

—— 研究助成報告 ——

覚醒下in vivoイメージングを用いた海馬歯状回ネットワークの 発作抑制機構における役割の解明

神 出 誠一郎¹⁾, 菅 谷 佑 樹²⁾

要旨：海馬歯状回はてんかんと関連が深く、中でも苔状細胞は歯状回の神経ネットワークにおける主要な細胞であり、発作後の細胞死により生じる苔状繊維の異常発芽等が海馬硬化と関連するなど、てんかんの難治化に関わることが知られている。しかし技術的な制約から、苔状細胞の性質は長く不明なままであった。本研究では、筆者らの作成した遺伝子改変マウスを用いて、カルシウムイメージングの手法により苔状細胞選択的に活動を可視化し、覚醒下で発作中の苔状細胞の活動を詳細に検討した。その結果、カイニン酸発作では歯状回の局所回路によって発作による苔状細胞の活動性が異なることが明らかとなった。また苔状細胞を選択的に活性化すると、貫通繊維刺激による発作にて歯状回の同期性の発火が増加した。これまでの知見と合わせ、苔状細胞は発作の種類により異なる役割を持つ可能性が示唆された。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2022 ; 33 : 69-74

Key Words : 歯状回, 苔状細胞, カイニン酸, DREADD, カルシウムイメージング

【序論】

海馬は古くから記憶・学習やストレスとの関連を中心に研究されてきたが、同様にてんかん発作とも深く関わる事が知られている^{1,2)}。また海馬は側頭葉内側に位置し、霊長類からマウス・ラットといったげっ歯類にいたるまでほぼ保存された特徴的な層構造を有することから、上記中枢機能の解明にはヒトを用いた研究だけでなく、げっ歯類などを用いた各種のモデル動物による研究も古くから行われてきた。海馬内の神経回路として、嗅内皮質から歯状回に至る貫通線維 (perforant path), 歯状回顆粒細胞からCA3錐体細胞に至る苔状線維 (mossy fibers), CA3錐体細胞からCA1錐体細胞に至るSchaffer側枝からなる3つのシナプスを含むいわゆるtrisynaptic circuitがよく知られている。

中でも歯状回は海馬への興奮性入力ゲートとして知られ、嗅内皮質からの入力を受け、歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維によってCA3錐体細胞に信号を送るほか、顆粒細胞からは歯状回門の苔状細胞や抑制性の介在ニューロンにも投射し、入力を受けた苔状細胞からはさらに顆粒細胞や介在ニューロンに連絡することなど、顆粒細胞を中心とした複雑なフィードバックループを形成し情報処理や興奮性の制御を行っていると考えられている³⁾。

歯状回門の苔状細胞はグルタミン酸作動性ニューロンとして上述の歯状回神経ネットワークの主要な細胞であり、記憶・学習などの歯状回機能に深くかかわるだけでなく、てんかん発作については興奮性刺激に脆弱で発作後に広範な細胞死にいたることが苔状線維の異常発芽を惹起するなど、海馬硬化への関与が知られてい

¹⁾ 東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻 精神医学分野
〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1]

²⁾ 東京大学大学院 医学系研究科 機能生物学専攻 神経生理学分野
〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1]

る。しかし、苔状細胞は顆粒細胞層に挟まれた歯状回門の狭いエリアで介在ニューロンと混在し、また近傍ではなくより遠位の同側海馬や対側海馬への投射が特徴である。したがってモデル動物を用いた薬理学的な破壊実験や海馬スライスによる電気生理学実験ではその性質の解明が難しいという技術的制約から、長くその特徴は明らかにされなかった。そのため、側頭葉てんかんに関しては、歯状回門の細胞死からてんかん原性獲得に至るいくつかの仮説が出されたが、いずれも決定的な解明方法がなく論争が続いていた³⁾。

