

令和元年6月18日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16624

研究課題名(和文) GABAニューロンの細胞動態に基づいたグリオーマ由来てんかんの新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of newly therapeutic method for glioma associated epilepsy based on cellular dynamics of GABAergic neuron

研究代表者

飯島 圭哉 (Iijima, Keiya)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・病院・医員

研究者番号：10751878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性神経細胞に特異的蛍光標識を遺伝子導入したVGAT-venus transgenic ratにtdTomatoで赤色の蛍光標識を施したC6グリオーマ細胞を移植するモデルを確立した。特に視床内の唯一の抑制性神経細胞の集まりであるthalamo-reticular nucleusに腫瘍を浸潤させるモデルを確立することができた。MRIを併用することで、実験の効率を高めることができた。immediately early geneであるc-FOSをの免疫染色を用いて、神経細胞の興奮性の評価に用いた。この方法により、腫瘍細胞周囲における抑制性神経細胞と興奮性神経細胞の興奮状態を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳腫瘍に伴うてんかんは、患者の生活の質を著しく下げる要因であるが、その病態生理は明らかになっておらず、治療に難渋することが多い。本研究では、脳腫瘍の周囲における抑制性ニューロンの細胞動態を明らかにすることができた。この知見は、今後、脳腫瘍に伴うてんかんに対する新規治療薬の開発に応用することができる。これにより、脳腫瘍関連てんかんの患者のQOLの向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We established brain tumor xenograft model using VGAT-venus transgenic rat and C6 glioma cell line that is fluorescent labelled with td-Tomato. model. Tumor cells were transplanted in thalamus selectively for analyses of GABA neuron dynamics in thalamo-reticular nucleus when tumor cells invade. We increased efficiency of experiment using MRI. We analysed excitability of inhibitory neurons and excitatory neurons using immunohistochemistry of anti c-FOS antibody.

研究分野：脳腫瘍関連てんかん

キーワード：てんかん 脳腫瘍 GABA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリオーマに代表される悪性脳腫瘍によるてんかん発作(症候性てんかん)の症状は痙攣発作であり、多くの患者は突然の四肢の痙攣を起こして意識を失う発作に悩まされ、生活の質が大きく低下する要因となっている。しかし、悪性脳腫瘍がてんかんを誘発する理由は未だ明らかにされておらず、その治療も困難である。

過去の基礎研究によれば、ラット由来グリオーマ C6 をラット脳へ移植することにより作製した脳腫瘍モデルにおいて、脳腫瘍周囲領域における興奮性ニューロンの異常発火が確認されている(Kohling et al, Neurobiol Dis, 2006)。このことから、申請者が実臨床で経験した病態が実験動物で再現できると考えた。一方で、悪性脳腫瘍が興奮性ニューロンを過剰興奮させるメカニズムは依然として不明である。

抑制性ニューロンは、興奮性ニューロンと比べて、低酸素状態に対して脆弱であることが、脳虚血モデル動物を用いた研究により明らかにされている(Sloper et al, Brain Res, 1980)。そこで申請者は、「脳腫瘍の周囲の環境下においても抑制性ニューロンは障害を受けやすいのではないかと」と考えるに至った。すなわち、「悪性脳腫瘍の周囲に存在する抑制性ニューロン(GABAニューロン)は容易に障害されてしまい、その結果として興奮性ニューロンが異常発火状態に陥る」と考え、この病態こそがてんかん原性発現のメカニズムであるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

申請者は近年、脳深部に発生した脳腫瘍(悪性グリオーマ)の周囲領域において、神経細胞が異常発火(burst 放電)していることを発見し、脳腫瘍コアを採取する際の重要な指標になることを報告した(Iijima et al, J Neurosurg, 2015; 図1)。申請者の臨床経験から、このような神経細胞の異常発火状態こそが、てんかん発作の誘因であると考えに至り、脳腫瘍による症候性てんかんの発生に強く寄与しているのではないかと推察した。この臨床研究において得られた興味深い知見として、異常発火部位の背景電位はむしろ正常部位よりも低下していること、および、異常発火部位は脳腫瘍からわずかに離れた部位に存在することが挙げられる。過去の基礎研究で示唆されている「興奮性ニューロンの機能亢進」だけでは、申請者が実臨床で経験した背景電位の低下を説明することができない。そこで申請者は、「腫瘍周囲では抑制性ニューロンが障害されるために、興奮性ニューロンが見かけ上の過剰発火状態になっている」という着想に至った。

