

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15272

研究課題名（和文）熱性けいれんに伴う神経回路変性における神経細胞－ミクログリア関連分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms underlying neuron-microglia interaction in neural circuit dysfunction induced by neonatal seizures

研究代表者

笠原 由佳（Kasahara, Yuka）

九州大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：50838208

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：けいれん性疾患は乳幼児に頻発し、将来の脳機能障害に寄与することが示唆されている。こうした長期に及ぶ影響は、発症時に生じる神経回路変性に起因すると考えられるが、変性に至る機序の詳細は不明である。申請者は、てんかん脳において認められる、神経細胞の過剰興奮とミクログリアの活性化に着目し、「小児てんかんにおいて過剰に興奮した神経細胞がミクログリアの活性化を誘起し、神経回路変性が生じる」という仮説を検証する。申請者は、小児てんかんモデルマウスを作製し、神経細胞の過剰な興奮とミクログリアの活性化が生じることを確認し、これらの事象の連関について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

けいれん性疾患は、乳幼児にとって最も一般的な中枢神経疾患である。しかし、その発症機序や発症により生じる影響の全容は、今日まで解明されていない。本研究によって遂行される、小児てんかんにおける神経回路変性の分子細胞生物学的メカニズムの解明は、新規治療ターゲットの発見に繋がることが期待できる。さらに、本研究で着目するミクログリアの活性化は、様々な中枢神経疾患においても報告されている。本研究により明らかとなる分子機構は、他の疾患においても共通の治療ターゲットとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Convulsive disorders frequently occur in infants and young children, and have been suggested to contribute to future brain dysfunction. The long-term effects are thought to be due to neural circuit degeneration. However, the mechanisms underlying neural circuit degeneration remain unknown. In this project, I focused on the Neuronal hyperexcitability and microglial activation in the epileptic brain, and hypothesized that "excessively excited neurons induce activation of microglia, resulting in neural circuit degeneration." I made the neonatal epilepsy model mouse, confirmed that neuronal hyperexcitability and microglial activation occurred, and investigated their association.

研究分野：神経科学

キーワード：神経細胞 ミクログリア てんかん 発達期

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんは小児期において特に発症率が高く、将来の脳機能への影響が懸念されている。こうした成体期にまで及ぶ長期的な影響は、てんかんの発症に伴って生じる神経回路変性に起因すると考えられている。しかし、変性に至る機序の詳細は不明であり、これをターゲットとした治療法の確立は成されていない。

脳内免疫細胞であるミクログリアは、外部環境に応じて形態や活性状態を変化させ、多様な機能を発揮する。健全な状態において、ミクログリアは脳内の恒常性維持を担う。一方、中枢神経疾患等の病的状態においてミクログリアは活性化し、活性酸素や炎症性サイトカインといった神経傷害因子を放出することで、神経細胞の変性や細胞死を誘導する (Amor et al., Immunology, 2010)。近年、ミクログリアの活性状態、及び、それに付随した生理機能の制御に神経細胞が関与することが明らかにされつつある (Kierdorf and Prinz, Front Cell Neurosci, 2013)。てんかんにおいてもミクログリアが活性化し、TNF α や IL1 β 等の炎症性サイトカインを放出することで、病態に深く関与することが報告されている。また、けいれん発作が生じる際、過剰に興奮した神経細胞から様々な生理活性物質が放出される (Eyo et al., Glia, 2017)。申請者は以上の事実に着眼し、神経細胞由来の因子によるミクログリアの活性化制御が、小児期のてんかんの発症に伴う神経回路変性に関与する可能性に思い至った。すなわち、けいれん発作発症時に過剰興奮した神経細胞から遊離される因子によってミクログリアが活性化し、神経細胞の形態異常を誘起、神経回路の変性に至ると考えた。本研究では、神経細胞とミクログリアの連関が小児てんかんにおける神経回路変性に関与するかを検討する。

2. 研究の目的

本研究では、小児てんかんの発症に伴う神経回路変性における分子細胞生物学的メカニズムの解明を目指す。特に、てんかん脳において認められる、神経細胞の過剰興奮とミクログリアの活性化に着目し、これらの細胞連関の関与について検討する。*In vitro* 及び *in vivo* モデルを相補的に使用し、組織化学的、遺伝学的、薬理学的手法を用いることで、「小児てんかんにおいて過剰に興奮した神経細胞がミクログリアの活性化を誘起し、神経回路変性が生じる」という仮説を検証する。

