

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07589

研究課題名(和文) 海馬歯状回のin vivoカルシウムイメージングによるてんかん原性獲得の機序解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanisms of epileptogenesis in the hippocampal dentate gyrus using in vivo calcium imaging.

研究代表者

神出 誠一郎 (Jinde, Seiichiro)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30376454

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)：海馬歯状回にある苔状細胞は側頭葉てんかんの病態と深く関わることが知られているが、その性質はほとんど不明だった。本研究では、苔状細胞特異的に遺伝子操作が可能なマウスと、in vivoカルシウムイメージングという先進的な技術を組み合わせ、覚醒した状態でてんかん発作時の苔状細胞の活動を可視化することができた。その結果、行動上のてんかん発作とともに苔状細胞の活動性が亢進するという特徴と、苔状細胞の活性化時に同じ歯状回の顆粒細胞の発火が促進することを明らかにした。これらの研究により、側頭葉てんかんのてんかん原性獲得メカニズムの一端が明らかになり、今後新たな治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

苔状細胞は側頭葉てんかんの特徴的所見である海馬硬化と関連が深いことが知られるが、その機能や役割はこれまでほとんど不明だった。本研究では、てんかん発作の最中に苔状細胞の活動をリアルタイムで可視化することや、苔状細胞だけの活動をコントロールする技術を用いて、てんかん発作中における苔状細胞の役割の一部を明らかにすることができた。特に苔状細胞の活動性上昇に応じて、海馬歯状回で神経ネットワークを共有する顆粒細胞の同期性の活動が上昇することがわかったことは、側頭葉てんかんの発症のメカニズム解明に近づく結果であり、学術的な意義だけでなく、新たな治療法の開発につながることで社会的にも大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Mossy cells in the hippocampal dentate gyrus are known to be deeply involved in the pathophysiology of temporal lobe epilepsy, but the exact role of mossy cells has not been elucidated. In the present study, the activity of mossy cells was visualized during epileptic seizures in the awake state by combining the mice that can be genetically engineered specifically for mossy cells with in vivo calcium imaging. The results showed that the activity of mossy cells was largely affected by increased activity along with behavioral epileptic seizures, and that, when the mossy cells was excited, the epileptic activity of granule cells in the dentate gyrus was increased. These studies have revealed a part of the mechanisms of epileptogenesis in temporal lobe epilepsy, and are further expected to lead to the development of new therapies in the future.

研究分野：精神医学

キーワード：歯状回 苔状細胞 てんかん カルシウムイメージング DREADD

1. 研究開始当初の背景

(1) 側頭葉てんかんと海馬苔状細胞

側頭葉てんかんは局在関連てんかんの中で最も多く、その病因として海馬の広範な細胞死による海馬硬化の頻度が高い。中でも歯状回門部はてんかん発作などの強い興奮性刺激に対して脆弱で細胞死を生じやすいことから、てんかん原性獲得に密接に関わる部位として注目されている。しかし側頭葉てんかんと海馬硬化の関連は古くから知られていたものの、歯状回門部の細胞死がいかにてんかん原性につながるかは不明なままであった。歯状回門部の苔状細胞は同部位の主要細胞であるにもかかわらず、より遠位の同側海馬や対側海馬への投射が特徴であり、つまり海馬スライスによる電気生理学実験では性質の解明が難しいなど、技術的問題からその特徴は長く明らかにされなかった。そのため、側頭葉てんかんに関しては、歯状回門部の細胞死からてんかん原性獲得までに至るいくつかの仮説 (dormant mossy cell 仮説, irritable mossy cell 仮説など) が提唱されたが、いずれも決定的な解明方法がないまま論争が続いていた (下記文献 1)。

(2) 苔状細胞特異的な遺伝子発現変化の利用

申請者は 2012 年に苔状細胞特異的除去モデルマウスを作成し、苔状細胞除去後に生じた歯状回顆粒細胞の興奮性増加とてんかん閾値低下を明らかにした。この結果から歯状回門部の細胞死によるてんかん原性獲得の機序解明につながる可能性を世界に先駆けて示した (文献 2)。その後、苔状細胞の特徴解明に注目が集まっているが、てんかんに関連した苔状細胞自体の活動性に迫る報告は出ていない。また前述の文献 2 の論文は側頭葉てんかんの発症機序に迫るものではあったが、苔状細胞の除去後に生じた顆粒細胞の活動を記録したものであり、当時の技術的な制約から苔状細胞そのものの活動を観察することはできなかった。その後、苔状細胞の興奮性の特徴を捉えられる手法について検討を重ね、今回研究分担者となった菅谷氏の電気生理学やイメージング技術を用いることにより、文献 2 で作成した苔状細胞特異的 Cre 発現マウスにウイルス投与にて苔状細胞を直接選択的にラベルして観察するカルシウムイメージングを可能にした。

