

—— 研究助成報告 ——

リーリン機能低下による側頭葉てんかん発症機構の解明と、これを標的とした新規治療法の検証

服 部 光 治

要旨：海馬の顆粒神経細胞層分散は、側頭葉てんかんの主原因の一つであり、その原因の一つに分泌タンパク質リーリンの機能低下が示唆されている。本研究では、我々が作製したリーリン機能低下（一部欠損）マウスおよびリーリン機能増強（非分解型リーリン発現）マウスを利用し、海馬層構造形成とてんかんの関係を解析した。その結果、リーリンシグナルの強度とてんかん増悪化の関係は明確にはできなかったが、細胞内タンパク質Cofilinのリン酸化が海馬層構造形成に必要であることを見いだした。また、リーリン欠損マウスの生後脳へのリーリントタンパク質投与により、全身症状が一部改善することも見いだした。本研究は、リーリン機能増強により、てんかんを含む神経疾患の治療への重要な基礎となるものと期待している。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2023；34：47-50

Key Words：リーリン，Granule cell dispersion (GCD)，遺伝子改変マウス，Cofilin，リン酸化

【序論】

海馬の顆粒神経細胞層分散（Granule cell dispersion, 以下GCD）は、側頭葉てんかんの主原因の一つである。また、てんかん発作によってGCDが起きることも知られており、両者間には悪循環の関係がある。よって、この悪循環を断ち切ることはてんかん治療においては大きな意義をもつと考えられる。

分泌タンパク質リーリンは海馬顆粒細胞層の形成に必須であり、またその機能低下がてんかんやGCDの一因であることが複数のグループにより報告されている^{1, 2)}。リーリンは、N末端領域、8回繰り返し構造のリーリンリピート、C末端領域（CTR）からなる。我々は以前、32アミノ酸残基からなるリーリンのCTRが効率的な下流シグナル誘導活性に必須であること^{3, 4)}、また、CTRのみ欠損したリーリンを発現するノック

アウトマウス（ΔC-KIマウス）は、脳構造の一部が異常であることを明らかにした^{4, 5)}。リーリンは受容体と結合し、細胞内タンパク質Dab1のリン酸化を誘導することにより下流シグナル経路を活性化し、神経細胞の形態や移動を制御する。また、成体海馬においては、てんかん発作によりリーリンの機能が低下し、これがGCDの成因となる^{6, 7)}ことが知られている。よって、リーリン機能を増強することは、GCDおよびてんかん発症を治療できると考えられる。しかし、今までリーリンの機能を増強する方策は存在せず、また、成体海馬においてリーリン機能低下がGCDを引き起こすメカニズムも不明であった。

我々は、ΔC-KIマウスの海馬では、GCD様の層構造異常が生じることを見出した¹⁾。また、リーリンを分解・不活化する酵素ADAMTS-3の同定に世界で初めて成功し^{8, 9)}、

分解部位に変異を導入したノックインマウス (PADV-KIマウス・リーリン機能は増強されている) も作製した¹⁰⁾。本研究では以上の成果とツールに基づき、(1) リーリンの機能低下はなぜGCDを引き起こすのか？ (2) リーリンの分解阻害による機能増強は、GCDおよびてんかん増悪化を防ぐことができるのか？、という2点を解明することを目的に研究を行った。

【方法と結果】

7から8週齢の野生型マウスまたはΔC-KIマウスに、てんかん誘導薬剤として用いられるムスカリン性受容体アゴニストのピロカルピン (390μg/体重g) を腹腔内投与した。対照実験としては投与薬剤と等量の生理食塩水を投与した。野生型マウスでは、投与後30分以内に身体の震えや発作が見られ、その割合や症状はΔC-KIマウス (もともとGCD様の層構造異常を有する) でもほぼ同じであった。投与から1日後、野生型マウスの大脳皮質及び海馬のライセートを調整し、ウエスタンブロッティング法によってリーリンとDab1 (リーリンの下流分子) の発現量を調べた。その結果、コントロールマウスとてんかんモデルマウスの間に、リーリンの量や分解、およびDab1量に顕著な差は見られなかった。薬剤投与から10日後にNissl染色を用いて海馬の構造を調べた結果、てんかんモデルマウスにおいて海馬神経細胞の配置に軽微な異常が見られた。この異常はリーリンヘテロ欠損マウスやΔC-KIマウスにおいて特に悪化することはなかった。

