

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591671
 研究課題名（和文） ラット辺縁系てんかんモデルにおける細胞療法と併用した定位的脳深部刺激療法の開発
 研究課題名（英文） The development of stereotactic deep brain stimulation and cell therapy for limbic seizure in rat
 研究代表者
 梶田 泰一 (KAJITA YASUKAZU)
 名古屋大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：70303617

研究成果の概要：

カイニン酸を、右海馬に定位的に注入し、辺縁系てんかんモデルを作成した。コントロール群は、両側深部電極と両側前頭部電極脳波記録にて、深部電極のみで発作波を記録する部分発作と、両側前頭部の硬膜外電極に発作波が伝わる全般化した発作が記録された。視床下核を深部刺激すると、発作の2次性全般化を抑制した。骨髄間質細胞を海馬に移植後、視床下核を深部刺激したが、部分発作には、有意な変化はなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：てんかん、脳深部刺激療法、細胞療法、視床下核学

1. 研究開始当初の背景

てんかん発作は、脳内の神経細胞の異常な電氣的興奮に伴って痙攣や意識障害などが発作的に出現する慢性的な疾患である。異常な電氣的興奮が生じる原因については、古くより電気生理学的、生化学的、分子学的手法を用いて研究が続けられているが、未だ不明である。てんかん発作の治療は、まず発作型に

適した抗てんかん薬を選択し、十分量を使用することから開始される。しかしながら、抗てんかん薬にて発作のコントロールが困難な患者は本邦全てんかん患者（推定約100万人）の約30%とも考えられ、今も日常生活に多大な支障をきたしている。焦点性の発作起始を認め、てんかん原性領域が推定されれば切除外科の適応となるが、脳切除に伴う後

遺症の出現の可能性がある。あるいは、重要な脳機能部位が発作起始に関与している場合には、外科治療が困難となる。一方、脳深部刺激療法は、パーキンソン病などの神経変性疾患、中枢性疼痛症などにひろく臨床応用される安全な治療法である。抗てんかん薬にて発作のコントロールが困難な難治性てんかん患者さんに対する新しい治療法が期待されているなかで、根治療法への礎となりうる細胞療法と、脳深部刺激療法を併用する治療法の有用性を検討した。

2. 研究の目的

脳深部刺激療法は、脳内で異常な電氣的興奮性を示している部位を同定し、細い電極を正確に留置して、微細な電流を流して、脳神経の異常な興奮を正常化させる治療法である。現在、不随意運動、難治性疼痛、強迫神経症、鬱病などの様々な神経疾患に応用され、成果をあげている。特に、振るえ、無動、固縮などで発症するパーキンソン病においては、抗パーキンソン病薬を服用しても、徐々に症状が悪化したり、薬の副作用によって十分な内服ができない患者さんに対して、視床下核に治療用電極を留置して、電気刺激する治療法がひろく行なわれている。この脳深部刺激療法を難治性てんかんの治療に応用する試みはあるものの、まだ日本においては臨床に至っていない。近年、大脳の基礎的研究により視床下核と大脳皮質間に直接的なネットワークが存在することが明らかとなり、視床下核と大脳皮質の活動の関係が注目されている。一方、てんかん発作を生じる焦点（てんかん原性領域）に共通する所見として、脳代謝機能の低下や、神経細胞の脱落があることが知られている。このような、機能的及び組織学的異常を正常化することで、発作をコントロールすることは、脳機能低下を決してもたらさない最も理想的なてんかん治療と考える。今回、上記2治療を組み合わせた新しい治療法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Sprague-Dawleyラットには、両側前頭部硬膜外及び両側海馬に深部電極を留置し、脳波モニターがなされた。

(2) 脳深部刺激療法の目標部位は、1) 視床下核刺激群、2) 黒質網様体群、3) 視床前核群に分類される。それぞれに、適切に刺激電極が留置されたことは、微小電極による単一神経活動記録を行うことで確認される。刺激条件は、不随意運動が誘発されない範囲で、刺激頻度、幅はそれぞれ130Hz, 60 μ secに設定される。

