

—— 研究助成報告 ——

てんかんに伴って成体大脳新皮質内で起きる興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の新生現象

Kindling in the mouse neocortex induce excitatory neurons and inhibitory neurons in the mouse neocortex

玉 巻 伸 章¹⁾, Shogo Ninomiya¹⁾, Shigeyuki Esumi¹⁾, Kunimasa Ohta²⁾,
Takaichi Fukuda³⁾, Tetsufumi Ito⁴⁾, Itaru Imayoshi⁵⁾, Ryoichiro Kageyama⁵⁾,
Toshio Ikeda⁶⁾, Shigeyoshi Itohara⁷⁾

要旨：ネスチンは、神経前駆細胞に発現します。また、神経系への侵襲が有った際にも、多くの脳内の細胞にネスチンが発現します。私共は、マウスの扁桃体と大脳新皮質の表面に電極を埋め込み、kindlingを形成すると、脳の外面にある脳軟髄膜にネスチン陽性細胞が現れることを発見しました。私共は、軟膜のネスチン陽性となる細胞をpia-progenitorと命名しました。更に電気刺激によりkindlingを1か月に渡って続けると、ネスチン陽性のpia-progenitorは、GAD67（抑制性神経細胞のマーカー）陽性となる細胞や、NeuroD6（大脳皮質興奮性神経細胞のマーカー）陽性となる細胞が見つかりました。そこで、pia-progenitorが生み出す細胞の形態を調べるために、GAD67陽性細胞特異的にGFPを発現するシンプルレトロウイルスを、またNeuroD6陽性細胞特異的にGFPを発現するシンプルレトロウイルスを、くも膜下腔に注入してkindlingを2週間継続しました。その結果、多くのGFP陽性の脳皮質興奮性神経細胞と大脳皮質抑制性神経細胞を見つけることが出来ました。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2015 ; 26 : 55-62

Key Words : arachnoid, epilepsy, NeuroD6, GAD67, kindling

<はじめに>

ネスチンは、神経細胞産生領域に分布する中間

径フィラメントであると考えられています。また、ネスチンは、成体終脳胞の脳室下帯 (SVZ) や、歯状回の顆粒細胞下層 (SGZ) において、

¹⁾ 熊本大学大学院生命科学研究部脳回路構造学

〔〒860-8556 熊本市中央区本荘1-1-1〕

Nobuaki Tamamaki¹⁾, Shogo Ninomiya¹⁾, Shigeyuki Esumi¹⁾, Kunimasa Ohta²⁾, Takaichi Fukuda³⁾,
Tetsufumi Ito⁴⁾, Itaru Imayoshi⁵⁾, Ryoichiro Kageyama⁵⁾, Toshio Ikeda⁶⁾, Shigeyoshi Itohara⁷⁾

¹⁾ Department of Morphological Neural Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University,
Kumamoto, 5 Japan

²⁾ Department of Developmental Neurobiology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University,
Kumamoto, 6 Japan

³⁾ Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University,
Kumamoto, 7 Japan

⁴⁾ Department of Anatomy and Neuroscience, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui, 8
Japan

⁵⁾ Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, 9 Japan

⁶⁾ National Institute for Longevity Sciences, Aichi, 10 Japan

⁷⁾ Laboratory for Behavioral Genetics, RIKEN, BSL, Wako, 11 Japan

⁸⁾ Coruse of Physical Therapy, Department of Rehabilitation, Faculty of Nursing and Welfare, Kyushu
University of Nursing and Social Welfare, Kumamoto, 12 Japan

神経前駆細胞のマーカーとみなされています^{1,2)}。しかし、Lendahl et al¹⁾は、NG2グリア細胞のような非神経細胞、及び血管の内皮前駆細胞³⁻⁵⁾もネスチンを発現することを報告しています。虚血、出血、てんかん、および機械的損傷によって引き起こされる脳損傷が、ネスチン発現を誘導することから考えても、脳の機能回復に、ネスチンが関連することは常に推定されてきました⁵⁻⁷⁾。

