

令和元年6月4日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19634

研究課題名(和文) てんかん原生獲得における活性化ミクログリア機能の解明

研究課題名(英文) Contribution of activated microglia in epileptogenesis after status epilepticus

研究代表者

佐野 史和 (Fumikazu, SANO)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：00622375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は本研究を通じて、ピロカルピン誘発性側頭葉てんかんモデルマウスにおいて、ミクログリアはけいれん重積後早期に活性化し、てんかん原生獲得期(慢性期)にはアストロサイトのみが活性化していることを見出した。このけいれん重積後早期に活性化するミクログリアをけいれん重積誘発後短期間のみミノサイクリンを投与し薬理的に抑制すると、慢性期のアストロサイトの形態的な活性化が抑制され、てんかん原生の獲得も阻害されることを見出した(現在投稿準備中)。このことは、活性化ミクログリアによって引き起こされるアストロサイトの異常活性化がてんかん原生獲得過程に強く関係していることを示唆すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、てんかん原生獲得の分子病態におけるグリア相互作用(活性化ミクログリアが誘導するアストロサイトの活性化)の関与が明らかとなったことで、既存のてんかん治療薬とは全く異なる、グリア細胞を標的とした新たなてんかん治療薬開発の基盤となる成果となりうる。また、これらの結果は、従来の難治てんかんに対する「単にてんかん発作を抑制する」という対症療法的な治療戦略と異なりてんかん原生そのものを予防・消失させるという「てんかんに対する病態修飾治療」という新たな治療戦略の基礎的概念の確立と、臨床応用にむけた萌芽的な研究成果となりうる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to test our hypothesis that early microglial activation after status epilepticus (SE) lead to reactive astrocytes which can cause epileptogenesis.

We detected a significant increase in the area of Iba1-positive microglia, mRNA of TNF- $\alpha$  in the hippocampus at 1 day after SE which was followed by the increase in the area of GFAP-positive astrocyte in CA1 from 7 to 28 days after SE. Astrocytes displayed significantly larger and longer Ca<sup>2+</sup> signals from 25 to 32 days after SE. In addition, less dose of pilocarpine was required for the induction of the second SE at 28 days after the first SE. Microglia inhibition with minocycline reduced astrogliosis, Ca<sup>2+</sup> signals of astrocytes, and rescued the increased seizure-susceptibility. These results suggest that reactive astrocytes triggered by activated microglia undergo a part of physiological changes which can cause epileptogenesis.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん ミクログリア アストロサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは、世界での患者数が 5,000 万人以上にのぼる頻度が高い神経疾患である。約 70% の例で内服治療が有効である一方、30% 前後は従来の抗てんかん薬が無効な難治てんかんであり、その治療及び予防に関する社会的要請は非常に大きい。現在てんかん治療に用いられている薬剤は、主に神経細胞に作用する抗「けいれん」薬であり、発作抑制には有効であるが、けいれん発作の原因であるてんかん原生に対する作用は極めて乏しいのが実情である。一方、これまで神経細胞ほど注目されてこなかったグリア細胞のうち、特に炎症反応や貪食に関連するミクログリアが、うつ病や統合失調症などの様々な神経疾患の病態に関与すると報告されている。てんかんにおいては、薬物誘発性のけいれん重積後にミクログリアが活性化することが報告されているが(Koizumi, Nature 2007)、ミクログリアとてんかん原生獲得機序の関連については未解明の点が多い。申請者はこれまでに、けいれん重積誘発後にミクログリアが活性化(炎症性サイトカイン産生能および貪食能が亢進)すること、これがてんかん原生獲得過程のトリガーとなっている可能性を見出している(未発表)。この様な背景のもと、本研究では、側頭葉てんかんモデルマウスを用い、「ミクログリアを介したてんかん原性獲得メカニズム」の解明を目指す。本研究の遂行により、ミクログリアを標的とした、従来とは全く異なる作用機序の抗てんかん薬開発に直接繋がる基盤データ・技術が輩出されることが期待できる。

