実験的てんかんモデルにおける細胞性癌遺伝子 c-fos の発現に関する研究

新潟大学脳研究所神経内科学部門（主任：宮武　正教授）
中島　孝

The Expression of Proto-oncogene c-fos following Various Seizures in Mouse Brain

Takashi NAKAJIMA

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University, Japan
(Director: Professor Tadashi MIYATAKE)

Since c-fos is a transcriptional factor gene that is induced by various stimulations including dbc-AMP, Ca-influx, and phorbolester, it is thought to be a useful marker of neuronal activity in the nervous system. In the present study the anatomical distributions of c-fos mRNA expression were examined following various seizures including electroconvulsive shock, caffeine-induced seizures, kainate-induced seizures, and lidocaine-induced seizures. The distribution of c-fos mRNA expression was different between those seizures and was dependent on seizure induced mechanisms. Neuronal cell death following systemic kainate injection occurs in the discreet brain areas within the distributions where c-fos mRNA was induced following the treatment. However, dentate granule cells where c-fos mRNA was markedly observed are relatively strong. It will be of particular interest to analyze plastic change of neuronal cell in specific brain structures following those seizures at molecular levels.

Key words: c-fos, seizures, electorconvulsve shock, caffeine, lidocaine, kainate
c-fos, けいれん, 電撃けいれんショック, カフェイン, リドカイン, カイニン酸)

はじめに

神経細胞は成熟すると正常状態では分化も増殖もしないが，個体に作用した刺激や個体内部の情報は各種の細胞外シグナル伝達系を介し細胞レベルの刺激に変換され，受容体への作用を介して細胞内シグナル伝達系を活性化し，最終的に神経細胞内での物質合成の変容を引き起こしていると考えられている．この物質合成の変容は，遺伝子の転写制御という形と，スプライシングなどの転写後修飾または燐酸化などの翻訳後修飾という形でおもに

Reprint request to: Takashi NAKAJIMA, Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University, 1-Asahimachi-dori, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町757
新潟大学脳研究所神経内科学部門
中島　孝

行われている．

臨床的なてんかん，実験的な動物けいれんモデルにおいては発作により脳内の広い範囲で神経細胞の活動性が亢進すると考えられているが，そのような神経活動は脳内の物質合成をどの様に変容しているのだろうか．今回の研究では受容体を介した細胞内シグナル伝達系の活性化がどの様に遺伝子の転写調節をしているかについててんかんモデルを対象として調べる．

レトロウイルスの FBJ および FBR murine sarcoma virus には癌遺伝子である v-fos が存在するが[1]，細胞性癌遺伝子 c-fos（cellular fos）とはこの相同体で正常の染色体 DNA に存在するものである．この c-fos の成熟細胞での基礎発現値は非常に低い事が知られている．培養細胞系では nerve growth factor（神経成長因子）[2]，fibroblast growth factor，（繊維芽細胞成長因子）などの成長因子，ニコチン[3]，グルタミン酸[4]などの神経伝達物質などの刺激は細胞応答として細胞内に c-fos を発現させることがわかっている．細胞内シグナル伝達系のセカンドメッセンジャーレベルの知見としては c-AMP の安定同族体である dbc-AMP[5]，C－キナーゼを活性化し腫瘍増殖因子としても知られる phorbolester[5]，Ca イオンの細胞内流入[6]などはそれぞれ独立して c-fos を発現させることがしられている．これらのことから A-キナーゼ（cAMP 依存性キナーゼ），C-キナーゼ，および Ca を介する細胞内シグナル伝達系の活性化はすべて c-fos を発現させると考えられる（図 1）．このため c-fos mRNA の細胞レベルでの発現は細胞内シグナル伝達系の活動のよい指標といえる．それ以上分化増殖しない神経細胞においては細胞内シグナル伝達系に直接対応した神経活動の指標として使えると考えられる．この c-fos mRNA の発現メカニズムの分子遺伝学的機構は c-fos 遺伝子のプロモター領域の研究により明らかにされてきている．c-fos 遺伝子のプロモター領域には特徴的な塩基配列が認められており SRE（serum response element）[7]，CRE（c-AMP response element）[8][9] と呼ばれている（図 1）．現在までのところ，C-キナーゼの活性化は serum response factor（SRF）の活性化を引き起こし SRE を介して，c-fos mRNA の発現を調節している[7]と考えられている．また c-AMP による A- キナーゼの活性化や Ca イオンは cyclic AMP response element 結合蛋白（CREB）の燐酸化を経て CRE を活性化し c-fos mRNA

