

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08356

研究課題名(和文) 2次性てんかん予防治療における漢方療法の可能性 脳内炎症の観点からの基礎的検討一

研究課題名(英文) Suppressive effects of GOREI-SAN (Kampo) for brain edema and inflammatory response in acute phase after status epilepticus

研究代表者

伊藤 康一 (Kouichi, itoh)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：30291149

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)：五苓散はSE後1日3回(100mg/kg)経口投与で、早期(2～3日)に海馬でAQP4を介する一過性BBB透過性亢進と血管原性脳浮腫を抑制した。さらに、脳炎症マーカーPentraxin3の顕著な上昇が認められ、ミクログリアや脳内浸潤マクロファージが活性化され、多くの炎症性サイトカインも高発現しSE誘発脳内サイトカインストームが出現することが観察された。五苓散は、このサイトカインストームを制御した。しかし、長期間脳波測定では、五苓散による有意なてんかん様脳波出現抑制効果は認められなかった。つまり、五苓散単独投与では、脳内炎症関連反応は抑制するにも関わらず、発作を抑制する効果は限定的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な高齢社会を迎え、脳卒中、アルツハイマー病など脳器質性病変を原因とする2次性てんかん発症率が上昇し続けている。てんかん発作は、日常生活に大変な不安をもたらすQOL低下を招く。従って、てんかん発症予防は大変重要な課題であり漢方療法も有用である。てんかん発症における脳内水代謝異常と炎症に関わる方剤、五苓散を用いて検討した。てんかん発症初期段階における脳浮腫、脳内炎症を五苓散は顕著に抑制した。しかし、五苓散単独ではてんかん脳波に関しては抑えることはできなかったが、他の抗てんかん薬(特にレベチラセタム)と併用することで2次性てんかん発作の出現を抑制でき可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：GOREI-SAN (GRS) has been used for water intoxication. Recently there have been a lot of clinical application studies of GRS

GRS was orally administered 3 times a day (100 mg/kg) after status epilepticus (SE), and in the early stage (2 to 3 days), it suppressed AQP4-mediated transient BBB permeability and vasogenic edema in the hippocampus. In addition, it was observed that the marker of cerebral inflammation Pentraxin3 was markedly increased. Microglia and infiltrating macrophages in the brain were activated, and many proinflammatory cytokines were also highly expressed. This was called SE-induced brain cytokine storm. GRS regulated this cytokine storm. However, long-term EEG measurements did not show a significant effect of suppressing the appearance of epileptiform discharges by GRS. Therefore, the administration of GRS alone limited the effect of suppressing seizures, while suppressing the inflammation-related reaction in the brain.

研究分野：脳神経薬理学

キーワード：てんかん 五苓散 脳波 脳内炎症 血液脳関門 脳浮腫

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、脳疾患の中で最も一般的な疾患の一つである(有病率は約1%)。また、単一の疾患ではなくてんかん症候群と呼ばれ、大きく特発性(35%)と症候性(60%)に分類されている。2次性てんかんは、外傷性脳損傷、脳卒中、脳腫瘍、脳炎、アルツハイマー病など脳の器質的病変が原因となっているものが症候性てんかんの20%以上を占めている。特に高齢者の初発てんかんの増加は、ほとんど高齢化に伴う脳卒中、アルツハイマー病患者数の増加に依存している。その中で特に、脳卒中罹患(130万に以上)に伴い、約10%以上の患者がてんかんに発症していることでも明らかである。高齢者にとって、てんかんと診断されることは、精神的問題(不安、スティグマ、鬱など)がQOLに多大な影響を与える。また、高齢者てんかん発作は、多くの場合認知症と間違われ、不適切な治療が行われる場合も非常に多いなど多くの問題を抱えている。これらの問題を解決するために、脳卒中などの発症後にてんかん発作を起こさないための予防的治療を速やかに開始することが必要である。つまり、高血圧や脂質異常症、糖尿病などの治療と同様に、てんかん予防のための継続服薬を考える必要がある。抗てんかん薬は、過去10年間に8剤が新規に加わったものの、既存薬を含め臨床でてんかんを予防する効果を有するものはない。てんかん発症予防を考えると、脳疾患罹患後ある一定期間(数日から数年)を経過し突然てんかん発作が発症するため、その過程(てんかん原性)において脳内でどのような変化が起きているかを明らかにする必要がある。最近、てんかん原性機構について研究が世界的に推し進められている。つまり、てんかん原性期における予防的治療が成功することは、2次性症候性てんかん発症の根本的治療につながる。一方、高齢者医療においてポリファーマシーが問題となり、若年者に比べ薬物有害事象の発生も多い。この点も考慮し、申請者は長期間服用に対する漢方薬の利点に着目した。しかし、てんかん発症後での漢方治療には小柴胡湯合桂枝加芍薬湯や柴胡加竜骨牡蠣湯などその有用性が認められているものもあるが、西洋薬同様、てんかん予防効果に関してのエビデンスは皆無であるが、脳神経外科領域で脳浮腫抑制のために適用されている五苓散に関して(1)重積けいれん発作後の脳各部位で腫脳浮腫の時空間的変遷(細胞性脳浮腫→血管原性脳浮腫)を漢方薬が抑制した。(2)アクアポリン4を介するBBB透過性の亢進による血管原性脳浮腫を漢方薬が抑制した。(3)さらに、最近これらてんかん原性初期の脳浮腫発症が血管新生、脳内炎症により誘導され、この初期過程がてんかん発症に重要が報告され、五苓散のてんかん予防効果の可能性が示唆された。これらの実験結果から、2次性症候性てんかん発症原因を「脳内炎症」と捉え、脳障害後のてんかん原性期の五苓散の経口連続服用により、2次性てんかん発症を予防する可能性を追求する。

