

マウス海馬齒状回肥大化モデルを用いた海馬硬化病態増強因子の検索

(13671432)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究（C））研究成果報告書

平成16年6月

研究代表者 鈴木 文夫
(滋賀医科大学医学部講師)

は し が き

研究組織

研究代表者： 鈴木 文夫 (滋賀医科大学医学部講師)

研究分担社： 黒川 清 (滋賀医科大学医学部助教授)

交付決定額 (配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	1,800千円	0円	1,800千円
平成14年度	800千円	0円	800千円
平成15年度	800千円	0円	800千円
総計	3,400千円	0円	3,400千円

研究発表

(1) 学会誌

Hisao Hirai, Fumio Suzuki, Kiyoshi Kurokawa, Koichi Mitsuya, Masayuki Matsuda, Mouse Famingo1/Celsr2 relates neuronal reorganization of the hypertrophic dentate granule cells after kainite injection. Brain Research 966 : 40-46, 2003

(2) 口頭発表

・鈴木文夫、三矢幸一、黒川清、マウス海馬硬化モデルにおける顆粒細胞分散に対するグルタミン酸受容体アンタゴニストの効果、日本神経学会大会、2002年7月7-9日

・鈴木文夫、三矢幸一、黒川清、マウス海馬硬化モデルの形態変化に対するグルタミン酸アンタゴニストの効果、日本脳神経外科学会 2002年10月2-4日

・三矢幸一、鈴木文夫、平井久雄、松田昌之、マウス側頭葉てんかんモデル慢性期のグルタミン酸含量とtim m 染色性の変化、日本脳神経外科学会、2002年10月2-4日

・Fumio SUZUKI, Koichi MITSUYA, Kiyoshi KUROKAWA、Effects of glutamate receptor antagonists on granule cell dispersion in mouse model of hippocampal sclerosis、Sixth IBRO World Congress of Neurosciece, 2003年7月10-15日

滋賀医科大学附属図書館



2003009076

マウス海馬歯状回肥大化モデルを用いた海馬硬化病態増強因子の検索

I: 培養系実験を用いた海馬抽出液の効果の検討

1: 研究の目的

私たちはこれまで進行性の海馬歯状回顆粒細胞の肥大化と顆粒細胞の分散を生じるモデルを報告してきた^{1,3,5}。このモデルは脳発達終了後のマウス成獣海馬にカイニン酸(KA)を1回投与することにより生じるもので、KA投与側では顆粒細胞は直径で正常の2倍以上に拡大し、顆粒細胞層自体が海馬全体を占めるくらいにまで強く分散する。これまでの研究より、この分散した顆粒細胞の間を埋め、分散を増強する主な原因はグリオシスであることが示されている⁵。その他、このモデルは脳波、グルコース代謝、抗てんかん薬に対して抵抗性であること、苔状線維の萌芽など海馬硬化に見られる特徴的所見と多くの類似点を持つモデルであることもわかっており、海馬硬化の病因の解明に寄与するものと考えられる^{1,3}。

今回の研究では、このマウスモデルを用い、肥大化した顆粒細胞層より蛋白を抽出・生成し、この蛋白の中に、顆粒細胞の肥大化、あるいは分散を促進する物質、あるいはグリオシスを増強する因子が存在するのかを主目的とし研究を行った。加えて、環境因子を検討する目的としては、組織全体よりも細胞外液の変化がより重要であると考えられたため、細胞外液をマイクロダイアリースにて採取し検討した。

2: 研究の方法

蛋白抽出液の影響は2系統の培養系で調べた。(1) 通常の細胞培養より in vivo

C57Bl/6j 成獣雄マウス（週令8 - 10週、日本クレア）を使用した。抱水クロラール（350mg/kg, i.p.）で麻酔後、定位脳手術装置に固定し、以下の coordinate(1: AP -1.8 mm, L 1.5 mm, D 1.7 mm, 2: AP -2.7 mm, L 2.4 mm, D 2.3 mm)にて右側背側海馬に KA（1nanoM/ 005ml 生理食塩水）を投与した。

2) 蛋白抽出液の作成

KA 投与後7日目にネンブタール（100mg/kg）にて深麻酔後に両側海馬を摘出し、直後に凍結し-80 度にて保存した。同様に KA 非投与正常マウスからも海馬を摘出した。計量後、ホモゲナイズし、12000rpm で15分遠心後、上澄を採取。220nm のフィルターを用い遠心濾過を行った。蛋白定量を行い最終濃度2mg/ml に調整し、凍結保存した。

