

〔別紙 2〕

審査の結果の要旨

氏名 中原 聡一郎

てんかんは神経細胞群の過剰な同期発射を要因とする慢性の脳疾患である。てんかんのうち内側側頭葉てんかんの患者では、乳幼児～小児期に何らかの外部刺激(脳損傷、発熱、感染等)誘発性のけいれんを経験していることが少なくない。また、この時期は神経回路形成に重要な時期であり、けいれんの要因となる過剰な神経活動が、正常な神経回路形成に影響を与え、その結果として形成される異所性神経回路がてんかん原性領域となる可能性がある。そこで、本研究では、乳幼児期のけいれんが神経回路形成に与える細胞生物学的メカニズムの解明を目的とした研究をおこなった。

異所性神経回路の典型例として、内側側頭葉てんかん患者の海馬歯状回における苔状線維の異常発芽の形成が挙げられる。これは、顆粒細胞の軸索である苔状線維が歯状回門で過剰な側枝を形成し、顆粒細胞間にシナプスを形成する現象である。なお、異常発芽した苔状線維は海馬歯状回において顆粒細胞の同期発射を誘発する。本研究では、顆粒細胞の過剰な側枝形成における細胞内サイクリックAMP(cAMP)量の変動の関与を検証した。これは、cAMP が様々な神経細胞において形態調節をおこなうこと、そして、てんかんモデル動物の海馬において cAMP 量の上昇が確認されているためである。

1. てんかん原性獲得過程における cAMP の上昇

乳幼児期のてんかん原性獲得過程を研究するラットモデルを作成した。具体的には、GABA_A 受容体阻害薬である PTZ を 1 日 1 回、哺乳 6 日齢(P6)から P30 まで処置した。投与後、全てのラットにけいれん発作が誘導され、日数の経過に伴い、発作頻度は増大した。また、P45 の時点で反復性の自発発作が確認された。次に、この発作の増悪化の過程において、顆粒細胞の形態をゴルジ染色により検証した。P10 の時点では、コントロールと比べ、PTZ 処置群では、顆粒細胞の形態に差異は観察されなかった。しかし、P16 および P30 では PTZ 処置群において、苔状線維が多くの側枝を伸長させていた。また、各日齢のモデル動物の歯状回において、cAMP レベルを免疫組織化学染色により検証したところ、PTZ 処置群では、顆粒細胞層の cAMP 量の有意な上昇が P10 より認められ、P16 および P30 においても上昇は持続していた。以上より、PTZ 処置群において、顆粒細胞における cAMP 量の上昇が異常発芽の形成に先行し、その後発作頻度を上昇させることが示唆される。

2. 顆粒細胞の形態形成における cAMP の役割

海馬切片培養系を利用して、異常発芽形成における cAMP の役割を詳細に検証した。培養切片中の顆粒細胞を可視化するため、電気穿孔法を用いて、細胞膜移行性を有する memGFP を顆粒細胞に強制発現させた。P6 ラット由来の培養切片の培養初日から薬物を処置し、培養 5 日目に memGFP を導入し、培養 9 日目に形態を解析した。Sp-cAMPs (cAMP アナログ) を処置すると苔状線維長が増大し、異常発芽が形成された。また、ピクロトキシン(GABA_A 受容体阻害薬)処置により、てんかん様状態を誘導することで誘導された異常発芽は Rp-cAMPs (cAMP 不活性化アナログ) の共処置により部分的に抑制された。

単一顆粒細胞内の cAMP 量を時間制御し、異常発芽形成への寄与を検証するため、photoactivated adenylyl cyclase (PAC: 光活性化アデニル酸シクラーゼ)ベクターを顆粒細胞に電気穿孔法を用いて導入

した。PAC はミドリムシの鞭毛に局在するタンパク質であり、470 nm の励起光により活性化され、cAMP を産生する。同ベクターを培養 5 日目に導入し、その 2 日後に 470 nm の光を $20 \cdot \text{mol/s/m}^2$ の強度で 1 日間、切片に照射した。するとさらにその 2 日後、非照射群に比べて軸索形成の促進が確認された。また、光強度を $2000 \mu \text{mol/s/m}^2$ にした場合、30 秒といった短期照射でも、軸索形成が促進した。

30 秒、 $2000 \mu \text{mol/s/m}^2$ の光照射による PAC の活性度を cAMP 上昇の持続時間として、ELISA により検証した。HEK293 細胞に PAC を導入し、その 2 日後に光を照射し、任意の時間における ELISA をおこなった。すると、 $20 \mu \text{mol/s/m}^2$ または $2000 \cdot \text{mol/s/m}^2$ の強さの光を 30 秒照射した場合、照射直後に、cAMP 量が最も上昇し、時間経過と共に減衰した。これより、 $2000 \mu \text{mol/s/m}^2$ の強さの光で誘導される cAMP 量は、それが一過的な上昇でも十分に形態形成を誘導することが明らかとなった。

3. cAMP 依存的な異常発芽形成におけるミトコンドリアの関与

cAMP が異常発芽形成を誘導していることが明らかとなったので、次にそのメカニズムを追究した。そこで、ミトコンドリアに着目した。これは、神経細胞の形態形成にはミトコンドリアの産生する ATP が重要な役割を果たすことと、これまでに我々が異常発芽の形成にミトコンドリアの軸索局在が関与することを発見しているためである。そこで、ミトコンドリアの局在を経時観察するために、memGFP とミトコンドリア移行性を有する mitoDsRed を培養切片顆粒細胞に共発現させた。まず、培養 7 日目に苔状線維内のミトコンドリアの局在を観察し、直後に Sp-cAMPs を処置し、その 24 時間後に同じ軸索部位を再度観察し、ミトコンドリア密度の変化量を検証した。すると、Sp-cAMPs の処置により軸索内のミトコンドリアの密度上昇が観察された。また、この様なミトコンドリアの密度上昇と苔状線維形態の関連を詳細に培養 7 日目から 9 日目にかけて経時的に観察したところ、まず、苔状線維内のミトコンドリア密度が増加し、その後、局在化し、局在部位より側枝が形成され、最終的に異常発芽が形成された。本結果により苔状線維の形態形成において cAMP によるミトコンドリアの局在亢進が関与することが示唆された。

本研究により、幼児期のてんかん原性過程において、異常発芽の形成は、以下のような過程を経ることが明らかになった。即ち、①顆粒細胞での cAMP 上昇→②軸索内でのミトコンドリア密度の上昇→③新たな側枝の形成→④異常発芽の形成、である。以上の結果は、てんかん原性獲得過程における、一過的な cAMP 上昇の重要性を初めて明らかにするものであり、博士(薬学)の授与に値すると判断した。