

平成22年 5月13日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20800026
 研究課題名(和文) Wnt 阻害因子 sFRP3 による側頭葉てんかんの新たな治療方法の開発
 研究課題名(英文) Development of new therapy for the temporal lobe epilepsy using secreted Wnt inhibitor sFRP3.
 研究代表者
 北畠 康司 (KITABATAKE YASUJI)
 大阪大学・医学部附属病院・特任助教
 研究者番号：80506494

研究成果の概要(和文)：

側頭葉てんかんは難治性の疾患であり、海馬の苔状線維発芽の形成が発症原因のひとつである。申請者は本研究において、分泌性 Wnt 阻害タンパクである sFRP3 が成体海馬に強く発現し、sFRP3 ノックアウトマウスでは苔状線維発芽が促進されることを発見した。これにより sFRP3 が苔状線維発芽を抑制的に制御する重要な因子でありことが判明し、今後側頭葉てんかん発症のメカニズム解明と治療法の開発に結びつく可能性があると思われる。

研究成果の概要(英文)：

Temporal lobe epilepsy is associated with circuit rearrangements within the hippocampus. Mossy fibers sprout and pathologically innervate the inner molecular layer of the dentate gyrus, providing a recurrent excitatory pathway not detected in the normal brain. Here we report that the expression of secreted Frizzled-related protein 3 (sFRP3), a Wnt inhibitor highly expressed in the adult dentate gyrus, is rapidly suppressed by pilocarpine-induced status epilepticus, and then recovered to normal level in four weeks. Furthermore, the deletion of the gene encoding sFRP3 promoted innervations of mossy fiber into inner molecular layer after pilocarpine treatment. This study identifies sFRP3 as a key regulator of mossy fiber sprouting and temporal lobe epilepsy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

てんかんは様々な病因により生じる慢性の脳疾患であり、大脳神経細胞の過剰放電に由来する反復性の発作を主な症状として多様な臨床症状を呈する。なかでも側頭葉てんかんは成人にみられるもっとも一般的な難治性てんかんであり、主に海馬・扁桃体といった側頭葉内側部に端を発する自発的な進行性てんかん発作によって特徴づけられる。

海馬にいくつかの病理的所見が見られるが、その中でも‘苔状線維発芽’はとりわけ頻繁に生じ、実験動物モデルでも再現性よく観察される。通常、歯状回の顆粒細胞の軸索である苔状線維は歯状回門やCA3野の標的細胞とシナプスを形成するが、側頭葉てんかん患者の海馬では歯状回門での苔状線維の異常分岐や過剰なシナプスの形成など、この投射パターンの崩壊像が見られる。これが‘苔状線維発芽’である。この現象が目される理由は、結果として海馬神経ネットワークのパターンが大きく変化する点にある。すなわち発芽によって顆粒細胞は再帰型の興奮性入力を受けようになり、これによって歯状回の興奮性が上昇し、てんかんの悪化や慢性化の引き金になると考えられる。したがってこの苔状線維発芽の予防が側頭葉てんかんの治療となることが期待されるが、発芽を制御する分子メカニズムについてはあまり分かっていない。

2. 研究の目的

我々は神経回路の形成メカニズムを研究するにあたり、成体海馬における神経新生とその制御因子であるWnt経路に焦点を当てて研究を続けてきた。そして分泌性Wnt阻害蛋白のひとつであるsFRP3が成体海馬に強く発現し、神経新生を制御する重要な因子であることを発見した。sFRP3は神経新生と細胞の形態変化を抑制的に制御しており、sFRP3ノックアウトマウスでは新生した細胞の増殖・移動・樹状突起伸長の各過程が促進されている。注目すべきことは、sFRP3の発現が神経活動により厳密に調節されていることである。すなわち、電気刺激を与えるとsFRP3の発現量は劇的に低下し、Wnt経路が活性化され、結果的に神経新生が活発化される。このようにsFRP3は海馬歯状回における神経ネットワークの再構成を制御する鍵となる因子であることが明らかとなった。苔状線維は歯状回顆粒細胞の軸索であり、てんかん刺激を受けた際の軸索伸長もこのsFRP3によって制御されているのではないだろうか。そこで‘てんかん発作による海馬での電気刺激はsFRP3の発現量を減少させ、それがWnt経路の脱抑制を介して歯状回顆粒細胞の軸索伸長を引き起こし、結果として苔状線維

発芽を誘導する’という仮説を立て、*in vitro* / *in vivo*の系を組み合わせてこの仮説の検証を行った。

3. 研究の方法

(1) ピロカルピンてんかん重積モデル

雌C58BL/6マウスにメチルスコポラミン (2 mg/kg) を腹腔内に投与し、その30分後にピロカルピン (320 mg/kg) の腹腔内投与を行った。ピロカルピン投与後2時間以内にレベルII-IVのけいれん発作を呈したマウスのみをその後の実験に用いた。対照群はピロカルピンの代わりに同量の生理食塩水を投与した。