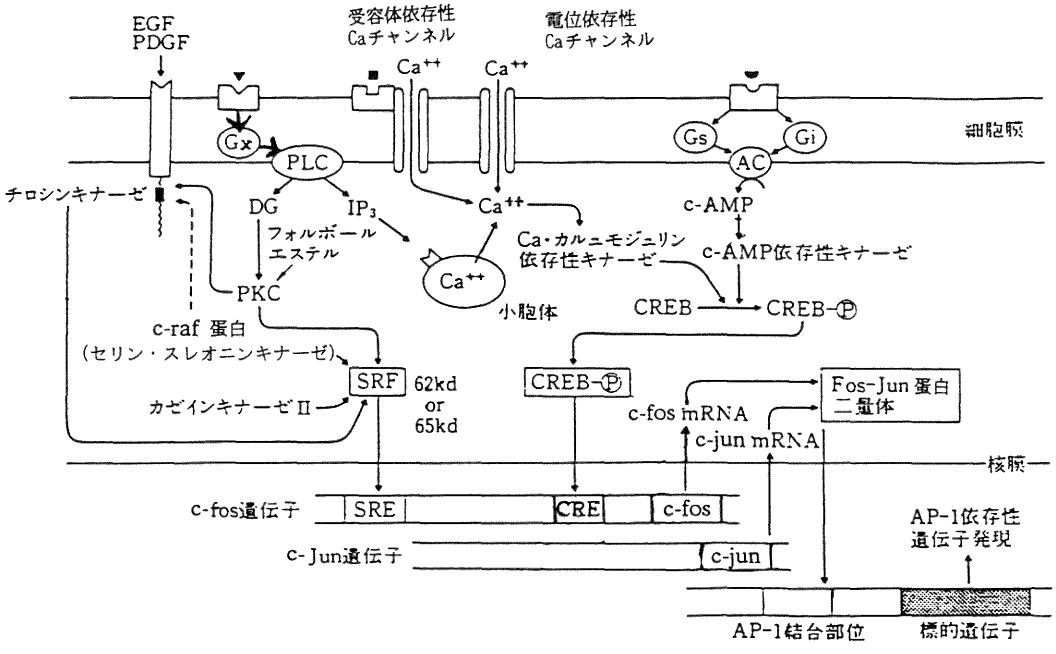


図 1　神経細胞における細胞内シグナル伝達系と遺伝子発現

Gx, Gs, Gi: GTP 結合蛋白，PLC: フォスフォリパーゼ C，AC: アデニル酸シクラーゼ，PKC: C-キナーゼ，SRF, SRE, CREB, CRE: 本文参照．

の転写制御を行っている[8)9)]．また，c-fos と別の細胞性癌遺伝子である c-jun はそれぞれ蛋白産物としてロイシンジッパー構造を持つ Fos-Jun 複合体を形成し，これが転写因子として遺伝子 DNA 上にある AP-1 結合部位（TPA response element または TRE）に結合する．その結果 AP-1 結合部位を持つ標的遺伝子の転写が促進する．AP-1 結合を持つ遺伝子としてはプロエンケファリン，アミロイド前駆蛋白，エンドセリン，メタロチオネインなどの興味深い蛋白が多く含まれている．

いままで述べてきたように，神経細胞においては c-fos mRNA は細胞内シグナル伝達系の活動に対応した指標と考えられ，AP-1 結合部位依存性の遺伝子発現がはじまり，それらの蛋白合成の活動性を示していると考えられる．

ここでは各種けいれんモデルで脳内でどの様に c-fos が発現しているかそれぞれのモデルを比較しながらまとめてみる．具体的にはけいれんモデルとして電撃けいれんショック，カフェインによるけいれん，リドカインによるけいれん，カイニン酸によるけいれんモデルを利用し，脳内の c-fos mRNA の発現をノーザンブロットと in situ ハイブリイゼーションにより調べ，神経細胞の可塑性および変性についても考察する．

材料および方法

動物モデル

雄の Swiss マウス（20～25g）を使用した．

電撃けいれんショックは ear clip 電極を使用し，6 mA，1秒にて作成し（n＝3，また ear clip 電極を使用するが電流を流さない sham コントロールも作成した（n＝3）．

カフェインによるけいれんは腹腔内にけいれん閾値を越える量（178mg/kg）のカフェインを投与して作成し（n＝6）同時に生理食塩水のみを腹腔内に注射した sham コントロールも作成した（n＝6）．また，用量反応実験として 10，32，56，100mg/kg カフェインの投与群も作成した（各々n＝3）．

リドカインによるけいれんはけいれん閾値を越える量（100mg/kg）を腹腔内に投与する事で作成した（n＝4）．また，用量反応実験として 10，32，56mg/kg のリドカイン投与群も作成した（各々n＝4）．

カイニン酸によるけいれんは 60mg/kg を腹腔内に注射し作成した（n＝3）．

これらの投与後またはけいれん後15分で断頭し，脳を取り出しイソペンテン中で－45℃にて凍結したその後，－70℃にて保存した．

時間反応実験のために 15，30，60，120，240分後に断頭する群（各々n＝3）を電撃けいれんショックおよび sham コントロール群の両者について作成した．これらの脳は液体窒素にて凍結し－70℃にて保存した．

また，カフェイン及びリドカインの用量反応実験用の脳は液体窒素にて凍結した後，－70℃にて保存した．

方　法

in situ ハイブリダイゼーション法：Harpper & Marselle らの方法を一部変更して施行した[10)]．凍結した脳を 15 μm coronally or sagittally cut cryostat section を4％ paraformaldehyde で（2分間）固定した後，acetylation，glycination を施行した．ハイブリダーゼーションはランダムプライマー法を利用し ^{35}S でラベルした Hind III-BamH I mouse c-fos DNA fragment（Specific activity：$5X10^5$ dpm/ng）を50％ formamide，10％ dextransulfate，3XSSC の条件で42℃で一昼夜行った．50％ formamide，2XSSC，42℃で洗ったのち48時間 X-OMAT film に感光した．

ノーザンブロット分析：total RNA はグアニジウム－塩化セシウム法[11)]で抽質し各レーン 15μg または 20 μg の RNA をフォルムアルデヒドーアガロース電気泳動した．ニトロセルロース膜にノーザントランスファーを行った．C-fos DNA probe は in situ ハイブリダイゼーションで使用したものと同じ fragment をランダムプライマー法で ^{32}P でラベルした（specific activity：$5X10^5$ dpm/ng）．ハイブリダイゼーションは50％フォルムアミドの存在下で 5XSSC，42℃にて行った．洗浄の条件は最終的には 0.1XSSC，50℃にて行った．12時間 X-OMAT film に感光した．film は LKB Ultro Scan にてデンシトメトリーを行った後，serial dilution standard との比較で c-fos mRNA の相対量を定量した．

結　　果

電撃けいれんモデル

untreated コントロールでの c-fos mRNA の発現はほとんど認められなかった．earclip による痛み刺激では c-fos mRNA の発現値は刺激後約15分で基礎値の2から3倍の値にまで上昇することがわかった（**図 2-A，B**）．またこのレベルは時間とともに減少し4時間後には基礎値に戻るパターンを示した．この c-fos mRNA の脳内の分布は in situ ハイブリダイゼーションによ