てんかんの発症率は人口の1%に達する重大な神経学的障害です。てんかんは、脳損傷後または患者の生活のかなり長い期間続くことが知られています。てんかんの本質的なメカニズムとして、繰り返しによって形成される焦点にあります。焦点が広がると、てんかんを悪化させ、全ての抗てんかん薬に抵抗性となり、脳萎縮を引き起こす難治性の状態になります。てんかんを模倣する動物モデルを生成することは、患者の脳におけるてんかんの進行を研究するために重要です。

扁桃体キンドリリングは、扁桃体に刺激電極を配置することによって形成することができ、本稿では、キンドリリングにより生じた変化の中でも、脳内、脳表面に発現するネスチンに着目して、研究を始めることにしました。

<材料および方法>

動物とキンドリリング形成

実験には、野生型マウスC57BL / 6Jマウスを、SLC（静岡Japan）から購入しました。また、10週齢のマウスの3種のラインをこの実験に使用しました。NST-Istopl-DTA（ジフテリア毒素Aフラグメント）/ NesCreERT2（NES-DTA）は、ホモNST-Istopl-DTAマウスとホモNesCreERT2マウスを交配することにより準備しました⁸⁾。ネスチン-GFPトランスジェニックマウスは、東京大学の山口先生より供与⁹⁾を受けました。今回の動物実験は、熊本大学の動物実験委員会によって承認されました。

初めの実験では、3ラインのマウス、C57/B6野生型マウス、NST-DTAマウス、及びNestinGFPマウスをケタミン（100mg/kg）で麻酔し、実験に供しました。麻酔の適切な深さ

は、つま先のピンチに応答して反射の欠如によって確認しました。マウスの胸を開き、心臓の左心室穿刺して、固定剤（0.1 Mリン酸、4%パラホルムアルデヒド、0.9%生理食塩水[PBS]をバッファリング）で灌流し、全身を固定しました。

第2番目の実験では、上記のような麻酔後に、5匹の野生型マウス、9匹のNST-DTAマウス、及び3匹のNestin-GFPマウスの脳に刺激電極を植えました。マウスは、定位固定装置に保持され、電極を挿入するためのポイントは、頭蓋骨にマッピングして、電極をブレグマから尾側3 mm横1.6 mmのポイントから脳内に挿入し、ブレグマから4 mmの深さに入れました。参照電極は尾1.6 mmとブレグマに対して横1 mmの新皮質中に入れました。

第3番目の実験では、野生型マウスは、1日2回（2 mA最大2秒間60 Hzの矩形波）電気刺激を与えて、一日二回（1.5時間間隔で2回50 μ g/kgの腹腔内）BrdUをを投与しました。そしてこの様な作業を、28日間繰り返しました。電気刺激の結果、野生型マウスにおけるキンドリリング後の行動は、0~5の発作クラスにより記録しました¹⁰⁾。てんかん行動の持続時間は、脳電図（EEG）を記録しました。EEGは、プレアンプ（BSA-ECG, ユニーク・メディカル株式会社、東京）とペンレコーダーに電気刺激電極を再接続して記録しました。電極なし3野生型マウスは、28日間一日二回（1.5時間間隔で2回50 μ g/kgの腹腔内）BrdUを投与しました。28日目には、BrdUを注射した後、6野生型マウスは、免疫組織化学のために麻酔をかけ、ホルマリン固定液で灌流し固定しました。

電極を有する3匹の野生型マウス、及び3匹のNesCreERT2 x NST-Istopl-DTAマウスを4週後、電気刺激に加えて、タモキシフェン（1 mgをサンオイルに溶かして経口投与で与えました。）およびBrdU（50 mg/kgの投与は30分及び電気刺激後2時間）を投与後、固定剤で灌流して脳を取り出しました。他の6匹マウスにも同様な処置をし、電極を有するNesCreERT2 x NST-Istopl-DTAマウス6匹に、3日間（各3匹のマウス）または週（各3匹）にタモキシフェン

