

論文の内容の要旨

論文題目

熱性けいれんによる 苔状線維巨大終末の異所形成

氏名 市川 淳也

【背景・目的】

熱性けいれんは発熱中に起こり、乳幼児が経験する最も一般的なけいれん発作である。熱性けいれんには単純型と複雑型が存在し、前者は良性とされている一方で、後者に関しては、将来的に側頭葉てんかんの発症へ関与する可能性が示唆されている。側頭葉てんかん患者の海馬では、歯状回における顆粒細胞層の形成異常、顆粒細胞の軸索である苔状線維の異常発芽、抑制性神経細胞の死滅、そしてアンモン角における錐体細胞の死滅及びグリオーシスによる海馬硬化などの病理学的変化が生ずる。従って、熱性けいれんが細胞・分子レベルで海馬に与える影響及び、これがてんかん原生の獲得に関与する可能性を追求することは、てんかんの発症メカニズムを解明する上で重要となる。

苔状線維は歯状回門、及び海馬 CA3 野に存在する神経細胞とシナプスを形成する、歯状回顆粒細胞の軸索である。苔状線維は通常のシナプスとは異なり、巨大終末 (large mossy fiber terminals (LMTs)、直径 4-10 μm) を有し、CA3 の錐体細胞と巨大シナプスを形成する。個々の LMT は数千個ものシナプス小胞を含んでおり、一つの終末には複数のシナプス活性領域が存在し、多いものでは 30 個を越える。そのため、高頻度の刺激により放出される神経伝

達物質の量が増加する frequency facilitation という現象が生じ、CA3 野の神経回路網における興奮、抑制のダイナミクスは顆粒細胞の発火頻度に依存する。すなわち、LMTs における可塑的变化は海馬の興奮性と抑制性のバランスに影響を及ぼすことを意味している。

本研究では、乳幼児期に頻発して起こる熱性けいれんが歯状回顆粒細胞の苔状線維、特に LMTs に与える影響を検証した。これは、乳幼児期に経験した熱性けいれんが LMTs 形成に異常をきたし、海馬の興奮性上昇を介して将来のてんかん発症に寄与するとの仮説に基づく。私は、熱性けいれんにより異所性 LMTs が形成され、成体期まで残存すること、そして異所性 LMTs の形成には cAMP-PKA 経路が関与することを明らかにした。

【方法と結果】

1. 熱性けいれんによる苔状線維巨大終末数の増加 (幼若期)

熱性けいれんが LMTs の形成に影響を及ぼす可能性を検証するため、生後 14 日齢 (P14) の Thy1-mGFP マウスにヘアドライヤーを用いて温風をあてることにより体温を上昇させ、けいれん発作を誘導した。熱性けいれんを誘導 (HT: hyperthermia) し、1 週間後の P21 において CA3 錐体細胞層内に形成された LMTs 数を定量した結果、LMTs 密度がコントロール (NT: normothermia) 群と比較して有意に増加していることが確認された (図 1A, B)。熱性けいれんは高熱を誘導することにより、けいれん発作が起こる。そのため、CA3 錐体細胞層内における LMTs の増加が高熱によるものなのか、もしくはけいれん発作によるものなのかを区別する必要がある。高熱処置 15 分前に短時間型バルビツレート酸系鎮静薬であるペントバルビタールを投与し、けいれん発作を抑制した。この群を HT-control 群とし、LMTs 密度を定量した結果、NT 群と同程度まで LMTs 密度は減少した (図 1A, B)。この結果は熱