2 . 研究の目的

世界的な高齢社会を迎え、脳卒中、アルツハイマー病など脳器質性病変を原因とする2次性てんかん発症率が、上昇し続けている。てんかん発作は、日常生活に大変な不安をもたらすQOL低下を招く。従って、てんかん発症予防は大変重要な課題である。高齢者治療においてポリファーマシーから服用期間、相互作用、副作用を考えると問題点が多い。既に脳神経外科領域で臨床適用されている漢方薬の中から五苓散の2次性てんかん予防治療への可能性について脳内炎症に伴う血液脳関門機能不全改善効果の観点から臨床適用に直結する基礎的検討を行う。

3 . 研究の方法

(1) 重積けいれん(SE)モデル動物作製：側頭葉てんかんの代表的モデルは、常法に従い、ICR雄性マウス(8~10週齢、35~45g)にピロカルピン(PILO, 290 mg/kg, i.p.)投与後90分間に全身けいれんを5回重積(SE)させることで作製した。5回発作後(60分以内)、ジアゼパム(1 mg/kg, i.p.)によりけいれん発作を終息させた。

(2) 漢方薬の投与(五苓散エキス剤はツムラから供用)の投与方法：SE消失後水または漢方薬の投与を開始する。自発けいれん発作発現の有無、または期間を指標に確定する。通常、このモデルでは自発けいれん発作発現に7~10日を要するため、その期間1日2~3回(30, 100, 300 mg/kg)経口投与した。

(3) 慢性脳波測定：自発けいれん発作発現の有無は、マウスに慢性脳は電極を装着し発作波の出現とビデオモニターによりけいれんの出現を観察し判定を行う。特に非けいれん発作に着目した。

(4) 脳浮腫の変化(MRI)：細胞障害性と血管原性脳浮腫を分別評価するために、マルチパラメーターでMRI撮像(T2強調画像T2WI, 拡散強調画像DWI)することで、脳浮腫の定性的評を行い、T2緩和時間及び見かけの拡散係数(ADC)値の計測をROIで選択した脳各部位について定量的評価を行った。漢方薬がBBBを変化させる脳領域を検出：BBB損傷程度を時空間的に定性および定量的に評価するために、BBB不透過MRI造影剤(ガドリニウム(Gd)造影剤; Gd-DTPA; gadopentetate dimeglumine, Magnevist®, 0.4 mmol/kg)を尾静脈より急速静注する。脳実質内でのGd拡散状態を小動物専用1.5T永久磁石MRI装置(MRT社製)で撮像、観察する。BBB透過性亢進により脳実質内にGdが漏出し出現した部位ではT1高信号となり、BBBの破綻領域を示す(図2)。Gd静注後10分ごとに30分間撮像する。Gdの脳実質内への漏出によるT1緩和時間短縮を画像解析により描出した。

(5) 炎症、血管新生、BBB 関連分子マーカー発現量：SE 後経時的にマウス脳を摘出し、大脳皮質、視床、海馬、側頭葉(扁桃体、梨状葉)に分割、mRNA およびタンパク質を抽出後、それぞれ real-time RT-PCR とウエスタンブロット(WB)法で検出、定量した。炎症(IL1 β , IL6, TNF α , iNOS など)、血管新生(VEGF, VEGFR2, angiopeitin-1/-2, tie2, CD31 など)、BBB(claudin-5, occluding, VE-cadherin, ZO-1, AQP4 など)。さらに、RNA-Seq を用いた網羅的遺伝子発現の定量化を試みた。特に炎症関連分子に関しては、Proteome ProfilerTM Array, Mouse XL Cytokine Array Kit (R&D Systems) を用いて、113 種類の炎症関連分子の発現動態を網羅的に解析した。