を投与しました。その間の脳内の組織学的変化を調べるために、すべてのマウスは、ケタミンで麻酔し、上記と同じ固定液で灌流しました。

免疫組織化学

固定した脳は、免疫組織化学のために使用しました。この実験で使用された抗体は、以下に記載されています。抗カスパーゼ3（ウサギ1/200セルシグナル）、抗BrdU（ラット1/200アブカム）、抗DTA（マウス1/200-1/1000アブカム）、抗GAD67（マウス1/1000ミリポア）、抗GAD67（ウサギ1/200アブカム）、抗GFP（ウサギ1 μ g/mlの、モルモット1 μ g/mlの¹¹⁾）、抗GFAP（ウサギ1/2000ダコ）、抗ネスチン（マウス1/300-1/1000 BD）、抗NG2（ウサギ1/1000ミリポア）。二次標識抗体は、ウサギIgG、またはラットIgG、ロバ、またはヤギで作成したマウスIgGの定常領域を認識する抗体を用い、以前の論文¹²⁾に記載のように免疫反応性部位は、alexa-488, alexa-594, またはABC/DAB反応の蛍光によって可視化しました。

電顕観察

6匹の野生型マウスは、電子顕微鏡（EM）で、軟膜とくも膜の構造を観察するために使用しました。刺激電極は3匹のマウスの脳に植え、7日間毎日1回刺激しました。その後、軟膜とくも膜の電顕観察をするために4%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタルアルデヒドで灌流固定と浸漬固定をしました。その後、3つの対照マウスも麻酔し、同様の処置をしました。2時間後固定した後、脳組織を小ブロックにトリミングし、PBS中1%OsO₄で後固定しました。段階的なアルコール/水の溶液で脱水した後、脳blockをプラスチック樹脂（エボン-812、応研、東京、日本）に包埋しました。脳組織を有するプラスチックブロックは、削り出し薄片（0.5 μ mの厚さ）にし、光学顕微鏡下で観察した。その後、プラスチックブロックをさらにトリミングした。関心領域は、（厚さ60nm）超薄薄片に切片化した。酢酸ウラニルで染色し、クエン酸鉛後、超薄薄片を電子顕微鏡（H-7500、日立、日本）で観察した。

免疫ブロット法

キンドリリングを繰り返したマウスからは、大脳新皮質を摘出し、E15.5マウスからは、脳の全体を収集して、イムノブロッティングを行いました¹³⁾。採取した組織は、（4%SDS, 0.1mMのトリス-HCl (pH6.8), 8.3%の β メルカプトエタノール, 20%グリセロール, 0.02%BPBを含む）SDS溶解緩衝液で溶解しました。各溶解物を、5%SDSポリアクリルアミドゲル（PAGE）に電気泳動しました。ゲル中のタンパク質をPVDF膜（イモビロン、Millipore）に移し、膜を以下の一次抗体と共にインキュベートしました。

マウス抗ネスチン（Rat401, 1:500; ab11306, Abcam社）、ウサギ抗GAPDH（1:2500, G9545, Sigma社）を使用しました。GAPDHシグナルは標準レベルを示すために使用しました。次いで、膜（抗マウスIgG1またはヤギ抗ウサギIgG、ジャクソンImmunolaboratoryヤギ）、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした適切な二次抗体と反応させた後、Immunostar（和光）を使用して発色しました。また、（バイオラッドChemiDocのXRS）バンドはルミノ・イメージアナライザーで定量しました。バンド強度は、レーン間の荷重のばらつきを考慮してGAPDHに対して正規化しました。これは、脳溶解物（GAPDHに対して正規化）の相対的なバンド強度を意味しますが、キンドリリング群と対照群との比較のために1.0の相対値を割り当てました。

<結果>

この実験では、キンドリリングの進行に伴って、どの様にマウスの新皮質におけるネスチンおよび他の遺伝子が発現するかを調べました。まず、扁桃体および皮質で3野生型マウスおよび刺激電極を装着したマウスで、キンドリリングの進行は20日間発作クラス¹¹⁾、発作、及びてんかん脳波の存続期間に測定しました。多くの場合、発作クラスは、6日間でプラトーに達し、発作の持続時間は、10日間でプラトーに達しました。

私共は、電極なしの脳でも、いくつかの遺伝子の発現を検出しました。すなわち、電極挿

入から1週間の回復期間後、その回復期間及び刺激後に、3回、7回後に、状態を調べました。三つの条件で、C57/B6野生型マウス、及び3匹ずつネス-DTAマウスに電気刺激を与えた後に、タモキシフェンおよびBrdUを投与し、状態を記録しました。そして固定液で灌流しました。灌流した後、固定した脳を免疫組織化学のために回収しました。

