

称号及び氏名	博士(獣医学)	沼倉 佑樹
学位授与の日付	2022年9月23日	
論文名	Analyses for histopathology and PHF24-expression of Noda epileptic rat (NER) (Noda epileptic rat (NER)の病理組織学および PHF24 蛋白発現の解析)	
論文審査委員	主査	桑村 充
	副査	小川 和重
	副査	森山 光章

論文要旨

緒言

Noda epileptic rat (NER)は、Crj:Wistar 系コロニーにて見出された自然発症性の強直-間代性のもんかん発作を特徴とする遺伝性てんかんモデルラットである。てんかん発作は8週齢から発現し、その後おおよそ30時間おきにてんかん発作を引き起こすことが知られている。てんかん発作中の大脳皮質および海馬の脳波はヒトのてんかん時の脳波と類似しており、側脳性てんかんモデルとして分類されている。NERにおける脳の過興奮はGABA作動性神経の異常な活動により引き起こされている可能性が示唆されており、海馬のCA3領域の錐体細胞の過興奮はCa²⁺チャンネルの機能不全と関連があることが報告されている。しかしながら、NERのてんかん発生の詳細なメカニズムはいまだ明らかとなっていない。複数の遺伝子がNERのてんかん発生に寄与していることが報告されている。中でもPHD finger protein 24 (*Phf24*)として知られる遺伝子の関与が高いことが報告されており、*Phf24*の発現低下がNERのてんかん発生に関係している可能性が報告されている。*Phf24*は末梢のGABA_Bシグナルの重要な調節因子であることが知られているが、その詳細な機能については不明な点が多い。本研究では、NERのてんかん発生を明らかにすることを目的とし、NERの病理組織学的解析を実施した。NERの候補原因遺伝子である*Phf24*の正常動物における蛋白発現を検討し、*Phf24*の特徴を踏まえた病理組織学的解析をNERにおいて行った。

第1章 NERの病理組織学的特徴

第1節 NERの脳の組織学的特徴

HE 染色により、NER の大脳皮質、海馬ならびに扁桃体を評価した結果、大脳皮質において、小型の錐体細胞が見られた。その他の領域には、明らかな組織学的異常は見られなかった。

第 2 節 NER の脳における各種免疫組織化学

NER の脳において Iba-1 (ミクログリア)、OLIG-2 (オリゴデンドロサイト) および GFAP (アストロサイト) に対する免疫組織化学を実施した結果、NER において変化は見られなかった。また、増殖活性マーカーである Ki67、未熟な神経細胞マーカーである Tbr2、Nestin および DCX に対する免疫組織化学を行った結果、NER において変化はなかった。てんかん患者ならびにてんかんモデルラットでは海馬における苔状線維の異常発芽が生じることが知られているため、苔状線維マーカーである mZnT3 に対する免疫組織化学を行ったが、NER において変化はなかった。

第 3 節 NER の海馬における Timm 染色

苔状線維の異常発芽のさらなる評価を目的として、苔状線維が染色される Timm 染色を行ったが、NER の海馬 CA3 領域および歯状回において異常な線維は見られなかった。

以上より、NER は大脳皮質の小型の錐体細胞を除き、明らかな形態学的異常を示さなかった。また、NER においててんかん発作による 2 次的な神経新生が顕著でなく、てんかん患者や他のてんかんモデルラットで知られている海馬における苔状線維の異常発芽や異所性の顆粒細胞も見られなかった。これらの結果は、NER の重要な病理組織学的な特徴であると考えられた。