り歯状回顆粒細胞，海馬錐体細胞，梨状皮質，小脳顆粒細胞などに認められた（**図 3**）．

電撃けいれんショックではけいれん後に c-fos mRNA は15分以内に最高値に達した．このレベルは基礎値の約8倍であり，時間とともに減少し4時間後には基礎値まで戻るパターンを示した（**図 2-A, B**）．その脳内分布は in situ ハイブリダイゼーションにより外側中隔，梨状皮質，海馬錐体細胞（CA1 中心），歯状回顆粒細胞，扁桃体，嗅内野，腹内側視床下部，内側膝状体，下丘，一次視覚野を中心とする大脳皮質，小脳顆粒層などに c-fos mRNA の強い発現を認めた（**図 3**）．

カフェインモデル

カフェインのマウスへの腹腔内注射により c-fos mRNA の発現を調べた．けいれん閾値を越える量（178mg/kg）で c-fos mRNA の量は最高を示すがけいれん閾値以下の投与量で用量依存性の発現を示し 100mg/kg では基礎値の4倍を示した（**図 4-A**）．in situ ハイブリダイゼーションではカフェインによるけいれん後，線条体，側座核，及び嗅結節に強い c-fos mRNA の発現を認めた（**図4-B**）．また，腹腔内注射刺激などの弱い痛み刺激でも前述の ear clip による痛み刺激と同様の脳内分布で c-fos mRNA の軽度の発現を認めた（**図 4-B**）．

リドカインモデル

けいれん閾値を越える56，および 100mg/kg のリドカイン投与により c-fos mRNA が強く発現し基礎値の約4倍を示した（**図 5-A**）．閾値以下のリドカイン投与では用量依存性の c-fos mRNA 発現は有意に認められなかった．リドカインによるけいれんによる c-fos mRNA の分布は線条体，側座核，嗅結節，外側中隔，梨状皮質，海馬錐体細胞（CA1 中心），歯状回顆粒細胞，扁桃体，嗅内野，大脳皮質に強く認められた．小脳の c-fos mRNA のレベルは変化しなかった（**図 5-B**）．

カイニン酸モデル

カイニン酸によるけいれんでは外側中隔，梨状皮質，扁桃体，海馬錐体細胞（CA1，CA3，CA4），視床下部，嗅内野，大脳皮質に強く c-fos mRNA が発現した．小脳の c-fos mRNA のレベルは変化しなかった（**図 6**）．

考　　察

ear clip や腹腔内注射刺激などの軽度の痛み刺激が生体に加わった際の反応として情動に関係する大脳辺縁系を中心として刺激直後より c-fos mRNA が発現する事が明らかにされた．これはストレスにより引き起こされた遺伝子発現の変化として興味深い．ストレスと小脳顆粒層との関係は今のところよくわかっていない．脊髄では Hunt らの研究[12]により，痛み刺激が同側の脊髄後角の神経細胞の一部に c-fos を発現させることが以前報告されている．また，Sagar ら[13]によりマウスの絶水ストレス下では ADH を産生する視床下部の室旁角にのみ c-fos が発現する事が報告されている．

電撃けいれんショックは，薬剤を使わず全身けいれんを引き起こすことができる．この刺激において c-fos mRNA は大脳辺縁系を中心に発現するといえるが，痛み刺激の時と比較し，分布はより広く発現量は強かった．またこの他に満腹中枢である腹内側視床下部の神経細胞や内側膝状体や下丘といった知覚に関連した神経核の神経細胞も活性化されていた．カフェインは少量投与では認知増強因子（Cognitive enhancer）などの中枢神経刺激作用をもつが，大量投与では全身けいれん誘発作用を持っている[14]．c-fos mRNA はカフェインによるけいれん後，線状体を中心とする神経細胞にのみ発現した．電撃けいれんショックによる全身けいれんの際に c-fos mRNA が大量に発現した海馬歯状核顆粒細胞などの大脳辺縁系にまったく発現されなかった．カフェインによるけいれんも電撃けいれんショックも強直間代性の全身けいれんを呈するが病態が異なることが示唆された．リドカインは局所麻痺作用の他に大量の全身投与にて全身けいれんを引き起こすが[15]マウスにおいては c-fos mRNA の分布は電撃けいれん後の c-fos mRNA の分布の両者を合わせたものに類似していた．しかし，下丘，内側膝状体，小脳などには c-fos mRNA は発現しなかった．またカフェインの場合と異なって c-fos mRNA の発現には明らかな用量依存関係を示さなかった．カイニン酸によるけいれんでは脳内の特定の部位に神経細胞死が起きることがしられているが，その神経細胞変性部位は c-fos mRNA の発現部位にほぼ類似していた[16]．しかし，歯状回顆粒細胞などは c-fos mRNA が発現するが変性はおきにくく，かならずしも c-fos mRNA 発現は神経細胞死に一対一に対応していないと考えられた．海馬においては電撃けいれんショックやリドカインによるけいれんでの c-fos mRNA の分布とは多少の差があり，CA3，CA4 での c-fos mRNA の発現がカイニン酸によるけいれんではより強いといえる．CA3，CA4 にはカイニン酸受容体密度が高いと報告されている事[17]に対応すると考えられる．

これらの実験で，各種けいれん刺激では脳内に c-fos mRNA が発現する事が分かったが，その脳内分布は誘

発の仕方によって異なっていた．行動上類似した全身けいれんであっても，細胞内シグナルトランスダクション系の活動を c-fos mRNA の発現により調べてみると，その分布は異なっている事が明らかになった．けいれんの後に，c-fos mRNA が発現した特定の部位の神経細胞群に AP-1 依存性の遺伝子発現がおき，蛋白合成が変化していると考えられるが，今後，神経系の可塑性について考察していく上でも今回の報告で用いた c-fos mRNA の発現についての研究は重要であると思われる．