海馬錐体細胞層形成におけるリーリンの機能を明らかにするため、発達期のΔC-KIマウス海馬の組織学的解析を行った。生後3日目の野生型マウスでは、多くのCtip2陽性細胞が錐体細胞層 (SP) に配置した一方、ΔC-KIマウスではその割合が減少し、上昇層 (SO) に配置する細胞の割合が増加した。この配置異常は、生後1日目では認められず、生後3日目以降は成体期にいたるまで観察された。したがって、CTRを有するリーリンは、生後3日目にSPに到達する神経細胞の配置制御に必要であることが示唆された。

野生型マウスを用いた研究から、海馬CA1神経細胞は産生時期により、誕生から配置までの日数が異なることが知られている。この知見を基に、私は、リーリンCTRが特定の時期に産生された神経細胞の配置制御に必要であると考えた。これを検証するため、チミジンアナログである5-ブロモデオキシウリジン (BrdU) を用いて、細胞を産生時期により標識し、神経細胞の配置を解析した。野生型マウスとΔC-KIマウスともに、胎生早期に産生された神経細胞は、そのほとんどがSPに配置した。一方、胎生後期に産生された神経細胞については、野生型マウスではそのほとんどがSPに配置したが、ΔC-KIマウスでは約40%がSOに配置した。したがって、CTRを有するリーリンは、胎生後期に産生された海馬CA1神経細胞の配置に必要であることが明らかとなった。ΔC-KIマウス海馬において、移動神経細胞の足場である放射状グリア細胞の形態は概ね正常であった。したがって、ΔC-KIマウス海馬CA1の神経細胞配置異常は、足場の構造異常ではなく神経細胞自律的な機構に起因することが示唆された¹¹⁾。

ΔC-KIマウスにおけるGCD様の層構造異常の原因を解明するため、5-ブロモデオキシウリジンを胎生12.5または16.5日目の妊娠マウスに投与後、産仔の海馬構造を組織免疫染色により解析した。その結果、異常配置細胞の多くは胎生後期に産生されたものであることが明らかとなった (次項Fig. 1参照)。大脳新皮質においては、リーリンはCTR介して共受容体ニューロピリン1と結合し、この結合は正常な脳形成に必須である⁵⁾。ΔC-KIマウス海馬における既知のリーリン下流シグナル分子の発現量を網羅的に解析した結果、アクチン骨格の脱重合制御分子であるCofilinのリン酸化量が顕著に少ないことを見いだした¹¹⁾。また、Cofilinの疑似リン酸化体を子宮内電気穿孔法により胎児海馬神経細胞に発現することで、層構造異常が一部改善することも見いだした¹¹⁾。よって、充分強いリーリンシグナルによるCofilinのリン酸化が、海馬神経細胞層の正確な形成に必要であることが判明した¹¹⁾。

成体におけるリーリン機能増強がてんかん誘

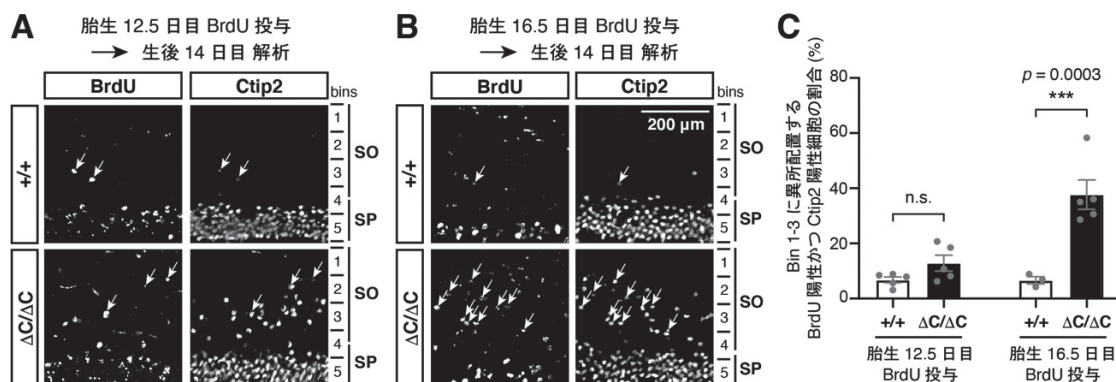


Fig. 1

導型の発作に対して保護効果をもつか否かを明らかにするため、上記と同じ方法により、野生型マウスとPADV-KIマウスにてんかん誘導を行い、投与後30分間の発作の有無と、生存個体数について調べた。その結果、PADV-KIホモマウスは、野生型マウスに比べ、24時間以上生存した個体数の割合がわずかに多かったが、統計的に有意な差は認められなかった。よって、リーリン分解阻害による機能増強は、ピロカルピン誘導性のてんかんの増悪化または改善には関与しないと考えられた。