## 2. 研究の目的

現在てんかん治療に用いられている薬剤は、主に神経細胞に作用し発作抑制には有効であるが、てんかん発作の原因であるてんかん原生に対する作用は極めて乏しい。一方、これまで神経細胞ほど注目されてこなかったグリア細胞のうち、ミクログリアが様々な神経疾患の病態に関与することが報告されている。そこで本研究では、従来とは異なる因子を標的とした、「てんかん原生を予防」できる新たな抗てんかん薬開発の基盤となるメカニズムの解明を目指し、側頭葉てんかんモデルマウスを用いて、「ミクログリアを介したてんかん原性獲得メカニズム」を解明することを目的とする。具体的には、けいれん重積誘発後の活性化ミクログリア機能(特に炎症性サイトカイン産生能および貪食能)を解析し、これらがてんかん原生獲得機構と関連があるのかを検討する。

## 3. 研究の方法

これまでに、けいれん重積後早期にミクログリアが活性化することを見出している。本研究は、けいれん重積後の側頭葉てんかん発症(てんかん原生獲得)における活性化ミクログリアの役割を解明することを目的としている。初年度は、ピロカルピン誘発性側頭葉てんかんモデルマウスの病態解析および、てんかん重積後のミクログリアの表現型(形態・機能)の時・空間的变化を精査することで、「てんかん原生獲得過程における活性化ミクログリアの役割」を解明する。次年度で活性化ミクログリアの抑制によるてんかん原生獲得予防可能性を明らかにする。

### 1) ピロカルピン誘発性側頭葉てんかんモデルマウスの病態解析

初年度は、上記モデルマウスの病態解析(側頭葉てんかん発症時期、海馬組織の経時的変化の解析)を中心に行う。これにより、ミクログリアの活性化時期が海馬硬化およびてんかん発症に先行しているのかを明らかにする。具体的には以下の実験を予定している。

#### 上記モデルマウスでのてんかん発症時期の解明

これまでに、上記モデルマウスはけいれん重積後 4 週間で、てんかん発作易誘発性とな

ることを見出しているが、自発てんかん発作発症時期は確認できていない。そこで、4 週間を目安に長時間ビデオ脳波同時モニタリングを行い、けいれん重積後の自発てんかん発作開始時期（側頭葉てんかん発症時期）を明らかにする。具体的には、深部電極による両側海馬および硬膜外ネジ電極による両側前頭葉皮質の電気活動を計測し、発作時脳波を確認する予定である。

#### **上記モデルマウスの病理組織学的変化の経時的推移の解明**

本モデルマウスの海馬硬化（難治性側頭葉てんかんに認められる特徴的な病理変化の一つ）の進展様式とミクログリアの活性化時期を明らかにする。そこで、けいれん重積誘発後、1日・3日・7日・28日後に海馬を摘出し、蛍光免疫組織染色法により海馬組織の経時的変化を検討する。実際には、NeuN を用いて神経細胞を標識し、神経細胞の脱落過程を、GFAP を用いてアストロサイトを標識しグリオシスの進展過程を、Iba-1 を用いてミクログリアを標識し、ミクログリアの活性化時期を、細胞数や蛍光強度などを指標として用いて定量解析する。なお、観察に必要な共焦点レーザー顕微鏡は本学の共用設備を用いる。また、 の実験と合わせ、てんかん発症期とてんかん原生獲得期（海馬硬化進展時期）ミクログリア活性化時期の前後関係を解明する。

#### **2) 活性化ミクログリアの表現型解析**

活性化ミクログリアによるてんかん原生獲得過程の分子病態を解明する。初年度は、けいれん重積後に惹起される活性化ミクログリアの機能および表現型を解析し、次年度の介入実験の基礎的データを得ることを目標とする。主に以下の2つの実験を予定している。