(2) Timm染色

ネブタールによってマウスに麻酔をかけたのち硫化ナトリウム溶液100mlで灌流を行い、血液を除去したのちに4%パラホルムアルデヒドで固定を行った。脳を取り出し後固定したのち凍結組織から脳切片 (40 μm) を作成した。スライド上の切片を Arabic gum / hydroquinone / silver nitrate) 溶液に1時間浸したのち、アルコール系列 (50, 70, 80, 90, 100% 希釈) とキシレンで脱水・脱脂処理を行った。

(3) 定量RT-PCR

マウス脳から海馬を取り出し、ドライアイス上で速やかに凍結したのちQIAGEN RNeasy kitを用いてRNA抽出をおこなった。逆転写反応によりcDNAを作成しSYBR-green PCR master mixで反応させ、ABI PRISM 7900H sequence detection systemを用いてmRNA定量をおこなった。内部対照としてはGAPDHを用いた。

GAPDH: 5' -GTATTGGGCGCTGGTCACC-3' (forward), 5' -CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG-3' (reverse)
sFRP3: 5' -CAAGGGACACCGTCAATCTT-3' (forward), 5' -CATATCCCAGCGCTTGACTT-3' (reverse)
いずれの反応も3回ずつ行い、sFRP3の平均値をGAPDHの平均値で標準化を行った。

(4) sFRP3ノックアウトマウス

sFRP3ノックアウトマウスはJohns Hopkins大学のJ. Nathans研究室によって作成された。このマウスについては、発生期に異常は見られず、成体の脳の形態についても野生型と変わらない

ことをHE染色・ニッスル染色により確認済みである

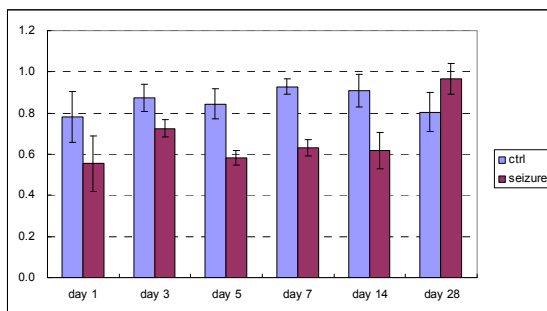
4. 研究成果

仮説‘sFRP3は顆粒細胞の軸索伸長を抑制的に制御しており、てんかん発作時の電氣的刺激によるsFRP3発現量の減少が苔状線維発芽を誘導する’を検証するため、以下のように実験を行った。

(1) てんかんモデルにおけるsFRP3発現レベルの変化

ムスカリンアゴニストであるピロカルピン投与モデルはけいれん重積発作を誘発する方法として信頼性のある動物モデルである。ピロカルピンの投与後数分以内にマウスはけいれん重積発作の状態を呈し、その発作は抗けいれん薬を投与するまで持続する。苔状線維発芽を誘発する刺激により、海馬歯状回におけるsFRP3の発現がどのように変化するかについて、ピロカルピン投与後のけいれん重積発作モデルを用いて調べた。重積発作誘発後のマウスの脳を取り出し、海馬組織からRNAを抽出して定量的RT-PCRによって経時的に調べた。sFRP3の発現量はピロカルピン投与後に速やかに減少し、1日後には約55%まで低下した。そしてそののちゆっくりともとのレベルに回復することが分かった(Fig. 1)。このsFRP3発現量の変化は電気ショック投与によるものと同じ傾向を示し、発現低下の程度も類似しているが、回復の速度は電気ショック投与時よりも遅く、4週間かかることが分かった。

Fig. 1 ピロカルピン投与によるけいれん重積発作誘発後の海馬におけるsFRP3発現量の変化

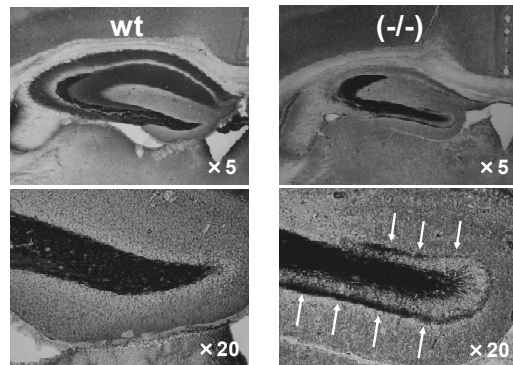


(2) sFRP3ノックアウトマウスにおける苔状線維発芽の促進

sFRP3発現量の低下が苔状線維発芽を促進することを示すため、sFRP3ノックアウトマウスをもちいて実験を行った。ピロカルピンを投与されたマウスは、急性期の重積発作のち数週間のあいだに苔状線維発芽を含めた神経回路の再構築が起こり、てんかん発作の慢性期症状を呈するようになる。

sFRP3ノックアウトマウスのホモ型にピロカルピンを投与することによっててんかん重積発作を誘発し、おなじく発作を誘発された同胞野生型とのあいだで苔状線維発芽形成の違いについて比較した。苔状線維は亜鉛を多く含んでおり、それを利用したTim染色により特異的に染色することが可能である。そこでピロカルピン投与の30日後にTim染色を行い、苔状線維を染色し、発芽の程度を比べた(Fig. 3)。ピロカルピン投与によるてんかん重積発作の誘発の程度や持続時間、死亡個体の数などによく変化はみられなかった。その結果、ノックアウトマウスでは野生型に比べ、より早期から苔状線維の側枝が歯状回の内側分子層で異常シナプスを形成(矢印)しており、苔状線維発芽の促進されていることが判明した。

