形成機序はよくわかっていない。異所性顆粒細胞の形成機序を検討することは、てんかんの病理発生への理解を深め、てんかんの治療につながる重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、異所性顆粒細胞の形成機序の解明を目的とし、特に、異所性顆粒細胞におけるアポトーシスおよびアポトーシス抑制因子の発現、グリア細胞と異所性顆粒細胞形成の関連性の2点に注目した。これらの点に注目し、ピロカルピン投与てんかんモデルラットの脳(海馬)を詳細に解析した。

では、てんかんモデルにおいて活性化する海馬の神経新生において、アポトーシスが生じるか否かを検討する。また、神経細胞は発生過程(分化、遊走、神経ネットワークの形成など)に異常が生じた場合アポトーシスにより死滅することが知られている。しかし、異所性顆粒細胞は遊走および神経ネットワーク形成に異常を伴うにも関わらず残存する。このため異所性顆粒細胞におけるアポトーシス抑制機構の有無について検討を行った。

では、てんかんの海馬に生じることがよく知られるグリア細胞の活性化が異所性顆粒細胞の形成に与える影響を評価した。特に本研究では、ミクログリアの活性化に注目し、ミクログリアの活性化を抑制する薬剤であるミノサイクリンを投与したてんかんモデルを作製し、詳細にその脳を解析した。

3. 研究の方法

ピロカルピンを投与し発作を誘発したてんかんモデルラット(Pilo群)を作成した。また、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンを投与した群(Pilo-Mino群)を作成した。Pilo-Mino群では、発作誘発後からサンプリングまで連日ミノサイクリンの投与を行った。発作誘発後7日間BrdUを投与し新生細胞を標識した後、発作誘発7日後および14日後に脳を採材した。定法に従いサンプルのパラフィン切片を作成し、主に免疫組織学的手法を用いて検索を実施した。

4. 研究成果

(1) 発作により誘発される異常な神経新生における細胞死の検討

ラットにピロカルピンを投与し、発作を誘発した後にBrdUを7日間投与することでこの期間に産生される新生細胞を標識した。発作誘発7日後および14日後の脳を採材し、海馬に見られるBrdU陽性新生細胞の数を検討したところ、発作誘発7日後から14日後にかけて新生細胞は平均6割程度に減数していた(図1)。このため、発作により活発な神経新生が海馬に誘発される一方で、多くの新生細胞が死滅していることが示唆された。細胞死の際に見られる核濃縮を示す細胞や、免疫組織学的にssDNAに陽性を示す細胞が少数確認された。また、蛍光標識二重染色により、アポトーシスの指標となるCleaved caspase-3に陽性を示すBrdU陽性新生細胞が見られることから、アポトーシスによる細胞死が生じていると考えられた。

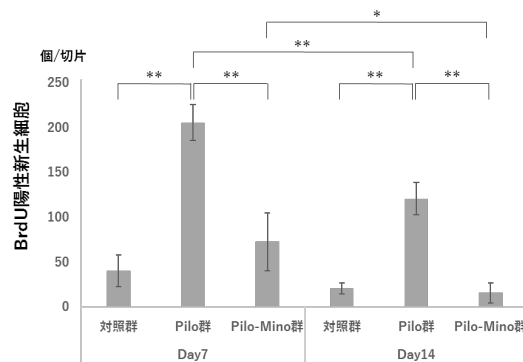


図1 発作誘発後7日および14日後のBrdU陽性新生細胞数

(2) アポトーシス阻害タンパク質の発現検討

免疫組織学的に、アポトーシス阻害タンパク質の1つであるSurvivinについて検討した。Survivinは対照群およびPilo群の海馬歯状回を構成する顆粒細胞に発現していた。加えて、未成熟神経細胞のマーカーであるDoublecortinとの蛍光標識二重染色を行うと、Doublecortin陽性細胞のなかにSurvivinを発現するものが見られた(図2)。未成熟神経細胞におけるSurvivin発現を発現する細胞の割合を検討したところ、対照群に対しPilo群において有意な増加が認められた(図4)。また、海馬門部に遊走する未成熟神経細胞、および異所性顆粒細胞にSurvivinを発現するものが確認された(図3)。このため、Survivinを発現した未成熟神経細胞がアポトーシスを免れ、異所性顆粒細胞を形成すると考えられた。

