

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09340

研究課題名(和文) てんかん脳の異常ネットワーク形成により発現する細胞膜蛋白を標的とする新規治療

研究課題名(英文) New therapeutic investigation targetting to cell membrane protein induced by epileptic brain network

研究代表者

重藤 寛史 (Shigeto, Hiroshi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50335965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々の開発した生後7週前後にてんかんを発症してくる皮質異形成ラットを用いて、神経免疫、特にグリア細胞のてんかん発症への関連を、免疫染色、PCR法を用いて検討した。結果、発症前の生後4週の皮質、海馬においてアストロサイトやミクログリアの足突起を首座とした炎症が生じていると推定できた。このことから、発症前にIL-1やTLR4に関連した炎症の抑制をターゲットとした治療を行うことで、てんかん発症を防ぐことができる可能性が示唆された。また、てんかん患者の聴覚誘発磁界の計測により機能的ネットワークの変化を抽出できた。聴覚誘発脳磁界計測は重症度を推定するバイオマーカーになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We had developed a new rat model, which has spontaneous seizure beginning around 7 weeks old. We investigated the pathogenesis of spontaneous seizure in relation to neuroimmunological aspect, especially to glial cells, using immune staining and PCR analysis. NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GAD, GFAP, AQP4, Vimentin, Cx43, Cx36, Iba-1, Cx3cr1, IL-1R, IL1, TLR4 were measured at 4 weeks and 8 weeks after birth. As a result, immune activation at the foot processes of microglia and astrocyte were presumed before onset of epilepsy. Based on the result, we speculated that the immune suppressive therapy targeting at IL-1, TLR4 before disease onset may prevent the development of epileptogenesis. In other experiment, we were able to extract the change of functional network in epilepsy patients by measuring the auditory evoked magnetic field. The change of auditory evoked magnetic response is expected to be a biomarker of epilepsy severity.

研究分野：神経内科学

キーワード：てんかん 皮質異形成 ネットワーク 脳波 臨床神経生理学

1. 研究開始当初の背景

てんかんは100人に1人が罹患する。その約3割は適切な抗てんかん薬治療を行っても発作が消失しない。てんかん発作による外傷、突然死、高次脳機能障害、自動車事故、就労の問題、催奇形性の問題など医学的にも社会的にも克服しなくてはならない問題点が多く、病態の解明と新規治療の開発は急務である。脳構造異常、遺伝子異常、感染、代謝、神経免疫などがてんかん発症の原因と推定されているが、その詳細はわかっていない。我々は、胎生期ラットの頭蓋に冷却刺激を与えることにより皮質異形成という脳構造異常を生じるモデルを開発した。このラットは出生7週前後に自然にてんかん発作が生じてきて、ヒトでいえば思春期～成人に発症するてんかんのモデルといえる。電気刺激や薬物投与、あるいは遺伝子異常によって発症するモデルと異なり、自然に発症してくる点がヒトてんかんの発症に類似しており、てんかん発症のメカニズムを解明するには非常にすぐれたモデルである。我々はてんかん発症に神経免疫や発育に伴い変化する神経ネットワークが関係しているのではないかと推定し、このモデルの解析で、TLR4やグリア細胞の関与を報告してきた。神経免疫の関与やネットワーク変化を解析することにより、てんかん発作を止めるだけでなく、てんかんの発症を予防する新たなターゲットを見出すことが期待される。

2. 研究の目的

1) 我々の開発したてんかん自然発症ラットモデルを用いて、てんかん発症に神経免疫、特にグリア細胞がどのように関わっているのかを検討する。

2) てんかん患者において、神経ネットワークの変化を抽出するためのバイオマーカーを見出す。

3. 研究の方法

1) てんかんを自然発症する皮質異形成ラットにおけるグリア細胞および神経免疫関連物質の検討

従来我々が行ってきた方法により胎生18日に子宮壁外から液体窒素で冷却したプローブを子宮壁越しに胎児両側半球に圧接して両側大脳半球に冷却損傷を与えることにより、出生後7週前後から自発てんかんを発症してくる皮質異形成ラットを作製した。