免疫組織化学では、成体マウスの脳組織にノーマルマウスモノクローナル抗体を用いて、バックの結合レベルを下げました。マウス正常血清は、免疫グロブリンG (IgG) を含み、PBSの灌流によっても、マウス脳から完全に除くことができません。マウス正常血清によるバックグラウンド染色を評価するために、インキュベーション溶液 (1% ロバ正常血清, 0.25の一次抗ネスチンマウスモノクローナル抗体 (1/1000精製IgG) の有無にかかわらず、厚さ50 μ mのマウス脳切片をインキュベートしPBS, λ カラギーナン, 0.3% トリトンX-100) 中で一晩インキュベーションしました。次にマウスIgGを、抗マウスIgGロバIgGのビオチン化, ABC複合体 (ベクター, USA) およびDAB反応により検出しました。抗ネスチンマウスIgGなしと抗ネスチンマウスIgG有りで比較して、染色の結果を見ました。染色は高いバックグラウンドではありませんが、以下の文章に有りますように、ネスチン免疫反応性の部位があり、したがって、我々は、組織非特異的な染色は、無視できるという結論に達しました。

成体マウスの脳にも、低レベルですが、ネスチン免疫反応性があります。ネスチン免疫組織反応は、第三脳室、海馬采、および脈絡叢の下面に見られました。第三脳室におけるネスチン陽性細胞は脳室帯¹⁴⁾にあり、tanycytes¹⁾にも含まれています。その後、成長に伴い、側脳室周囲の脳室下帯 (SVZ) と顆粒細胞下層 (SGZ) がネスチン陽性になります¹⁾。また、既報の通り、血管の内皮前駆細胞も、増殖するにつれて、ネスチン免疫組織化学陽性になりました²⁻⁵⁾。これらの陽性細胞は、血管内皮にはまばらに、新皮質の毛細血管と軟膜の表面上にも

見られました。新皮質の実質および海馬には、ネスチン陽性細胞の形状を明らかにするほどには発現していませんでした。しかし、新皮質と海馬の実質にあるNG2細胞にはネスチンが含まれていました^{1,16)}。

特に電極と新皮質の表面付近のネスチン陽性反応は、電極の挿入後に有意に増加しましたが、さらに3日間の刺激によりネスチン陽性反応は増えました。しかし、それ以降は電気刺激をしても、陽性反応は減少しました。実質及び新皮質表面の免疫反応性も減少したので、陽性細胞の形態を観察することは困難になりました。それ故、私共は電子顕微鏡にてネスチン陽性細胞を観察しました。固定液でマウスを灌流しネスチン免疫組織化学処理をし、固定された組織をエポン樹脂に埋め込み、光顕用切片 (0.5 μ m厚) または電顕用切片 (厚さ60nm) を作成しました。新皮質の実質に見られたネスチン陽性細胞は、小細胞体から放射状に多数のプロセスを伸ばしていました。これまでに、このような組織を観察された方々は^{2,16)}、サテライトグリアの一種であると主張していました。軟膜の表面上のネスチン陽性反応は、追加の電気刺激により強化されました。基底膜はラミニンで構成され、脳と軟膜との境界にあります。したがって、ネスチン陽性顆粒細胞は、脳の外にあるが、それらは、血液細胞または毛細血管細胞とは区別することができました。このようなネスチンの発現量を数値により比較するために、3匹の対照マウスから採取した脳組織、刺激後のマウスから採取した脳組織を溶かして、ネスチンウェスタンブロットリング試験を実施しました。免疫組織化学では、最高のネスチン-IRは、3日間刺激後に見出されましたが、ウェスタンブロットリングの結果でも、全く同じ変化が再現できました。

ネスチンとその他の免疫反応性 (IR) も、電気刺激後の新皮質の実質で調べたところ、ネスチン陽性細胞のかかなりの数が、NG2陽性でした。しかしGAD67陽性の細胞はNG2陰性でした。ネスチン-IRおよびGFAP-IRは、刺激電極の周りを除いて、新皮質で重複しませんでした。

