

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462240

研究課題名(和文) 光感受性イオンチャネルを用いた新しい動物てんかんモデルの確立

研究課題名(英文) Development of new animal model of epilepsy using optogenetics

研究代表者

岩崎 真樹 (Iwasaki, Masaki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00420018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんはありふれた病であるにも関わらず、その発生機序が十分に解明されていない。その理由として、優れた疾患動物モデルがないことが挙げられる。本研究は、光遺伝学技術を応用した初めてのてんかんモデル開発を目的に行った。チャンネルロドプシン2を神経細胞に選択的に発現した遺伝子改変動物の海馬に光ファイバーを慢性留置し、所定の条件の光刺激を4日間連続で与えた。誘発されるけいれん発作の持続時間と強度は、連日の刺激に従って進行することが分かった。本研究の成果は、神経細胞の選択的刺激による初めての獲得性てんかんモデルであり、てんかん原性獲得機序の解明に有用と思われる。

研究成果の概要(英文)：Epilepsy is one of the most common neurological disorders. However, mechanism of epileptogenesis is not fully understood because ideal animal model of epilepsy is not easily available. This study was aimed to develop new animal model of epilepsy using optogenetics. Optic fiber was chronically implanted in the hippocampus of the transgenic rats expressing channelrhodopsin-2 selectively in their neurons. In these rats, duration and severity of induced epileptic seizures were escalated and fully developed after four-day photo-stimulation to the hippocampus with a certain stimulus condition. This is a first animal model of acquired epilepsy developed by selective neuronal stimulation by using optogenetics. This model would promote further studies on epileptogenesis.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：optogenetics epilepsy kindling seizure

## 1. 研究開始当初の背景

(1) てんかんはありふれた病であるにも拘わらず、発生機序が十分に解明されていない。てんかんは有病率0.5~0.8%と最も多い神経疾患のひとつであるが、その病態や治療の多くは不明である。脳腫瘍、外傷、大脳形成障害、遺伝子疾患などあらゆる脳の病変がてんかんを引き起こすが、病因によらず類似した「てんかん発作」症状として現れる。てんかん発作は、一部の神経細胞の集まりが一過性に過剰に同期して引き起こされる神経症状である。平均発火頻度の高い異常な興奮性神経細胞が引き金になるが、皮質の正常な神経ネットワークを伝播して異常活動が広がるために臨床症状を呈する。正常な皮質ネットワークがどのようにしててんかん発作という異常な状態に遷移するのか、その機序は不明である。このため、てんかんの治療は非選択的に神経細胞の興奮性を抑える薬物治療、あるいはてんかんの原因である器質的病変を正常細胞とともに切除する外科治療に限られている。

(2) てんかんには優れたモデル動物がない。初期には局所にとどまっていた神経細胞の同期活動は、発作を繰り返す度に持続時間が長くなり、より広範な活動へと広がっていくことが知られている。この現象はキンドリング現象と呼ばれ、成人てんかんの原因として最も頻度の高い側頭葉てんかんのモデルとされる。この現象を観察できる動物モデルの代表として、脳の局所を電気刺激することによって生じる電気刺激キンドリングモデルがある。しかし、電気刺激は、細胞や周囲組織に対し、非選択的な刺激であり、刺激自体が組織に与えるメカニズムは明らかとなっていないため、キンドリング現象に伴って生じる変化を、電気刺激によって生じる変化から識別できないという問題点があった。

(3) オプトジェネティクスの急速な発展にもかかわらず、てんかんへの応用はほとんど試みられていない。

光感受性イオンチャネルの遺伝子工学オプトジェネティクスは、ニューロモジュレーションの手法としていま最も期待されている技術である。細胞選択的にイオンチャネル遺伝子を導入し、そこに特異的な波長の光刺激を与えることで、イオンを通過させ、細胞膜の興奮をコントロールできる。従来の電気刺激の長所である時間分解と薬物刺激の長所である細胞選択性を兼ね備えた刺激方法である。電気生理学的な疾患であるてんかんはオプトジェネティクスの有望な応用分野であるにも関わらず、現在まで発表された研究はごくわずかである。当グループでは、世界に先駆け、オプトジェネティクスによる選択的神経細胞刺激方法を用いて、けいれんモデルを開発した(Osawa S et al. 2013 PLoS one)。このモデルはオプトジェネティクスをてんかん研究に応用した画期的な発表である。本モデルを

使用し、けいれんを繰り返し誘発することで、キンドリング現象を観察できれば、随伴する現象をより詳細に検討できると考えた。

## 2. 研究の目的

オプトジェネティクスの手法を用いた選択的神経細胞刺激によるキンドリング現象を確認することを目的に実験を行った。また、これまでに存在しなかった神経細胞の刺激方法によって、従来の電気刺激によるモデルとは異なつたてんかんの側面を模索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