この自然発症てんかんラットにおいて、てんかん発作発症前と、てんかんを発症している週齢のラットを対象に、興奮性・抑制性受容体、アストロサイト、ミクログリア、コネクシン、炎症性関連物質、など以下の発現を観察した；グルタミン酸受容体マーカー NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GABA 合成酵素 GAD, アストロサイトに発現する GFAP, アストロサイトの足突起に多く存在する AQP4,

TNF- によって増強され活性化アストロサイトのマーカーである Vimentin, アストロサイト間・アストロサイト/オリゴデンドログリア間・アストロサイト/脳血液関門間の接着および細胞間情報伝達に役割を果たす Cx43, 海馬 CA1 の介在 GABA 神経に存在し記憶に関連した機能を持つと推定されている Cx36, マクロファージの活性化に関与しミクログリア細胞のマーカーでもある Iba-1, ケモカインフラクタルカインの受容体で脳内ではミクログリアに特異的に発現する Cx3cr1, IL-1R 受容体, 炎症性サイトカイン IL1, 自然免疫反応を活性化させる受容体蛋白 TLR4.

まず、グリア細胞がどの時期から自発発作出現にかかわっているのかを検討するために、出生4週と10週のモデルラット海馬(1匹, 3匹)に Cx43, GFAP, AQP4, Iba1 の免疫染色を行いコントロールラットと比較した。この予備実験における検証を元に、てんかんを自然発症しているであろうと推定される生後8週目の皮質異形成ラット5匹とシャム手術ラット5匹を対象に、NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GAD, AQP4, IL1, TLR4, Cx36 の免疫染色を行い、各ラットの海馬および皮質より25カ所ずつ測定範囲を設定して ImageJ にて半定量を行い比較した(unpaired t-test)。次にグリア細胞、神経免疫関連物質の発作出現前における関わりを検証するために、生後4週の皮質異形成ラット5匹の脳組織を対象に、Cx3cr1, Iba1, GFAP, Vimentin, IL-1R, TLR4, Cx30, Cx43 の発現をリアルタイム PCR 法を用いて定量化し、シャム手術ラット5匹と比較した(Wilcoxon test)。

これらラットの実験に加え、コンディショナルノックアウトの手法を用いてアストロサイトの Cx43 を脱落させたマウスモデルを作成し、マウスの皮質と海馬の両方の脳波活動を計測する。

2) てんかん患者における神経ネットワーク異常を抽出するバイオマーカーの開発

てんかん患者において、皮質海馬間に異常なネットワークが形成されていると仮定して、聴覚刺激により誘発された皮質反応が側頭葉てんかん患者と健常対象でどのように異なるか、脳磁図を用いて解析した。海馬硬化を有する側頭葉てんかん患者17名、健常者17名の聴覚誘発脳磁界を脳磁図で計測。脳磁図は306チャンネル全頭型脳磁計(Elekta-Neuromag, Finland), サンプリング周波数1KHz。刺激は持続時間100ms, スロープ30msのトーンバースト音で片耳ずつ100回刺激。刺激強度は聴覚閾値から50dB上とし、対側耳にはマスキングノイズを与えた。潜時100msの反応 M100 と潜時300-500msの反応 M400 を解析対象とし、各成分の等価電流双極子(ダイポール)の推定を行った。また海馬および聴覚関連領域(側頭平面, ヘルムホルツ, 上側頭回)の容積計測を行い, M100,