神出らが苔状細胞特異的に遺伝子操作可能なマウスを開発し、2012年に苔状細胞特異的除去モデルマウスを用いて苔状細胞除去後に生じた歯状回顆粒細胞の興奮性増加とてんかん閾値低下を明らかにした結果から、世界に先駆けて苔状細胞の興奮抑制的作用を初めて報告して以来⁴⁾、歯状回の神経ネットワークの一部としててんかん発作に関連する苔状細胞の機能が注目されているが、まだ十分な解明に至っていない。

本研究では上記の苔状細胞特異的な遺伝子操作が可能なマウスを用いて、覚醒下にてin vivoカルシウムイメージング技術により苔状細胞の活動を可視化し、カイニン酸投与等によるてんかん発作で生じた苔状細胞の活動性変化の特徴を検討することと、Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) による苔状細胞選択的な興奮性変化で生じた発作閾値の変化を検討することにより、苔状細胞のてんかん発作への作用について詳細に明らかにし、てんかん発作における海馬歯状回ネットワークの興奮性制御メカニズムの解明に迫ることを目的とする。

【方法】

本研究に関わった研究者のいずれも本学の所定の動物実験講習会に出席し、動物実験における倫理について学んでおり、また全ての研究は本学医学部の動物実験委員会による承認を受けたものである。

1. カイニン酸発作における苔状細胞の活動性変化

1-1. モデル動物作成

苔状細胞特異的cre組み換え酵素発現マウス（以下Mossy Creマウス）を用い、アデノ随伴ウイルスベクターにより片側海馬にAAV1-hSyn-FLEX-GCaMP6fを注入することで、カルシウムセンサーであるGCaMP6fを片側海馬の苔状細胞特異的に発現するマウスを作成した。

1-2. カルシウムイメージング

この苔状細胞選択的GCaMP6f発現マウスを用い、ウイルスベクター注入の3週後に歯状回の直上に屈折率分布型（GRIN）レンズをデンタルセメントで固定した。さらにその1週間後からカルシウムイメージングにて覚醒下での苔状細胞の活動を可視化し記録した。

1-3. カイニン酸投与

まず、オープンフィールド内での自由行動時のカルシウムイメージングからベースラインの苔状細胞の活動性について記録・解析を行った。次に、これらのマウスにカイニン酸（30 mg/kg、腹腔内投与）を投与して急性発作を惹起した際の苔状細胞の活動を経時的に記録した。

2. DREADDによる苔状細胞の興奮性操作とてんかん発作への影響

2-1. モデル動物作成

Mossy Creマウスにアデノ随伴ウイルスベクター投与によって上記1-1と同じfloxed GCaMP6s遺伝子の導入に加え、AAV2-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherryの投与により興奮性DREADDであるhM3Dq遺伝子を導入し、GCaMP6fとhM3Dqの両方を片側海馬の苔状細胞特異的に発現するマウスを作成した。

2-2. カルシウムイメージング

上記1-2と同様、苔状細胞選択的GCaMP6f-hM3Dq発現マウスを用い、ウイルスベクター注入の3週後に歯状回の直上にGRINレンズをデンタルセメントで固定した。さらにその1週間後

