

氏 名	嶋 綾子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士乙第413号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成27年 3月10日
学位論文題目	Activation of mTOR pathway is secondary to neuronal excitability in a mouse model of mesio-temporal lobe epilepsy. (マウス側頭葉てんかんモデルにおける mTOR シグナル伝達系の活性化は神経興奮に続発して生じる)
審査委員	主査 教授 山田 尚登 副査 教授 江口 豊 副査 教授 遠山 育夫

論文内容要旨

*整理番号	417	氏名	嶋 綾子
		(ふりがな)	しま あやこ
学位論文題目	Activation of mTOR pathway is secondary to neuronal excitability in a mouse model of mesio-temporal lobe epilepsy. マウス側頭葉てんかんモデルにおけるmTORシグナル伝達系の活性化は神経興奮に続発して生じる		
目的	<p>近年、細胞の増殖や増大に関与するmammalian target of rapamycinシグナル伝達系(mTOR pathway)の活性化が結節硬化症(TSC)などの病態発生やてんかんの発生・進行に関与していることが多数報告されるようになった。最近では、内側側頭葉てんかん(MTLE)についても、mTOR pathwayの抑制によりてんかん源性そのものを制御できる可能性が報告がされるようになった。しかし、否定的な結果も示され未だ議論のあるところである。</p> <p>われわれは一側性で、てんかん性脳波異常がきわめて高頻度に生じるマウスMTLEモデルについて報告してきた。このモデルでは海馬顆粒細胞の増大・分散(granule cell dispersion:GCD)を含めた形態変化の進行が他のモデル動物と比べきわめて高度に生じるため、より強いmTOR pathwayの発現変化が予測される。今回の研究では、このモデルでのmTOR pathwayの発現変化をその指標となるPhospho-S6 ribosomal protein(p-S6)発現で調べ、その抑制によるてんかん性形態異常や脳波異常を検討し、その他にも発現に関与する因子を調べ、mTOR pathwayがMTLEてんかん病態の発生に関与しているかを検討した。</p>		
方法	<p>C57Bl/6マウスの右側海馬背側に定量的に1nMのカイニン酸(KA)を投与しモデルを作成。組織検査としてCresyl violet染色、p-S6, BDNF, NeuN, ZnT3, GFAPの免疫組織化学を施行。脳波測定は植え込み型電極にて行った。mTOR pathway抑制にはラパマイシンを投与し、てんかん性神経興奮の抑制にはミダゾラム(ベンゾジアゼピン)を使用した。</p>		
結果	<p>1 : p-S6はKA投与後、15時間をピークとした両側海馬歯状回での一過性の発現上昇(first phase)を認めた。対側の上昇はその後認めず、KA投与側では投与後3日目にグリアでの発現上昇が生じ、また歯状回での発現上昇は14日目にピークを持ち、観察した最終期間の180日目まで持続した(second phase)。</p> <p>2 : mTOR pathwayの抑制のためラパマイシン(Rap)をKA投与から連日投与すると、GCDや苔状線維神経萌芽(mossy fiber sprouting:MFS)、gliosisの増生は抑制されたが、てんかん性脳波異常(hippocampal paroxysmal discharges:HPDs)は抑制されなかった。</p>		

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. *印の欄には記入しないこと。

3 : Rapの連日投与は脳由来神経栄養因子 (BDNF) の上昇、GAD67陽性の抑制系神経の低下や歯状回門部の神経細胞低下は抑制しなかった。

4 : KA投与後21日目では、GCD, MFSは既に高度に進行し、脳波異常もコンスタントに出現するじきであるが、この際にミダゾラムを投与しててんかん性異常興奮を抑制すると、p-S6の発現は急速に低下した。

考察

1: 初期のてんかん重積によるmTOR pathwayの活性化について。

このモデルの過去の研究において、KA投与後に両側海馬に脳波異常がありnon-convulsive status epilepticus (SE)を生じることがわかっているが、このSEの発生と両側のp-S6の発現上昇は時間的に一致していた。他モデルでも同様の2峰性の発現上昇が報告されており、この初期の一過性p-S6の発現上昇(first phase) はSEに伴う神経興奮の結果生じるものと推測された。