3) マイクロダイアリーシス

KA 投与後6日目に、抱水クロラールで麻酔後定位脳手術台にマウスを固定し、ブレグマより後方2mm、外側1.5mm、脳表より0.9mm の深さにまで、マイクロダイアリーシス挿入用の専用カニューラ（CUP7 ガイドカニューラ, CMA 社性）を刺入し、歯科用骨セメントにて固定した。24時間後にカニューラ先端より1mm 長の透析膜部分が海馬内に挿入されるようにプローブ（CUP7 マイクロダイアリーシスプローブ、CMA 社製）を挿入した。無麻酔、無抑制下で、人工髄液（147 mM NaCl, 2.3 mM CaCl₂, and 4 mM KCl）を1.5 μ l/min でプローブ内に灌流し、灌流開始後1時間より8時間、20分間毎に回収した。

4) 培養系による評価

(i) 切片培養による検討

Stoppini らの方法⁴に準じ施行した。生後7日目の C57Bl/6j マウスより海馬を摘出し、チョッパーにて海馬長軸に直行する厚さ約0.35mm の切片を作成し、Millicell-CM membrane 上で培養した。培養7日目より10日目まで1日に1回、各切片上に直接蛋白抽出液を滴下した。培養14日目に4%パラホルムアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝液にて1時間半固定した。リン酸緩衝液にて洗浄後、グラチンコートのスライドグラスに貼付し、Cresyl violet にて染色した²。

(ii) 神経幹細胞培養による検討

マウス ES 細胞より常法により調整されたマウス神経幹細胞を田辺製薬先端医学研究所よ

り提供をうけた。培養液内への FGF 添加を中止し、分化誘導のかかる状態で、培養液内に濃度の異なる海馬蛋白抽出液、あるいはマイクロダイアリースで採取した細胞外液（培養液 1/10 量）を 8 日間連続して添加した。9 日目に 4% パラホルムアルデヒドにて固定し、抗 MAP-2 抗体と抗 GFAP 抗体にて蛍光免疫組織化学法にて 2 重染色し、観察した。

3 : 結果

(i) 切片培養 (図 1)

C57Bl/6j マウス海馬切片培養の結果を図 1 に示す。通常よく行われているラット海馬の切片培養に比し、生後 7 日目の海馬のサイズが小さいことより、くも膜除去が行いがたく、やや切片の断端の組織損傷が生じやすかった。組織を薄切することも困難であり、培養切片そのものをクレシルバイオレットにて染色した。このため免疫組織化学での神経分化は一部でのみしか検討できなかつた。クレシルバイオレットによる結果も組織辺縁では切片間に差が認められたが、歯状回からアンモン角錐体細胞層の形態については観察可能であった。

蛋白流出液未添加の対照群では、成獣に比べやや細胞層の厚い歯状回とアンモン角錐体細胞層が認められた (図 1-A)。これに対し、KA 投与対側海馬より抽出し、1mg/ml の濃度に調節した蛋白液を連日添加した群でも、対照と比べ明らかな差はなく、歯状回、アンモン角の細胞層の形態は観察された (図 1-B)。一方、同様に最終濃度を調節した KA 投与側海馬蛋白抽出液では、対照のと比較し海馬の正常構造が障害されている場合が多く認められた。図に示すように歯状回よりも錐体細胞層障害を生じることが多かった。このため KA 投与海馬切片による免疫組織化学についての検討は行えなかつた。

(ii) 神経幹細胞による検討

マイクロダイアリースによる結果を図 2 に示す。マイクロダイアリースによる細胞外液採取後には組織切片にてプローブがほぼ海馬内に限局して挿入されていたこと、KA 投与側では海馬顆粒細胞層の分散があることを確認した。

細胞外液自体の濃度の問題であるかもしれないが、培養結果ではマイクロダイアリースの灌流に使用する人工髄液のみを添加した群と比較し、正常海馬、KA 投与海馬からの灌流液投与群との間に、神経分化、神経膠細胞分化についての明らかな違いは認められなかつた (図 2)。