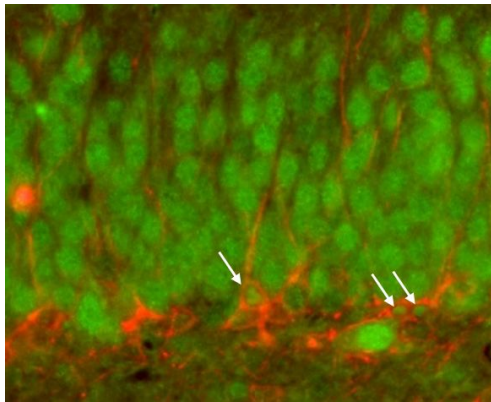


図 2 Pilo 群 (Day14) の海馬歯状回の二重免疫染色像 (赤: Doublecortin、緑: Survivin)。矢印は両陽性細胞を示す。

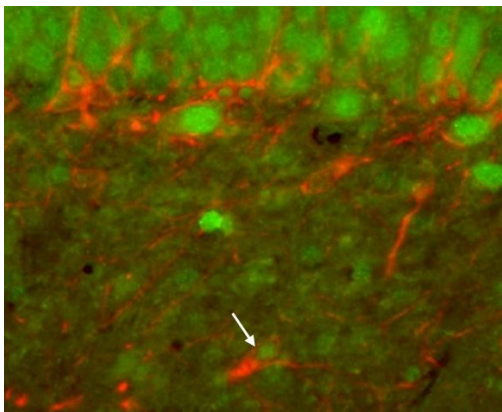


図 3 図 2 の下方 (海馬門部)。両陽性細胞が認められる (矢印)。

(3) ミクログリアの活性化と異所性顆粒細胞形成の検討

てんかん患者の海馬では、グリア細胞の 1 つであるミクログリアの活性化が生じることが知られている。ミクログリアの活性化が異所性顆粒細胞の形成に与える影響を検討するため、ピロカルピン投与てんかんモデルに、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリンを連日投与した Pilo-MI の群を作製し、1) および 2) と同様の検討を行った。また、ミクログリアマーカーである Iba-1 の免疫染色を行い、ミクログリアの数および形態からミクログリアの活性を評価した。

Iba-1 免疫染色の結果、Pilo 群にみられるミクログリアは、多くが腫大した細胞質と突起を有する活性型の形態であったのに対し、Pilo-Mino 群には細胞質に乏しく突起の細い非活性型のミクログリアが多く見られた。また、Pilo 群に対し、Pilo-Mino 群にみられるミクログリアの数は減少傾向を示し、ミノサイクリンによりミクログリアの活性化が抑制されていることが示唆された。

BrdU 陽性新生細胞数は、発作誘発 7 日後および 14 日後のいずれにおいても、Pilo 群に対し Pilo-Mino 群では有意に減少していた (図 1)。また、Pilo-Mino 群では 7 日後から

14 日後にかけて BrdU 陽性細胞が平均 2 割程度に減数しており、Pilo 群より多くの新生細胞が死滅することが示唆された。

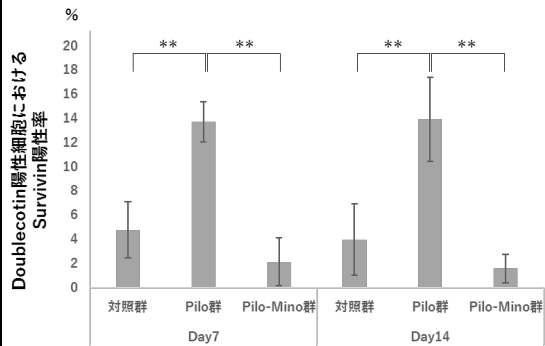


図 4 未成熟神経細胞における Survivin 発現細胞の割合

Survivin を発現する Doublecortin 陽性未成熟神経細胞は、Pilo-Mino 群では Pilo 群より有意に少なく、対照群と同程度の割合であった (図 4)。また、異所性顆粒細胞数は、発作誘発 14 後において減少傾向がみられた。

以上より、ピロカルピン投与てんかんモデルラットにおいて、ミクログリアの活性化が異所性顆粒細胞の形成に關与する可能性、およびその背景に未成熟神経細胞における Survivin の発現が關連することが示唆された。

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 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* (査読有). 38(2):pp135-143, 2018

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 櫻井 優, 坂井 祐介, 森本 将弘, リチウム-ピロカルピンてんかんモデルラットの異常な海馬の神経新生における細胞死と細胞生存についての検討 (演題番号: P-1-F10), 第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2017 年、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

櫻井 優 (SAKURAI Masashi)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号： 00747967

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()