

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15644

研究課題名(和文) 笑い発作に伴うてんかん性脳症の動物モデル 光遺伝学を用いた異常波伝搬経路の検証

研究課題名(英文) Animal model of cognitive impairments following gelastic seizures with the use of optogenetics

研究代表者

長谷川 功 (Hasegawa, Isao)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60282620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：外側視床下部からChR2をウイルス導入してChR2発現が認められる視床背内側核と外側手綱核の軸索終末部を80Hzの青色光で経路特異的に光刺激すると、 \sim 帯域および帯域パワーの一過性の増強とそれに続く抑制が誘導された。光刺激は視覚弁別課題の成績には有意な影響を及ぼさなかったが、空間作業記憶課題の手がかり呈示中に光刺激を行うと成績が顕著に低下した。遅延期間中の光刺激では行動への影響は弱かった。以上より、外側視床下部-視床背内側核/外側手綱核経路の過興奮とそれに続く抑制により認知機能障害がもたらされることがわかり、この系は視床下部過誤腫てんかん後の脳症の動物モデルとして適切と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We introduced ChR2 into lateral hypothalamus using AAV9 viral vectors, and photostimulated ChR2-expressing axonal terminals in the dorsomedial and lateral habenular nuclei in the thalamus at 80 Hz when the rats conducted a spatial working memory and control visual discrimination tasks. The pathway-specific photostimulation induced transient increases and late suppression of \sim and powers, and induced working memory task-specific behavioral impairments when stimulation was applied during the cue-presenting period, but not during the delay period. These results demonstrated the feasibility of pathway-specific photostimulation in mimicking post-epileptic neural circuit changes, indicating that transient hyperactivation and subsequent suppression of the hypothalamus-dorsal thalamic pathway plays a role in cognitive impairments following gelastic seizures.

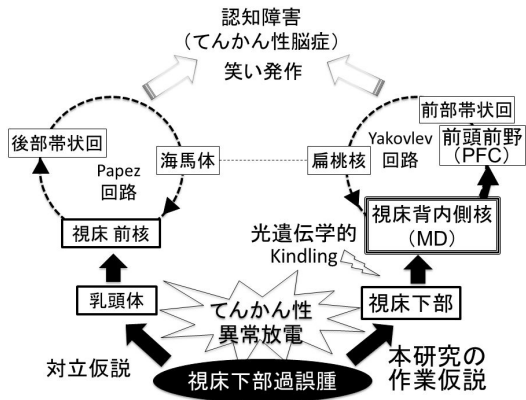
研究分野：神経生理学

キーワード：笑い発作 てんかん性脳症 視床下部 視床 光遺伝学 チャネルロドプシン 作業記憶

1. 研究開始当初の背景

胎生期に視床下部に生じた過誤腫は、楽しい感情を伴わない強制的な“笑い”発作を特徴とする薬剤抵抗性のてんかんを誘発し、脳の形成異常や「てんかん性脳症」とよばれる緩徐進行性の認知機能障害を高率に合併する。視床下部過誤腫の治療法確立と、てんかん性脳症の進行予防は、患者の予後/社会適応を左右する重大な問題であるが、てんかん発作時/発作間欠期の異常神経興奮がどのようにして認知機能の障害をきたすかの脳回路レベルの病態機序と、これと密接に関連した術式の選択をめぐる論争が未だに決着していない。

視床下部過誤腫てんかんの発作時に、視床背内側核 (MD) に限局した SPECT の賦活が認められることから、連携研究者の亀山らは MD を要する Yakoblev 回路 (下図右) の関与を重視 (Kameyama et al *Epilepsia* 2010) し、過誤腫の視床下部正常組織への付着部位を定位温熱凝固する手術方式で良好な発作制御成績と術後の認知機能改善を報告してい



る (Kameyama et al *Neurosurgery* 2009)。一方、米国の Kerrigan らは、異常波が過誤腫から乳頭体、視床前核を経て辺縁系に伝わる Papez の回路を責任回路と位置づけ (下図左)、乳頭体との近接部を含む過誤腫の開頭摘出術を志向している (Parvizi et al *Brain* 2012)。しかし後者の術式は侵襲性が高い割に発作制御率や記憶障害の改善率が必ずしも十分でない。本研究では、亀山の説を拡張して「視床下部から MD を経て前頭前野 PFC に至る経路を異常波が伝わり、正常な神経活動が障害されると、認知機能が低下する」という作業仮説を立て、ラット動物モデルの作成により、行動学的・電気生理学的な仮説検証を目指した。