軟膜におけるネスチン陽性顆粒細胞は、その核内にBrdUを取り込んで、導出静脈の周りで増殖していました。我々が観察した限り、軟膜におけるネスチン陽性細胞はNG2陰性でした。軟膜には、正常時にはGAD67-IRは検出できませんが、キンドリング刺激によりGAD67-IRが現れました。ネスチン-IRおよびGAD67-IRは、軟膜にある顆粒細胞に共局在していました。

野生型マウスおよびNSTプロモーターおよびタモキシフェン投与の制御下でDTAを発現するNST-DTAマウス間で比較すると、DTA発現の結果として、BrdU陽性細胞が削除され、冠状断面で激減していました⁸⁾。

<考察>

この研究では、神経活動を人工的に変えると、脳内の遺伝子発現現象を起こすことができることを示すことができました。電極を挿入し、キンドリングで脳を電気刺激すると、ネスチンを容易に発現させることができます。そして、発現した細胞には、GAD67を含む細胞も見られ、それは中枢神経系の神経細胞が産生されたことを示しています。他の細胞は、非神経細胞に分化するものと考えられました。ネスチン発現を検出するためには、GFP cDNAにネスチンエンハンサーおよびプロモーターをつないだトランスジェニックマウスが有用です⁹⁾。我々は、ネスチン-GFPトランスジェニックマウスを利用して、軟膜で顆粒細胞を可視化することができました。田中ら¹⁶⁾は、ネスチン-GFPトランスジェニックマウスを利用すると、NG2陽性サテライトグリアが、ネスチンを発現することを示していました。また、GFP発現によって可視化して、そのような虚血、出血、および傷害などの出来事の後に、軟膜における神経前駆細胞を検出することに成功した研究があります^{5,7)}。その様な中、私共は、「脳にストレスを加える手法としてキンドリングを使い、*in vivo*でネスチンおよびGAD67を神経前駆細胞に発現させることに成功しました。両マーカーを発現する軟膜顆粒細胞を見つけたことは、脳内で神経細胞を産生させる手法の創出への第一歩である」と考えています。

文献

- 1) Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D., 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-595.
- 2) Dahlstrand, J., Lardelli, M., Lendahl, U., 1995. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **84**, 109-129.
- 3) Kobayashi, M., Sjöberg, G., Söderhäll, S., Lendahl, U., Sandstedt, B., Sejersen, T., 1998. Pediatric rhabdomyosarcomas express the intermediate filament nestin. *Pedi-atr. Res.* **43**, 386-392.
- 4) Suzuki, S., Namiki, J., Shibata, S., Mastuzaki, Y., Okano, H., 2010. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J. Histochem. Cytochem.* **58**, 721-730.
- 5) Sgubin, D., Aztiria, E., Perin, A., Longatti, P., Leanza, G., 2007. Activation of endogenous neural stem cells in the adult human brain following subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1647-1655.
- 6) Crespel, A., Rigau, V., Coubes, P., Rousset, M.C., de Bock, F., Okano, H., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., Lerner-Natoli, M., 2005. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **19**, 436-450.
- 7) Decimo, I., Bifari, F., Rodriguez, F.J., Malpeli, G., Dolci, S., Lavarini, V., Pretto, S., Vasquez, S., Sciancalepore, M., Montalbano, A., Berton, V., Krampera, M., Fumagalli, G., 2011. Nestin- and doublecortin-positive cells reside in adult spinal cord meninges and participate in injury-induced parenchymal reaction. *Stem Cells* **29**, 2062-2076.
- 8) Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., Kageyama, R., 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* **11**, 1153-1161.