海馬蛋白抽出液の添加実験では、最終蛋白濃度を 2mg/ml に調節し、原液と 10 倍希釈液を用意した。原液投与群では、KA 投与・非投与にかかわらず、幹細胞の増殖が強く認められ、overgrowth となり未分化状態であり、両者間の差を検討することはできなかった。これはおそらく培養液の蛋白濃度上昇による結果と考えられた (図 3A-C)。10 倍希釈による検討では蛋白濃度上昇による overgrowth は認められなかった。蛋白未添加、1/10 正常海馬蛋白抽出液、1/10 KA 投与対側海馬抽出液、1/10 KA 投与側海馬抽出液の 4 群の比較においての比較では、各群間に差は認められなかった (図 4D-F)。原液から 10 倍希釈液の中間の濃度程度では差が生じる可能性は否定できないが、今回の結果からは、明らかな神経分化因子や神経膠細胞分化因子が KA 投与により分散肥大化する海馬歯状回蛋白抽出液にあることを示すことはできなかった。

4 : まとめ

このモデルでは顆粒細胞の胞体の肥大化、神経突起の高度な萌芽に加え、高度な細胞の分散が認められる⁵。この分散には神経細胞の遊走とそれに伴う周囲の神経との連絡の再構築が必要であり、その機構を支える因子の可能性を検討することを目的に今回の研究を行った。しかし、以上の結果のように今回の結果では神経再構築を増強するような物資の存在を示唆する結果は得られなかった。

神経細胞そのものではなく、その分化に適した環境の有無を調べるためには、細胞外液を中心に調べるべきである。その目的より、マイクロダイアリースによる資料採取を試みた。ただし、この方法で得られる資料はプローブの入っているすぐ近傍のものであり、量・濃度としてきわめて少ないものであると考えられ、細胞培養液内への添加という方法では全く量が不足していた可能性がある。

一方、蛋白抽出液では、非特異的な細胞増殖を生じるような高い蛋白量が得られた。しかし、この場合に細胞外液のしめる量は少なく、実際にこのモデルより期待される結果を選定しにくい条件となったものと推測された。実際の結果でも対照との差はなく、今後この実験を継続するためには、外液を濃縮し使用する必要性があるものと考えられた。

参考文献

- 1: Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G.: Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 89: 717-29, 1999.
- 2: Marty S, Wehrle R, Sotelo C. Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus. *J Neurosci.* 20: 8087-95. 2000.
- 3: Riban V, Bouilleret V, Pham-Le BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A.: Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 112:101-11. 2002
- 4: Stoppini L, Buchs P-A, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182, 1991
- 5: Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sorensen JC, Onteniente B.: Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience.* 64: 665-74, 1995.

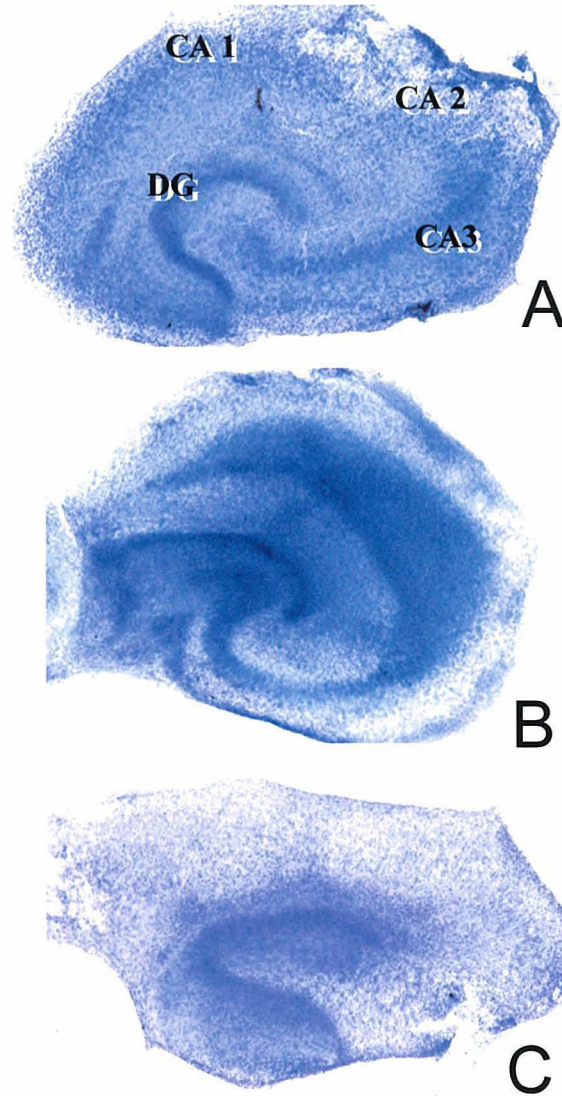


図1: マウス海馬切片培養に対する海馬蛋白抽出液の影響。蛋白抽出液無添加(A)の対照と比較し、KA投与反対側の海馬より抽出した蛋白を培養液内に添加した群(B)では対照と明らかな差は認められなかったが、KA投与側蛋白抽出液(C)ではアンモン角の錐体細胞層が変性脱落していた。

