

審査の結果の要旨

てんかん脳におけるマイクログリア依存的な聴覚機能障害

氏名 平木 俊光

てんかんは、神経回路の過剰興奮と、それに伴うけいれん発作を主症状とする中枢神経疾患である。中でも側頭葉てんかんは難治性とされ、脳内において慢性的な炎症反応が生じることが示唆されているが、細胞レベルでの発症メカニズム解明には至っていない。

中枢神経系の免疫細胞であるマイクログリアは、細胞外環境の変化に応答して、炎症性および抗炎症性因子の放出や死細胞の貪食を行うことが知られているため、てんかんの研究においても注目を浴びてきた。これまでに、てんかん患者またはてんかんのモデル動物の脳内において、マイクログリアが活性化し、脳内で起こる炎症反応に関与することが明らかになっている。近年になって、マイクログリアは脳内の免疫機能を担うだけでなく、シナプス除去を介して神経回路の発達や維持に寄与することが示された。このことから平木は、マイクログリアは、てんかん脳においてもシナプス除去を介して神経回路機能に影響を与えると考え、マイクログリアによる神経回路の再編成がてんかん病態に与える影響を明らかにすることを目的とした研究を行った。

本研究では、側頭葉てんかんのモデルとして頻用される、カイニン酸の腹腔内投与によるてんかん重積モデルを用いた。まず、全てのマイクログリアが緑色蛍光タンパク GFP で標識される CX3CR1^{GFP/+}マウスにカイニン酸を投与し、マイクログリアの活性化が起こる脳領域を網羅的に調べた。その結果、内側膝状体 (MGN) においてマイクログリアの活性化が生じることを発見した。MGN は視床の中継核であり、音に対して生じた神経細胞の応答を聴覚野へと伝達する脳領域である。また、この活性化は、MGN に隣接する視床の領域である外側膝状体 (LGN) では認められず、MGN 特異的な現象であった。てんかん重積後に活性化したマイクログリアが、聴覚経路の神経活動に影響を及ぼす可能性が考えられたため、自由行動下のマウスから局所場電位を記録した。てんかん重積の誘導前と比較して、てんかん重積の誘導後では、MGN や聴覚野において、てんかん発作様脳波が検出された。一方で、前頭前野では、てんかん発作様脳波がほとんど検出されなかったことから、聴覚経路特異的に神経活動が亢進していることが示唆された。

次に平木は、MGN のシナプス密度を調べた。プレシナプスとポストシナプスのマーカーの免疫染色を行い、これらが重なる部分をシナプスと定義した。その結果、カイニン酸投与群において抑制性シナプス密度が有意に低下した一方で、興奮性シナプスの密度に有意差はなかった。続いて、抑制性シナプス密度が減少するメカニズムに着目した。CX3CR1^{GFP/+}マウスにカイニン酸を投与し、てんかん重積を誘導した。その後、Nissl 染色で神経細胞の細胞体を、Gephyrin の免疫染色で抑制性ポストシナプスを可視化した。その結果、MGN において、マイクログリアの突起が神経細胞の細胞体を覆い、突起に覆われた細胞体近傍の抑制性ポストシナプスが減少していた。以上より、てんかん重積後の MGN においてマイクログリアによって抑制性シナプスが除去され、神経活動が亢進することが示唆された。

MGN は視床の中継核であり、音に対して生じた神経細胞の応答を聴覚皮質へと伝達する脳領域である。そのため、MGN におけるマイクログリアの活性化は、聴覚機能に影響を及ぼす可能性がある。実際に、側頭葉てんかんの患者は、音の高低を判別する能力が低下するなどの聴覚機能障害を併発することが知られている。しかしながら、その併発メカニズムに関してはほとんど明らかとなっていない。そこで、周波数が上昇または低下していく、2 種類の音刺激を弁別させる音弁別回避課題をマウスに行わせ、てんかんマウスモデルにおいても聴覚機能障害が再現されるかを調べた。本課題では、マウスを棒で仕切られた部屋に入れ、異なる 2 種類の音刺激を学習させる。周波数が上昇していく go 刺激が呈示された場合は隣の部屋へ移動し、周波数が低下し

ていく no-go 刺激が呈示された場合は元いた部屋に待機しなければならない。失敗した場合は足元に電気ショックが与えられる。この課題を 10 日間行わせると、弁別比が上がり、学習が成立した。続けてカイニン酸を投与すると、コントロールと比較して弁別比が有意に低下した。このことから、てんかん重積後のマウスに聴覚機能障害が生じることが示唆された。さらに、てんかん重積の誘導前に、両側の MGN へのクロドロン酸の局所投与によって、MGN 内のマイクログリアを除去しておくことで、てんかん重積後の弁別比の低下が緩和された。以上の結果から、てんかん重積後、MGN において活性化したマイクログリアが聴覚機能障害を引き起こすことが示唆された。

本研究により、てんかんと聴覚機能障害の併発メカニズムに、聴覚経路のマイクログリアの活性化が関与することが示唆された。マイクログリアはてんかん重積後の内側膝状体 (MGN) において特異的に活性化し、抑制性シナプスを特異的に除去する。これにより、MGN の神経細胞の過剰興奮が誘導されることで、聴覚機能障害が生じると考えられる。この結果を踏まえると、マイクログリアを治療標的にすることで、てんかん発作に加えて患者の quality of life (QOL) を低下させる要因となる、聴覚機能障害の治療に貢献できる可能性がある。本研究は、聴覚機能障害発症のメカニズムの一端を解明した点で意義深く、さらにてんかんに併発する聴覚機能障害の治療の可能性を提示した点で重要である。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。