- 9) Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M., Mori, K., 2000. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* **11**, 1991-1996.
- 10) Racine, R.J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **32**, 281-294. Rakic, P., 1985. Limits of neurogenesis in primates. *Science* **227**, 1054-1056.
- 11) Tamamaki, N., Nakamura, K., Furuta, T., Asamoto, K., Kaneko, T., 2000. Neurons in Golgi-stain-like images revealed by GFP-adenovirus infection in vivo. *Neurosci. Res.* **38**, 231-236.
- 12) Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K., Kaneko, T., 2003. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* **467**, 60-79.
- 13) Ohta, K., Lupo, G., Kuriyama, S., Keynes, R., Holt, C.E., Harris, W.A., Tanaka, H., Ohnuma, S., 2004. Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Dev. Cell* **7**, 347-358.
- 14) Nataf, S., Strazielle, N., Hatterer, E., Mouchiroud, G., Belin, M.F., Ghersi-Egea, J.F., 2006. Rat choroid plexuses contain myeloid progenitors capable of differentiation toward macrophage or dendritic cell phenotypes. *Glia* **54**, 160-171.
- 15) Barrett, P., Ivanova, E.S. et al. 2006 Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J. Endocrinol.* **191**, 687-698.
- 16) Tanaka, Y., Tozuka, Y., Takata, T., Shimazu, N., Matsumura, N., Ohta, A., Hisatsune, T., 2009. Excitatory GABAergic activation of cortical dividing glial cells. *Cereb. Cortex* **19**, 2181-2195.
- 17) Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G., McMahon, A., 1994. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* **12**, 11-24.
- 18) Wu, S., Esumi, S., Watanabe, K., Chen, J., Nakamura, K.C., Nakamura, K., Kometani, K., Minato, N., Yanagawa, Y., Akashi, K., Sakimura, K., Kaneko, T., Tamamaki, N., 2011. Tangential migration and proliferation of intermediate progenitors of GABAergic neurons in the mouse telencephalon. *Development* **138**, 2499-2509.
- 19) Koketsu, D., Mikami, A., Miyamoto, Y., Hisatsune, T., 2003. Nonrenewal of neurons in the cerebral neocortex of adult macaque monkeys. *J. Neurosci.* **23**, 937-942.
- 20) Kronenberg, G., Wang, L.P., Synowitz, M., Gertz, K., Katchanov, J., Glass, R., Harms, C., Kempermann, G., Kettenmann, H., Endres, M., 2005. Nestin-expressing cells divide and adopt a complex electrophysiologic phenotype after transient brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **25**, 1613-1624.
- 21) Nakagomi, T., Molnár, Z., Nakano-Doi, A., Taguchi, A., Saino, O., Kubo, S., Clausen, M., Yoshikawa, H., Nakagomi, N., Matsuyama, T., 2011. Ischemia-induced neural stem/progenitor cells in the pia mater following cortical infarction. *Stem Cells Dev.* **20**, 2037-2051.
- 22) Williamson, S., Faulkner-Jones, B.E., Cram, D.S., Furness, J.B., Harrison, L.C., 1995. Transcription and translation of two glutamate decarboxylase genes in the ileum of rat, mouse and guinea pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* **55**, 18-28.

Summary

Kindling in the mouse neocortex induce excitatory neurons and inhibitory neurons in the mouse neocortex

Nobuaki Tamamaki, Shogo Ninomiya, Shigeyuki Esumi, Kunimasa Ohta, Takaichi Fukuda,
Tetsufumi Ito, Itaru Imayoshi, Ryoichiro Kageyama, Toshio Ikeda, Shigeyoshi Itoharu

Nestin is an intermediate filament found in neurogenic progenitors and non-neuronal cells. Nestin immunoreactivity (IR) in the brain often increases after brain damage. Here we show that amygdala kindling, which mimics the epileptic seizures, also induces nestin expression in the brain. Nestin-IR was greatly enhanced in the leptomeninges (pia and arachnoid maters) and neocortical parenchyma, but not much in the SVZ around the lateral ventricle, SGZ in the dentate gyrus, or the endothelial progenitor cells of blood vessels, fimbria, or choroid plexus after kindling. Electron microscopy revealed that nestin-IR in the leptomeninges was localized to granule cells, where it co-localized with GAD67-IR after electrical stimulation. The nestin-positive granule cells in the leptomeninges, especially around the emissary vein, were proliferative. However, nestin-IR in the neocortical parenchyma was expressed in NG2 glia and did not co-localize with GAD67-IR. Deletion of nestin-positive cells resulted in a high susceptibility to electrical stimulation. Consequently, almost all of the mice died or dropped out during kindling progression in 20 days, from naturally generated epileptic seizure or exhaustion. We speculate that the nestin-positive cells activated by amygdala kindling may involve in the protection of the brain from epilepsy.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2015 ; 26 : 55-62