Fig. 2 けいれん重積発作誘発30日後におけるsFRP3ノックアウトマウスの苔状線維Tim染色像



我々のこれまでの研究により、sFRP3は成体海馬における神経回路の再構築を制御する重要な因子であることが判明した。そして興味深いことに電気刺激を与えるとsFRP3の発現量が劇的に低下し、Wnt経路が活性化され、歯状回顆粒細胞の形態がダイナミックに変化することが明らかとなった。てんかん発作とは神経細胞への電氣的刺激に他ならない。てんかん発作による電氣的刺激が苔状線維発芽(=顆粒細胞の軸索伸長)を引き起こすのであれば、両者のあいだにsFRP3がkey moleculeとして機能している可能性は十分に考えられるであろう。実際今回の研究により、てんかんモデルとして多く利用されるピロカルピン投与モデルにおいて、sFRP3 mRNAは電気ショック投与時と同じく速やかに減少し、しかもその回復には単発の電気ショック投与時より長く、約4週間を要することが分かった。さらに苔状線維発芽の様子をTi

mm染色で観察したところ、ピロカルピン投与30日後に野生型ではまだ苔状線維発芽が見られていないにもかかわらず、sFRP3ノックアウトマウスの海馬では明らかにシナプスの異常形成が見られていた。このことはsFRP3の発現量変化が顆粒細胞の軸索伸長、ひいては苔状線維発芽の形成に強い影響を及ぼしていることを示す。また単発の電気刺激では苔状線維発芽を誘導しないが、これはsFRP3の発現抑制が短期間であるためであると考えられる。

本研究での問題点は、sFRP3は胎生期の脳にも発現しているが、今回用いるのはコンディショナルでなく通常のノックアウトマウスであるため、発生期における影響を否定しきれない点である。そのため今後、RNAiをもつレトロ・レンチウイルスのインジェクションによるsFRP3のノックダウンを行い重積発作誘発マウスにおける軸索の長さの変化を見る必要もあると考えられる。

本研究で得られた結果により、sFRP3が側頭葉てんかんの発症メカニズムに強く関与していることを示唆している。では側頭葉てんかんの発症を防止する、あるいは症状の軽減を図るにはどうすればよいのだろうか。すでに述べた仮定が正しいとするならば、sFRP3の発現抑制を止めるような処置あるいはsFRP3の投与などが苔状線維発芽を抑制すると考えられる。この可能性を検討するため、現在レトロ／レンチウイルス投与による海馬へのsFRP3の過剰発現を行っているところである。レトロウイルスは増殖中の細胞にのみ感染するため、GFPを発現するレトロウイルスを野生型マウスの海馬歯状回に打ち込むことで同じ日齢の新生ニューロン間で軸索の長さを比較することができる。sFRP3 cDNA-IRES-GFPを組み込んだレンチウイルスを海馬へ打ち込むことによって、sFRP3のautonomousな過剰発現が軸索変化に与える効果を見ることのできるであろう。またさらに、sFRP3-IRES-tdTomatoを過剰発現するレンチウイルスも作成し、GFPを発現するレトロウイルスとともにインジェクションすることで、分泌されたsFRP3の効果を見ることもできるだろう。この場合tdTomato陽性、すなわちsFRP3が過剰発現している部位にあるGFP陽性ニューロンの軸索の長さに注目する。いずれの実験においても、レトロ・レンチウイルスをインジェクションした1週間後にマウスにピロカルピンを投与してけいれん重積発作を誘導し、その28日後に脳を取り出してことでsFRP3による歯状回顆粒細胞の軸索伸長に対する影響を解析する。仮説どおりであれば、sFRP

3が過剰発現している部位にあるGFP(+)ニューロンではコントロールに比べて軸索伸長が抑制されていると考えられる。

さらによりin vivoでの反応を確かめるために、浸透圧ポンプを用いたリコンビナントsFRP3の脳室内への持続投与などの実験を行う予定である。浸透圧ポンプの注入部の針は太いので、海馬への損傷あるいは炎症の発生を防ぐ為、あえて海馬でなく脳室への注入を考えている。

もしこの研究結果から得られた仮定が正しいことを示すことができれば、sFRP3の投与が苔状線維発芽の抑制につながると考えられ、今後てんかん発作の発症・悪化を抑制する因子として重要な知見をもたらすことができると期待される。

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2件)

1. Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination
Jablonska B, Aguirre A, Raymond M, Szabo G, Kitabatake Y, Sailor K, Ming G, Song H, Gallo V.

Nat Neurosci 13 (2010): 541-550. (査読有り)

2. Neuronal Activity-Induced Gadd45b Promotes Epigenetic DNA Demethylation and Adult Neurogenesis.

Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H.

Science 323 (2009):1074-1077. (査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北畠 康司 (KITABATAKE YASUJI)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80506494

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

