

令和 2 年 4 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860724

氏 名

野口 浩史

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： カリフォルニア大学サンフランシスコ校（米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

苔状細胞由来 Shh に着目した、てんかん発作後新規てんかん発生メカニズムの解明

3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

カリフォルニア大学サンフランシスコ校 Department of Neurology

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

背景・目的

記憶形成を司る海馬には、成体においても神経幹細胞を保持し続けることができる特殊な脳領域、“海馬歯状回”が存在する。そこで神経幹細胞より日々新生されるニューロンは、記憶形成や学習など海馬機能の発揮に重要な役割を担っている。しかし、このような神経幹細胞のニューロン新生は様々な病態下で破綻することが示されている。例えば、海馬内ニューロンの異常興奮が引き起こされる側頭葉てんかんでは、てんかん発作により、神経幹細胞の過剰な増殖が誘導され、それによってニューロンが過剰新生される。これにより海馬内に異常な神経回路が形成され、てんかん発作頻度を増悪させる“てんかん原生”を形成する一因となる。しかし、てんかん発作がどのようにして神経幹細胞のニューロン新生を破綻させているのか、という極めて基本的、かつ、てんかん原生発生の根源を成すメカニズムが未解明である（図1中の“?”）。

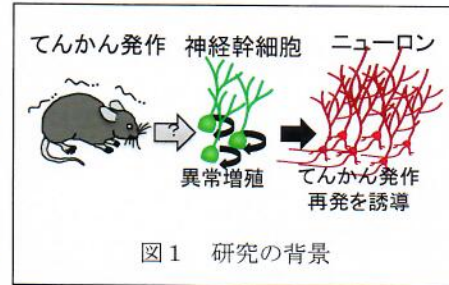


図1 研究の背景

てんかん発作後の異常ニューロン新生では、神経幹細胞の異常増殖がニューロンの異常増加に先立って引き起こされる。そこで申請者は、神経幹細胞の増殖を誘導する因子に着目し、その中でも、海馬歯状回の神経幹細胞の発生・維持に重要な役割を担い、また数多くの病態下で発現が誘導されることが示されている Shh に焦点を当て、てんかん発作後に引き起こされる異常ニューロン新生のメカニズム解明を目指して以下の検討を行ってきた。

1. てんかん発作により Shh シグナルが増加する

てんかん発作により海馬歯状回内の Shh シグナルが変動するかについて検討を行った。Shh シグナルの下流標的遺伝子である Gli1 のプロモーターの制御下で LacZ 遺伝子が発現する Gli1-LacZ マウスにカイニン酸 (KA) を投与しててんかん発作を誘導した。てんかん発作誘導後 1、3、7 日目に LacZ 染色を行い、LacZ 陽性細胞の Shh シグナルが活性化している細胞を標識・観察した。海馬歯状回の神経幹細胞は海馬歯状回顆粒細胞下帯 (SGZ) に存在しており、それらの局在を反映して Shh シグナルの活性化を示す LacZ 陽性細胞は SGZ に限局して観察された。LacZ 陽性細胞の数の変化を観察した結果、陽性細胞数はてんかん発作後 1 日目より増加を開始し、てんかん発作後 3 日目をピークに LacZ 陽性細胞が顕著に増加していくことが明らかとなった。以上の結果は、てんかん発作により Shh シグナルの活性化が誘導されることを示しており、またこの Shh シグナルの増加時期と一致して、てんかん発作 3 日目にかけて神経幹細胞の異常増殖が誘導されることから、てんかん発作後の Shh シグナルの増加が神経幹細胞の異常増殖に関与している可能性が示された。

2. Shh を減少させることにより、てんかん発作後の異常ニューロン新生が減弱する

先の実験において、てんかん発作後の Shh シグナルの増加がてんかん発作により誘導される異常な神経幹細胞の増殖—ニューロン新生を引き起こす一因になっている可能性が得られた。そこで次に、Shh シグナルを減少させることで、てんかん発作後の異常ニューロン新生を弱体化させることができるか検討を行った。