2 : てんかん源性獲得に際してのmTOR pathwayの活性化について。

second phaseの上昇はKA投与後14日目にピークとなり以後も持続するが、脳波異常は14日目まで変化しながら、14日後に定型的なHPDsになるパターンとなり、両者の時間的変化はよく一致していた。これらより、mTOR pathwayの全経過での活性の変化は海馬の過剰興奮性とよく一致していることがわかった。

3 : 側頭葉てんかんの特徴的な病理所見であるGCD, MFS, gliosis, cell lossなどについてのRapの影響について。

RapによるmTOR pathwayの抑制でGCDやMFSやgliosisは抑制されたが、cell lossについては抑制されなかった。これまでの報告でも示されているように、このモデルにおいてもmTOR pathwayがてんかん性の形態変化に強く関連していることが示唆された。Cell lossについては、過去の結果を含め検討するとRapの投与のタイミングが関連しており、KA投与などのてんかん性変化の誘因となる過剰刺激が生じる前から投与を開始しなければ抑制されないと考えられた。

4 : Rapの投与がBDNFや抑制系神経の神経保護に及ぼす影響について

これまでの研究よりBDNFや抑制系神経の低下はこのモデルのてんかん病態の進行に重要であることがわかっているが、Rapの投与はこの両者に対し影響はなく、これら因子はmTOR pathwayとは関係なく変化するものと考えられた。Cell lossを含め、これら因子はてんかん病態の発生進行に重要で有るが、これらを抑制できないRapは、このモデルの側頭葉てんかん病態に対し有効ではないことが示唆された。

5 : 神経興奮の抑制によるmTOR pathwayの活性化について。

てんかん病態が確立した時期に、HPDsを抑制するようにミダゾラムを投与するとp-S6の発現は短時間で著減したことより、このモデルにおいてはmTOR pathwayの活性化はneuronal excitationの結果であって、mTORの発現変化は一次性ではなく二次性のものであることが示唆された。TSCなどの一次性にmTOR pathwayの異常を持っている病態ではmTOR pathwayの抑制がてんかん源性抑制になるが、側頭葉てんかんなどの二次性に变化をもたらすものでは、基本的にRapのてんかん源性の発生・進行に対する抑制効果は期待できないものと考えられた。

結論

今回の検討から、mTOR pathwayは側頭葉てんかんに特異的な形態変化の発生・進行の抑制には有効であるが、その活性化は二次性に生じるもので有り、本質的にはてんかん源性の抑制にはなり得ないと考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	417	氏名	嶋 綾子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>本学位論文は、カイニン酸 (KA) 誘発性てんかんモデルマウスを用いて、mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル伝達系発現と側頭葉てんかんの病態の関連性を調べようと試みた研究である。mTOR シグナル伝達の指標としては Phospho-S6 ribosomal protein(p-S6) を用い、てんかん性形態異常や脳波異常の発現変化を指標として検討を加えた。</p> <p>その結果について検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. p-S6 は KA 投与後、15 時間後と 14 日目の 2 峰性のピークを示した。 2. rapamycin の連日投与により、granule cell dispersion(GCD)、苔状繊維神経萌芽 (mossy fiber sprouting)、gliosis の増生は抑制されたが、てんかん性異常脳波は抑制されなかった。 3. rapamycin の連日投与は、BDNF の上昇、GAD67 抑制精神系の低下や神経細胞低下を抑制しなかった。 4. これらの結果から、mTOR シグナル伝達系の抑制は、側頭葉てんかんに特異的な形態変化の発生や進行の抑制には有効であるが、てんかん源生の抑制とは関連が低いことが示された。 <p>本論文は、十分明らかになっていない側頭葉てんかんの病態生理解明に関して新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試験を受け合格したので、博士 (医学) の学術論文に値すものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 600 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 27 年 1 月 27 日)</p>			