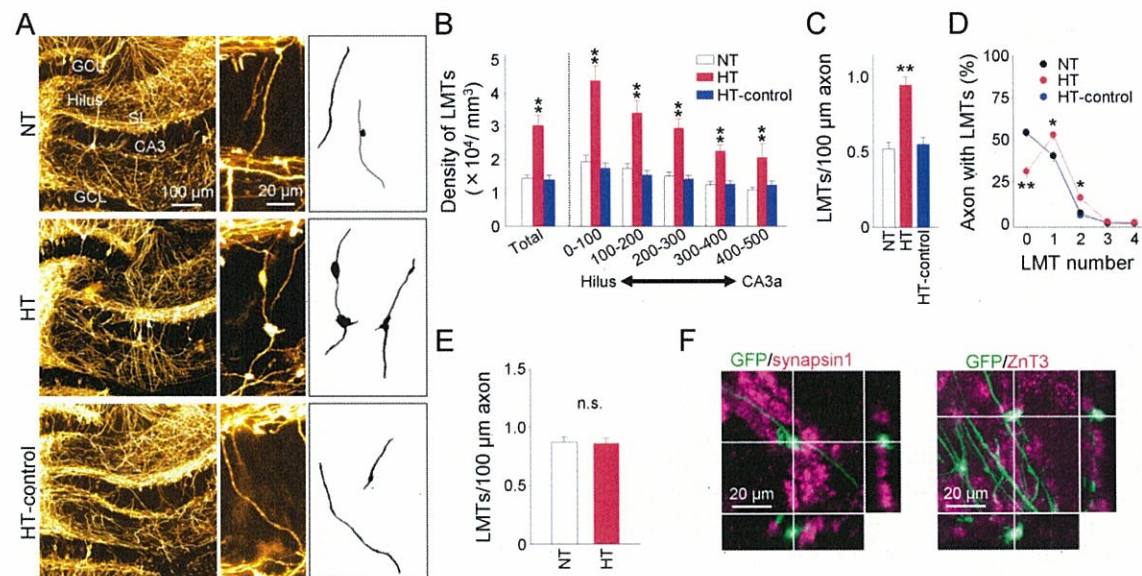


図1. 熱性けいれんによる苔状線維巨大終末の増加

(A) Thy1-mGFPマウスを用いた苔状線維巨大終末(LMTs)の可視化。(B) 歯状回門から100 μm 毎におけるLMTs密度。(C) 軸索100 μm あたりのLMTs密度。(D) 苔状線維がLMTsを形成した割合。(E) 明瞭層(SL)におけるLMTs密度。(F) 異所性LMTsにおける synapsin1、ZnT3の発現。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Tukey's test after ANOVA。

ではなく、けいれん発作が CA3 錐体細胞層内での LMTs の形成に必要であることを示唆している。

次に、苔状線維あたりの LMTs 密度を定量した。これまでの解析法では、LMTs 密度は CA3 錐体細胞層内を走行する GFP 陽性の線維の数に依存する。熱性けいれんが GFP 陽性の細胞数自体を増加させた可能性を排除するため、苔状線維 100 μm あたりの LMTs 数を定量した。LMTs 密度は、HT 群で有意に増加し、HT-control 群で抑制された (図 1C, D)。

苔状線維は通常 CA3 野の明瞭層に投射する。熱性けいれんが明瞭層における LMTs 数に影響を与える可能性を検証した結果、NT 群、HT 群間で有意な差はなかった (図 1E)。このことから、熱性けいれんは CA3 錐体細胞層内に異所性 LMTs を形成することが明らかとなった。また、異所性 LMTs が明瞭層内に存在する LMTs と同様の特性を有するのかを免疫染色法により検討した。異所性 LMTs がシナプス小胞関連タンパクである synapsin1、及び、 Zn^{2+} のトランスポーターである ZnT3 を発現することを確認した (図 1F)。

2. 熱性けいれんによる苔状線維巨大終末数の増加 (成体期)

熱性けいれんによる LMTs の増加は、けいれん誘導後 1 週間という短い期間で生じていた。そのため、この影響が成体期まで残存する可能性を次に検証し

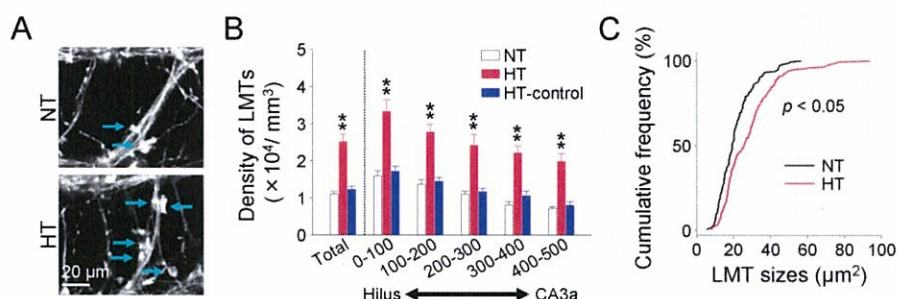


図2. 成体期における異所性苔状線維巨大終末の出現

(A) 成体期 (P60) における mGFP 発現苔状線維巨大終末 (LMTs)。矢印は CA3 野内の異所性 LMTs を示す。(B) 齒状回門から 100 μm 毎における LMTs 密度。* $p < 0.01$; Tukey's test after ANOVA。(C) NT、HT 群における LMTs サイズの累積度数分布。Kolmogorov-Smirnov test。