この仮説を検証するために以下の3つの項目を掲げた。

- (1) 実験動物(ラット)の脳深部にC6グリオーマを移植することで脳深部腫瘍モデルを作製し、腫瘍周辺領域における神経細胞の興奮性を評価する。
- (2) 上記のモデル動物を使用し、腫瘍周辺領域におけるGABAニューロンの形態変化について評価する。
- (3) グリオーマ細胞とGABAニューロンの細胞間相互作用について、培養細胞を用いたin vitro 解析を行う

本研究の目的は、脳腫瘍によるてんかん原性の発生に関わる抑制性ニューロンの役割を明確にすることである。申請者が本研究について学内でプレゼンを行ったところ、研究協力者である柳川右千夫教授(群馬大学遺伝発達行動学分野)から学術的支援を得ることができ、実験に利用できる遺伝子改変動物を提供していただけることになった。

GABAは代表的な抑制性神経伝達物質であるが、GABAやGABA合成酵素といったGABA神経特異的に発現するタンパク質を認識する抗体は免疫反応特異性が著しく悪いことが知られており、研究を困難なものにしていた。協力研究者である柳川は、GABA神経特異的に発現するタンパク質を標的とした遺伝子改変動物(マウスおよびラット)を開発し、てんかんの病態解明とそれから波及する治療法に関する研究に大きく貢献してきた。GABAニューロン特異的に黄色蛍光を発するラット(VGAT-venus transgenic rat)およびGABA合成酵素であるGAD65を特異的に欠損するラットを既に繁殖・維持しており、本研究ではこれら遺伝子改変ラットを使用することで、極めて新規性の高い研究を行うことが可能である。

3. 研究の方法

脳深部腫瘍モデルの開発

過去の報告(Kohling et al, Neurobiol Dis, 2006)の手法を参考にし、C6グリオーマ細胞を野生型ラットの視床へ移植して脳深部腫瘍モデルを作製した。移植後の腫瘍のサイズは小動物用MRI装置によりin vivoで継続的に観察し、適切なサイズまで生育した段階で解析に供した。偽手術群(対照群)として、細胞培養液のみを同様に処置したラットを作製した。

脳深部腫瘍モデルラットおよび偽手術群から脳を摘出し、クライオスタットを用いて脳薄切片を作製した。神経細胞の興奮性の評価は、immediately early geneであるc-Fosを免疫染色し、c-Fos陽性細胞数を解析することで行った。特に、腫瘍周辺領域におけるc-Fos陽性細胞数を計測し、偽手術群と比較してその違いを明確にした上で、c-Fos陽性細胞と腫瘍との空間的な位置関係を解析した。

申請者がこれまでに得た臨床所見と、上記の基礎研究の結果を比較することで、脳深部腫瘍モ

デルとしての妥当性について評価する。

脳腫瘍周囲に位置する GABA 神経の形態学的変化の解析

GABA 神経特異的に黄色蛍光を発する VGAT-Venus transgenic rat の視床へ C6 グリオーマを移植して脳深部腫瘍モデルを作製した。このラットから脳薄切片を作製し、実験に用いた。移植した C6 グリオーマ細胞の周辺領域に存在する GABA 神経細胞の形態学的変化について解析し、偽手術群と比較することで、C6 グリオーマによる GABA 神経障害作用を検証した。蛍光顕微鏡による観察下で C6 グリオーマの認識が困難である点を改善するため、赤色蛍光タンパク質である tdTomato を C6 グリオーマへ導入し、tdTomato 標識 C6 グリオーマを VGAT-Venus transgenic rat へ移植することで視認性の改善を図った。さらに、c-Fos を蛍光免疫染色することで、機能不全に陥った GABA 神経と c-Fos 陽性細胞(興奮状態にある細胞)との位置関係について解析し、申請者の作業仮説を検証した。

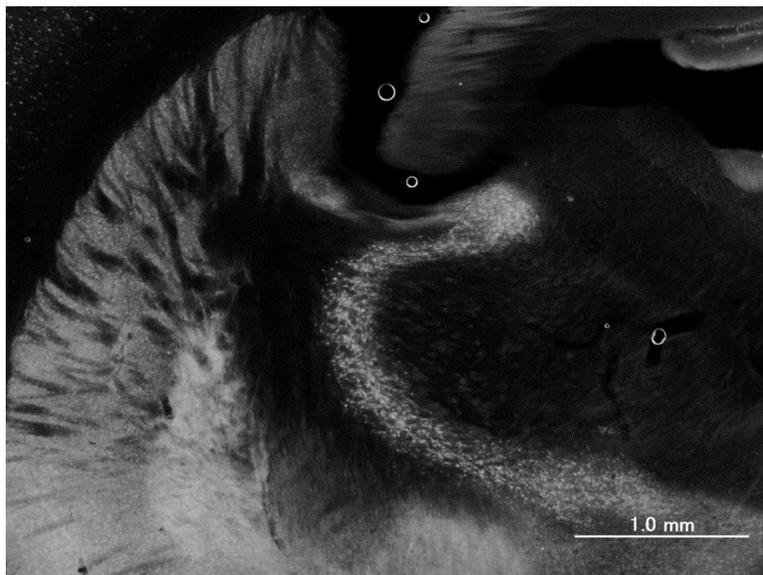
4. 研究成果

(1)