M400 との相関を調べた。

4. 研究成果

1) 冷却刺激作成皮質異形成ラットにおける炎症関連物質の変化

皮質異形成ラットの海馬において、4 週目では Cx43 の上昇を認めましたが、その他には上昇を認めなかった。10 週目では Cx43, AQP4 に上昇を認めましたが、GFAP, Iba-1 には上昇を認めなかった。10 週目の皮質異形成ラットの海馬にて NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, GAD, AQP4, IL1 にて優位な増加を認めましたが Cx36, TLR4 に有意差は認めなかった。皮質異形成ラットの皮質においては NMDAR1, NMDAR2B, GAD, AQP4, IL1, Cx36 にて優位な増加を認めましたが NMDAR2A, TLR4 に有意差は認めなかった(表 1)。4 週目の海馬において Cx3cr1, GFAP, Vimentin, IL-1R1, TLR4, Cx43 の有意な上昇を認めましたが、Iba1, Cx30 の上昇は有意ではなかった。8 週目ではこれらすべてに有意差が無かった(図 1a)。皮質異形成部においては、Cx3cr1, Vimentin, TLR4, Cx43 の有意な上昇を認めましたが、GFAP, IL-1R1, Iba1, Cx30 の上昇は有意ではなかった。8 週目ではこれらすべてに有意差が無かった(図 1b)。

また、マウスの皮質と海馬の両方の脳波活動を計測する方法を確立し、Pten gene ノックアウトによって mTOR が亢進したマウスにおける海馬のてんかん性活動を証明した。

2) てんかん患者の聴覚誘発脳磁界

M100 のダイポール推定率は海馬硬化側で低下していた。海馬容積は減少していたが、M100 の主要発生源である側頭平面とヘシュル回の容積に差は無かった。一方振幅は海馬および側頭平面の体積と正の相関があり、ヘシュル回と負の相関があった。

M400 は海馬硬化側で増大し(図 2a)、ヘシュル回容積と正の相関があり、罹病期間と正の相関を認めた(図 2b)。側頭葉切除術後には著明に低下した。

表 1 皮質異形成ラットとシャムラットの半定量比較 (Mean density)

	FL-hippocampus	WC-hippocampus	p value	FL-cortical	WC-cortical	p value
NMDAR1	30.19±10.68	21.57±7.15	<0.001	45.53±8.76	27.27±10.42	<0.001
NMDAR2A	15.61±3.95	12.01±4.64	<0.001	12.05±4.60	10.70±4.63	0.0458
NMDAR2B	27.79±9.44	11.45±5.01	<0.001	42.02±13.27	28.20±18.47	<0.001
GFAP	26.11±6.25	27.33±7.69	0.2341	20.58±7.26	17.68±6.18	0.0076
GAD	14.98±5.10	11.33±4.03	<0.001	16.17±5.55	13.06±5.39	<0.001
TLR4	22.53±8.65	21.02±5.59	0.8093	24.56±5.18	19.87±12.92	0.0566
AQP4	12.26±4.87	9.67±2.79	<0.001	21.19±6.19	12.84±6.50	<0.001
IL-1β	19.17±5.77	15.32±8.47	<0.001	25.60±4.49	14.70±4.74	<0.001
Cx32	10.91±3.92	7.73±2.95	<0.001	9.17±4.78	6.65±4.02	0.0004
Cx36	6.24±2.41	7.70±5.20	0.5987	15.06±5.46	11.00±4.95	<0.001
Cx43	35.80±8.85	18.71±7.92	<0.001	37.85±15.65	30.23±4.36	<0.001