海馬歯状回内の Shh シグナルを減少させるために、Shh シグナルのリガンドである Shh のヘテロ欠損マウスを利用した。まず、Shh ヘテロ欠損マウスにおいて実際に Shh シグナルが減弱しているかを確認するために、Shh ヘテロ欠損マウスと先の実験で用いた Gli1-LacZ マウスをかけ合わせ、LacZ 染色により Shh ヘテロ欠損マウスにおいて Shh シグナルの活性化が減弱しているか調べた。その結果、Shh ヘテロ欠損マウスでは LacZ 陽性細胞が著しく減少することが明らかとなり、またてんかん発作により誘導される LacZ 陽性細胞の増加も観察されなかった。これらのことは、Shh ヘテロ欠損マウスではてんかん発作後に増加する Shh シグナルの活性化が誘導されないことを示している。そこで次に、この Shh ヘテロ欠損マウスにてんかん発作を誘導し、てんかん発作後に誘導される異常ニューロン新生を観察した。その結果、野生型に比べて Shh ヘテロ欠損マウスでは、てんかん発作後に過剰に産生される新生ニューロンの数が減少していた。てんかん発作後に産生されるニューロンは異所的に配置されることが示されているが、Shh ヘテロ欠損マウスではこのような異所的に配置されるニューロンの数も減少していた。以上の結果は、てんかん発作により誘導される Shh シグナルの増加がてんかん発作後の異常ニューロン新生の一因になっている可能性を示している。

3. 海馬歯状回において苔状細胞が Shh を発現している

Shh シグナルの活性化がてんかん発作後に誘導され、異常なニューロン新生を引き起こしている可能性が得られた。これは、てんかん発作後に海馬歯状回内に放出される Shh が増加することを示唆しているが、成体マウスの海馬歯状回においてどの細胞が Shh を放出しているのかはわかっていない。

そこで、Shh のプロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現する Shh-Cre マウスと、Cre リコンビナーゼによる組み換え依存的に赤色蛍光タンパク質 Ai14 を発現する Rosa-loxP-Stop-loxP(LSL)-Ai14 マウスを掛け合わせ、海馬歯状回において Shh を発現している細胞の同定を行った。その結果、海馬歯状回の歯状回門 (hilus) において

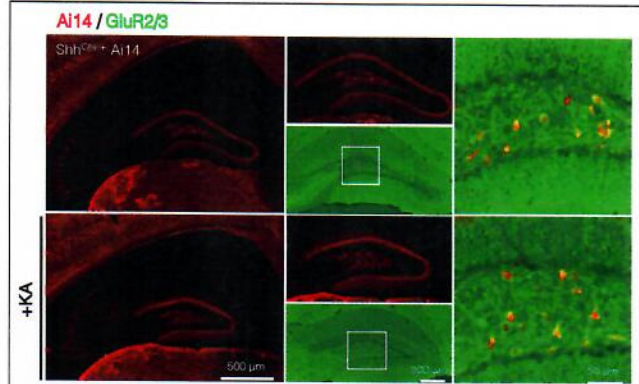


図2 Shh 放出細胞の同定

Shh を放出している細胞が Ai14(赤)で標識されている。これらの細胞は海馬歯状回門に位置し、苔状細胞マーカー GluR2/3 (緑) を発現している

Ai14 を発現している細胞が観察された (図2)。Hilus には複数のサブタイプの抑制性ニューロンに加え、興奮性ニューロンの苔状細胞が局在している。抑制性/興奮性ニューロンのマーカータンパク質を用いて Shh を発現している細胞種の同定を行った結果、Ai14 陽性細胞は苔状細胞マーカータンパク質である GluR2/3 を発現していることが明らかとなった。また、Ai14 の発現は GluR2/3 陽性細胞に限局していることから、海馬歯状回において苔状細胞が Shh を発現していることが示された。

