

【6】

氏名	かね こ けんたろう 金子 堅太郎
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第650号
学位授与の日付	平成27年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (統合神経生理学)
学位論文題目	マウス海馬歯状回における短時間の実験的熱性けいれんによる興奮性シナプス伝達への長期的影響
論文審査委員	(主査) 教授 有 阪 治 (副査) 教授 上 田 秀 一 教授 山 口 重 樹

論文内容の要旨

【背景】

単純型熱性けいれんは一般的に予後良好であると考えられており、その長期的な影響については広範にわたって調べられていない。しかし一部の報告では単純型熱性けいれんが以前から考えられているような良性疾患ではない可能性を示唆している。

Syntaxin 1Aはシナプス小胞の開口放出に関わるSNARE (soluble NSF attachment protein receptor) 蛋白の一種である。そのため神経伝達物質の放出に重要な役割を担っており、海馬の機能調節にも関わっている。

【目的】

本研究では単純型熱性けいれんを想定した軽度のけいれんの長期的影響を検討した。ヘアドライヤーモデルによる短時間の熱性けいれんを新生ICRマウスに誘導し、その影響を海馬歯状回においてreal time RT-PCR・Timm染色・パッチクランプ・ホールセル記録により検討した。さらにsyntaxin 1Aの発現低下による電気生理学的変化をsyntaxin 1Aノックダウン海馬培養細胞において検討した。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針にしたがって行った。

生後14～15日のICRマウス36匹を対象とした。直腸温をモニタリングし、ドライヤーによる5分間の高体温（38℃以上）による短時間の実験的熱性けいれん (brief experimental febrile seizure :

BEFS) を誘発した。対照群は冷風を用い、体温変化をさせずに同様の処置を行った。BEFS誘発後のマウスをケタミン100mg/kgとキシラジン10mg/kgの腹腔内投与による全身麻酔下に①～③の実験を実施した。

①BEFS誘発後6週間目のマウスから脳スライスを作製し、Timm染色を行った。得られたスライス標本におけるBEFS群と対照群の海馬歯状回での苔状線維の異常発芽の程度の比較はすでに確立されているTimm scoreによって行った。②BEFS誘発後4週間後に海馬歯状回を分離し、real time PCRにかけた。Syntaxin 1Aの発現量をGAPDHで標準化し、比較Ct法によって相対的に定量した。③BEFS誘発後4～6週間後の雄性マウスの海馬を摘出し、厚さ400 μ mのスライス標本を作製した。歯状回顆粒細胞からパッチクランプ・ホールセル記録を実施した。本研究では灌流液にbicucullineとstrychnineを含有させ、自発的な活動電位非依存性の興奮性シナプス後電流 (EPSCs) を微小興奮性シナプス後電流 (mEPSCs) とした。④胎生17日のマウスの海馬から分離した初代培養ニューロンに antisense oligodeoxynucleotide (antisense ODN) を導入させることによるsyntaxinノックダウン海馬培養細胞を作製した。遺伝子導入の2日後 (in vitroでの培養日数16–23日頃) にパッチクランプ・ホールセル法による海馬培養細胞におけるmEPSCsの記録と解析を歯状回顆粒細胞での方法と同様に実施した。

Timm scoreの平均値の比較にはMann-Whitney U-testを用いた。歯状回におけるsyntaxin 1Aの発現と、歯状回顆粒細胞におけるmEPSCsの各パラメーターの平均値間の比較にはStudentの t 検定を用いて行った。

【結 果】

Timm染色による海馬歯状回の苔状線維異常発芽の定量ではBEFS群と対照群との間で有意差はなかった。しかし、歯状回のsyntaxin 1Aの発現はBEFS群において $81.8 \pm 0.74\%$ と有意に減少していた。さらに顆粒細胞におけるmEPSCsのイベント間隔とその振幅の平均値を比較したところ、BEFS群では振幅を変化させることなく、イベント間隔が $45 \pm 3\%$ と有意に減少していた。antisense ODNによる海馬培養細胞の実験ではその一例の結果において、syntaxin 1AのノックダウンがmEPSCsのイベント間隔をその振幅に影響することなく、短縮させていた。

【考 察】

海馬歯状回の苔状線維の異常発芽は側頭葉てんかん患者や複雑型熱性けいれんの動物モデルの病理像である再帰性の興奮性回路として認識されている。本実験におけるTimm染色の結果は単純型熱性けいれんが良性疾患であり、てんかん発生に関連するような興奮性回路の形成をしないことを示唆している。

BEFSは明らかな組織学的変化を誘導しなかったが、BEFS群のマウスでは海馬歯状回顆粒細胞のmEPSCsがその振幅を変化させることなく、頻度を有意に増加させていた。これらの所見からBEFSが歯状回顆粒細胞において、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達をシナプス前性に亢進させていると考えられた。この変化は海馬歯状回におけるsyntaxin 1Aの発現減少を伴っていた。そこで我々はsyntaxin 1Aの発現低下がグルタミン酸作動性興奮性シナプス伝達を亢進させるという仮説を

antisense ODNによる海馬培養細胞の実験を試みた。その一例の結果においてBEFS群のin vivoの実験で観察された所見と同様の結果が得られた。

以上の結果からBEFSは海馬歯状回におけるsyntaxin 1Aの発現レベルを減少させ、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達をシナプス前性に亢進させることを示唆している。これらの知見は単純型熱性けいれんが必ずしも良性疾患でないことを示唆している。