##### **けいれん重積後の神経炎症過程の解析**

けいれん重積後に惹起される活性化ミクログリアによる、神経炎症過程の程度および持続期間を解明するため、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の mRNA の発現量変化を定量 RT-PCR 法を用いて定量解析する。さらに、この活性化ミクログリアが神経障害性ミクログリア（M1 ミクログリア：炎症性サイトカインなどの神経傷害因子を産生する）であるのかを、抗 TNF- $\alpha$  抗体および抗 iNOS 抗体（M1 ミクログリアのマーカー）を用いた蛍光免疫組織染色で確認する。

##### **活性化ミクログリアによる神経細胞貪食過程の解析**

けいれん重積誘発後の海馬組織における P2Y6 受容体（ミクログリアの貪食作用のマーカー）の mRNA の発現量変化を定量 RT-PCR 法を用いて解析する。さらに、P2Y6 受容体の発現亢進がミクログリアにおいて認められているのかについて、抗 Iba-1 抗体および抗 P2Y6 受容体抗体を用いた蛍光免疫組織染色で確認する。

#### **3) ピロカルピン誘発性側頭葉てんかんモデルマウスのてんかん発症予防**

次年度は、活性化ミクログリアおよびその関連分子に介入することで、上記モデルマウスの側頭葉てんかん発症が予防できるかを明らかにする。具体的には以下の実験を予定している。

##### **けいれん重積後の活性化ミクログリア抑制による、てんかん発症予防可能性の検討**

初回けいれん重積後に、ミノサイクリン 20mg/kg/日を連日腹腔内投与しミクログリアの活性化を抑制することで側頭葉てんかんの発症が予防できるかについて検討を加える。てんかん発症の有無・発作頻度（重症度）は初年度と同様に連続的ビデオ脳波同時モニタリングを行い、けいれん重積誘発後の自発てんかん発作をモニタリングする事で評価する。

#### **上記モデルマウスの病理組織学的変化の経時的推移の解明**

と同様の方法でミノサイクリンを投与し、海馬硬化の進展が抑制されるかについて、初年度と同様に蛍光免疫組織染色を用いて定量評価する。なお、上記実験におけるミノサイクリン至適投与期間については、初年度で得られるマイクログリアの活性化持続期間を参考に決定する。

#### 4) 薬剤による抑制前後での活性化マイクログリアの表現型解析

けいれん重積誘発後に、ミノサイクリン 20mg/kg/日を連日腹腔内投与することで、神経炎症過程が抑制されるのかについて、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  と、抗炎症性サイトカインである IL-4, IL-10 の mRNA の発現量変化を定量 RT-PCR 法を用いて確認する。さらに、神経障害性マイクログリアが減少しているかを、初年度と同様の蛍光免疫組織染色で定量解析する。

#### 活性化マイクログリアによる神経細胞貪食過程の解析

けいれん重積後に誘発されるマイクログリアの貪食能の活性化と神経細胞の脱落（海馬硬化）の関係を解明する。そのために、P2Y6 受容体ノックアウトマウスと野生型マウスでけいれん重積後の組織変化（神経細胞の脱落の程度）に差異がみられるかについて、NeuN を用いて神経細胞を標識した蛍光免疫組織染色で細胞数（錐体細胞層の厚さ）などを指標として定量評価する。

### 4. 研究成果

#### 1) ピロカルピン誘発性側頭葉てんかんモデルマウスの病態解析

(1)本モデルマウスにおいて、自発のてんかん発作の発症時期は確定できなかったが、けいれん重積誘発 4 週間後において、けいれんの閾値が低下することを見出し、これをけいれん感受性の指標として用いることとした。