ラット視床における GABA neuron の局在の解析

過去の報告によると、視床内のほとんどの神経細胞は興奮性ニューロンであり、抑制性ニューロンは thalamoreticular nucleus にのみ局在すると考えられた。これを確かめるために、VGAT-venus rat の視床の神経細胞を確認した。図 1 に示すように、VGAT-venus 陽性細胞は視床内ではごく一部に陽性になるとどまり、図譜で確認すると、この領域は thalamoreticular nucleus に一致することがわかった。

図 1



(2)

VGAT-venus rat の視床への C6 グリオーマ移植モデルの開発

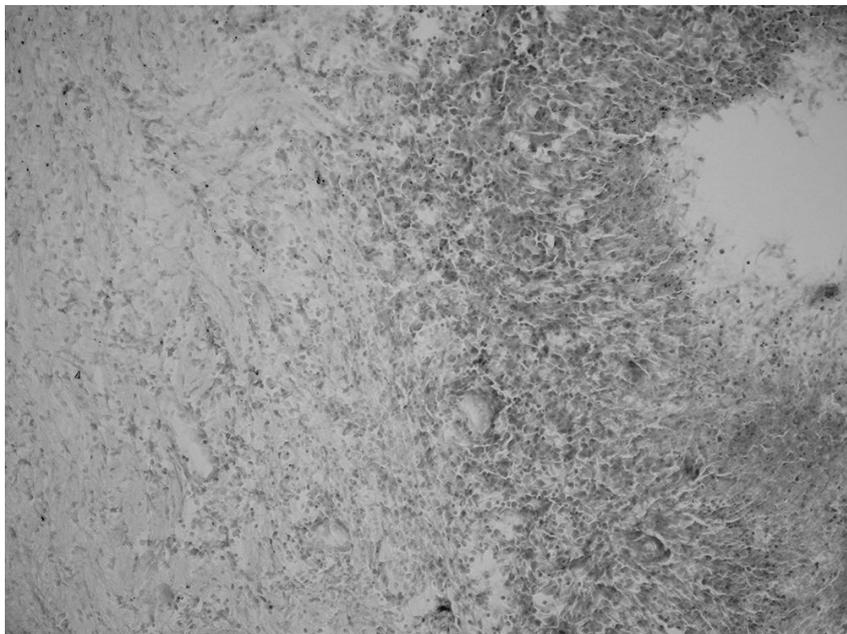
C6 グリオーマ細胞をラット脳の視床に移植するモデルを確立した。移植後のラットの脳を取り出し、HE 染色により腫瘍が狙った部位に生着していることを確認した(図 2)。生着率は約 100%であった。

(3)

MRI による解析

この C6 グリオーマ移植ラットを、生存している状態で腫瘍細胞の生着を確認するために、小動物用 MRI を用いて in vivo 解析を行った。MRI により、ラットが生存している状態で、脳内の腫瘍細胞の生着と広がりを確認することができた(図 3)。この方法で生着を確認できることは、今後このラットに治療を試用する際に有用であると考えられた。また、実験を効率よく行うためにも有用であった。

図 2



(4)

tdTomato 標識 C6 グリオーマ細胞の移植

蛍光顕微鏡下での C6 グリオーマ細胞の視認性を高めるために、tdTomato 標識 C6 グリオーマ細胞を作成し、これを VGAT-venus rat に移植することに成功した(図 4)。これにより、腫瘍細胞、腫瘍周囲の GABA neuron、腫瘍周囲の GABA neuron 以外の細胞を識別することができた。