てんかん発作により苔状細胞以外の細胞が Shh の放出を開始する可能性を考慮し、てんかん発作誘導後に同様に Ai14 陽性細胞の局在を調べた。その結果、てんかん発作後においてもてんかん発作前と同様に苔状細胞特異的に Ai14 の発現が観察され、てんかん発作後に新たに Shh の発現を開始した細胞種は観察されなかった (図2)。以上の結果は、海馬歯状回において苔状細胞が Shh を発現しており、苔状細胞由来の Shh がてんかん発作後の異常ニューロン新生に寄与している可能性を示している。

4. 苔状細胞由来 Shh の欠損によりてんかん発作後の異常ニューロン新生が減弱する

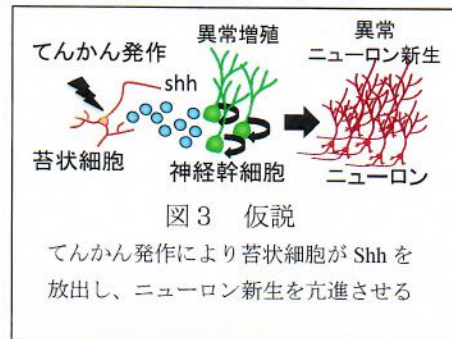
海馬歯状回において苔状細胞が Shh を特異的に発現していることから、次に苔状細胞特異的に Shh の欠損を誘導することで、海馬歯状回内の神経幹細胞の Shh シグナルを減少させ、てんかん発作後の異常ニューロン新生を減弱させることができるかについて検討を行った。

まず苔状細胞由来 Shh の欠損により、海馬歯状回内の神経幹細胞における Shh シグナルが減少するかについて調べるため、苔状細胞特異的タンパク質 Crlr のプロモーターを用いて苔状細胞由来の Shh を欠損させた Crlr-Cre:Shh^{fl/fl} マウスと Gli1-LacZ マウスを掛け合わせ、LacZ 陽性の Shh シグナルが活性化した細胞数の変化を観察した。その結果、苔状細胞由来 Shh の欠損により LacZ 陽性細胞の著しい減少が観察された。また、てんかん発作を誘導し、てんかん発作により誘導される Shh シグナルの活性化についても同様に調べた結果、苔状細胞特異的に Shh を欠損させたマウスでは、てんかん発作後に誘導される LacZ 陽性細胞の増加も認められなかった。これは、苔状細胞由来の Shh が海馬歯状回内の神経幹細胞の Shh シグナルを活性化させていることを示している。

そこで次に、Crlr-Cre:Shh^{fl/fl} マウスにてんかん発作を誘導し、苔状細胞由来 Shh の欠損によるてんかん発作後の異常ニューロン新生への影響を調べた結果、Crlr-Cre:Shh^{fl/fl} マウスではてんかん発作後に誘導される異常な新生ニューロンの増加が減弱していた。加えて、Shh ヘテロ欠損マウスでの結果と同様に、苔状細胞由来 Shh を欠損させたマウスでは、てんかん発作により誘導される異所性ニューロンの数も顕著に減少していた。以上の結果は、苔状細胞由来の Shh が海馬歯状回内の神経幹細胞の Shh シグナル活性化を誘導しており、てんかん発作により惹起される異常ニューロン新生の一因となっていることを示唆している。

5. 苔状細胞は神経活動の活性化により Shh を介してニューロン新生を増加させる

てんかん発作により脳内のニューロンは過剰な興奮状態に陥る。カイニン酸により誘導されるてんかん発作は側頭葉てんかんの病態を模しており、特に側頭葉てんかんでは海馬歯状回の苔状細胞が過剰な興奮状態に陥ることが示されている。興味深いことに、ニューロンからの Shh の放出が神経活動により誘導されることを示唆する結果が報告されており、以上のことから、てんかん発作時の過剰な神経活動が苔状細胞からの Shh の放出を増加させ、異常なニューロン新生を引き起こしている」と仮説を立て、検証を行った（図3）。