2. 研究の目的

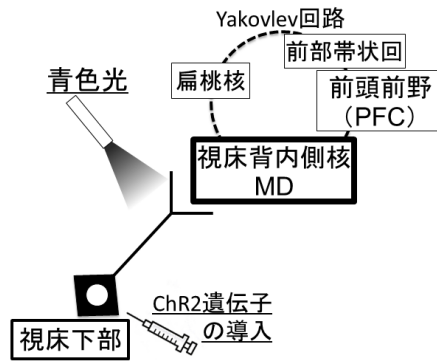
作業仮説に従って、視床下部過誤腫てんかん後の脳症のラット動物モデルを開発することを目標とした。具体的には、光遺伝学的手法によりラット視床下部-MD 間の経路特異的な興奮刺激を反復し、MD と PFC において刺激後異常神経発火や自発的異常発火の誘導を試み、また覚醒頭部固定下のラット慢性標本において典型的な前頭葉機能である

空間作業記憶の行動成績を調べるための課題を開発した。

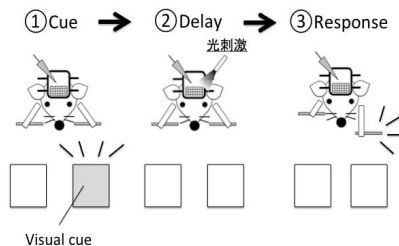
この動物モデルを用いて、前頭葉機能の行動学的解析と、PFC・MD の神経活動の電気生理学的解析を進め、視床下部過誤腫に伴うてんかん性脳症の責任脳回路を同定することを旨とした。

3. 研究の方法

神経回路特異的刺激を行うため、『光遺伝学』の手法 (Tye & Deisseroth *Nat Rev Neurosci* 2012) を導入した。すなわち、光照射により細胞を脱分極する膜タンパクのチャンネルロドプシン ChR2 と enhanced GFP (e-GFP) を含む遺伝子コンストラクトを連携研究協力者の岡戸が作成してアデノ随伴ウイルス



AAV9 に挿入し、このウイルスベクターを連携研究者の戸田と研究協力者園田らが視床下部外側に注入して神経細胞に遺伝子導入させた。この手法を用いて、MD 核近傍の視床背側部に青色光の光刺激を与えると、ChR2 注入部位 (視床下部) と光刺激部位 (MD) を結ぶ経路だけを特異的に刺激することが可能となり、光刺激自体が電気的アーチファクトに直結することもない。ウイルス注入の 3 週間後に、MD に微小電極付き光ファイバ (オプトロード) を慢性留置し、てんかん誘発閾値以下の一定条件で、毎日 1-2 回青色光による 80Hz 刺激をおこない、刺激後 30 分間の行動観察と脳活動記録を併せておこなった。電気生理学的には、MD に刺入したオプトロードと PFC の脳表部に留置した ECoG 電極から、刺激後 30 分間に記録される活動電位および電場電位 local field potentials を解析した。



また、園田らが中心となり、頭部固定下のラットを対象として、視覚的な手掛かりを 1 秒間与え、その側のレバーを引くと報酬が得

られる視覚弁別課題と、数秒間の遅延期間の後に手掛かりの側のレバーを引くと報酬がもらえる空間作業記憶課題を開発した。

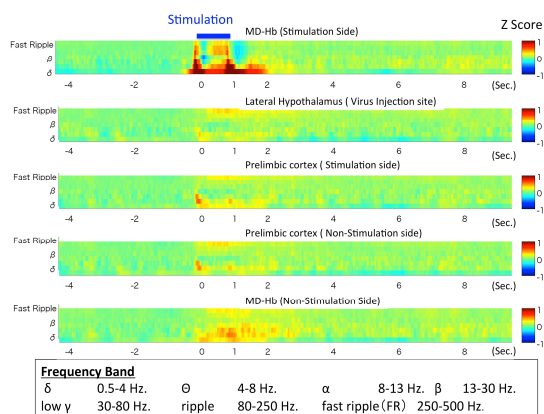
これらの課題を訓練した慢性動物標本に対して ChR2 の注入手術を施し、回復期間を経て経路特異的 ChR2 光刺激をおこなって、課題の成績がどのように変化するかを行動学的に解析した。