図 2a 生後 8 週目海馬におけるグリア・免疫反応 PCR 定量

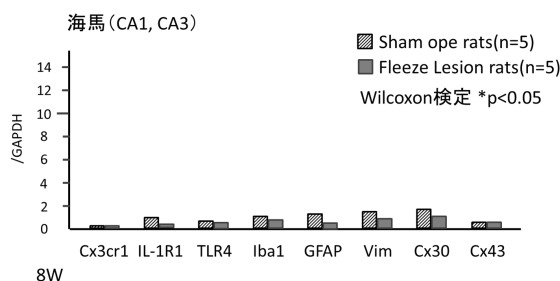


図 2b 生後 8 週目皮質異形成部におけるグリア・免疫反応 PCR 定量

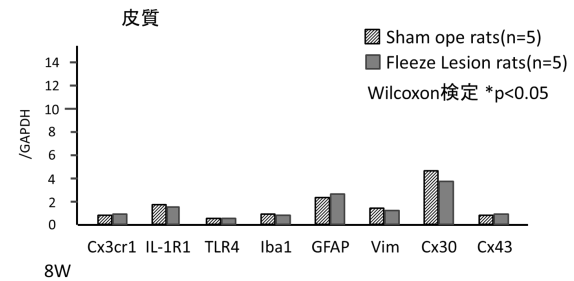


図 3a 聴覚誘発磁界振幅のコントロール (HC) と内側側頭葉てんかん患者 (mTLE) の比較

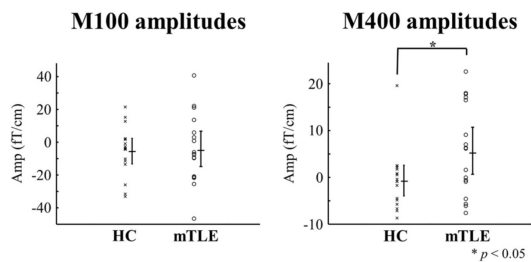
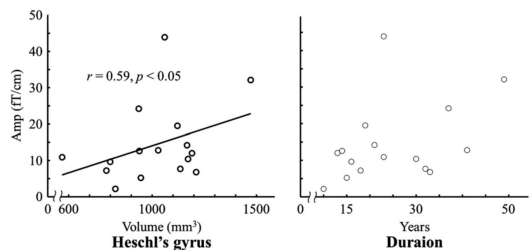


図 3b M400 振幅とヘシュル回容積、罹病期間との相関



(結論・考察)

皮質異形成ラットではてんかん発症前の 4 週目に既に、TLR4 の増加、ミクログリアの活性化、アストロサイトの活性化、アストロサイト関連コネクシンの増加がみられたことから、てんかん発症前の皮質、海馬の両者において、まず TLR4 を介した炎症がミクログリア、アストロサイトを活性化させ、コネクシンの発現を増加させる状態が生じていると考えられた。また、海馬においては IL-1 を介した炎症も生じていると推定された。なかでも、Cx43, AQP4 や Cx3cr1 が増加していることから、アストロサイトやミクログリアの足突起を首座とした活性化が生じていると推定された。これらのことから、アストロサイトやミクログリアの増殖がない時点においても、てんかん発症前に IL-1 や TLR4 に関連した炎症の抑制をターゲットとした治療を行うことで、てんかん発症を防ぐことができる可能性が示唆された。また、マウスの皮質と海馬の両方の脳波活動を計測する方法を確立したので、コンディショナルノックアウトの手法を用いてアストロサイトの Cx43 を脱落させたマウスモデルをはじめ、各

種ノックアウトマウスのでんかん性活動の局在推定ができるようになった。

てんかん患者では聴覚処理を含む脳内ネットワークに変化が生じていた。聴覚誘発磁界の計測は、MRI では抽出できない機能的ネットワークの変化を抽出することが可能であり、罹病期間・重症度を推定するバイオマーカーになりうると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Shimmura M, Shigeto H(4 番目), et al. : Slowed abduction during smooth pursuit eye movement in episodic ataxia type 2 with a novel CACNA1A mutation. J Neurol Sci 査読有 381: 4-6, 2017 DOI: 10.1016/j.jns.2017.07.040.

Chatani H, Shigeto H(5 番目), Hashiguchi K(8 番目), Uehara T (10 番目), et al. : Neuromagnetic evidence for hippocampal modulation of auditory processing. Neuroimage 査読有 124 : 256-266 , 2016 , DOI: 10.1016/j.neuroimage.2015.09.006.

Matsushita Y, Sakai Y, Shimmura M, Shigeto H (4 番目), et al. : Hyperactive mTOR signals in the proopiomelanocortin -expressing hippocampal neurons cause age-dependent epilepsy and premature death in mice. Sci Rep 査読有 6: 1-12, 2016, DOI: 10.1038/srep22991.

