

平成 2 1 年 5 月 2 7 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790048
 研究課題名(和文) 乳幼児期の海馬における新生顆粒細胞の移動機構とその破綻による海馬発達異常の解明
 研究課題名(英文) The effects of early -life seizures on the development of hippocampal neural circuits.
 研究代表者
 小山 隆太 (KOYAMA RYUTA)
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教
 研究者番号：90431890

研究成果の概要：てんかんは、大脳の神経細胞がいっせいに活動してしまうことで様々な発作を起こす病気であり、その原因の一つは神経回路の形成異常である。本研究では、げっ歯類を利用した実験によって、乳幼児期の熱性けいれんが神経細胞の移動を攪乱することが、成体期の脳内における一部の神経回路の形成異常に繋がることが示唆された。また、この現象は、神経伝達物質である (ガンマ) - アミノ酪酸 (GABA) が、神経細胞の正常な移動を阻害するためであることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：海馬顆粒細胞、細胞移動、GABA、てんかん、熱性けいれん、乳幼児、神経回路、培養切片

1. 研究開始当初の背景

脳が正常な機能を発揮するためには、乳幼児期を含む脳の形成期に神経細胞の移動が適切に制御され、正確な神経回路が形成される必要がある。成人の難治性てんかんの大部分を占める「側頭葉てんかん」の患者の海馬では、顆粒細胞層に存在するべき顆粒細胞が歯状回門に異所性に存在し(以下、異所性顆粒細胞と呼ぶ)、錐体細胞や顆粒細胞との間に異常興奮回路を形成する。側頭葉てんかんの70～80%は海馬を発作起始部としており、異常回路の付加がてんかんに特徴的な同期

した過剰神経発火を誘起すると推察される。申請者は、側頭葉てんかん患者の多くが乳幼児期になんらかの発作活動を経験していることに着目し、正常な顆粒細胞の移動機構が発作活動によって攪乱され、異所性顆粒細胞の出現に至ると考察した。この仮説は、乳幼児期が、多数の新生顆粒細胞が歯状回門から顆粒細胞層へと移動してその形成をおこなう時期であることに基づく。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳幼児期に新生した顆粒

細胞の移動機構を解明するとともに、同機構の破綻による異所性顆粒細胞の出現機構を明らかにすることである。また、移動機構を担う因子として抑制性神経伝達物質である - アミノ酪酸 (GABA) の関与を検証する。

3. 研究の方法

本研究は、主に以下の(i)~(iii)の方法によっておこなわれた。(i)新規に開発したラット海馬切片の共培養法及びリアルタイム観察法による、細胞移動への GABA の関与の解明。(ii)歯状回門移植片培養法による顆粒細胞の移動機構への GABA 及び Ca^{2+} 流入の関与の解明。(iii)熱性痙攣モデルラットを利用した *in vivo*での解析による、GABA と異所性顆粒細胞出現の関連の解明。

4. 研究成果

2007年度は、まず、GFP 強制発現ラット由来の歯状回門切片と野生型ラット由来の海馬切片を共培養することにより、放射状移動中の幼若顆粒細胞が GABA_A 受容体を介した興奮性入力を受けていることを電気生理学的手法によって明らかにした。また、側頭葉てんかん患者が乳幼児期に高頻度で経験する熱性けいれんの実験モデルラットより歯状回門切片を摘出して共培養したところ、同切片由来の細胞が歯状回門中で逆走する様子が頻繁に観察され、この現象は GABA_A 受容体阻害薬によって阻止された。さらに同モデルラットの海馬における異所性顆粒細胞の出現は、GABA_A 受容体阻害薬の投与によって抑制された。以上の結果は、顆粒細胞の移動を GABA が調節することを初めて示すとともに、熱性けいれんを経験した海馬では GABA の入力によって顆粒細胞が逆走し、将来的に異所性顆粒細胞となる可能性を示唆した。以上の結果は、GABA 入力の制御による異所性顆粒細胞の出現の防止が、新たな側頭葉てんかんの治療法開発に繋がる可能性を含み、基礎医学的にも意義深い。これらの結果の一部は第 37 回北米神経科学学会年会で研究発表し、2007年度 日本神経科学学会「トラベルアワード」を受賞した。また、研究代表者は、成体海馬に存在する顆粒細胞の大部分が乳幼児期に新生した細胞であること及び、乳幼児期のてんかん発作が成体期の異所性顆粒細胞出現に繋がることを、マウスに新生細胞マーカーである BrdU を投与することによって示し、2 報の論文に纏めた。