まず、苔状細胞の神経活動がニューロン新生に与える影響を明らかにするために、人為的に苔状細胞の神経活動を過剰に活性化させ、それによりニューロン新生が増加するかどうかについて検討を行った。人為的な神経活動の誘導には clozapine (CLZ) の投与により神経活動を誘導/抑制することができる designer receptor exclusively activated by designer drugs (DREADD)法を用いた。Cre リコンビナーゼによる組み換え依存的に CLZ 応答性神経活動誘導タンパク質 hM3Dq を発現する Rosa-LSL-hM3Dq マウスと Crlr-Cre マウスを掛け合わせ、CLZ の投与により苔状細胞特異的に神経活動を誘導できる Crlr-Cre; Rosa-LSL-hM3Dq マウスを作成した。このマウスに CLZ を 1 週間連続投与して苔状細胞の活性化を誘導した後、これによるニューロン新生への影響を調べた結果、苔状細胞の神経活動の活性化により新生されたニューロンが著しく増加することが明らかとなった。

苔状細胞は両方の脳半球にまたがって神経突起を投射しており、片側脳半球に存在する苔状細胞の活性化が、他方の脳半球内の海馬歯状回にも影響が及ぶ可能性が考えられる。そこで、一方側の苔状細胞のみに神経活動の活性化を誘導し、他方のニューロン新生への影響を調べることで、苔状細胞による活性化の影響が限局的なものであるのか、または広範囲に及ぶのかについても検討を行った。Cre リコンビナーゼによる組み換え依存的に CLZ 応答性神経活動誘導タンパク質 hM3Dq を発現するアデノ随伴ウイルスを Crlr-Cre マウスの海馬歯状回に導入し、一方側の脳半球の苔状細胞のみに hM3Dq を発現させた。その後、CLZ の投与により一方側の苔状細胞の神経活動のみを誘導し、これによるニューロン新生への影響を調べた。興味深いことに、ウイルスが導入された側の海馬歯状回ではニューロン新生に変動は観察されなかったが、ウイルスが導入された苔状細胞が神経突起を投射している反対側の脳半球では、苔状細胞の活性化によりニューロン新生の増加が観察された。これは、苔状細胞が神経活動の影響が反対側の脳半球のニューロン新生に影響を与えることを示唆している。以上の結果は、苔状細胞が神経活動依存的にニューロン新生を制御しており、またこの制御機構が神経突起を介して遠方の苔状細胞により行われていることを示唆している。

次に、これらの苔状細胞の神経活動の活性化によるニューロン新生の増加が、Shh を介して行われているのかについて検討を行った。苔状細胞由来の Shh を欠損させた Crlr-Cre:Shh^{fl/fl} マウスと、Cre リコンビナーゼによる組み換え依存的に CLZ 応答性神経活動誘導タンパク質 hM3Dq を発現する Rosa-LSL-hM3Dq マウスを掛け合わせ、Shh の欠損を苔状細胞に誘導するとともに CLZ の投与により苔状細胞の神経活動を誘導できるマウスを作成した。同様に CLZ を投与し、苔状細胞の神経活動を誘導した後ニューロン新生への影響を観察した結果、苔状細胞由来の Shh を欠損させたマウスでは、苔状細胞の神経活動の活性化によるニューロン新生の増加が観察されなかった。以上の結果は、苔状細胞の神経活動に応じたニューロン新生の増加が、苔状細胞の Shh に起因して誘導されていることを示している。

6. 苔状細胞の神経活動抑制によりてんかん発作後の異常ニューロン新生が減弱する

苔状細胞の神経活動によりニューロン新生が増加したことから、次にてんかん発作下での苔状細胞の過剰な活性化を抑制することで、てんかん発作に続き誘導されるニューロン新生の増加を弱体化させることができるかどうか検討を行った。苔状細胞特異的に Cre を発現する Crlr-Cre マウスと、Cre リコンビナーゼによる組み換え依存的に CLZ 応答性神経活動抑制タンパク質 hM4Di を発現する Rosa-LSL-hM4Di マウスを掛け合わせ、CLZ の投与により苔状細胞の神経活動の抑制を任意のタイミングで誘導できるシステムを構築した。ウイルスの代わりに遺伝子組み換えマウスを用いることで、両側の苔状細胞の神経活動を同時に抑制することが可