た。P14 で熱性けいれんを誘導し、P60 の CA3 錐体細胞層内の LMTs 密度を定量した結果、HT 群で有意に増加し、HT-control 群では NT 群と同程度まで減少した (図 2A, B)。また、LMTs の大きさを定量した結果、HT 群で有意に増加した (図 2C)。NT 群では、P60 で CA3 錐体細胞層内の LMTs 密度が P21 と比較して減少していることを考慮すると、この結果は、幼若期に熱性けいれんによって増加した LMTs 数は成体期まで痕跡として残存することを示唆する。

3. cAMP による苔状線維巨大終末形成の制御

当研究室のこれまでに、過剰興奮状態の誘導により、細胞内の cAMP が上昇することを報告している。また、突起伸長過程においても cAMP が関与することが知られている。そのため熱性けいれんによる LMTs の形成に cAMP が関与する可能性を考えた。まず、熱性けいれんが細胞内の cAMP を上昇させる可能性を免疫組織化学的に検証した結果、熱性け

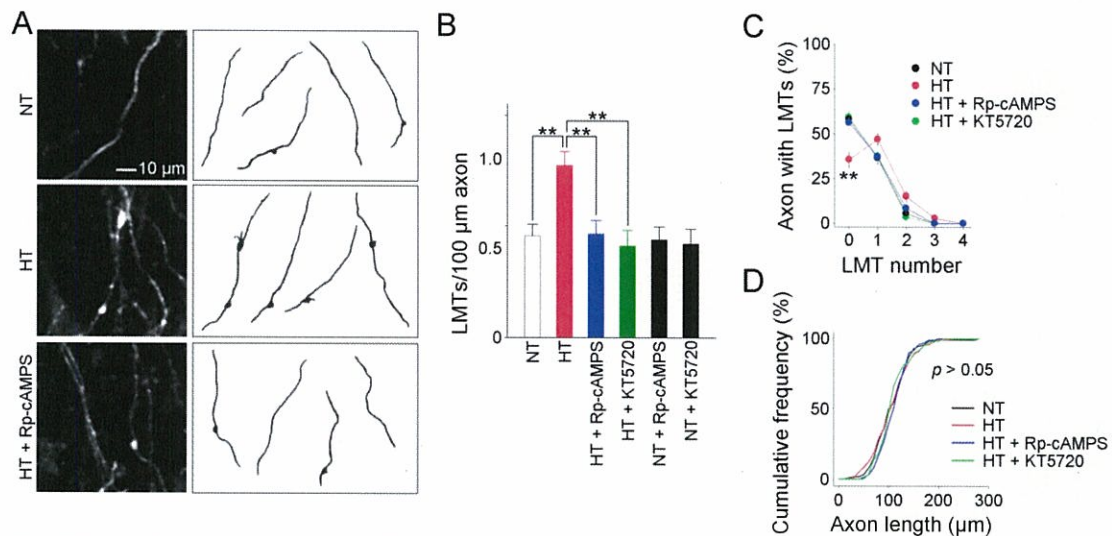


図3. 異所性LMTs形成におけるcAMPの関与

(A) 培養海馬切片の代表画像、及びトレース像。(B) 各群におけるLMTs密度。(C) 苔状線維がLMTsを有する割合。(D) CA3 錐体細胞層内における苔状線維の長さ。 ** $p < 0.01$; Tukey's test after ANOVA (B, C), Kolmogorov-Smirnov test (D)。

いれんの誘導 6 時間後、24 時間後に cAMP の蛍光強度が有意に上昇した。次に、LMTs の形成に cAMP が関与する可能性を検証するため、海馬切片培養系を用いて薬理的に調べた。生後 P11-12 の Thy1-mGFP マウスに熱性けいれんを誘導し、翌日に切片を作製し、7 日間培養した。HT 群では NT 群と比較して、有意に LMTs 密度が増加しており、cAMP のアンタゴニストである Rp-cAMPS (100 μM) の処置により、その密度は有意に減少した (図 3A, B)。また、NT 群由来の切片に Rp-cAMPS を処置した際には LMTs 密度に変化は無かった。次に、cAMP-PKA (プロテインキナーゼ A) 経路が LMTs の形成に関与する可能性を検証するため、PKA 阻害剤である KT5720 (10 μM) を処置した結果、LMTs は NT 群と同程度まで減少した (図 3B)。以上の結果は、熱性けいれんによって生じる CA3 錐体細胞層内における LMTs の過剰形成には cAMP-PKA 経路の活性化が必要であることを示唆している。