Irie T, Shigeto H (2 番目), Yamaguchi H (4 番目), et al. : Dermatomyositis complicated with asymmetric peripheral neuritis on exacerbation: a case report and literature. Clinical & Experimental Neuroimmunology 査読有 7: 373-380, 2016, DOI: 10.1111/cen3.12332.

進村光規, 重藤寛史 (4 番目)ら. : 塩酸ククロニジンが有効であった急性散在性脳脊髄炎および低酸素脳症後の paroxysmal sympathetic storm の 1 例. 臨床神経学 査読有 56: 108-111, 2016, PMID: 26754594

水野裕理, 重藤寛史 (2 番目), 鈴木 諭 (5 番目)ら. : 2 回目の脳生検により原発性中枢神経系血管炎の確定診断に至り治療しえた 1 例. 臨床神経 査読有 56: 186 - 190, 2016 , PMID: 26960271

横山 淳, 山口浩雄 (2 番目), 重藤寛史 (3 番目)ら. : Stroke-like episodes を呈さずに痙攣重積と横紋筋融解症で発症した mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) の 1 例. 臨

床神経 査読有 56: 204 - 207, 2016, PMID: 26960270

Mukaino T, Uehara T(4 番目), Yamaguchi H (5 番目), Shigeto H (6 番目), et al. : Multimodal diagnostic approach for limbic encephalitis associated with anti-voltage-gated potassium channel complex antibodies. Clin and Experimental Neuroimmunol 査読有 6: 318-320, 2015.

Yamashita C, Shigeto H (2 番目), et al. : A case of central pontine myelinolysis caused by hypophosphatemia secondary to refeeding syndrome. Case Rep Neurol 査読有 7: 196-203, 2015 DOI: 10.1159/000440771

村上信哉, 橋口公章 (3 番目), 鈴木 諭 (4 番目), 重藤寛史 (5 番目)ら. : 胚芽異形成上皮腫瘍に伴う難治性てんかん症例における発作起始域の臨床的・病理学的検討. 神経研究の進歩 査読有 67: 525-532, 2015 DOI: 10.11477/mf.1416200170.

石橋秀昭, 重藤寛史 (2 番目)ら. : Down 症候群に合併した遅発性ミオクロニーてんかんの一例. てんかん研究 査読有 32: 564-567, 2015.

[学会発表](計 42 件)

重藤寛史: てんかん診療 Up to date 第 220 回 日本神経学会九州地方会 2017.12.16 琉球大学医学部大会議室

重藤寛史: てんかん診療 up-to date 第 47 回日本臨床神経生理学会学術集会 2017.11.29 パシフィコ横浜

重藤寛史: 迷走神経刺激療法 第 14 回迷走神経刺激療法技術講習会 第 51 回日本てんかん学会 2017.11.25 京都国際会議場

重藤寛史: 教育講演 8 発作時症候 第 51 回日本てんかん学会 2017.11.4 京都国際会議場

Shigeto H, et al. Fast ripples and fast activities detected by frequency analysis in temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis and without hippocampal sclerosis. World congress of Neurology 2017, 2017.9.19 Kyoto International Conference Center

Shigeto H et al. Evaluation of the effect of anterior temporal lobectomy on non-lesional temporal lobe epilepsy patients. 32th International epilepsy congress 2017.9.4 Palau de Congressos de Catalunya, Barcelona, Spain