クラミドモナス由来のチャネルロドプシン2(青い光によって活性化し、開口する陽イオンチャネル)が Thy-1 promoter 領域(神経細胞)に組み込まれたトランスジェニックラット、生後2-3ヶ月齢を用いた。麻酔下に海馬歯状回に向けてプラスチック製の光ファイバーを両側性に挿入し、脳表脳波測定のためにネジ電極を頭蓋骨に固定した。手術の後、数日の術後回復期間を設けた。自由行動下に、24時間持続的に脳波を測定でき、光刺激が与えられる観測装置を作成し、その環境下で実験を行った(図1)。十分な水と餌を与えた。刺激を開始する前日に、片側のファイバーより高頻度光刺激を行い、後発射(Afterdischarge)を誘発する光強度の閾値を測定した。この閾値の3倍の光強度を用い、翌日より実験を開始した。キンドリング現象誘発を目的に、1時間に1回、1日12回の誘発刺激を4日間にわたって行った。誘発されるけいれん発作の行動を Racine てんかんステージ分類(Racine 1972)で評価した。また、脳波に出現する後発射を背景活動の2倍以上の振幅と定義し、その持続時間を測定した。

第1日目と第4日目にけいれん発作を誘発した後の動物の脳組織標本を作成した。免疫染色を行うことで、組織学的に神経活動の範囲を評価した。

## 4. 研究成果

(1) キンドリング現象を確認するには、数日にわたって、慢性的にけいれん誘発を繰り返す必要があったため、ラットが自由に行動できる環境下に、いつでも光刺激をラット脳に与えることができ、24時間継続して脳波を測定できる観測装置を作成した(図1)。この装置により、数日にわたって同じ動物に対し、けいれん発作を繰り返し誘発することが可能となった。

(2) 高頻度の光刺激を行うと、神経細胞の興奮を示す脳波上の変化に引き続き、後発射が誘発された。それとともに行動の変化(けいれん発作)が認められた。刺激初日は、顔に限局したごくわずかなけいれん、ひげが揺

れる程度の行動変化 (Racine てんかん stage 1) だった。しかし、1日に12回の光刺激を連日4日間行い、発作誘発を繰り返したところ、日毎に誘発される後発射の持続時間が延長し、発作症状のてんかんステージが上昇した(図2)。刺激4日目には立ち上がりを伴う全般性間代性けいれん発作(Racine てんかんステージ4, 5)へと発作症状が進展した。

第1日目に1回発作誘発を起こした後、15分後に灌流固定した動物から得られ脳組織切片を、神経活動マーカーである c-fos で染色したところ、両側の海馬に限局した染色性を認めた。それに対し、第4日目に1回目の発作誘発を起こした動物から同様に作成した c-fos の免疫染色脳切片では、両側の海馬のみに限らず、両側の皮質を含む、広範囲の神経細胞の活動を認めた。

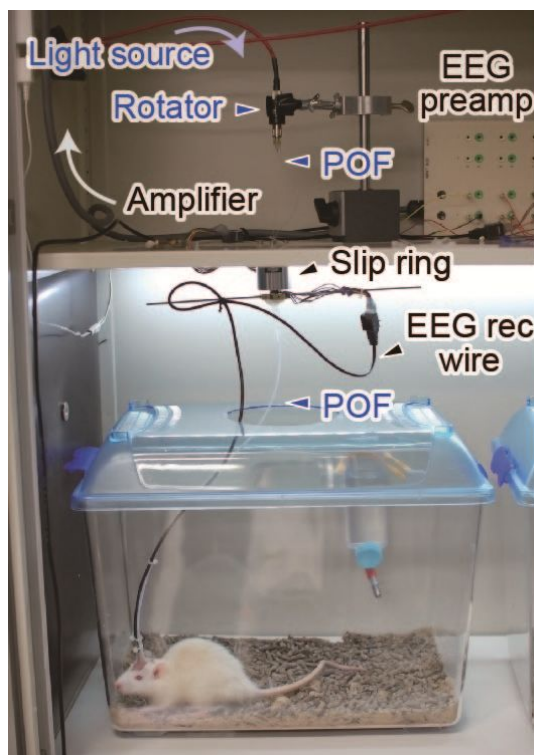


図1: 自由行動下24時間脳波、ビデオ記録、光刺激を可能とした飼育環境の作成。オプトジェネテクスによるけいれんモデルをてんかんモデルへと発展させるためには、数日間に渡り、けいれんを誘発する必要があった。そこで、自由行動下に脳波、行動が記録でき、いつでも光刺激できる環境を作成する必要があった。ラットはネジ電極と POF(プラスチック製ファイバー)が頭蓋骨に固定され、それぞれ、ケーブルで脳波アンプ、光源に接続されている。ラットは覚醒しており、自由に行動することができるこの状態で数週間の飼育が可能である。