4. 熱性けいれんによるけいれん発作感受性の増大

熱性けいれんが将来のてんかん発症と関与する可能性を検証するため、けいれん誘導薬であるピロカルピンを処置し、けいれん発作感受性を調べた。P14 で熱性けいれんを誘導したマウスに、P60 でピロカルピン (280 mg/kg) を腹腔内投与した後、80 分間行動観察し、けいれん発作スコアを算出した。NT 群、HT-control 群では、ピロカルピン処置 20 分後にけいれん発作スコアがピーク (スコア 2.2 ± 0.1 , NT; 2.3 ± 0.2 , HT-control: tremor) に達し、その後は減少した。HT 群ではピロカルピン処置 5 分後から NT、HT-control 群と比較して有意にけいれん発作スコアが増加し、60 分後にピークに達した (スコア 4.2 ± 0.4 : head bobbing, 図 4A)。また、1 固体における発作最大スコアも HT 群で有意に高く (図 4B)、熱性けいれんがけいれん発作感受性を増大させていることを示唆している。次に、ピロカルピンによるけいれん発作誘導直後に灌流固定をおこない、最初期遺伝子である Fos の免疫染色によって活動した神経細胞数を定量した。CA3 錐体細胞層内の Fos⁺細胞の密度は、HT 群において有

意に増加した (図 4C)。また、CA3 錐体細胞層内で活動した神経細胞が錐体細胞、もしくは抑制性神経細胞かを区別するため、GAD67 (抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素) の免疫染色をおこなった。Fos⁺/GAD67⁺細胞密度は NT、HT 群間で変化はなく、Fos⁺/GAD67⁺細胞密度が HT 群で有意に増加した (図 4D)。このことは、けいれん発作を誘導した際に活動した神経細胞の大部分は抑制性神経細胞ではなく錐体細胞であることを示唆している。

【総括】

本研究において私は、乳幼児期の熱性けいれんにより LMTs の異所形成が生じることを明らかにした。異所形成された LMTs は成体期まで残存すること、及び LMTs の異所形成には cAMP-PKA 経路の活性化が必要であることを示した。熱性けいれんは、側頭葉てんかん患者の多くが経験しているけいれん発作であり、今回の知見は乳幼児期の神経回路異常が将来にまで維持され、てんかん発症に寄与する可能性を支持するものであり、細胞内シグナルの制御が新たな治療戦略の候補となる可能性を秘めている。

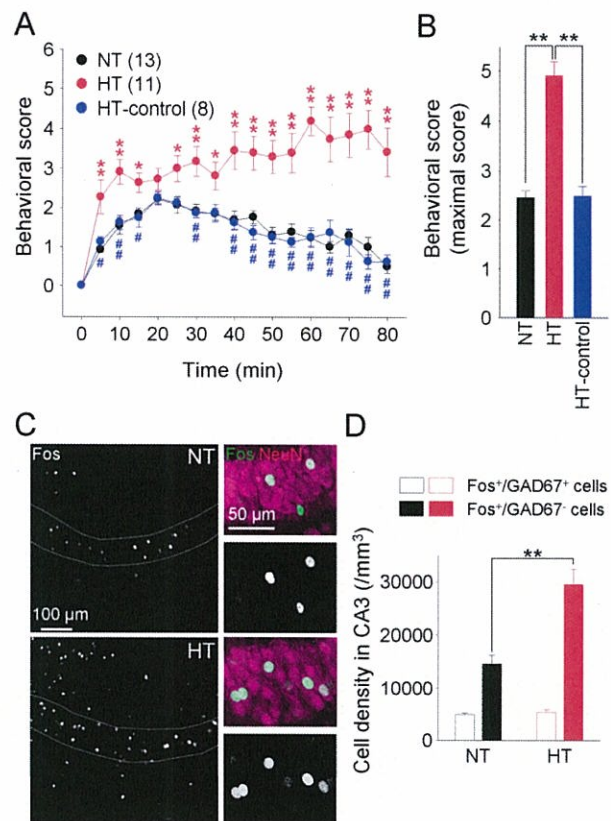


図4. 熱性けいれんによるけいれん発作感受性の増加

(A) P14のマウスに熱性けいれんを誘導し、P60でピロカルピン (280 mg/kg) を処置した。80分間行動を観察し、けいれん発作スコアを算出した。(B) 各個体における最大けいれん発作スコア。(C) Fos、及びNeuNの免疫染色像。NeuN: 神経細胞マーカー。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Tukey's test after ANOVA。NT群、HT群におけるFos⁺/GAD67⁺、及びFos⁺/GAD67⁻細胞密度。