参考文献: 1) Jinde et al., Front Neural Circuits, 2013、2) Jinde et al., Neuron, 2012

2. 研究の目的

先駆的なマウスと遺伝子工学技術を用い、覚醒下での苔状細胞のカルシウムイメージングを行うことで、平常時とてんかん発作に類似した強い興奮性入力に対する苔状細胞の特徴を明らかにする。また、Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) 技術により、苔状細胞選択的な活動性の操作により生じる顆粒細胞の活動性変化をカルシウムイメージングによって直接観察する。これらの結果により、苔状細胞の活動性とその後の歯状回の興奮性変化の関連について詳細が明らかにされる。これらの結果から、側頭葉てんかんのてんかん原性獲得メカニズムに迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

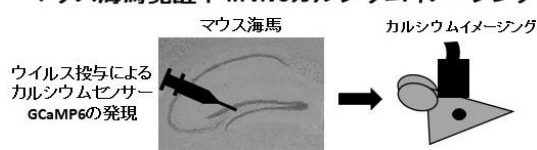
(1) 歯状回苔状細胞特異的カルシウムセンサー発現マウス作成

苔状細胞特異的 cre 組み換え酵素発現マウスを用い、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの歯状回への定位的な注入でカルシウムセンサーである GCaMP6f を苔状細胞に発現させた。ベクターによる GFP 発現について組織学的検討から苔状細胞の選択的発現を検証した。

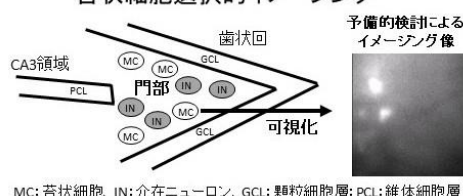
(2) 覚醒下・自由行動時の in vivo カルシウムイメージング

上記の苔状細胞選択的 GCaMP6 発現マウスを用いて、in vivo マイクロエンドスコープをマウス歯状回に設置し、覚醒下・自由行動時における苔状細胞の興奮性変化をカルシウムイメージングにより 10 分間記録した。

マウス海馬覚醒下 in vivo カルシウムイメージング



苔状細胞選択的イメージング

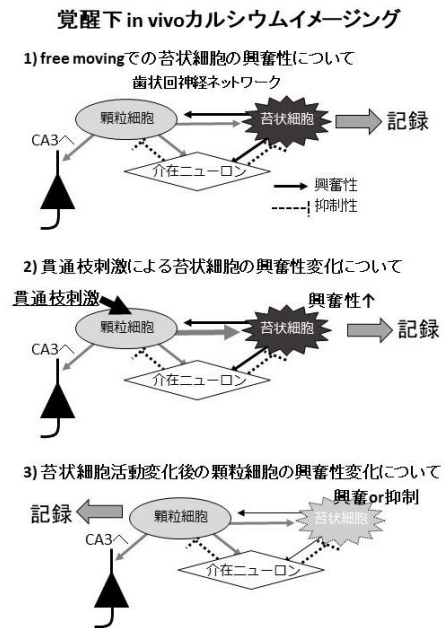


(3) カイニン酸発作後の苔状細胞の活動記録

上記 2 で用いたマウスに対し、30mg/kg のカイニン酸を腹腔内投与した。その後、行動上のてんかん発作をビデオにてモニタリングしながら、カルシウムイメージングにて苔状細胞の活動を 60 分間測定した。

(4) 苔状細胞選択的な活動の制御と、それに伴う顆粒細胞の興奮性変化

苔状細胞選択的 cre 発現マウスの歯状回へのウイルス注入によって、苔状細胞選択的に興奮性 DREADD または抑制性 DREADD を発現させた。さらに同様に AAV ベクターを用いて苔状細胞選択的に GCaMP6f を発現させた。DREADD の特異的リガンドである clozapine-N-oxide (CNO) の腹腔内投与後、興奮性または抑制性 DREADD を発現した苔状細胞の活動の変化を記録した。次に、苔状細胞選択的に DREADD を発現したマウスにおいて顆粒細胞の活動の計測を電気生理学的に行った。これにより苔状細胞に選択的な活動の増強・抑制後に生じる顆粒細胞の興奮性の変化をリアルタイムに観察することができる。Sugaya ら (2013) の手法を用い、外科的手技にて脳内に刺激電極を固定し、苔状細胞の活動が DREADD により変化している状態で貫通枝刺激を行い、刺激強度がけいれん閾値を超えて生じた脳波上の発作について、顆粒細胞の活動を対照群と比較した。