第 2 章 正常ラットの中枢神経における PHF24 発現

第 1 節 正常ラットおよび NER の中枢神経における PHF24 発現

NER は *Phf24* の第 2 イントロンに内在性レトロウイルス配列の挿入が認められている。*Phf24* の正常ラットの中枢神経における発現分布は知られていないため、NER の野生型ラットの中枢神経を対象に PHF24 に対する免疫組織化学を実施した。加えて、NER の同部位に対する PHF24 の免疫組織化学により配列挿入による蛋白発現への影響を評価した。PHF24 に対する免疫組織化学を野生型ラットの中枢神経において実施した結果、嗅球、大脳皮質、延髄および脊髄等において発現が見られた。大脳皮質においては、神経網におけるびまん性の発現と特定の神経細胞の細胞質における発現が見られた。嗅球では傍糸球体細胞で発現が見られ、脊髄においては背角の第 II 層に局限した発現が見られた。ホモ型 NER においてはこれらの発現は見られなかった。

第 2 節 大脳皮質における PHF24 の発現

大脳皮質で認められたびまん性の PHF24 発現の詳細を検討するために、シナプス前終末マーカーである synaptophysin との二重免疫組織化学を実施した。PHF24 ならびに Synaptophysin は顆粒状の陽性像を示し、一部で共発現が見られたが、共発現しない領域が多く見られた。

第 3 節 嗅球および脊髄における PHF24 陽性細胞

嗅球ならびに脊髄における PHF24 陽性神経の性質を明らかにするために、各種神経細胞マーカーと PHF24 の二重蛍光免疫組織化学を行った。脊髄および嗅球において、PHF24 は抑制性介在神経マーカーである calbindin および calretinin との共発現を示した。一方で、PHF24 またはこれらの抑制性神経細胞マーカーのどちらかのみを発現する細胞も見られた。嗅球では PHF24 は dopamine 作動性神経マーカーである tyrosine hydroxylase (TH) とほとんど共発現しなかった。

第 4 節 PHF24 の免疫電顕

PHF24 に対する免疫電顕の結果、嗅球ならびに脊髄の神経網において、シナプス前および後終末における PHF24 発現が確認された。特に嗅球においては、傍糸球体細胞の細胞質における発現

が見られ、特定の細胞小器官における局在は見られなかった。

第5節 嗅球および脊髄における抑制性介在神経数

PHF24 は抑制性の介在神経に発現している可能性が明らかとなったため、NER、*Phf24*-null ラットならびに対照群の中枢神経における抑制性介在神経の数を評価した。NER および *Phf24*-null ラットにおいて、嗅球における calbindin 陽性細胞数が増加する傾向が見られた。

以上より、NER の候補原因遺伝子産物である PHF24 蛋白質は正常動物において、嗅球、大脳皮質、脊髄を始めとする複数の領域において発現する一方で、ホモ型 NER では発現が見られないことが明らかとなった。PHF24 の発現パターンは、シナプス終末における発現を反映すると考えられる神経網のびまん性の発現と神経細胞の細胞質における発現に大別された。特に、嗅球ならびに脊髄において、PHF24 は抑制性の介在神経に発現していることが明らかとなった。

第3章 *Phf24* に着目した NER の病理組織学的な検討

第1節 NER の大脳皮質における神経数

第1章において、NER の大脳皮質では、小型の錐体細胞が見られたため、大脳皮質の神経数を詳細に検討した。大脳皮質における Neu-N 陽性細胞をカウントした結果、NER において神経数が有意に減少していた。特に細胞面積が 80-140 μm^2 の神経細胞が減少しており、これらの細胞は大脳皮質 II/III から IV 層において主に存在していた。また、calbindin 陽性細胞数が NER において有意に増加していた。calbindin の発現は、介在神経および錐体細胞の細胞質に見られた。

第2節 NER の中枢神経におけるシナプスマーカー発現

第2章において、*Phf24* の蛋白発現はシナプス終末に見られたことから、NER の中枢神経におけるシナプスマーカーの発現量を検討した。シナプス後終末マーカーである PSD-95 の陽性像は神経網におけるびまん性の発現と、神経細胞の細胞質内の顆粒状の強い発現に大別された。PSD-95 の染色強度は、NER の大脳皮質および扁桃体において減少傾向を示した。また、細胞質内の顆粒状の発現の発現強度に着目したところ、同様に NER において減少傾向が見られた。