(2)本モデルマウスの海馬硬化の進展様式とマイクログリアの活性化時期を明らかにするため、けいれん重積誘発後、1日・3日・7日・28日後に海馬を摘出し、蛍光免疫組織染色法により海馬組織の経時的推移を検討した。その結果、本マウスでは、けいれん重積 1-7 日後の早期にマイクログリアが活性化し、7-28 日後にかけて慢性進行性にアストロサイトが活性化することを見出した。

#### 2) 活性化マイクログリアの表現型解析

けいれん重積後に惹起される活性化マイクログリアによる、神経炎症過程の程度および持続期間を解明するため、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の mRNA の発現量変化を定量 RT-PCR 法を用いて定量解析した。その結果、けいれん重積後の海馬組織および、海馬組織に存在するマイクログリアにおいて、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (炎症性サイトカイン) の mRNA が、24 時間以内に発現上昇することも確認した。

#### 3) ピロカルピン誘発性側頭葉てんかんモデルマウスでのてんかん発症予防

初回けいれん重積後に、ミノサイクリン 20mg/kg/日を連日腹腔内投与しマイクログリアの活性化を抑制することで、けいれん重積誘発 4 週間後における、けいれんの閾値の低下が予防できることを見出した。同様に、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の mRNA の発現量変化を定量 RT-PCR 法を用いて確認し、神経障害性マイクログリアが産生していると考えられる、TNF- $\alpha$  の発現が低下していることを確認した。

#### 4) てんかん原生獲得期の活性化アストロサイトの解析

てんかん原生を獲得したけいれん重積誘発 4 週間後のアストロサイトにおいては、GFAP を用いた免疫染色で、形態的な活性化（アストログリオシス）が起こるが、薬理

学的にミクログリアの活性化を抑制した場合、このアストロサイトの活性化が抑制されることを見出した。また、てんかん原性を獲得したけいれん重積誘発4週間後のアストロサイトにおいては、海馬スライス標本を用いたCa<sup>2+</sup>イメージング法によって、Ca活動が亢進している可能性を見出した。

今後は、この活性化アストロサイトの機能解析を行っていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1) Shigetomi E, Saito K, Sano F, Koizumi S. Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders. *Int J Mol Sci* 2019; 20(4) (査読有)

2) 小泉修一、佐野史和. 【てんかん研究の最前線-新たな治療薬を求めて-】てんかん原性とグリア. *日薬誌* 2018; 152: 268-374 (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

1) 佐野史和 他. Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals via IP<sub>3</sub> receptor type2 mediate reactive astrocytes after status epilepticus. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. 2019年

2) 佐野史和 他. Astroglial activation by status epilepticus is dependent on IP<sub>3</sub> receptor type2. 第52回日本てんかん学会学術集会. 2018年

3) 佐野史和 他. Contribution of activated glial cells in epileptogenesis after status epilepticus. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 2018年

4) 佐野史和 他. Microglial VNUT derived ATP mediates astroglial activation-dependent epileptogenesis after status epilepticus. 第60回日本小児神経学会学術集会. 2018年

5) 佐野史和 他. Acute microglial activation phenotype after status epilepticus: role of microglial vesicular nucleotide transporter in epileptogenesis. 第51回日本てんかん学会学術集会. 2017年

6) 佐野史和 他. Microglial VNUT contribute to epileptogenesis including astroglial activation after status epilepticus. 第59回日本小児神経学会学術集会. 2017年

7) 佐野史和 他. Enhanced astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals via IP<sub>3</sub>R2 contribute to epileptogenesis after status epilepticus. 14th Asian Oceanian Congress of Child Neurology. 2017年

8) 佐野史和 他. Contributions of reactive astrocytes triggered by microglia to epileptogenesis following status epilepticus. 第50回日本てんかん学会学術集会. 2016年

9) 佐野史和 他. Activated microglia as a potential therapeutic target for epileptogenesis after status epilepticus. 第58回日本小児神経学会学術集会. 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

薬理学講座 - 山梨大学医学部

[https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical\\_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html](https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html)

において、研究活動の報告を行っている

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：