謝　辞

研究を指導していただいた米国 N.I.H. Robert Post 博士，Paul Marangos 博士，及び新潟大学神経内科 宮武 正教授に深謝いたします．

参 考 文 献

1) **中島 孝**: 神経系における細胞性癌遺伝子 c-fos の発現．医学のあゆみ，**51**: 321～324，1989．

2) **T. Curran and J.I. Morgan**: Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines, Science, **229**: 1265～1268，1985．

3) **M.E. Greenberg, E.B. Ziff and L.A.Greene**: Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription, Science, **234**: 80～83，1986．

4) **A.M. Szekely, M.L. Barbaccia and E. Costa**: Activation of specifric glutamate receptor subtype increases c-fos prot-oncogene expression in primary cultures of neonatal rat cerebellar granule cells, Neuropharmacol, **26**: 1779～1872，1987．

5) **R. Bravo, M. Neuberg, J. Burkhardt, J. Almendral, R. Wallich and R. Muller**: Involvement of common and cell type-specific pathways in c-fos gene control: stable induction by cAMP in macrophages, Cell, **48**: 251～260，1987．

6) **J.I. Morgan and T. Curran**: Role of ion flux in the control of c-fos expression, Nature, **322**: 552～555，1986．

7) **C. Norman, M. Ruswick, R. Pollock and R. Treisman**: Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element, Cell, **55**: 989～1003，1988．

8) **G. Gonzales and M.R. Montiminy**: Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133, Cell, **59**: 675～680，1989．

9) **M. Sheng, G. Mcfadden and M.E. Greenberg**: Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB, Neuron, **4**: 571～582，1990．

10) **M.E. Harper and L.M. Marselle**: RNA detection and localization in cells and tissue sections by in situ hybridization of 35S-labeled RNA probes, Methods Enzymol, **5**: 539～551，1987．

11) **J.M. Chirgwin, A.E. Przybyla, P.J. MacDonald and W.J. Rutter**: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, Biochemistry 18: 5294～5299，1979．

12) **S.P. Hunt, A. Pini and G. Evan**: Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, Nature, **328**: 632～634，1987．

13) **S.M. Sager, F.R. Sharp and T. Curran**: Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level, Science, **240**: 1328～1331，1988．

14) **P.J. Marangos, A.M. Martino, S.M. Paul and P. Skolnick**: The benzodiazepines and inosine antagonize caffeine-induced seizures, Psychopharmacology, **72**: 269～273，1981．

15) **R.M. Post, C. Kennedy, K. Shinohara, M. Squillace, M. Miyaoka, S. Suda, D.H. Ingvar and L. Sokoloff**: Motabolic and behavioral consequences of lidocaine-kindled seizures, Brain Res, **324**: 295～303，1984．

16) **Y. Ben-Ari**: Limbic seizures and brain damage produced by kainic acid: mechanism and relevance to human temporal lobe epilepsy, Neurosci., **14**: 375～403，1985．

17) **J.E. Schwob, T. Fuller, J.L. Price and J.W. Olney**: Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study, Neurosci, **5**: 991～1004，1980．

（平成3年3月1日受付）

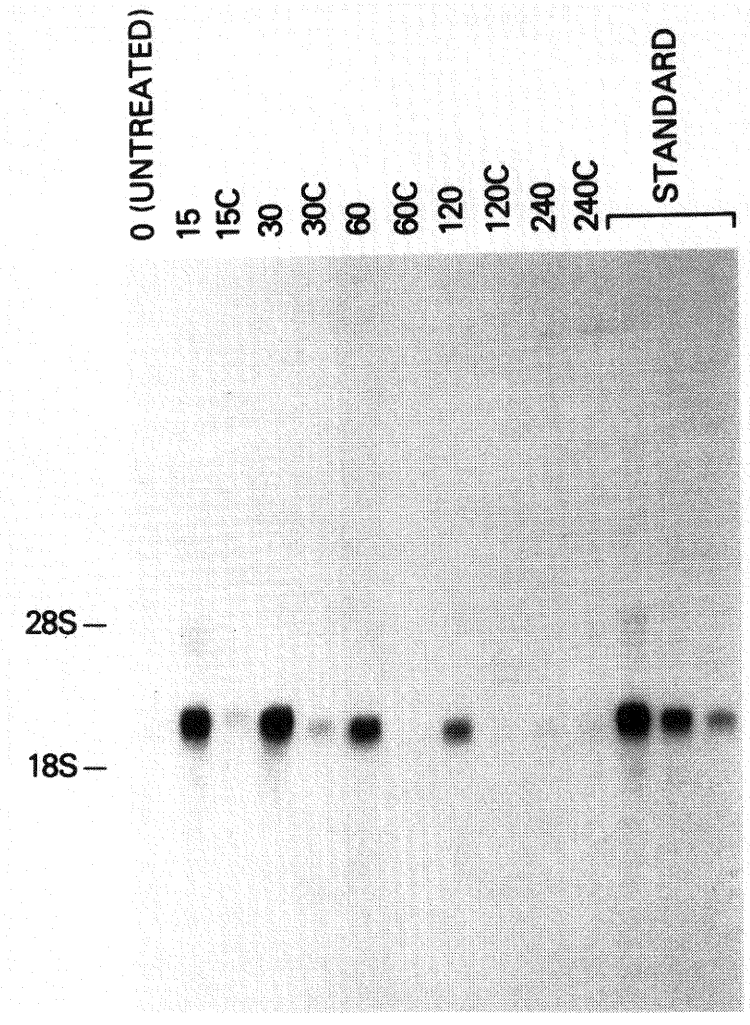


図 2–A マウス脳の c–fos mRNA のノーザンブロット，電撃けいれんショック後 15, 30, 60, 120, 240 分後の c–fos mRNA の発現と，耳朶電極のみを装着した後，15, 30, 60, 120, 240 分後（C）の c–fos mRNA の発現を示す．