リーリン欠損による全身症状を、生後におけるリーリントタンパク質投与で改善できるか否かを検証するため、切断抵抗型変異を導入したリーリントタンパク質（効果の持続時間が長い）を、生後0～3日目のリーリン欠損マウスの側脳室または小脳に投与した。生後21日目において行動解析を行ったところ、小脳に投与した群のみで、立ち上がり回数および協調性歩行能力が改善していた。プルキンエ細胞の配置にも、ごくわずかであるが改善傾向が観察された。この結果は、リーリン欠損ヒト患者生後脳にリーリンを投与することで、症状の改善が期待できることを示唆している¹²⁾。

【考察】

リーリン機能低下によるGCD発症の分子機構の一端を明らかにできたとともに、生後脳へのリーリントタンパク質投与が疾患治療に役立つ可能性を示せた。残念ながらリーリン分解阻害

（機能増強）による明確なてんかん改善効果は認められなかったため、リーリン分解阻害剤（精神疾患への応用を目指し、開発が進められている）がてんかん治療に役立つという示唆を得ることはできなかった。今後はさらにGCDおよびリーリン機能低下の脳への影響をその分子メカニズムを解明していくことが必要である。

【文献】

- 1) Kobow K, Jeske I, Hildebrandt M, Hauke J, Hahnen E, Buslei R, et al., Increased Reelin promoter methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; **68** : 356-64.
- 2) Haas CA, Frotscher M. Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Exp Brain Res*. 2011; **200** : 141-149.
- 3) Nakano Y, Kohno T, Hibi T, Kohno S, Baba A, Mikoshiba K et al., The extremely conserved C-terminal region of Reelin is not necessary for secretion but is required for efficient activation of downstream signaling. *J. Biol. Chem.* 2007; **282** : 20544-20552.
- 4) Kohno T, Honda T, Kubo K, Nakano Y, Tsuchiya A, Murakami T, et al., Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis.

- J. Neurosci. 2015 ; **35** : 4776-87.
- 5) Kohno T, Ishii K, Hirota Y, Honda T, Makino M, Ket al., Reelin-Nrpl interaction regulates neocortical dendrite development in a context-specific manner. J. Neurosci. 2020 ; **43** : 8248-8261
 - 6) Duveau V, Madhusudan A, Caleo M, Knuesel I, Fritschy JM. Impaired reelin processing and secretion by Cajal-Retzius cells contributes to granule cell dispersion in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Hippocampus 2011 ; **21** : 935-944.
 - 7) Orcinha C, Kilias A, Paschen E, Follo M, Haas CA. Reelin Is Required for Maintenance of Granule Cell Lamination in the Healthy and Epileptic Hippocampus. Front Mol Neurosci 2021 ; **14** : 730811.
 - 8) Ogino H, Hisanaga A, Kohno T, Kondo Y, Okumura K, Kamei T, et al., Secreted metalloproteinase ADAMTS-3 inactivates Reelin. J. Neurosci. 2017 ; **37** : 3181-3191.
 - 9) Ogino H, Nakajima T, Hirota Y, Toriuchi K, Aoyama M, et al., The secreted glycoprotein Reelin suppresses the proliferation and regulates the distribution of oligodendrocyte progenitor cells in the embryonic neocortex. J. Neurosci. 2020 ; **40** : 7625.
 - 10) Okugawa E, Ogino H, Shigenobu T, Yamakage Y, Tsuiji H, Oishi H, et al., Physiological significance of proteolytic processing of Reelin revealed by cleavage-resistant Reelin knock-in mice. Sci. Rep. 2020 ; **10** : 4471.
 - 11) Ishii K, Kohno T, Sakai K, Hattori M. Reelin regulates the migration of late-born hippocampal CA1 neurons via cofilin phosphorylation. Mol. Cell. Neurosci. 2023 ; **124** : 103794.
 - 12) Ishii K, Kohno T, Hattori M. Postnatal injection of Reelin protein into the cerebellum ameliorates the motor functions in reeler mouse. Neurosci. Res., in press.