2008年度は、熱性けいれんによって異所性顆粒細胞が生じるメカニズムを、*in vitro* 及び *in vivo* の両実験系を利用して詳細に解析した。まず、歯状回門切片の移植片培養法を開発し、熱性けいれんラット由来の移植片から移動する細胞では、移動に必要な先導突起の成長円錐上における GABA_A 受容体の発現量が上

昇していることを発見した。さらに、このような先導突起に対して GABA_A 受容体の作用薬を局所適用すると、先導突起から細胞体へとカルシウムオシレーションが生じ、細胞の移動が停止、または逆走することを発見した。次に、生後 5 日齢のラットに分裂細胞マーカーである BrdU を投与し、生後 11 日齢において熱性けいれんを誘導したところ、熱性けいれんを誘導していない群と比較して、生後 18 日及び生後 60 日目における異所性顆粒細胞 (BrdU および顆粒細胞マーカー Prox1 共陽性細胞) の密度が上昇することが明らかになった。さらに、熱性けいれんによる異所性顆粒細胞の出現は、けいれん誘導後に GABA_A 受容体の阻害薬を処置することで抑制された。また、生後 11~18 日目に GABA_A 受容体の作用薬を慢性処置することにより、異所性顆粒細胞が出現した。以上の結果は、熱性けいれんによって将来的に異所性顆粒細胞が出現することを初めて示したと同時に、その原因が、先導突起成長円錐上の GABA_A 受容体の活性化による新生顆粒細胞の逆走移動であることを解明した点で、細胞生物学的な見地からも意義深い。これらの結果の一部は第 42 回日本てんかん学会で発表し、優秀発表賞を受賞した。また、現在、本研究を論文として纏め、国際誌に投稿準備中である。

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 4 件)

1. 村松里衣子、池谷裕二、松木則夫、小山隆太、Early-life status epilepticus induces ectopic granule cells in adult mice dentate gyrus, *Experimental Neurology*, 211, 503-510, 2008、査読有
2. 村松里衣子、池谷裕二、松木則夫、小山隆太、Neonataly born granule cells numerically dominate adult mice dentate gyrus, *Neuroscience*, 148, 593-598, 2007、査読有
3. 市川淳也、山田隆二、村松里衣子、池谷裕二、松木則夫、小山隆太、Cryopreservation of granule cells from postnatal rat hippocampus, *Journal of Pharmacological Sciences*, 104, 387-391, 2007、査読有
4. 小山隆太、村松里衣子、佐々木拓哉、木村梨絵、上山千紘、田村誠、田村直寛、市川淳也、高橋直矢、宇佐美篤、山田麻紀、松木則夫、池谷裕二、A low-cost method for brain slice cultures, *Journal of Pharmacological Sciences*, 104, 191-194, 2007、査読有

[学会発表](計 22 件)