3. 研究の方法

カイニン酸投与によるてんかんモデルマウスを使用し、てんかん脳で認められる神経細胞とミクログリアへの影響及びその関連性の検討、神経細胞によるミクログリア活性制御における分子メカニズムの解明、神経細胞によるミクログリア活性制御の神経回路変性への関与の検討を行う。では、組織化学的手法により、神経活動への影響及びミクログリアの活性状態への影響を評価する。さらに、これらの現象が互いに連関するか、ミクログリア単離培養系と神経細胞培養系を用いて検証する。では、ミクログリアの活性制御に関与する神経細胞由来の因子を特定するため、RNA-seq 解析を行う。遺伝子オントロジー解析により、カイニン酸の投与により発現が増加し、かつ、ミクログリアの活性制御に関与する候補因子を抽出する。同定した複数の候補因子を、*in vitro* 実験系を用いて薬理的にスクリーニングする。で同定した候補因子が神経回路変性に関与するか、候補因子の活性を薬理的に操作することで検討する。着目する脳領域としては海馬を選択する。これは、てんかん患者の海馬で様々な構造変化と異常な脳波所見が認められるからである。

4. 研究成果

生後 5 日の小児期のマウスにけいれん誘発剤であるカイニン酸を投与し、てんかん重積発作を誘導した。48 時間後に、ミクログリアマーカー (Iba1)、及び、ミクログリアの活性化に応じて発現が増加するリソソームマーカー (CD68) による免疫染色を行った。この結果、海馬 CA3 野の錐体細胞層にミクログリアが侵入する様子がみられ、カイニン酸の投与により、海馬でミクログリアの分布が変化することが示唆された。さらに、ミクログリアの CD68 の発現が増加したことから、ミクログリアが活性化していると考えられる。また、神経活動マーカー (c-fos) 発現の経時変化を観察したところ、カイニン酸投与後 1 週間にわたって c-fos の発現量が増加することを発見した。神経細胞の過剰な興奮がミクログリアの活性化に関与するか検討するため、神経細胞培養系とミクログリア単離培養系をそれぞれ作製した。カイニン酸で処理した神経細胞の培養培地をミクログリアの単離培養系に加え、ミクログリアが活性化するか検討した。ミクログリアは活性化すると形態が変化するため、初めに形態学的解析を行ったが、顕著な影響はみられなかった。現在は定量的逆転写 PCR 法を用いて、ミクログリアの活性化状態についてより詳細に検討している。

RNA-seq 解析を行ったが、候補因子の同定には至らなかった。所属研究室では、これまでに神経細胞由来の DNA がミクログリアの活性化を引き起こすことを明らかにしている (Matsuda et al., Nat Commun. 2015) ため、申請者は、小児てんかんにおいても神経細胞が DNA を放出するのではないかと考えた。さらに、この DNA は小児期の脳に多く存在する未成神経細胞で高発現するレトロトランスポゾンに由来すると仮説を立てた。定量的逆転写 PCR 法により、カイニン酸の投与から 3、12、24 時間後でレトロトランスポゾン的一种である Long INterspersed Element-1 (L1) の発現が増加することを発見した。

L1 は逆転写酵素活性をもつため、自身の RNA を DNA に変換できる。逆転写酵素阻害剤である 3TC をカイニン酸モデルマウスに投与したところ、成体期にカイニン酸を再投与した際の発作感受性が低下することを発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kasahara Yuka, Nakashima Hideyuki, Nakashima Kinichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Seizure-induced hilar ectopic granule cells in the adult dentate gyrus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1150283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2023.1150283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kasahara Yuka, Masukawa Daiki, Kobayashi Kenta, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Goshima Yoshio	4. 巻 40
2. 論文標題 L-DOPA-Induced Neurogenesis in the Hippocampus Is Mediated Through GPR143, a Distinct Mechanism of Dopamine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 215 ~ 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stmcls/sxab013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kasahara Yuka, Masukawa Daiki, Kobayashi Kenta, Goshima Yoshio
2. 発表標題 L-DOPA and its receptor GPR143 are involved in hippocampal neurogenesis and mood regulation.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 L-DOPA promotes neurogenesis in the Hippocampus via its receptor, GPR143.
2. 発表標題 Kasahara Yuka, Masukawa Daiki, Kobayashi Kenta, Goshima Yoshio
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 L-DOPA and its receptor GPR143 are involved in hippocampal neurogenesis and mood regulation.
2. 発表標題 Kasahara Yuka, Masukawa Daiki, Kobayashi Kenta, Goshima Yoshio
3. 学会等名 成体脳ニューロン新生懇談会
4. 発表年 2022年

〔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

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