

氏名・(本籍)	中 川 栄 二 (滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第334号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成12年3月27日
学位論文題目	Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy (てんかんモデルラットにおける初期の辺縁発作による歯状回前駆細胞の分化促進について)

審査委員	主査 教授	松 田 昌 之
	副査 教授	遠 山 育 夫
	副査 教授	島 田 司 已

論文内容の要旨

【目 的】

側頭葉てんかん脳では、側頭葉硬化と呼ばれる海馬の神経細胞死や顆粒細胞の軸索（苔状線維）の発芽などの神経病理学的再構築が認められる。一方、実験てんかん脳では、けいれん発作により海馬歯状回において、神経前駆細胞から顆粒細胞への分化増殖が促進されることが最近明らかになった。神経細胞死と苔状線維の発芽は、てんかん原性獲得過程の初期に認められるが、その両者の関係については明らかではない。また、けいれん発作による顆粒細胞の分化増殖の促進と海馬の神経細胞死との間の関係についても不明である。我々は、てんかん原性が獲得される初期の過程において、けいれん発作によって苔状線維の発芽ばかりでなく、新たな顆粒細胞の分化増殖も加わって海馬のシナプスの再構築が行われるのではないかと考えた。そこで今回は、てんかん原性が形成される過程における、顆粒細胞の分化増殖が促進される時期を明らかにするとともに、海馬の神経細胞死が新たな顆粒細胞の分化増殖の促進に影響を与えるか否かについて、てんかんモデルラットを用いて検討した。

【方 法】

カイニン酸投与と電気キンドリングによるてんかんモデルラット脳を用いて、海馬歯状回の神経前駆細胞から顆粒細胞への分化増殖と、海馬の神経細胞死について検討した。顆粒細胞への分化増殖は、臭化デオキシウリジン (BrdU) 標識法にて検索し、神経細胞の変性は、in situ DNA 末端標識法による DNA 断片化の検出にて検索した。

(1)カイニン酸投与モデル：カイニン酸を雄 SD ラットの腹腔内に投与し、全身のけいれん重積発作を誘発させ、投与後1日から13日の各段階で顆粒細胞の分化増殖を BrdU 標識法にて検索した。神経細胞死の検討は、カイニン酸投与後、3時間から4週間の各段階で in situ DNA 末端標識法にて検索した。(2)電気キンドリングモデル：雄 SD ラット脳の左側貫通路に電極を植え込み、電気刺激を1日2回与えた。けいれん発作の進展毎に顆粒細胞の分化増殖の程度を BrdU 標識法で検索したグループと、軽微な顔面の辺縁発作を誘発した後、1日から13日目の経時的な顆粒細胞の分化増殖を BrdU 標識法で検索した二つのグループで検討した。また、同時に神経細胞死の検討も両グループで行った。

【結 果】

歯状回顆粒細胞層において、BrdU で標識された新しく分化増殖した細胞が、神経細胞でありグリア細胞でないことを示すため、BrdU と OX-42 (ミクログリアのマーカー)、BrdU と GFAP (アストロサイトのマーカー) の免疫二重染色を行い、グリア細胞でないことを確認した。(1)カイニン酸投与による全身のけいれん重積誘発後、標識された顆粒細胞数は、3日目から増加し5日目に最高値に達し、10日目にコントロール値に戻り、13日目にはコントロール値よりも有意に低値となっ

た。また、カイニン酸投与後18時間目より海馬のCA1、CA3と門部の錐体細胞のDNA断片化が認められ、7日目に著明となり、4週間頃まで断片化を検出することができた。(2)電気キンドリングモデル：各けいれん発作の強さの進展毎に顆粒細胞の分化増殖を検討したグループでは、軽微な顔面の辺縁発作が5回誘発された後より、標識顆粒細胞の分化増殖の促進が認められた。しかしながら、繰り返し二次性全般化発作が誘発された後では、標識顆粒細胞数の分化増殖の促進は認められなかった。軽微な顔面の辺縁発作を5回誘発した後、経時的に顆粒細胞の分化増殖を検討したグループでは、誘発後、1日目から3日目（すなわち最初の電気刺激から、3日から5日目）に標識顆粒細胞数の分化増殖の促進が認められ、7日目（すなわち最初の刺激から9日目）には、標識顆粒細胞数はコントロール値に戻った。また、いずれの電気キンドリングのグループでも、明らかなDNA断片化は検出されなかった。

【考 察】

カイニン酸投与と電気キンドリングによる異なる病理機構をもつてんかんモデルにおいて、歯状回の神経前駆細胞から顆粒細胞への分化増殖の促進現象が、同様の時間的経過で認められた。この顆粒細胞への分化増殖の促進現象は、電気キンドリングモデルでは、てんかん原性が形成される初期の辺縁発作の過程で著明であり、二次性全般化発作が確立された後には認められなかった。このことより、顆粒細胞への分化増殖を促進する機構は、てんかん原性が獲得される初期の過程においてのみ認められることが示唆された。一方、海馬の神経細胞死は、カイニン酸投与によるてんかんモデルにおいては著明に認められたが、電気キンドリングモデルでは明らかではなかった。これらの結果は、海馬の神経細胞の変性が、必ずしも新たな顆粒細胞への分化増殖を促す引き金ではないことを示した。一方、顆粒細胞の苔状線維の発芽現象は、カイニン酸投与後あるいは電気キンドリングの刺激開始後、10日から14日頃より著明になるといわれている。顆粒細胞への分化増殖の促進現象が刺激開始後3日から5日目に一過性に著明となり、苔状線維の発芽に先駆けて認められたことは、新しく分化増殖した顆粒細胞が、苔状線維の発芽現象や、海馬のシナプスの再構築に何らかの影響を与えている可能性を示すものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

側頭葉てんかんでは、著明な海馬錐体細胞死に加え、グリアの増殖や顆粒細胞の苔状線維の発芽などの増殖性変化も認められる。一方最近、海馬歯状回に神経幹細胞の存在が確認された。けいれん発作によって苔状線維の発芽ばかりでなく、新たな顆粒細胞の分化増殖も加わって、海馬シナプスの再構築が生じている可能性が示唆される。本研究は、側頭葉てんかんにおける歯状回神経幹細胞の役割を解析する目的で、カイニン酸投与およびキンドリングてんかんモデル動物を用いて、歯状回神経幹細胞の分化増殖能について検討したものである。

その結果、

- 1) いずれのてんかんモデル動物でも、刺激開始3日後から顆粒細胞への分化が始まり、5日後にピークに達し、約10日後に正常に復した。
 - 2) 顆粒細胞への分化は、海馬錐体細胞死がなくても生じる。
 - 3) 顆粒細胞への分化は、てんかん原性獲得に先だって生じ、獲得後はむしろ減少する。
- などが解明された。

本研究は、歯状回顆粒細胞への分化増殖が、側頭葉てんかんにおけるてんかん原性獲得の初期に深く関与していることをはじめて明らかにした優れたものであり、博士（医学）の学位を授与するに値すると評価された。