実験終了後には、連携研究者の目黒と園田が、視床下部のウイルス注入部位および視床の投射先部位を免疫組織学的手法により同定した。

4. 研究成果

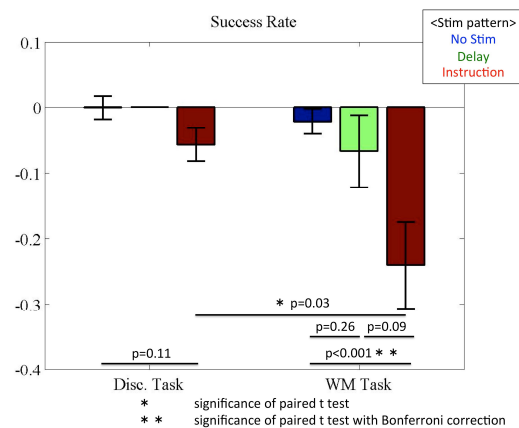
初年度に、MD から逆行性に細胞体が標識される視床下部の部位 と、MD から順行性投射を受ける PFC の部位を、園田、目黒らが組織学的に同定した。ChR2 と GFP を含む遺伝子コンストラクトを作成してアデノ随伴ウイルス AAV9 に挿入し、で同定した視床下部の領域に脳定位的に注入し、ウイルス注入 3 週間以後に、MD にオプトロードを慢性留置し、青色光刺激を行った。実験開始から約 2 週間後に、MD と PFC で刺激後異常発火や、自発的異常発火が認められることを明らかにした。行動学的には、ラットが喜ぶ際に出す高周波の鳴き声が観測され、また髭の非定型的な動きが誘発されることがあるようになった。また、園田が作業記憶課題のシステムを開発し、覚醒動物の行動訓練を開始した。

二年度目には、外側視床下部に ChR2 を、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて注入し、リポーター蛋白である GFP の分布を免疫組織学的手法で確認したところ、視床では主に順行性に、背内側核に加えて外側手綱核の軸索終末にも GFP 発現が認められた。この手法を利用し、覚醒頭部固定下における視覚弁別課題および空間作業記憶課題を訓練した 5 頭のラットにおいて外側視床下部から ChR2 を導入して、視床の背内側核/外側手綱核を 80Hz のレーザー光で刺激（経路特異的光刺激）することによる課題成績の変化を行動学的に解析するとともに、視床・大脳皮質における神経活動（電場電位）の変化に関する電



気生理学的解析を進めた。電気生理学的解析の結果、外側視床下部-視床背内側核/外側手綱核経路の 80Hz 刺激により、低周波（ δ ）帯域および高周波（ β ）帯域パワーの一過性の増強とそれに続く抑制が誘導されることがわかった。

行動解析の結果、光刺激は視覚弁別課題（図左・Disc Task）の成績には有意な影響を及ぼさなかったが、空間作業記憶課題（図右・WM Task）においては、左右の手がかり視覚呈示期間に光遺伝学的刺激を行うと、遅延期間の長さに関わらず成績が低下した（茶色）。遅延期間の最中に光刺激を行った場合、行動学的効果は弱かった（緑）。



つまり、外側視床下部-視床背内側核/外側手綱核経路の 80Hz 刺激は経路特異的過興奮とそれに続く抑制を誘導し、この抑制が作業記憶課題の記憶期間に生じたときに特異的に顕著な成績変化をもたらした。

以上の結果から、視床下部過誤腫によるてんかん性脳症においては、外側視床下部-視床背内側核/外側手綱核経路の過興奮とその後の抑制により認知機能障害がもたらされるという病態メカニズムが重要であり、本研究の開発した経路特異的光賦活は視床下部過誤腫てんかんの脳回路病態を検討する動物モデルとして適切なことが示唆された。

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 2 件)

Toda H, Kawasaki K, Sato S, Horie M, Nakahara K, Bepari AK, Sawahata H, Suzuki T, Okado H, Takebayashi H, Hasegawa I. Locally induced neuronal synchrony precisely propagates to specific cortical areas without rhythm distortion. *Scientific Reports*, doi:10.1038/s41598-018-26054-8, 2018

Sonoda M, Masuda H, Shirozu H, Ito Y, Akazawa K, Asano E, Kameyama S.

Predictors of cognitive function in patients with hypothalamic hamartoma following stereotactic radiofrequency thermocoagulation surgery. *Epilepsia*, 58, 1556-65, 2017.

〔学会発表〕(計 1 件)

Sonoda M, Masuda H, Shirozu H, Ito Y, Akazawa K, Kameyama S

Predictive analysis of perioperative cognitive function in patients with hypothalamic hamartoma, who underwent surgery of stereotactic radiofrequency thermocoagulation. The 11th Asian & Oceanian Epilepsy Congress 2017

〔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

長谷川 功 (新潟大学・研究統括)

研究者番号：60282620

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

岡戸 晴生 (東京都医学総合研究所・ウイルズベクターの開発)

研究者番号：60221842

目黒 玲子 (新潟大学・組織学的検証の監修)

研究者番号：30251804

戸田 春男 (新潟医療福祉大学・動物の手

術と電気生理実験の監修)

研究者番号：10217505

亀山 茂樹 (西新潟中央病院・仮説のブラシュアップ)

研究者番号：60221842

(4)研究協力者

園田真樹 (新潟大学・行動課題の開発と慢性行動/電気生理実験の実施)