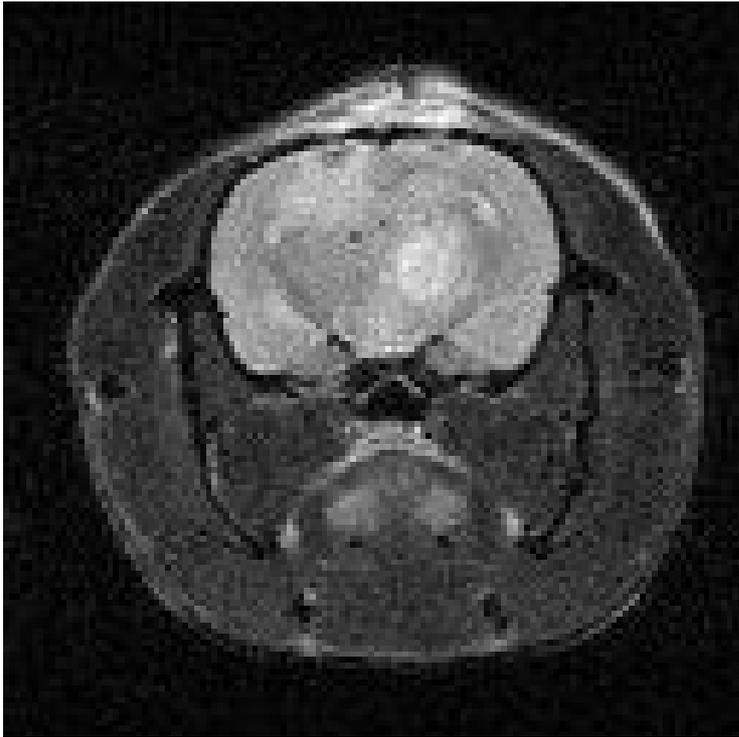


図 3

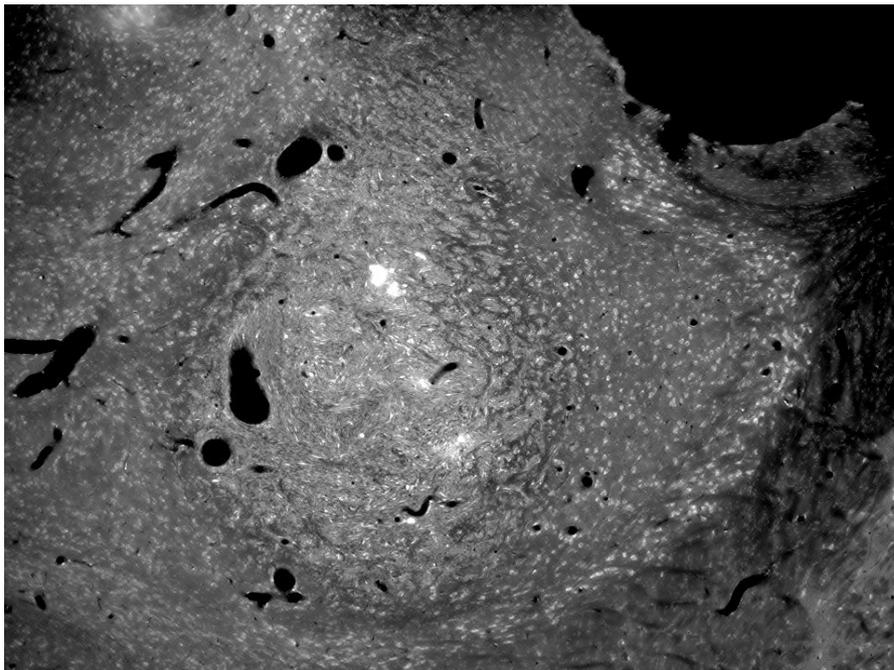


図 4

(5)

腫瘍周囲神経細胞の興奮性の検証

腫瘍周囲の神経細胞の興奮性を確認するために、抗 C-FOS 抗体(D-1)を用いた免疫染色を行った。すでに抑制性神経細胞は VGAT-venus により標識されているため、これにより興奮性神経細胞と抑制性神経細胞のそれぞれの興奮性を腫瘍の周囲で確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)
投稿準備中

〔学会発表〕(計2件)

(1) 第45回 関東機能的脳神経外科カンファレンス
Epilepsy surgery for a patient with intractable epilepsy after radiochemotherapy of glioma in childhood
飯島圭哉 池谷直樹 木村唯子 岩崎真樹

(2) 平成30年度国立精神神経医療研究センター病院研究発表会
Genetical analysis of low-grade epilepsy associated tumor
飯島圭哉 後藤雄一 南久美子 秋山千佳 佐藤典子 齊藤祐子 鈴木博義 宮田元 高山裕太郎 村岡範裕 木村唯子 金子裕 岩崎真樹

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
該当なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：宮田 茂雄
ローマ字氏名：Miyata, Shigeo
研究協力者氏名：柳川 右千夫
ローマ字氏名：Yanagawa, Yuchio
研究協力者氏名：込山 和毅
ローマ字氏名：Komiya, Kazuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。