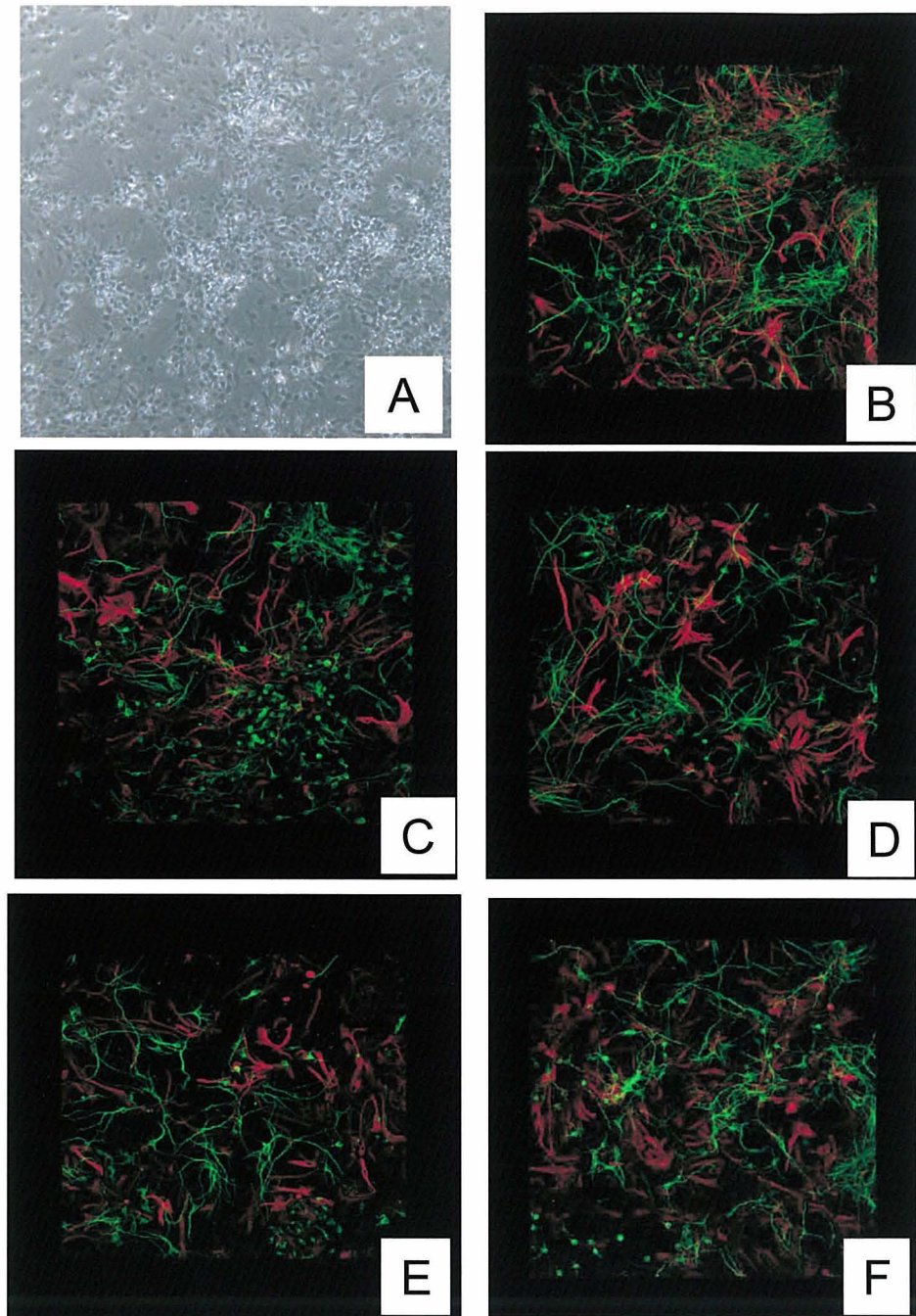


図2: マイクロダイアリースにより採取した海馬細胞外液をマウス神経幹細胞の培養液に添加して、神経幹細胞の分化に対する影響を調べた。対照としてマイクロダイアリースの灌流液である人工髄液を同様に添加した(A, B)。正常海馬より抽出した細胞外液の1/10希釈液(C)と原液(D)、カイニン酸投与から1週間経過した海馬細胞外液の1/10希釈液(E)と原液(F)を添加した両群を比較した。幹細胞分化誘導について明らかな差は認められず、人工髄液との比較でも違いは認められなかった。 緑:MAP2、赤:GFAP