第3節 NER の中枢神経における perineuronal nets

第2節より、NER ではシナプス数の減少が示唆された。従って、シナプスの可塑性や恒常性維持に重要な perineuronal nets に着目し検討を行った。中枢神経における perineuronal nets マーカーである Wisteria floribunda Agglutinin (WFA)を用いてレクチン染色を行った。NER の大脳皮質、海馬 CA3 領域および扁桃体において WFA に染色される perineuronal nets の減少が見られた。

第4節 NER の錐体神経の Golgi 染色

最後に NER の大脳皮質の錐体細胞の詳細な形態を Golgi 染色によって観察した。NER の大脳皮質第 V 層において、しばしば樹状突起上のシナプス後終末を形成する棘状の構造であるスパインが乏しい錐体細胞が観察された。

以上より、NER では大脳皮質において神経細胞数が減少していることに加え、中枢神経においてシナプス数ならびに perineuronal nets が減少していることが示唆された。perineuronal nets の減少はシナプスの恒常性を破綻させることでてんかんを引き起こすことが、薬剤誘導性のもてんかんモデル動物ならびにヒトで知られているため、NER におけるてんかん発生に同様のメカニズムが関与している可能性が示唆された。また、これまでに遺伝性てんかんモデル動物において、perineuronal nets の異常が報告されたことはなく、本研究が初めての報告となる。

総括

本研究では、自然発症性の遺伝性てんかんモデルラットである NER のてんかん発生メカニズムを明らかとするため、詳細な病理組織学的解析と、特に候補原因遺伝子である *Phf24* の特徴に着目した解析を実施し、以下の結果を得た。

PHF24

- PHF24 は中枢神経に広くに発現し、神経細胞質ならびに神経網においてびまん性に発現が見られた。一方でホモ型 NER ではこれらの発現が見られなかった。神経網の PHF24 の発現はシナプス終末に一致していた。さらに PHF24 は嗅球の傍糸球体細胞層、脊髄の背角第 II 層の抑制性介在神経に発現が見られた。

NER

- 苔状線維の異常発芽や異所性の顆粒細胞を認めず、大脳皮質で小型の錐体細胞が見られた。
- 大脳皮質第 II/III から IV 層にかけて、神経細胞数が減少し、calbindin 陽性細胞は増加した。
- 大脳皮質および扁桃体でシナプス終末マーカーである PSD-95 の発現が減少傾向にあった。
- 海馬 CA3 領域、扁桃体および大脳皮質で WFA により染色される perineuronal net が減少した。
- 大脳皮質の第 V 層において、スパインが少ない錐体細胞が観察された。

審査結果の要旨

てんかんは、再発する自発的発作を特徴とする神経疾患および症候群であり、患者の約半数が遺伝的素因を有している。遺伝性てんかんおよび先天性焦点性てんかんの多くは、複数の遺伝要因と環境要因に起因することが明らかになっている。Noda epileptic rat (NER) は、自然発症性のてんかん発作を特徴とする遺伝性モデルラットである。NER のてんかん発生に複数の遺伝子要因が示唆されているが、中でも PHD finger protein 24 (*Phf24*) 遺伝子の異常が NER のてんかん発生に関与している可能性が報告されている。本研究では、NER のてんかん発生を明らかにすることを目的とし、NER の詳細な病理組織学的解析を行い、*Phf24* の正常動物における蛋白発現を検討し、*Phf24* の特徴を踏まえた病態メカニズムの解析を行っている。

第 1 章では、NER を病理組織学的に詳細に解析し、NER の大脳皮質において小型の錐体細胞が見られることを明らかにした。続いて NER の脳における Iba-1 (ミクログリア)、OLIG-2 (オリゴデンドロサイト) および GFAP (アストロサイト) に対する免疫組織化学的解析を実施したが、NER において変化は確認されなかった。また、増殖活性マーカー Ki67、未熟な神経細胞マーカー Tbr2、Nestin および DCX に対する免疫組織化学的解析を行ったが、NER において変化はなかった。海馬における苔状線維の異常発芽を調べる目的で、苔状線維マーカーである mZnT3 に対する免疫組織化学および Timm 染色を行ったが、NER の海馬 CA3 領域および歯状回において異常な線維は見られなかった。以上より、てんかんにおいて報告されている明瞭な形態学的異常は NER には認められなかったが、大脳皮質の小型の錐体細胞の出現が NER の重要な病理組織学的な特徴であると考えられた。