4. 研究成果

1. GRS は、PILO-SE マウスの BBB を介した血管性脳浮腫を抑制する。

MRI により、海馬領域において PILO-SE 後 2 日以内に BBB 透過性亢進により発症した血管原性脳浮腫が、GRS 投与により発症または進行を阻害することが示された。

2. GRS は、SE 後の特定の脳領域の水量含量増加を抑制する。

血管形成性脳浮腫が最初の 2 日間の SE 後の海馬で発症したことが再確認され、SE 直後に GRS の連続投与により、発症初期段階で抑制された。

3. GRS は、PILO-SE マウスで見られる AQP の mRNA 発現を抑制する。

海馬での *Aqp4* mRNA の発現を誘導し、それが BBB 障害を引き起こし、最終的に血管原性脳浮腫の形成につながることを示していました。GRS は SE による海馬の AQP4 のアップレギュレーションを阻害することにより神経保護作用が示唆され、AQP の抑制が SE 後の脳浮腫発症を抑制した。

4. GRS は、SE 誘発血管内皮増殖因子(VEGF)および炎症関連遺伝子の mRNA 発現を抑制する。

GRS の投与が SE 後の angiopeitin-2、CD31 発現上昇により BBB 不完全形成血管新生が誘発されること、さらに VEGF-A/VEGFR2 シグナル伝達経路の誘導を阻害し、BBB 透過性の維持と脳浮腫形成の制御に関与していることが示唆された。さらに、脳内炎症マーカー Pentraxin3 の顕著な上昇が認められた。その時期に一致してミクログリアや脳内浸潤マクロファージが海馬で活性化し、多くの炎症性サイトカイン(IL-1 β , IL-6, TNF- α 等)が高発現した SE 誘発脳内サイトカインストームが出現することが観察された。GRS は、このサイトカインストームを顕著に制御した。

5. GRS 単独投与では、SE 後のてんかん性発作波(EEG)と自発発作(SRS)を抑制しない。

GRS は、24 時間ビデオ脳波長期測定により、てんかん性発作波と SRS 発症は

顕著な抑制効果は認められなかった。GSR 単独投与では、脳内炎症関連反応は抑制するにも関わらず、発作を抑制する効果は限定的であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishihara Yasuhiro, Itoh Kouichi, Tanaka Miki, Tsuji Mayumi, Kawamoto Toshihiro, Kawato Suguru, Vogel Christoph F. A., Yamazaki Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Potentiation of 17 β -estradiol synthesis in the brain and elongation of seizure latency through dietary supplementation with docosahexaenoic acid	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6268 ~ 6279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06630-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Miki, Ishihara Yasuhiro, Mizuno Shodo, Ishida Atsuhiko, Vogel Christoph F., Tsuji Mayumi, Yamazaki Takeshi, Itoh Kouichi	4. 巻 496
2. 論文標題 Progression of vasogenic edema induced by activated microglia under permanent middle cerebral artery occlusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 582 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤康一、石原 康宏
2. 発表標題 てんかん原性形成における免疫細胞動態 - サイトカインストームとの関連性 -
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野智海、小澤千尋、松尾 平、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 重積発作後てんかん原性初期の海馬内脳内炎症関連遺伝子の解析
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤千尋、河野智海、松尾 平、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 CAGE-seq法を用いた重積発作後てんかん原性初期の海馬内遺伝子変化
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤康一、松尾 平、石原 康宏
2. 発表標題 重積発作後の脳内サイトカインストームと抗てんかん薬
3. 学会等名 第13回日本てんかん学会中国・四国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 康一、橋本律香、久保静香、松尾平、小森理絵、水野翔童、石原 康宏
2. 発表標題 てんかん原性初期における脳内炎症関連サイトカインのプロファイル
3. 学会等名 日本薬学会第138 年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 康一、橋本律香、久保静香、松尾平、小森理絵、水野翔童、石原 康宏
2. 発表標題 症候性てんかん原性脳内における炎症関連分子発現プロファイリング
3. 学会等名 第70回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	石原 康宏 (Ishihara Yasuhiro) (80435073)	広島大学・統合生命科学研究科(総)・准教授 (15401)	