能である。このシステムを利用し、苔状細胞の神経活動を抑制した状況下で、てんかん発作により異常ニューロン新生が誘導されるのかについて調べた。てんかん発作誘導前に CLZ を投与し、苔状細胞の神経活動を予め抑制しておき、その後カイニン酸を投与しててんかん発作を誘導した。てんかん発作後のニューロン新生を観察したところ、てんかん発作前に苔状細胞の神経活動を抑制させた場合では、てんかん発作後に増加する新生ニューロン数が減弱することが明らかになった。これは苔状細胞の神経活動を抑制することで、てんかん発作後の異常ニューロン新生を弱体化させることができることを示している。

考察及び総括

申請期間の研究により、海馬歯状回において苔状細胞が特異的に Shh を放出していることを明らかにし、苔状細胞由来の Shh がてんかん発作後の異常な神経幹細胞の増殖及び、ニューロン新生の増加に寄与していることを示唆する結果を得ることが出来た(図4)。加えて、苔状細胞特異的に神経活動の活性化・抑制を誘導できる実験系を確立し、苔状細胞の神経活動がニューロン新生を制御していること、苔状細胞の神経活動の抑制によりてんかん発作後の異常ニューロン新生を弱体化させることができることを明らかにすることができた。これらの結果では、てんかん発作を再発させる原因となる異所性ニューロンの産生数においても減少が見られた。これはてんかん発作後に Shh シグナルを減少させることや、苔状細胞の神経活動を抑制することにより、てんかん発作を頻発させる原因となるてんかん原生の発生を抑制できる可能性を示している。今後のさらなる展開として、苔状細胞由来の Shh を欠損させたマウスや苔状細胞の神経活動を抑制したマウスに、カイニン酸を投与しててんかん発作を誘導し、10 週間の期間を置いた後に、低濃度のカイニン酸を投与して、低濃度カイニン酸に対する感受性の増加が Shh の減少及び苔状細胞の神経活動の抑制により減弱するかについて検討することを計画している。これらの実験により、てんかん発作後に放出される苔状細胞由来の Shh がてんかん原生の発生に寄与していることを直接明らかにすることができるとともに、Shh シグナルの抑制及び、苔状細胞の神経活動の抑制がてんかん原生発生を防ぐアプローチになり得ることを提示できると考えている。これらの本申請期間の成果は、論文として報告する予定である。

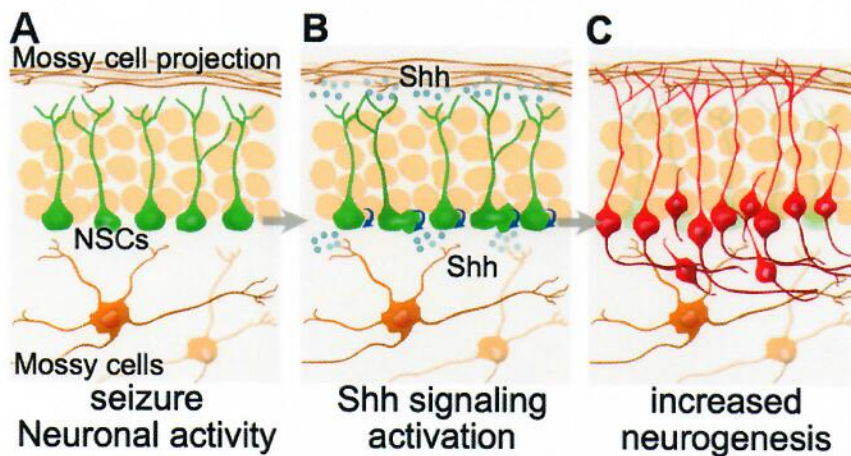


図4 本研究成果より得られた仮説

A: 神経幹細胞の周囲には苔状細胞が存在し、苔状細胞は海馬歯状回内に広範囲に渡って神経突起を伸ばしている。B: てんかん発作により苔状細胞の神経活動が活性化すると Shh が放出され、神経幹細胞の Shh シグナルが増加し、増殖が誘導される。C: これによりてんかん発作後に過剰なニューロン新生が引き起こされる。