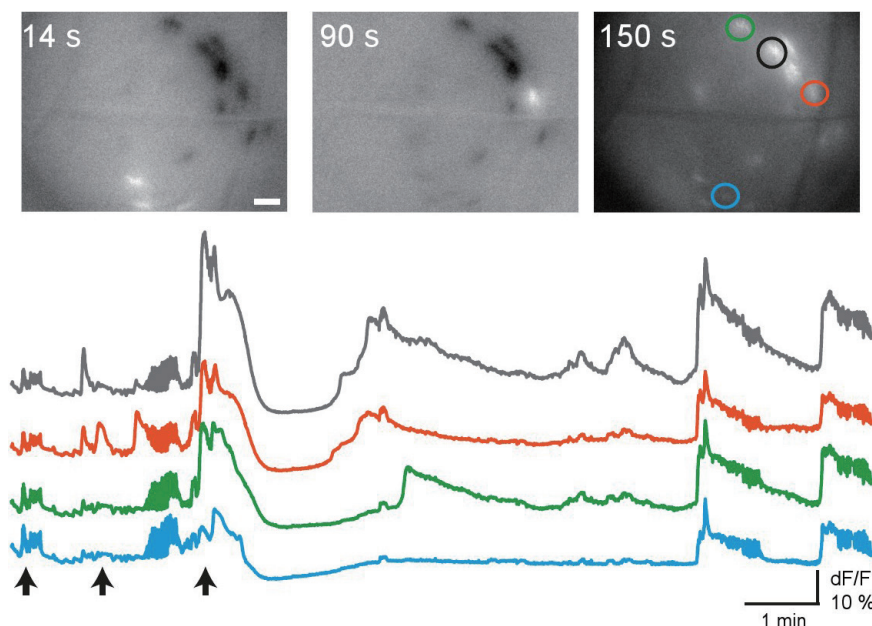


Fig. 1 カイニン酸投与10分後からのカルシウムイメージング記録。上段：左から14秒後、90秒後、150秒後の実際のイメージング像。下段：上段右の150秒後のイメージング像でマークした黒、赤、緑、青のそれぞれの細胞のカルシウム強度を経時的に示す。概ね同期しているが、実際には同期していない活動も一定数認め、部位によってカルシウム流入の違いが生じていることが示唆される。

からカルシウムイメージングにて覚醒下での苔状細胞の活動を可視化し記録した。

2-3. 苔状細胞特異的な活動性増加

Clozapine-N-oxide (CNO, 5mg/kg) を腹腔内投与し、苔状細胞特異的な活動性上昇の操作を行った。オープンフィールド内での覚醒下自由行動における苔状細胞の活動性変化をカルシウムイメージングにより経時的に記録した。

2-4. 貫通繊維刺激による歯状回の興奮性変化

苔状細胞の活動がてんかん発作に及ぼす影響を明らかにするため、上記2-1のAAV2-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherryを投与したマウスと、対照としてhM3Dqを含まないAAV2-hSyn-DIO-mCherryを投与したマウスを作成した。4週後、麻酔下にて苔状細胞選択的hM3Dq発現マウスと対照マウスに刺激電極をangular bundleに、記録電極を歯状回に設置した。その後、CNO (5mg/kg, 腹腔内投与) を投与し、angular bundleへ10Hz・10秒間の高頻度電極刺激を行

い、発作を誘発させた際の歯状回の活動を電気生理学的に記録した。

【結果】

1. カイニン酸発作における苔状細胞の活動性変化

まず自由行動下にて苔状細胞のベースラインの活動パターンが得られ、今回のin vivoカルシウムイメージングが問題なく行われていることを確認した。

次にカイニン酸30mg/kg腹腔内投与後の急性発作時における苔状細胞の活動を記録したところ、カイニン酸投与による急性発作時に多くの苔状細胞の同期性の活動が認められた。発作に伴うカルシウムイベントは非発作時のカルシウムイベントと比較して有意に長く、発作時にはカルシウムが持続的に大量に流入していることが明らかとなった。一方で、多くの苔状細胞の同期性の活動が認められたが、必ずしも観察範囲の苔状細胞すべての活動の同期性が一致しないことも明らかになった (Fig. 1)。

