

# (馬場史郎) 論文内容の要旨

## 主 論 文

### Involvement of the neuronal phosphotyrosine signal adaptor N-Shc in kainic acid-induced epileptiform activity

**NShc** ホスホチロシンアダプター分子のカイニン酸誘発てんかん性活動への関与

馬場史郎、大神和子、柿澤昌、大山恭司、安田邦彦、大坪宏、Brian W. Scott、  
W. McIntyre Burnham、松尾孝之、永田泉、森望

Scientific Reports 6:1-9, 2016

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：松尾 孝之 教授)

## 緒 言

てんかん患者のうち約 20%が抗けいれん薬で発作を抑制できない難治性てんかんとなり、発作やそれに伴う神経機能障害を抑制する新しい治療法が求められている。けいれん発作は、ニューロンの過剰な発射に起因し、周囲神経細胞の興奮と抑制の均衡が崩れることで生じるが、その細胞内分子メカニズムは未だ解明されていない。

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、特異的受容体 TrkB に結合し、NShc や PLC $\gamma$  などアダプター蛋白を介してシグナルを伝達することで、神経細胞の生存・成長・シナプスの機能亢進などを調節していると考えられている<sup>2,3,4</sup>。また BDNF-TrkB シグナル伝達系は、けいれんやてんかん原生獲得に関与していることが明らかにされてきた<sup>5,6,7,8,9</sup>。しかし、けいれんにおける TrkB 活性化後の NShc の機能的役割については依然不明な点が多い。

我々は、NShc を介したシグナル伝達系がてんかん性活動に関連しており、NShc を抑制することで、けいれん発作が抑制されると仮説を立てた。本研究では、NShc 欠損マウスを用い、カイニン酸誘発てんかん性活動における NShc の機能解明を目的とした。

## 対象と方法

### (1)実験動物

4 - 8 週齢の NShc 欠損マウス(NShc<sup>-/-</sup>)、コントロールとして NShc<sup>-/-</sup>マウスと同腹仔野生型マウス(NShc<sup>+/+</sup>)および C57BL/6 マウスを用いた。

### (2)カイニン酸誘発けいれん評価法

NShc<sup>-/-</sup>、NShc<sup>+/+</sup>、C57BL/6 マウスに対し、カイニン酸(KA)腹腔内投与(30mg/kg,i.p.)を行い、誘発されるけいれん発作を投与後より 320 分間観察し、重症度を Racine seizure scale を用いて評価した。

### (3)海馬脳波記録

N-Shc<sup>-/-</sup>、C57BL/6 マウスに対し麻酔下に定位的に海馬電極を留置。術後 1 週間目に

KA(30mg/kg,i.p.)投与前後の脳波記録を行った。てんかん性発射(棘波・鋭波)を投与後より2時間解析した。

#### (4)海馬錐体細胞死の組織学的検討

NShc<sup>-/-</sup>、NShc<sup>+/+</sup>、C57BL/6 マウスに対し KA(30mg/kg,i.p.)投与し、投与後1日目、7日目に灌流固定、脳を摘出し凍結標本とした。冠状断スライス標本を作成し、Nissl染色を行った。海馬 CA1、CA3 領域の錐体神経細胞数を計測し、神経細胞死を解析した。

## 結 果

### カイニン酸誘発けいれん発作

Racine seizure scale は、C57BL/6 マウスが 5.21、NShc<sup>+/+</sup>マウスが 5.50 に対し、NShc<sup>-/-</sup>マウスは 3.27 と有意に低下した(p<0.001)。

### 海馬てんかん性発射

KA 投与後のてんかん性発射の頻度は、投与後 0-1 時間後では C57BL/6 マウスが 5642.8 回/h に対し NShc<sup>-/-</sup>マウスは 1046 回/h と有意に低下した(p<0.001)。1-2 時間後では C57BL/6 マウスが 8040 回/h に対し、NShc<sup>-/-</sup>マウスは 981.5 回/h と有意に低下した(p<0.001)。

### 海馬錐体細胞死

CA3 領域の錐体神経細胞数は、KA 投与後 1 日目において C57BL/6 マウスが 15.7cells/10<sup>4</sup>μm<sup>2</sup>、NShc<sup>+/+</sup>マウスが 18.1cells/10<sup>4</sup>μm<sup>2</sup> に対し、NShc<sup>-/-</sup>マウスは 43.5cells/10<sup>4</sup>μm<sup>2</sup> と有意に錐体神経細胞死が抑制された(p<0.001)。また 7 日目において C57BL/6 マウスが 15.5cells/10<sup>4</sup>μm<sup>2</sup>、NShc<sup>+/+</sup>マウスが 20.2cells/10<sup>4</sup>μm<sup>2</sup> に対し、NShc<sup>-/-</sup>マウスは 45.0cells/10<sup>4</sup>μm<sup>2</sup> と有意に神経細胞死が抑制された (p<0.001)。一方、CA1 領域では 1 日目、7 日目ともに各郡での錐体神経細胞数に差はなかった。

## 考 察

本研究では、NShc<sup>-/-</sup>マウスにおいて KA により誘発されるけいれん重症度およびてんかん性発射がコントロールマウスに比べ有意に低下した。また、KA 投与後の海馬 CA3 領域の錐体細胞死が抑制された。これらの結果から NShc が KA 誘発てんかん性活動の細胞内分子メカニズムに関連していることを解明した。

TrkB や PLC $\gamma$  を抑制することでキンドリングによるてんかん原生獲得が抑制されることは報告されている<sup>9,10</sup>。その一方で記憶と学習に関わる海馬での long term potentiation(LTP)も低下するため<sup>10,11</sup>、TrkB 自体や PLC $\gamma$  を抑制することは認知機能や高次機能に影響を与える可能性がある。我々はこれまでの研究で NShc<sup>-/-</sup>マウスは海馬での LTP が増強され、野生型マウスよりも認知機能が優れていることを報告した<sup>12</sup>。これらのことから NShc を標的とすることで、高次機能に影響を与えることなく、てんかんを抑制できる新たな治療法を確立できる可能性がある。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。