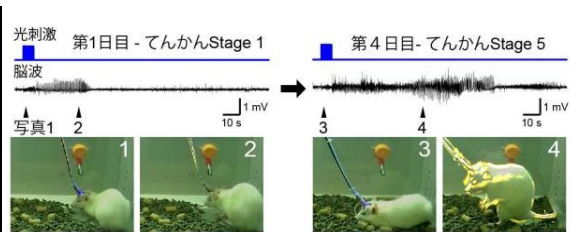


図2: 代表動物における第1日目と第4日目の脳波変化と行動変化。高頻度光刺激(6秒間)に引き続き、後発射が誘発される。上段左(第1日目)と右(第4日目)は、同じ動物から得られた誘発脳波であるが、4日間の発作誘発の後、大きく変化したことがわかる。後発射が出現している最中、動物はけいれん発作(特に動きの激しい箇所には、色をつけてある)を伴う(下段)。第1日目には、顔に限局したごく僅かなけいれん、ひげが揺れる程度(Racine てんかん Stage 1)であるが、けいれん誘発を続けた第4日目には、顔面から始まり、徐々に体全体へと広がっていく全般性間代性けいれん発作へと進展した。(Racine てんかん Stage 5)

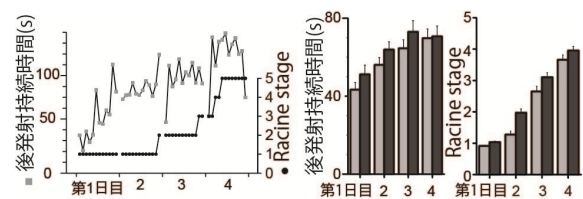


図3: 左: 代表動物の後発射持続時間と Racine てんかん Stage の4日間を通じた変化。灰色線; 後発射持続時間、黒色線; Racine てんかん Stage。右: キンドリング現象が認められた動物(n=77)における後発射持続時間と Racine stage の4日間を通じた推移。灰色; 1日の内、前半6回の平均値、黒色; 1日の内、後半6回の平均値を示している。

### 研究考察

本研究では、オプトジェネテクスを用い、神経細胞のみを選択的に刺激することで、キンドリング現象が誘発されることを初めて明らかにした。電気刺激によるキンドリング現象誘発時には、グリア細胞の人工的な賦活や、脳の破壊的的刺激などが生じ、キンドリング現象の一因になるとも考えられてきた。しかし、本研究結果から、電気刺激に随伴して生じていたと考えられる他の要因は必須ではなく、神経細胞の興奮とそれに伴って生じる後発射こそが、キンドリング現象にとって必要条件であることが明らかとなった。実際、第4日目にキンドリング現象が顕在化した際の脳組織切片において、グリア細胞の活性化マーカーである GFAP を免疫染色してみたところ、コントロール動物の脳組織切片と比較し、明らかな活性化は認められなかった。けいれん発作が始まる際、神経細胞の異常発火から生じるのか、他の原因から生じるのか、

その同定は容易ではない。しかし、神経細胞の異常発火から生じると仮定した場合、本モデルは、その状態を忠実に再現していると、実際、てんかんが成立していく仮定で、周囲の正常組織がどのように反応しているのかを詳細に検討することが可能である。神経細胞やグリア細胞を非選択的に刺激する電気刺激を用いている限り、キンドリング現象における神経細胞とグリア細胞のそれぞれの役割を明らかにすることはできない。神経細胞以外の因子に人工的な操作を加えていない本モデルは、キンドリング現象、てんかんが定着していく過程や原因の理解を深めるために意義のある新しい動物てんかんモデルとなる可能性がある。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 下田由輝：“Optogenetic retrogression of epileptogenesis” 神経オシレーションカンファレンス 2014(自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター，岡崎) 2014 年 7 月 18 日

2. 下田由輝 “Optogenetic retrogression of epileptogenesis” 光操作研究会 2014(長陵会館，仙台) 2014 年 8 月 21 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎 真樹 (IWASAKI, Masaki)  
東北大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：00420018

### (2) 研究分担者

虫明 元 (MUSHIAKE, Hajime)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：80219849

中里 信和 (NAKASATO, Nobukazu)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：80207753

### (3) 連携研究者

富永 悌二 (TOMINAGA, Teiji)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：00217548

八尾 寛 (YAWO, Hiromu)  
東北大学・生命科学系研究科・教授  
研究者番号：00144353