4. 研究成果

(1) マウス作成

イメージングに使用するモデル動物の作成とその検証として、まず我々が保有する苔状細胞特異的 cre 組み換え酵素発現マウスを用い、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの歯状回への定位的な注入でカルシウムセンサーである GCaMP6f を苔状細胞に発現させた。GCaMP6f の発現については、苔状細胞特異的 cre マウスに AAV-DIO-GFP を注入し、組織学的に検討したところ、歯状回門部、歯状回内側分子層における GFP の発現パターンから苔状細胞に特異的な発現を確認した。

(2) 覚醒下・自由行動時の in vivo カルシウムイメージング

覚醒下・自由行動時の in vivo カルシウムイメージングについては、上記の苔状細胞選択的 GCaMP6f 発現マウスを用い、ウイルスベクター注入から 2~3 週間後に歯状回の直上の頭蓋骨を広く開放し、脳定位固定装置を用いて屈折率分布型 (GRIN) レンズをデンタルセメントで固定した。術後の回復期間ののち、行動実験を行った。覚醒下・自由行動時における苔状細胞の興奮性について、苔状細胞カルシウムイメージングを各マウス共に 10 分間記録し、それぞれのマウスで苔状細胞から安定した記録を得ることができた。

(3) カイニン酸発作時の苔状細胞の活動性

貫通枝刺激の前に、まずてんかん発作を確実に誘発することができるカイニン酸の腹腔内投与を行い、行動学的な発作時における苔状細胞の活動性変化を確認した。海馬の直上にマイクロエンドスコープを装着したマウスに 30mg/kg のカイニン酸を腹腔内投与し、苔状細胞の活動を 60 分間測定した。苔状細胞は行動上でてんかん発作が観察される前から活動性が亢進し、行動上で発作を呈した間に活動性はピークを認めた。カイニン酸による急性発作は発作重積のため、ペントバルビタール (50mg/kg) の腹腔内投与によって発作を停止させたところ、細胞の活動も停止した。以上から、行動上の発作が出現すると苔状細胞の蛍光が著しく増強し、発作の停止とともに苔状細胞の蛍光が低下したことから、行動上の発作と一致して苔状細胞が非常に強く活動していることが明らかとなった。

(4) Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) による苔状細胞選択的な活動性変化

DREADD による苔状細胞選択的な活動性操作の影響を検討するため、苔状細胞選択的 cre 発現マウスの歯状回への AAV 投与により苔状細胞選択的に興奮性 DREADD を発現させ、続いて Clozapine-N-Oxide (CNO, 5mg/kg) の腹腔内投与による苔状細胞の活動性変化を評価した。まず自由行動下にて CNO 投与により苔状細胞の活動性が著しく上昇し、DREADD による苔状細胞選択的な活動性の操作が可能であることが確認された。しかし、同様の手順にて抑制性 DREADD によって苔状細胞の活動を抑制しようと試みたところ、有意な活動の低下は起きなかった。

(5) DREADD による苔状細胞選択的な活性化と海馬歯状回の興奮性変化

苔状細胞を興奮性 DREADD で活性化し、同時に電気刺激によって脳波上の発作波を引き起こし、歯状回顆粒細胞の同期性の発火を電気生理学的に計測した。すると対照群では歯状回顆粒細胞の同期性の発火がほとんど認められなかったが、苔状細胞活性化群では歯状回顆粒細胞の同期

性の発火が必ず認められた ($p=0.04$)。このことから、歯状回の神経回路が発作で強く活性化している時には、苔状細胞の活動により顆粒細胞の発火が促進される可能性が示唆された。

近年、苔状細胞は記憶学習関連での研究が多く報告されているが、てんかんに関する研究は少なく、苔状細胞からてんかんの発症機序に迫るものはほとんど報告がない。その中で本研究は独創的なマウスと技術を用い、苔状細胞の特徴だけでなく、苔状細胞選択的な活動性変化後に生じる顆粒細胞の興奮性変化までリアルタイムの観察をかのうにしたことで、海馬歯状回を介したてんかん原性獲得のメカニズム解明につながる所見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅谷 佑樹 (Sugaya Yuki) (00625759)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関