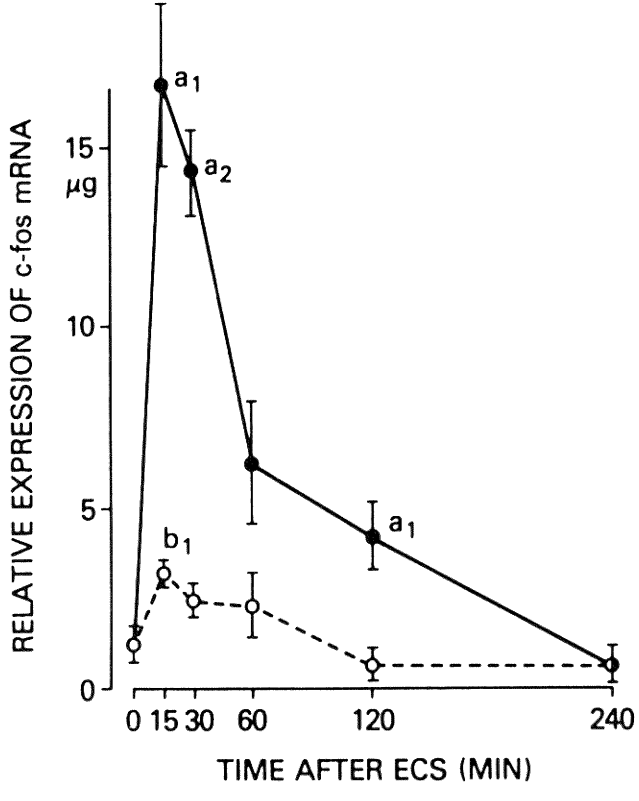


図 2–B 2A のデンシトメトリーによる c–fos mRNA の定量

実線は電撃けいれん群を破線は耳朶電極装着群を示す（n＝3, Mean±SEM）.

中島論文付図（Ⅱ）

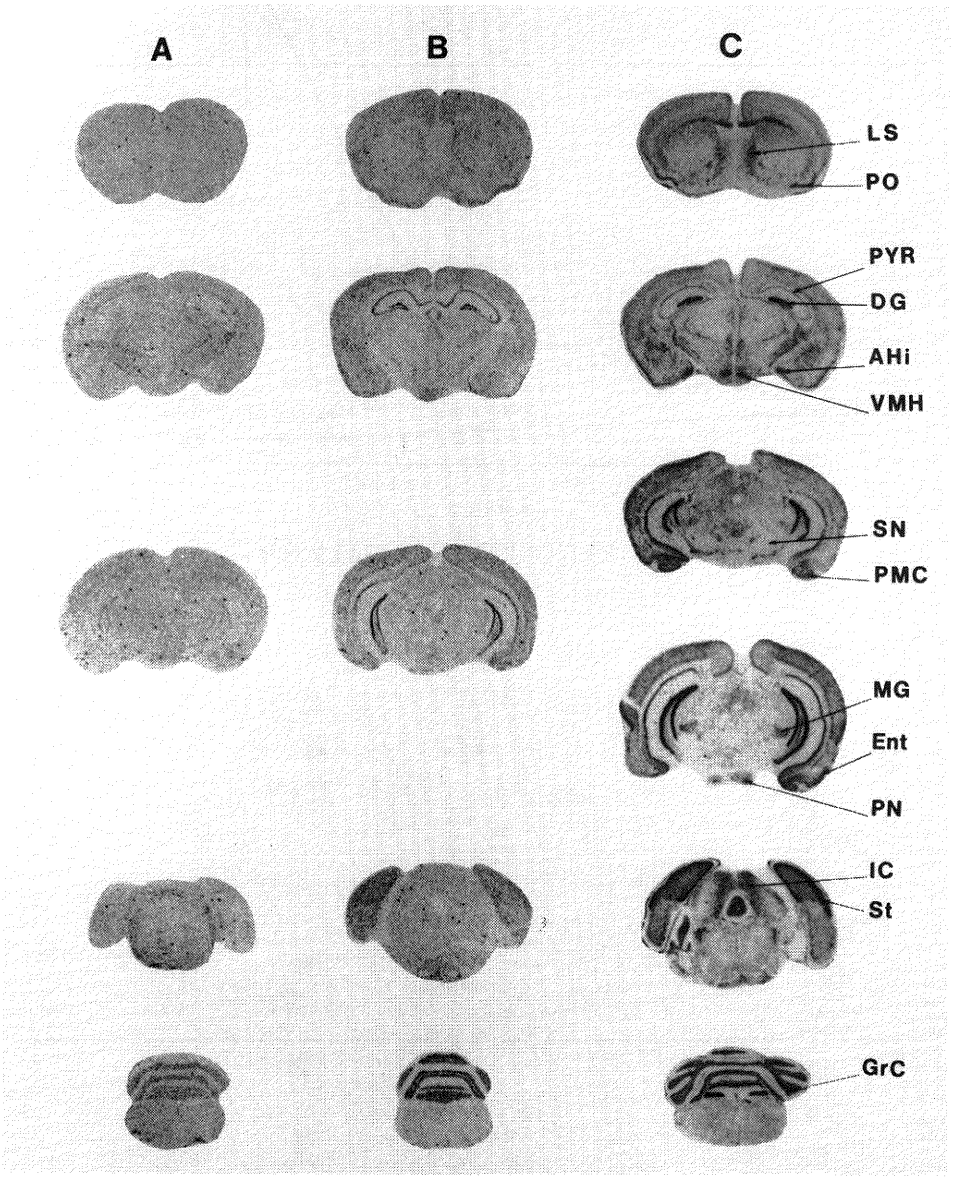


図 3　C-fos mRNA の in situ ハイブリダイゼーションオートラジオグラフィ（マウス脳の冠状断）

A：無治療コントロール，　B：耳朶電極装着後15分後

C：電撃けいれんショック15分後

略語：PO：梨状皮質，　PYR：海馬錐体細胞，　DG：歯状回顆粒細胞，　VMH：内腹側視床下部，　PMC：扁桃体後内側皮質核，　MG：内側膝状体，　IC：下丘，　GrC：小脳顆粒層．