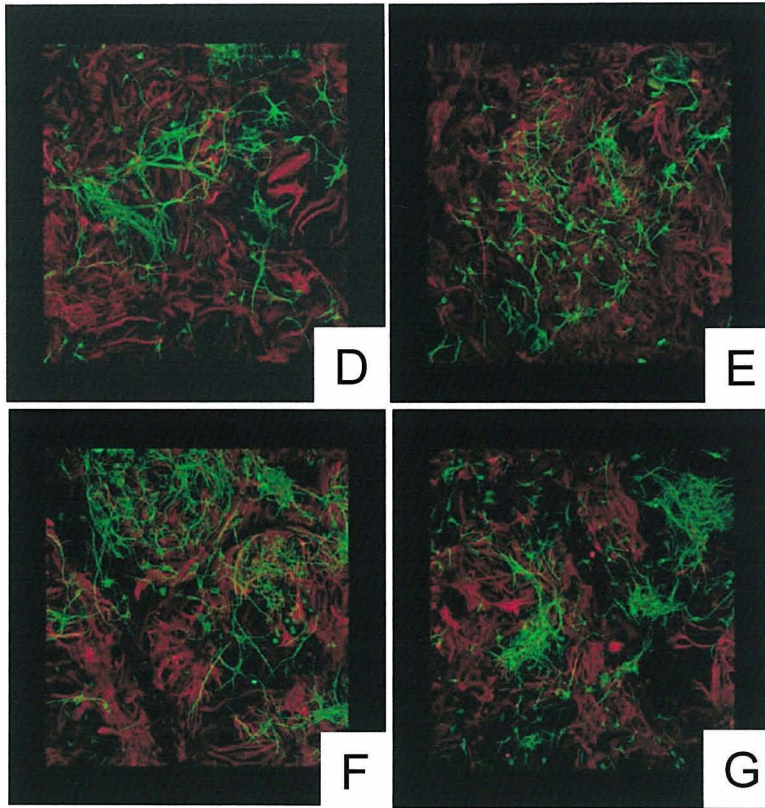
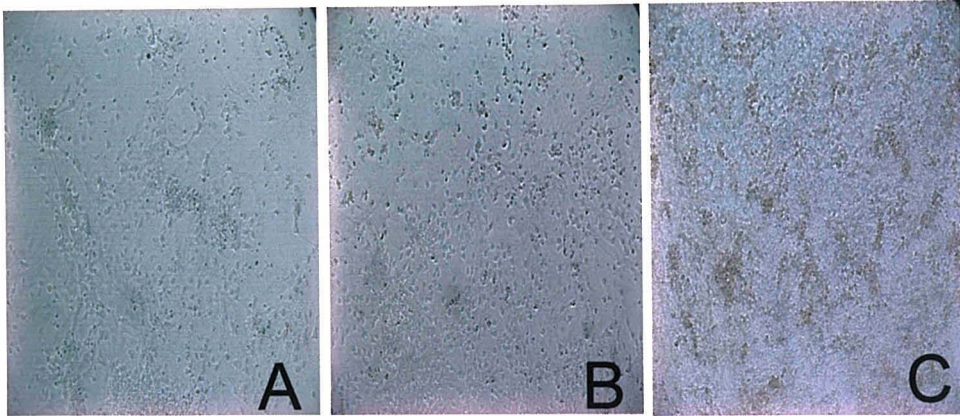


図3: マウス神経幹細胞に対する海馬蛋白抽出液の影響。蛋白抽出液を希釈せず培養液に添加すると、(C) の様に細胞がovergrowthになり、このため分化傾向が抑制された。この図にはKA投与側海馬蛋白抽出液の結果を示しているが、正常海馬、KA投与側対側海馬蛋白抽出液でも同様の結果であった。このため分化誘導の検討には1/10希釈液での検討を行った。(A)蛋白抽出液無添加、(B)1/10 KA投与側海馬蛋白抽出液。

(E)～(G): 培養液内へ1/10の蛋白希釈液を連日8日間投与して、免疫組織化学を施行した。(D): 未添加、(E): 正常海馬、(F): KA対側海馬、(G): KA投与海馬。各群とも赤色に染まるGFAPが優勢で、緑色に染まるMAP-2陽性の神経細胞は細胞の大きさや突起の伸展程度に明らかな違いは認められなかった。