(3) 辺縁系てんかんモデルは、カイニン酸10mg/kgを、右海馬に定位的に注入し、作成

する。カイニン酸を注入1時間後より、4チャンネル脳波記録が持続的に施行される。脳波記録において、発作波が、海馬に留置された一側、もしくは両側深部電極記録のみで記録された場合には、局所発作とし、両側前頭部の硬膜外電極に発作波が伝播した場合、2次性全般化したと判断する。ラットの行動評価は、脳波記録と同時に開始される。ラットの行動評価は、脳波記録と同時に開始される。発作は、1, eye closure and masticatory movements; stage 2, head nodding; stage 3, mild forelimb clonus; stage 4, clonus with rearing; stage 5, clonus with rearing and fallingの5段階で評価される。

(4) 一側（カイニン酸注入側と同側）深部刺激を同じ刺激条件で、視床下核、黒質網様体、視床前核にくわえることによる、それぞれの目標部位による2次性全般化発作の抑制効果を比較検討する。従って、深部刺激部位により1) 視床下核刺激群、2) 黒質網様体群、3) 視床前核群に大別され、カイニン酸注入後より、持続的刺激が開始された治療群と非治療群に分類されるため、計6グループ間での比較検討がなされる。

(5) 骨髄間質細胞の定位的移植による神経細胞保護効果の検討する。骨髄間質細胞の培養は、ラット大腿/脛骨より無菌的に採取された骨髄を分離後、0.84%NH₄Clによって赤血球を除去する。その後2X10⁶ nucleated marrow cellsを5ml Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) with 10% fetal bovine serumで培養すると、骨髄間質細胞はflaskに癒着、さらに新しいflaskと培養液で3 passages、incubaterで培養される。

(6) 骨髄間質細胞は定位的に海馬に移植される。移植する部位、及び時期により下記の6グループに分けられる。右海馬にカイニン酸を注入する1日前に移植、2) 右海馬にカイニン酸注入1日後に移植、3) 右海馬にカイニン酸注入3日後に移植、とグルーピングされる。3群においてそれぞれ、定位的移植後、2、3、4週間後に深部刺激術後と同様に評価される。

4. 研究成果

(1) コントロール群においては、カイニン酸を右海馬に注入後、海馬深部電極から発作波が記録される局所発作および両側前頭部より発作波が記録される全般化発作が観察されるラット辺縁系モデルが作成された。

(2) 脳深部刺激治療群においては、1) 視床下核群 2) 黒質網様体群、3) 視床前核群いずれの群においても、脳波上および発作様式上において、部分発作に有意な抑制効果はなかつ

た。

(2) 刺激条件を、80-100 microA 130Hz, 60 μ secsに設定すると、視床下核群においては2次性全般化を抑制した。一方、黒質網様体群においては、有意な抑制効果を認めなかった。

(3) 培養された骨髄間質細胞を、右海馬に、定位的に移植し、その生着を組織学的に観察した。

(4) 培養骨髄間質細胞を右海馬にカイン酸を注入する1日前に移植、2) 右海馬にカイン酸注入1日後に移植、3) 右海馬にカイン酸注入3日後に移植し視床下核刺激治療を追加すると、いずれの群においても脳波上及び発作観察上において、2次性全般化を有意に抑制した。

(5) 培養骨髄間質細胞を右海馬に移植し脳深部刺激療法を併用すると、部分発作において、コントロール群と比較して、発作回数や持続時間に減少傾向を認めたが、有意な差にはいたらなかった。

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 19 件)

1. Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, Fujii M, Shimato S, Ito M, Ohno M, Ito S, Ogura M, Yoshida J. p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. *Neurosurgery* 2009;64:455-61; discussion 61-2. 査読有
2. Oi S, Natsume A, Ito M, Kondo Y, Shimato S, Maeda Y, Saito K, Wakabayashi T. Synergistic induction of NY-ESO-1 antigen expression by a novel histone deacetylase inhibitor, valproic acid, with 5-aza-2'-deoxycytidine in glioma cells. *J Neurooncol* 2009;92:15-22. 査読有
3. Ohno M, Natsume A, Fujii M, Ito M, Wakabayashi T. Interferon-beta, MCNU, and conventional radiotherapy for pediatric patients with brainstem glioma. *Pediatr Blood Cancer* 2009. 査読有
4. Ito M, Natsume A, Takeuchi H, Shimato S, Ohno M, Wakabayashi T, Yoshida J. Type I Interferon Inhibits Astrocytic Gliosis and Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury by Deactivation of the MEK/ERK Pathway. *J Neurotrauma* 2009;26:41-53. 査読有
5. 梶田泰一、てんかんの手術適応、現代医学、査読無、58:59-67, 2008
6. Wakabayashi T, Natsume A, Hashizume Y, Fujii M, Mizuno M, Yoshida J. A phase I clinical trial of interferon-beta gene therapy for high-grade glioma: novel findings from gene expression profiling and autopsy. *J Gene Med* 2008;10:329-39. 査読有
7. Wakabayashi T, Kayama T, Nishikawa R, Takahashi H, Yoshimine T, Hashimoto N, Aoki T, Kurisu K, Natsume A, Ogura M, Yoshida J. A multicenter phase I trial of interferon-beta and temozolomide combination therapy for high-grade gliomas (INTEGRA Study). *Jpn J Clin Oncol* 2008;38:715-8. 査読有
8. Shimato S, Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Nakahara N, Ishii J, Ito M, Akatsuka Y, Kuzushima K, Yoshida J. Identification of a human leukocyte antigen-A24-restricted T-cell epitope derived from interleukin-13 receptor alpha2 chain, a glioma-associated antigen. *J Neurosurg* 2008;109:117-22. 査読有
9. Natsume A, Yoshida J. Gene therapy for high-grade glioma: current approaches and future directions. *Cell Adh Migr* 2008;2:186-91. 査読有
10. Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, Kondo Y, Sekido Y, Kawatsura H, Narita Y, Yoshida J. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer* 2008;122:2542-53. 査読有
11. Natsume A, Wakabayashi T, Ishii D, Maruta H, Fujii M, Shimato S, Ito M, Yoshida J. A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61:653-9. 査読有
12. Gao W, Kondo Y, Shen L, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Natsume A, Goto Y, Ito M, Murakami H, Osada H, Zhang J, et al. Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2008;29:1901-10. 査読有
13. Tsuno T, Natsume A, Katsumata S, Mizuno M, Fujita M, Osawa H, Nakahara

- N, Wakabayashi T, Satoh Y, Inagaki M, Yoshida J. Inhibition of Aurora-B function increases formation of multinucleated cells in p53 gene deficient cells and enhances anti-tumor effect of temozolomide in human glioma cells. *J Neurooncol* 2007;83:249-58. 査読有
14. Takeuchi H, Natsume A, Wakabayashi T, Aoshima C, Shimato S, Ito M, Ishii J, Maeda Y, Hara M, Kim SU, Yoshida J. Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner. *Neurosci Lett* 2007;426:69-74. 査読有
15. Shimato S, Natsume A, Takeuchi H, Wakabayashi T, Fujii M, Ito M, Ito S, Park IH, Bang JH, Kim SU, Yoshida J. Human neural stem cells target and deliver therapeutic gene to experimental leptomeningeal medulloblastoma. *Gene Ther* 2007;14:1132-42. 査読有
16. Nakane Y, Natsume A, Wakabayashi T, Oi S, Ito M, Inao S, Saito K, Yoshida J. Malignant transformation-related genes in meningiomas: allelic loss on 1p36 and methylation status of p73 and RASSF1A. *J Neurosurg* 2007;107:398-404. 査読有
17. Ito M, Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, Fujii M, Yoshida J. Genetically heterogeneous glioblastoma recurring with disappearance of 1p/19q losses: case report. *Neurosurgery* 2007;61:E168-9; discussion E9. 査読有
18. Ishii J, Natsume A, Wakabayashi T, Takeuchi H, Hasegawa H, Kim SU, Yoshida J. The free-radical scavenger edaravone restores the differentiation of human neural precursor cells after radiation-induced oxidative stress. *Neurosci Lett* 2007;423:225-30. 査読有
19. Ishii D, Natsume A, Wakabayashi T, Hatano H, Asano Y, Takeuchi H, Shimato S, Ito M, Fujii M, Yoshida J. Efficacy of temozolomide is correlated with 1p loss and methylation of the deoxyribonucleic acid repair gene MGMT in malignant gliomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2007;47:341-9; discussion 50. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 梶田 泰一 Image-guided epilepsy surgery 11th European Conference on Epilepsy and Society 平成 20 年 10 月 17 日、フランス・マルセイユ
2. 梶田 泰一 側頭葉てんかんの外科治療 側頭葉てんかん研究会、平成 19 年 12 月 1 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田 泰一 (KAJITA YASUKAZU)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70303617

(2) 研究分担者

夏目 敦至 (NATSUME ATSUSHI)
名古屋大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：30362255