Before CNO

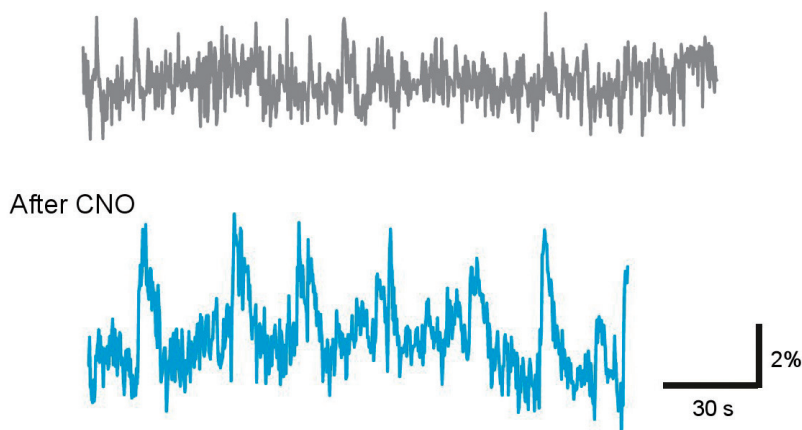


Fig. 2 DREADDを用いた手法により、CNOを投与する前後で自由行動下における苔状細胞の活動を記録したもの。上段：CNO投与前，下段：CNO投与後。CNO投与により苔状細胞の活動性が亢進し、10秒程度の周期性活動が認められている。

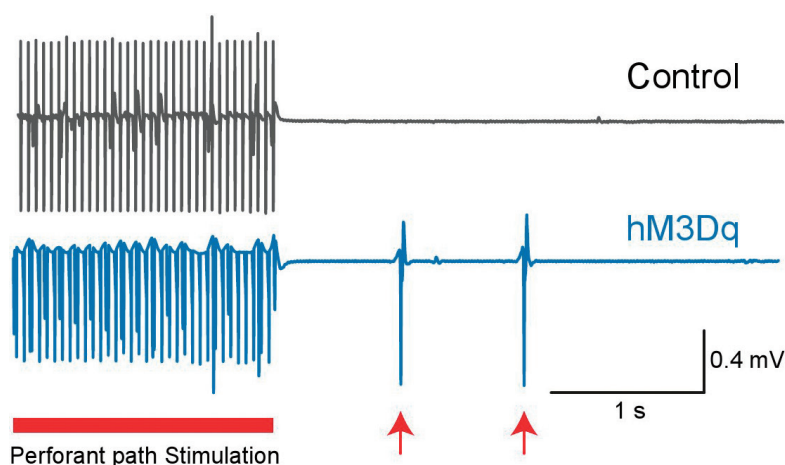


Fig. 3 貫通繊維を高頻度刺激した後の歯状回の電気生理学的活動を示す。上段：対照として苔状細胞の活動性が変化していないモデル，下段：DREADDにて苔状細胞の活動性を選択的に亢進させたモデル。苔状細胞の活動性亢進により，貫通枝刺激後の発作波の増加を認めた。

2. DREADDによる苔状細胞の興奮性操作とてんかん発作への影響

まずDREADDシステムを用いて苔状細胞の活動を操作した際に，苔状細胞の活動性がどのように変化するのかを明らかにするために，苔状細胞に興奮性DREADDであるhM3DqとカルシウムインジケータGCaMP6fを発現したマウスにCNOを投与し，苔状細胞の活動をカル

シウムイメージングにより計測した。CNO投与により苔状細胞の活動上昇と同期性の亢進を認め，DREADDによる苔状細胞選択的な活動操作がin vivoで可能であることが確認された (Fig. 2)。

次に，苔状細胞に興奮性DREADDを発現したマウスに麻酔下で刺激電極および記録電極を貫通線維および歯状回にそれぞれ埋め込み，

CNOを投与後に刺激電極から高頻度刺激を与え、歯状回で発作を起こしたところ、DREADDを発現していない対照群と比較して、興奮性DREADD発現群では歯状回における発作波の増加が認められた (Fig. 3)。

【考察】

本研究では、歯状回苔状細胞特異的にcre組換え酵素を発現するMossy Creマウスを用い、LoxP配列を含むウイルスベクター投与にて苔状細胞選択的に遺伝子組み換えを生じる手法を利用した。これにより、苔状細胞特異的にカルシウムセンサーを発現させ、覚醒下にてin vivoカルシウムイメージングを施行・記録することができた。てんかん発作への関与が不明であった苔状細胞についてこのカルシウムイメージング手法を用い、てんかん発作後の活動性に加え、苔状細胞の活動性を選択的に増強させたうえでてんかん発作を惹起させた場合の発作閾値の変化を明らかにした。