中島論文付図（Ⅲ）

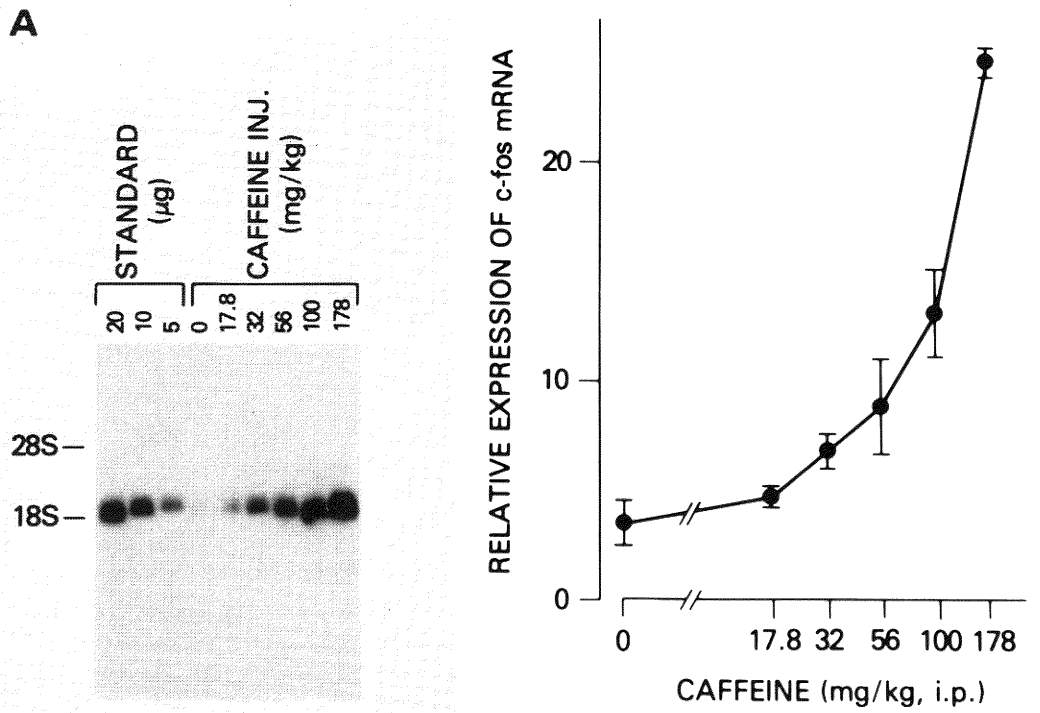


図 4−A　カフェイン投与による c−fos mRNA の発現（用量反応曲線）
カフェイン（17.8, 32, 56, 100, 178 mg/kg, i.p.）及び生食注射後15分後のノーザンブロット（左），その定量（右）．（n＝3，Mean±SEM）．