第2章では、正常ラットの中樞神経における PHF24 発現を検討している。PHF24 は嗅球、大脳皮質、延髄および脊髄等において発現が見られた。大脳皮質においては、神経網におけるびまん性の発現と特定の神経細胞の細胞質における発現が見られた。嗅球では傍系球体細胞で発現が見られ、脊髄においては背角の第 II 層に局限した発現が見られた。ホモ型 NER においてはこれらの発現は見られなかった。大脳皮質で認められたびまん性の PHF24 発現の詳細を検討するために、シナプス前終末マーカーである *synaptophysin* との二重免疫組織化学的解析を実施したところ、PHF24 ならびに *synaptophysin* は顆粒状の陽性像を示し、一部で共発現が見られたが、共発現しない領域が多く見られた。脊髄および嗅球において、PHF24 は抑制性介在神経マーカーである *calbindin* および *calretinin* との共発現を示した。一方で、PHF24 またはこれらの抑制性神経細胞マーカーのどちらかのみを発現する細胞も見られた。嗅球では PHF24 は *dopamine* 作動性神経マーカーである *tyrosine hydroxylase* とほとんど共発現しなかった。さらに PHF24 に対する免疫電顕解析の結果、嗅球ならびに脊髄の神経網において、シナプス前および後終末における PHF24 発現が示された。特に、嗅球ならびに脊髄において、PHF24 は抑制性の介在神経に発現していることが明らかとなった。

第3章では、*Phf24* に着目した NER の病理組織学的な検討を行っている。大脳皮質における Neu-N 陽性細胞をカウントした結果、NER において神経数が有意に減少していた。特に細胞面積が 80-140 μm^2 の神経細胞が減少しており、これらの細胞は大脳皮質 II/III から IV 層において主に存在していた。また、*calbindin* 陽性細胞数が NER において有意に増加していた。*Calbindin* の発現は、介在神経および錐体細胞の細胞質に見られた。シナプス後終末マーカーである PSD-95 の染色強度は、NER の大脳皮質および扁桃体において減少傾向を示した。シナプスの可塑性や恒常性維持に重要な *perineuronal nets* に着目し検討した。中枢神経における *perineuronal nets* マーカーである *Wisteria floribunda agglutinin* (WFA) を用いてレクチン染色を行った。NER の大脳皮質、海馬 CA3 領域および扁桃体において WFA に染色される *perineuronal nets* の減少が見られた。

Golgi 染色によって観察したところ、NER の大脳皮質第 V 層において、しばしば樹状突起上のシナプス後終末を形成する棘状の構造であるスパインが乏しい錐体細胞が観察された。

以上より、NER では大脳皮質において神経細胞数が減少していることに加え、中枢神経においてシナプス数ならびに *perineuronal nets* が減少していることが示唆された。*perineuronal nets* の減少はシナプスの恒常性を破綻させることでてんかんを引き起こすことが、薬剤誘導性てんかんモデル動物ならびにヒトで知られており、NER のてんかん発生に同様のメカニズムが関与している可能性が示唆された。これまでに遺伝性てんかんモデル動物において、*perineuronal nets* の異常が報告されたことはなく、本研究が初めての報告となる。

本研究は新たなてんかんモデルラットから同定された有力な候補遺伝子である *Phf24* を解析することによって、*Phf24* の生物学的機能の一端を明らかにした。今回得られた成果は、てんかんのメカニズム解明のための基礎獣医学ならびに基礎医学の発展・展開に貢献するものと考えられる。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。