カイニン酸腹腔内投与による発作時の活動の特徴として、多くの苔状細胞で同期性の活動が見られ、かつ1回のカルシウムイベントが長いことが特徴であった。ただ、全ての苔状細胞が一様に発作時に活動するのではなく、一部の苔状細胞の活動にばらつきが認められた。したがって、カイニン酸発作において、歯状回の局所的な回路に活動性の違いがあることが明らかとなった。

DREADDシステムを用いて苔状細胞特異的に活動を増強すると、苔状細胞の同期性の活動が促進されることが明らかとなった。また苔状細胞を活性化すると、貫通線維高頻度刺激による発作時の歯状回顆粒細胞による同期性の発火が増加したことから、苔状細胞は貫通線維刺激による発作時には発作促進的な役割を持つ可能性が示唆された。

顆粒細胞より興奮性入力を受けた苔状細胞からは、顆粒細胞に直接興奮性の投射をする回路と、抑制性の介在ニューロンを活性化することで間接的に顆粒細胞を抑制する回路の相反する二つの回路が知られており、そのバランスで歯状回全体の興奮性を調節していることが示唆さ

れてきた。これまでの研究において、てんかん発作においては、苔状細胞の操作方法や発作の種類によっていくつか異なる結果が報告されている。

筆者らの以前の研究ではジフテリア毒素受容体を苔状細胞選択的に発現させたマウスを用い、ジフテリア毒素の投与による苔状細胞除去後にカイニン酸発作が増強したことから、苔状細胞の発作抑制作用を報告した⁴⁾。しかし最近の研究から、Scharfmanらは抑制性のDREADDを苔状細胞選択的に発現させ、ピロカルピンによる発作時の電気生理学的検討を行い⁵⁾、またSolteszらは筆者らのCreマウスを用い、光遺伝学的技術を駆使して苔状細胞選択的に興奮性を操作し、カイニン酸発作後の海馬の活動を電気生理学的に検討したが⁶⁾、いずれも異なる結果が得られている。以上からは、発作の種類や急性・慢性などの発作の違い、さらに発作時と非発作時によっても苔状細胞の機能が変化する可能性があり、今後さらなる詳細な解明を要する。

本研究では、先駆的な遺伝子改変マウスと遺伝子工学技術、in vivoカルシウムイメージング技術によって苔状細胞選択的な活動を可視化し、これまで不明であった発作中の苔状細胞の活動を明らかにすることができた。その結果、歯状回の局所回路によって発作による活動性が異なることが明らかとなった。また苔状細胞を活性化すると発作時の歯状回顆粒細胞による同期性の発火が増加したとこれまでの知見を合わせて、発作の種類やタイミングなどの条件により苔状細胞は発作に対して異なる寄与をする可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H. The hippocampus, memory, and place cells : is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 1999 ; **23** : 209-226.
- 2) Baxendale SA. The hippocampus : functional and structural correlations. *Seizure* 1995 ; **4** : 105-117.
- 3) Jinde S, Zsiros V, Nakazawa K. Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell

- excitability. *Front Neural Circuits*. 2013 ; **7** : 14.
- 4) Jinde S, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Pickel J, Kohno K, et al. Hilar mossy cell degeneration causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation. *Neuron* 2012 ; **76** : 1189-1200.
- 5) Botterill JJ, Lu YL, LaFrancois JJ, Bernstein HL, Alcantara-Gonzalez D, Jain S, et al. An excitatory and epileptogenic effect of dentate gyrus mossy cells in a mouse model of epilepsy. *Cell Rep*. 2019 ; **29** : 2875-2889.
- 6) Bui AD, Nguyen TM, Limouse C, Kim HK, Szabo GG, Felong S, et al. Dentate gyrus mossy cells control spontaneous convulsive seizures and spatial memory. *Science*. 2018 ; **359** : 787-790.