中島論文付図（Ⅳ）

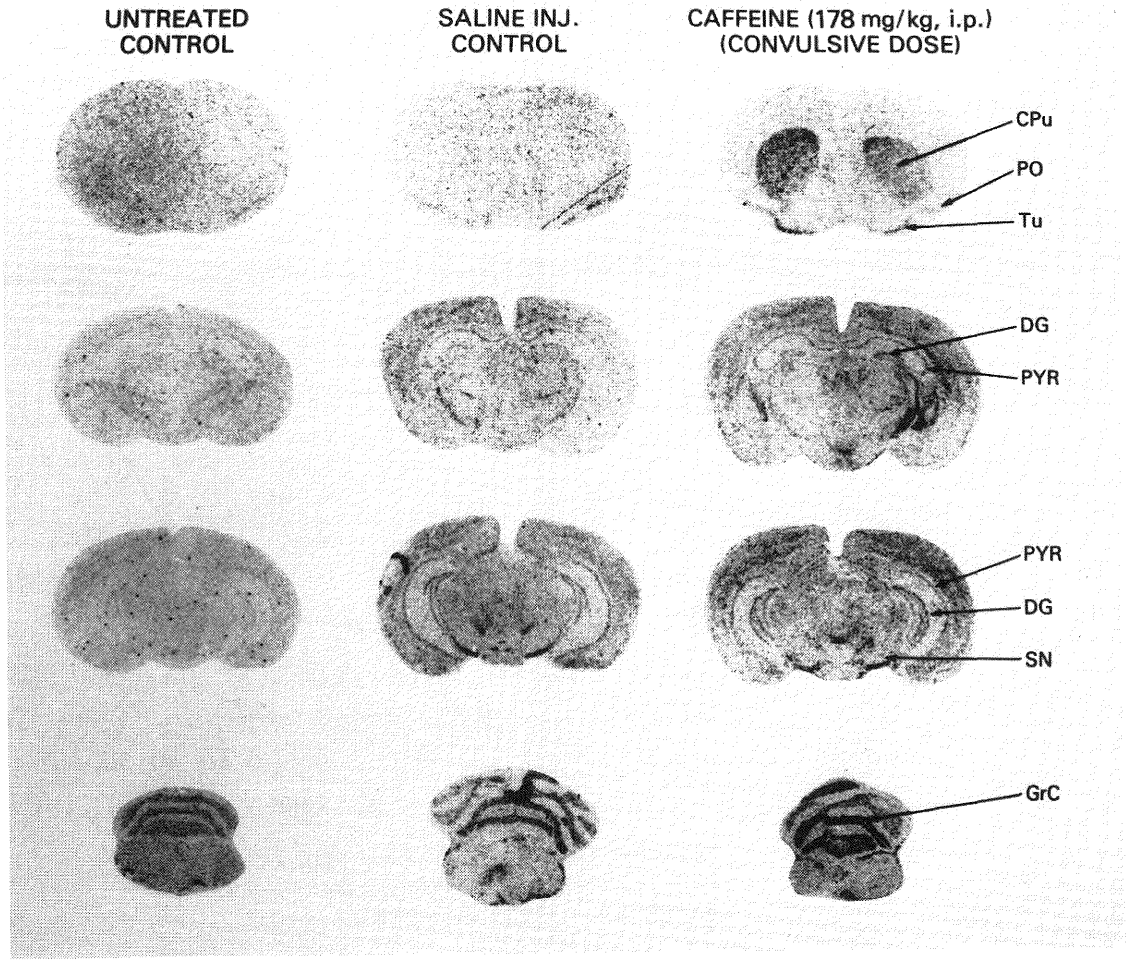


図 4-B C-fos mRNA の in situ ハイブリダイゼーションオートラジオグラフィ（マウス脳冠状断）

左より　無治療コントロール，腹腔内生食注射15分後，
けいれん量カフェイン（178mg/kg）の腹腔内投与後15分後

略語：CPu：線状体，　Tu：嗅結節，他前出．

中島論文付図（V）

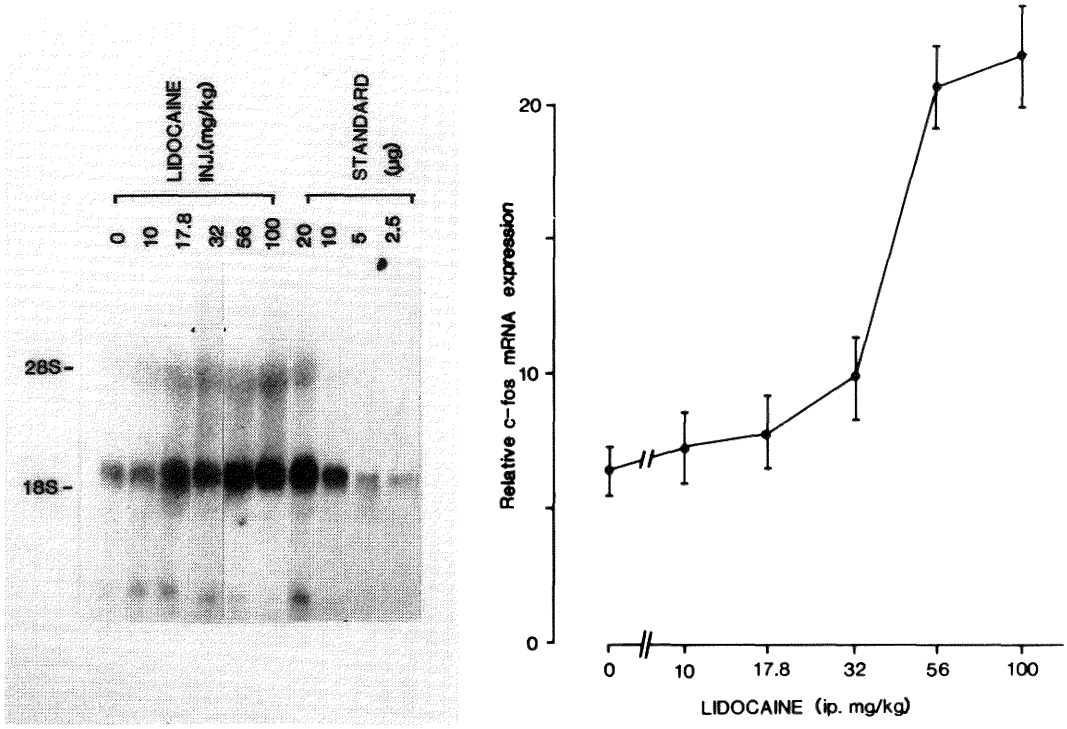


図 5−A　リドカイン投与による c−fos mRNA の発現（用量反応曲線）
リドカイン（10, 17.8, 32, 56, 100 mg/kg, i.p.）及び生食注射後15分後のノーザンブロット（左），その定量（右）．（n＝4, Mean±SEM）.

中島論文付図（Ⅵ）

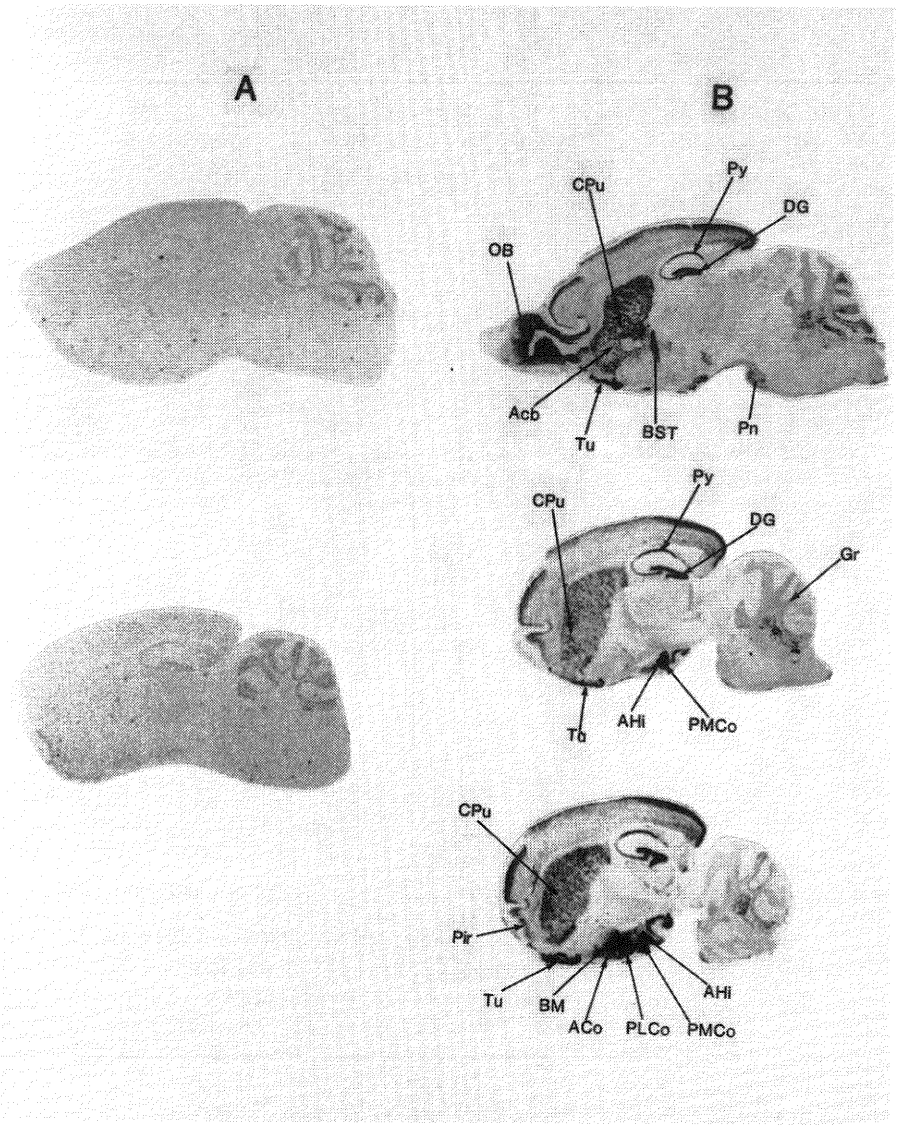


図 5−B　c−fos mRNA の in situ ハイブリダイゼーションオートラジオグラフィ（マウス脳矢状断）

A：腹腔内生食注射15分後，

B：けいれん量リドカイン（100mg/kg）の腹腔内投与後15分後

略語：BST：bed nucleus stria terminalis，OB：嗅脳，BM：basomedial amygdaloid nucleus，ACo：anterior cortical amygdaloid nucleus，PLCo：posterolateral cortical amygdaoid nucleus，他前出．

中島論文付図（Ⅶ）

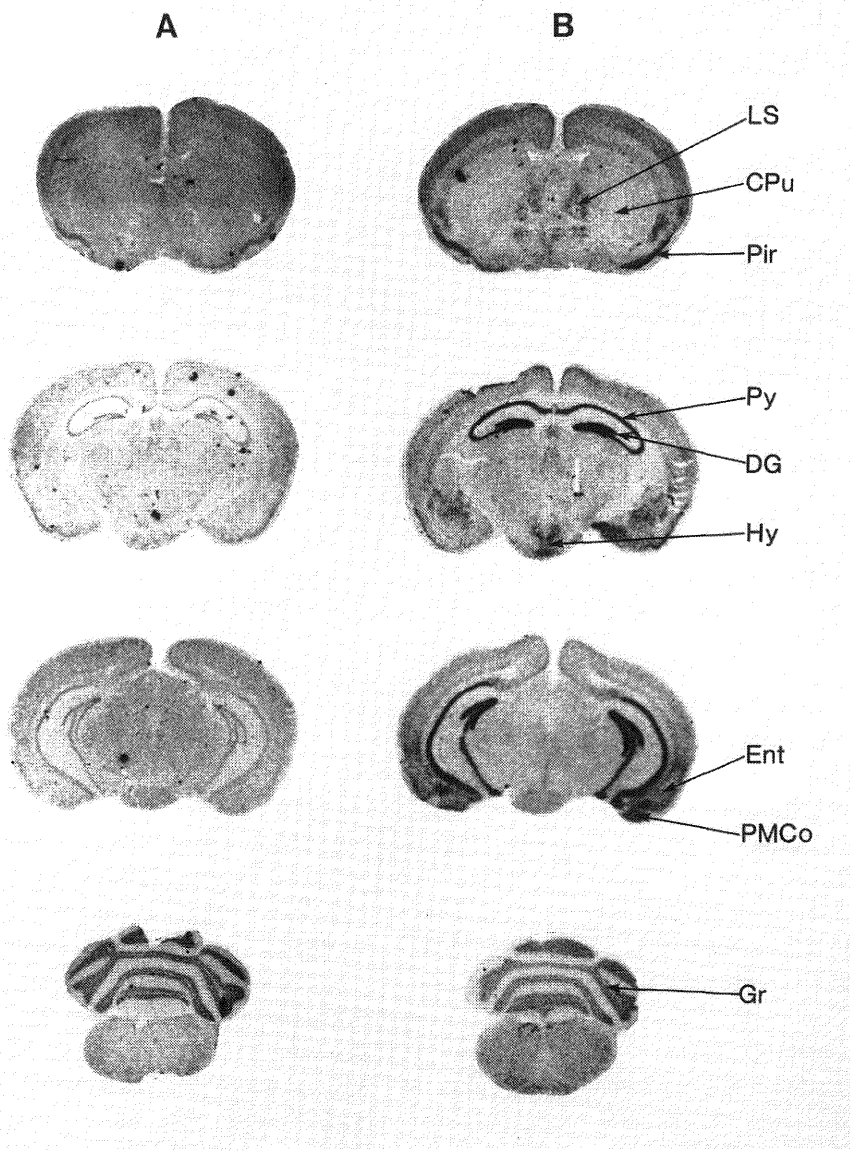


図 6　c-fos mRNA の in situ ハイブリダイゼーションオートラジオグラフィ（マウス脳冠状断）

A：腹腔内生食注射後（B のコントロール）

B：カイニン酸 60 mg/kg 腹腔内注射，けいれん後15分後

略語：前出．