本実験では歯状回顆粒細胞のmEPSCsの源は同定していない。顆粒細胞は苔状細胞、苔状線維の側枝、嗅内皮質からの投射など複数のグルタミン酸作動性の興奮性入力を受けている。また本実験においてTimm染色で苔状線維に組織学的変化はなく、歯状回でのsyntaxin 1Aの発現低下を観察した。以上のこととSyntaxin 1Aは海馬において神経伝達物質の放出を抑制的に制御していることから、少なくとも部分的には、苔状細胞でのsyntaxin 1Aの減少が本実験で観察されたグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達の亢進に寄与していることが推察された。

【結 論】

本研究の結果は新生期の単純型熱性けいれんが海馬歯状回において組織学的な影響を及ぼさないにもかかわらず、興奮性シナプス伝達を成人期まで継続して増強させることを示唆している。しかし、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達の亢進がてんかん発生に関連しているかどうかはまだ明らかにされていない。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

単純型熱性けいれんは一般的に予後良好で長期的な影響を及ぼすことは少ないと考えられている。しかし、一部の集団研究やMRIによる追跡調査では、単純型熱性けいれんでも長期的な影響を及ぼす可能性が示唆されている。そこで申請論文では、シナプス小胞の開口放出に関わるSNARE (soluble NSF attachment protein receptor) 蛋白の一種であり、海馬において神経伝達物質の開口放出抑制的に制御しているSyntaxin 1Aに着目し、海馬歯状回における短時間の実験的熱性けいれんの影響を検討した。

本研究では単純型熱性けいれんを想定し、生後14~15日のICRマウスにヘアドライヤーモデルによる5分間の実験的熱性けいれん (brief experimental febrile seizure : BEFS) を誘発した。その後Timm染色で苔状線維の異常発芽を、real time RT-PCRで海馬歯状回のSyntaxin 1Aの発現変化を、パッチクランプホールセル法で歯状回顆粒細胞の微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic currents : mEPSCs) をそれぞれ検討した。

その結果、苔状線維の再構成においてBEFS群と対照群の間で相違はなかった。しかし、歯状回顆粒細胞におけるmEPSCsのイベント間隔がその振幅に影響することなく、有意に短縮しており、この変化は歯状回におけるSyntaxin 1Aの発現減少を伴っていた。

歯状回顆粒細胞でみられたこれらの電気生理学的変化はグルタミン酸作動性のシナプス伝達がシナプス前性に亢進していることを示しており、この変化と上記の遺伝子発現変化が関連しているという

仮説のもと、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドによるSyntaxin 1Aのノックダウンを海馬培養細胞で試みた。その結果、ノックダウンによりSyntaxin 1Aの蛋白発現が減少した海馬培養細胞における電気生理学実験においてBEFS群と同様の電気生理学的変化を観察することができた。

以上のことからBEFSは長期にわたり、海馬歯状回顆粒細胞においてグルタミン酸作動性のシナプス伝達がシナプス前性に亢進しており、この変化にSyntaxin 1Aの発現減少による開口放出の増加が関連している可能性を推察することができた。歯状回顆粒細胞におけるmEPSCsの変化は興奮性介在ニューロンである苔状細胞由来の影響と考察した。しかし、上記のシナプス伝達の亢進がてんかん発症に関連しているかどうかは明らかにされておらず、今後のさらなる検討が必要であると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

単純型熱性けいれんは臨床においても良性疾患として認識されており、長期的な影響についての基礎研究はあまり実施されていない。複雑型熱性けいれんの動物モデルとして最も用いられているヘアドライヤーモデルを改変し、短時間及び単回としていることから、軽度の単純型熱性けいれんを想定したモデルとして、本研究方法は妥当なものである。本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得ている。

【研究結果の新奇性・独創性】

これまでヘアドライヤーモデルを用いた複雑型熱性けいれんの基礎研究は数多く行われてきたが、良性疾患とされる単純型熱性けいれんについての検討は十分に行われてこなかった。しかし、熱性けいれんの約70%は単純型熱性けいれんであり、そのうち過半数は単回性である。従って多くの患児が罹患しうるけいれんでも長期間にわたり影響を及ぼす可能性を示した本研究は、新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切なデータ採取と統計解析を用いている。これまで関連してきた多くの文献からの知見と比較検討しながら客観的に結論をまとめている。

本研究では、BEFS群において海馬歯状回のSyntaxin 1Aの発現低下を伴う顆粒細胞におけるシナプス前性のシナプス伝達の亢進を示した。苔状線維の再構成に影響はなかったが、持続的な機能的影響を及ぼすという結論は、妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

単純型熱性けいれんは、神経学的な後遺症を伴うことなく、そのみの罹患では積極的な治療的介入は必要ないとされている。本研究では短時間の単回の熱性けいれんの若年成人にまで及ぼし得る影響について検討を試みている。小児は神経細胞の回復機能に優れているため、本研究で観察した変化は長期的にみると一過性であり、その経過をみている可能性もある。このような基礎研究を継続していくことはてんかんのような慢性疾患の発症機序の手がかりとなり得る研究であると評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は単純型熱性けいれんの特徴、過去の熱性けいれんに関する文献について学び、仮説を立て

て研究計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は、独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Dokkyo Journal of Medical Sciences

41 : 221-229, 2014