重藤寛史: 部分てんかん 第 3 回脳波セミナー・アドバンスコース 2017.7.29-30 京都大学紫蘭会館

重藤寛史: 部分てんかん 第 2 回脳波セミナー・アドバンスコース 2016.8.6-7 京都大学紫蘭会館

重藤寛史: ハンズオン脳波 第 57 回日本神経学会総会 2016.5.21 神戸国際会議場

重藤寛史: てんかん治療フロンティア, てんかん外科の最新知見: 内科医の観点から 第 57 回日本神経学会総会 2016.5.18 神戸国際会議場

重藤寛史: てんかんの脳波と症例: 成人 第 52 回日本臨床神経生理学会技術講習会 2015.11.6 大阪国際会議場

重藤寛史: 神経救急としててんかん 成人特に高齢者における神経救急としてのてんかん診断 第 49 回日本てんかん学会学術集会 2015. 10.29 長崎新聞文化ホール

重藤寛史: マラソンレクチャー てんかんの診断: 成人 第 49 回日本てんかん学会学術集会 2015. 10.29 長崎新聞文化ホール

重藤寛史: てんかん発作との鑑別-睡眠関連疾患を中心に 第 19 回日本摂食障害学会学術集会 2015.10.25 福岡パピヨン 24

重藤寛史: 部分てんかん 第 1 回脳波セミナー・アドバンスコース 2015.8.8-9 京都大学紫蘭会館

Shigeto H : Minimum norm estimating in MEG may predict the propagation pattern of interictal epileptic discharges obtained by ECoG. 第 30 回日本生体磁気学会 2015.6.5 旭川大雪クリスタルホール

重藤寛史ら: 新規抗てんかん薬登場後の出産・授乳期における抗てんかん薬の使用実態 第 56 回日本神経学会学術大会 2015.5.20 新潟朱鷺メッセ

〔図書〕(計 9 件)

重藤寛史: 神経内科外来シリーズ 4 / てんかん外来 荒木信夫総編集, 辻貞俊担当編集. Case study 症例を通しててんかんを学ぶ 2 .前頭葉てんかん メジカルビュー社 総 222 ページ(136-141 ページ) 2016/1/20, 東京

重藤寛史: ここが知りたい! 臨床神経生理 飛松省三編集. 導出法中外医薬社 総 225 ページ(5-12 ページ), 2016/5/25, 東京

重藤寛史: てんかん・けいれんの薬 pp68-85 ブレインナーシング 2016 年夏季増刊号 脳神経領域で必須のくすり 橋本洋一郎監修 メディカ出版. 総 247 ページ(5-12 ページ), 2016/8/15 大阪

重藤寛史: VI 研究 2. 臨床研究 b. 成人 てんかん白書 てんかん医療・研究のアクションプラン日本てんかん学会編集 南江堂 総 197 ページ(166-168 ページ), 2016/10/20, 東京

重藤寛史: 神経内科研修ノート第 5 章 神経内科疾患の診療 中毒性神経筋疾患 3. 薬物 永井良三 総監修 診断と治療社 624-626 ページ, 2015 東京

重藤寛史: 複雑部分発作 臨床てんかん学 兼本浩祐ら編集 医学書院 151-154 ページ, 2015 東京

重藤寛史: 強直間代発作 臨床神経学兼本浩祐ら編集 医学書院 154-155 ページ, 2015 東京

重藤寛史: てんかん発作時脳波総論臨床神経学兼本浩祐ら編集 医学書院 268-275 ページ, 2015 東京

重藤寛史: 発作時の注意点 デジタル脳波の記録・判読の手引き 日本臨床神経生理学会編集 診断と治療社 総 102 ページ(93-94 ページ), 2015 東京

〔産業財産権〕

出願状況 なし
取得状況 なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.neuro.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重藤寛史 (SHIGETO, Hiroshi)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 50335965

(2) 研究分担者

山口浩雄 (YAMAGUCHI, Hiroo)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 00701830

上原 平 (UEHARA, Taira)

九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 30631585

橋口公章 (HASHIGUCHI, Kimiaki)

九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 80448422

(3) 連携研究者

鈴木 諭 (SUZUKI, Satoshi)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 90294917

(4) 研究協力者

鎌田崇嗣 (KAMADA, Takashi)
茶谷 裕 (CHATANI, Hiroshi)
進村光規 (SHIMMURA, Mitsunori)