1. 小山隆太 乳幼児期における海馬神経回路の形成機構の解明 - 難治性てんかんの新たな治療戦略 第 82 回日本薬理学会(横浜) 2009 年 3 月 18 日
2. 佐條麻里、松木則夫、小山隆太 乳幼児期の新生海馬顆粒細胞の移動機構におけるポリシアル酸の役割の解明 第 82 回日本薬理学会(横浜) 2009 年 3 月 18 日
3. 市川純也、松木則夫、小山隆太 GABA-induced KCC2 regulates the development of primary dendrites from dentate granule cells. 第 38 回北米神経科学学会年会(ワシントン) 2008 年 11 月 18 日
4. 小山隆太、佐々木拓哉、村松里衣子、松木則夫、池谷裕二 乳幼児期のけいれんによる海馬顆粒細胞の移動機構の破綻 第 17 回海馬と高次機能学会(金沢) 2008 年 11 月 22 日
5. 小山隆太 てんかんに伴う海馬の異常発芽と神経細胞新生 第 31 回神経研(東京都神経科学総合研究所)シンポジウム(東京) 2008 年 10 月 24 日
6. 小山隆太、佐々木拓哉、村松里衣子、松木則夫、池谷裕二 熱性けいれんモデルラットの海馬における GABA 依存的な異所性顆粒細胞の出現 第 42 回日本てんかん学会(東京) 2008 年 10 月 18 日
7. 小山隆太、佐々木拓哉、村松里衣子、松木則夫、池谷裕二 GABA による海馬顆粒細胞の移動異常 第 31 回日本神経科学大会(東京) 2008 年 7 月 9 日
8. 小山隆太、佐々木拓哉、村松里衣子、市川淳也、松木則夫、池谷裕二 Abnormal Migration of Hippocampal Granule Cells after Experimental Febrile Seizures 第 17 回国際神経発達学会(アシロマー) 2008 年 6 月 2 日
9. 市川淳也、松木則夫、小山隆太 KCC2 による海馬顆粒細胞の樹状突起形成の制御 第 118 回 日本薬理学会関東部会(東京) 2008 年 6 月 7 日
10. 市川淳也、松木則夫、小山隆太 Proper dendritic morphogenesis requires KCC2 expression in immature dentate granule cells. 第 17 回国際神経発達学会(アシロマー) 2008 年 6 月 2 日
11. 小山隆太、佐々木拓哉、村松里衣子、市川淳也、松木則夫、池谷裕二 熱性けいれんモデルにおける海馬幼若顆粒細胞の移動異常 第 23 回神経組織の成長・再生・移植研究学術研究集会(幕張) 2008 年 5 月 17 日
12. 市川淳也、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 GABAergic signaling facilitates the development of immature hippocampal granule cells. 第 37 回北米神経科学学会年会(サンディエゴ) 2007 年 11 月 3 日
13. 小山隆太、佐々木拓哉、村松里衣子、市川淳也、松木則夫、池谷裕二 GABA regulates the migration of neonatally born dentate granule cells. 第 37 回北米神経科学学会年会(サンディエゴ) 2007 年 11 月 3 日
14. 市川淳也、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 Different roles of GABA and glutamate in the development of immature dentate granule cells. Neurogenesis2007 (東京) 2007 年 5 月 15 日
15. 村松里衣子、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 Neonatally born granule cells numerically dominate the dentate gyrus of adult mice. Neurogenesis2007 (東京) 2007 年 5 月 15 日
16. 村松里衣子、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 Early-life seizure induces an emergence of ectopic granule cell in adult mice dentate gyrus. 第 10 回乳幼児けいれん研究会国際シンポジウム(東京) 2007 年 4 月 7 日
17. 市川淳也、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 GABA promotes the differentiation of newborn dentate granule cells. 第 10 回乳幼児けいれん研究会国際シンポジウム(東京) 2007 年 4 月 7 日
18. 市川淳也、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 乳幼児期における海馬新生顆粒細胞の成熟機構の解析 第 117 回日本薬理学会関東部会(東京) 2007 年 10 月 6 日
19. 小山隆太、佐々木拓哉、村松里衣子、市川淳也、松木則夫、池谷裕二 乳幼児期における海馬新生顆粒細胞の移動機構の解析 第 117 回日本薬理学会関東部会(東京) 2007 年 10 月 6 日
20. 村松里衣子、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 乳幼児期における海馬新生顆粒細胞の生存機構の解析 第 117 回日本薬理学会関東部会(東京) 2007 年 10 月 6 日
21. 市川淳也、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 GABA による海馬幼若顆粒細胞の成熟促進 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 2007 (東京) 2007 年 9 月 15 日
22. 市川淳也、池谷裕二、松木則夫、小山隆太 GABA、グルタミン酸による海馬新生顆粒細胞の分化 第 30 回日本神経科学大会(横浜) 2007 年 9 月 10 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小山 隆太 (KOYAMA RYUTA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90431890

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし