

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08256

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞移植を用いた難治性てんかんに対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapies for intractable epilepsy with bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

福村 忍 (Fukumura, Shinobu)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30718341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既にてんかんをきたした慢性期けいれん重積動物モデルに対して、骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)治療を行うことで、てんかんの抑制効果を有するかを検討した。リチウム-ピロカルピンによるけいれん重積後にてんかんを発症したラットに対して、けいれん重積後60日目に、MSCもしくはvehicle(DMEMのみ、細胞なし)を経静脈的に投与した。MSC投与群はvehicle投与群に比べ、てんかん発作減少効果およびガンマ帯域の減少効果を認めた。MSCは、けいれん重積後の慢性期にてんかんに対し、けいれん数および脳波上の興奮性を軽減させるに有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の抗てんかん薬は、けいれん発作を抑えるが、形成された異常神経回路(てんかん回路)を正常化する治療法ではないため、治療の長期化や認知機能への影響が問題となっており、より根本的で有効な治療法が望まれている。我々はすでに、けいれん重積後の急性期に骨髄間葉系幹細胞を移植により、てんかん発作予防効果および認知機能低下予防効果を示した。さらに本研究によりけいれん重積後の慢性期に骨髄間葉系幹細胞を移植により、てんかん発作の減少および脳波改善効果を示した。新たなてんかん治療薬候補となるだけでなく、今後てんかん回路を改善させるメカニズムを明らかにすることで、新たな創薬ターゲットにつながる成果である。

研究成果の概要(英文)：The present study tested the hypothesis that systemically infused mesenchymal stem cells (MSCs) improve epilepsy in a rat model of chronic epilepsy. Status epilepticus (SE) was induced using the lithium-pilocarpine injection. MSCs or vehicle (DMEM only, no cells) were administered intravenously to rats with chronic epilepsy on the 60th day after lithium-pilocarpine-induced SE. The number of seizures was lower in the MSC-treated group than in the vehicle-treated group. Furthermore, frequency analysis demonstrated that the percentage of gamma-band on the electroencephalography was also lower in the MSC-treated group than in the vehicle-treated group. These suggest that MSCs effectively reduced the number of seizures and excitability in the chronic phase of epilepsy.

研究分野：てんかん

キーワード：てんかん 再生医療 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは有病率が1%と頻度の高い神経疾患であり、その病態メカニズムは、1、興奮性伝達が抑制性伝達よりも相対的に優勢になることにより過剰な異常放電が生じ(抑制ニューロンの消失)、2、繰り返す異常放電により、脳内に興奮しやすい回路が形成される(異常神経回路形成)こととされている。

実際に、頻度の高い内側側頭葉てんかんでは、幼少期に痙攣を繰り返すことにより、抑制系のGABAニューロンの脱落とともに、異常苔状線維萌芽といった興奮回路(てんかん回路)の再構築が起きることで、後にてんかんを発症することが知られている。

従来の抗てんかん薬による薬物治療は、発作を抑える対症療法が主で、異常神経回路を正常化させることはできないため、長期服用が必要となる。そのため、怠薬などによる発作誘発が交通事故につながることもあり、昨今、大きな社会問題となっている。そのため、怠薬などによる発作誘発が交通事故につながることもあり、昨今、大きな社会問題となっている。またてんかんは、けいれん発作だけではなく、それに伴う認知機能異常も問題となっており、より根本的治療法が望まれている。外科的な焦点切除は、唯一の根本的解決方法として認知されているが、適応症例は限られる。

## 2. 研究の目的

近年、難治性神経疾患に対する細胞移植療法が注目されている。我々は今までに経静脈的に移植された骨髄幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSC)が多くの神経疾患(脳梗塞、脊髄損傷、脱髄疾患、末梢神経損傷など)において治療効果を呈するという多くの報告を行ってきた。MSCによる治療メカニズムは、神経栄養因子を介した神経保護作用、抗炎症作用、血液脳関門の安定化、血管新生作用、神経軸索のsprouting、再有髄化、神経可塑性の亢進、神経系細胞への分化などが多段階に時間経過とともに生ずることによって治療効果を発揮すると考えている。

てんかんモデルにおいては、先行研究(fukumura et al., 2018)で、MSCの静脈投与はけいれん重積後のてんかん予防、認知機能低下予防に有効である可能性が示唆された。けいれん重積後の急性期に静脈内投与したMSCは海馬に集積し、海馬歯状回門における抑制系GABAニューロンの減少を軽減させ、また海馬CA3における錐体細胞の減少を軽減させることで異常苔状線維萌芽を抑制させ、てんかん原性形成を減少させた。さらに海馬における神経細胞減少を軽減させることで、認知機能低下は抑制された。

本研究では、てんかんモデルの慢性期にMSCを経静脈的に移植することにより、MSCのてんかんの治療効果の検討を行う。また、その機序として、MSCが形成された異常神経回路を正常化するメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、既に発症したてんかんに対するMSC治療の有効性をてんかん治療の観点から、けいれん重積後にてんかん発作を形成したラットに対し、MSCを経静脈的に投与し、てんかん発作の減少効果を検討した。

<けいれん重積後てんかんモデル：リチウム-ピロカルピンモデル>

成体ラット (SD、6W、雄) に、Lithium 127 mg/kg を腹腔内投与 20 時間後に Pilocarpine hydrochloride 10 mg/kg 腹腔内投与し、けいれん重積が生じるまで 30 分毎に 10 mg/kg ずつ追加投与した。重積開始 60 分後にジアゼパム 5 mg/kg を腹腔内投与しけいれんを頓座させた。概ね 2 週間後から自発けいれんが生じ、慢性てんかんモデルとした。

けいれん重積から 2 週間経たところ (8 週齢) で、硬膜下電極を埋め込みを行った。ブレグマより前後 2 mm、左右 3 mm のところに Bis を埋込み、硬膜下電極とした。双極縦誘導として、脳波測定を行った。

重積後 50 - 55 日の間の 24 時間で行った。持続脳波モニタリングにより睡眠時てんかん波 (脳波上、バックグラウンドの活動とは無関係に 100  $\mu$ V を超える振幅を持つパースト波) の検出を行った。さらにテレビモニターによるけいれん発作 (Racine スケールで 3 以上) をカウントした。けいれん重積後 60 日目に、群間でてんかん波およびけいれん発作数が同程度になるように 2 群に分け、一方に MSC 1.0  $\times$  10<sup>6</sup> /  $\mu$ L 1ml を、もう一方に対照として vehicle (DMEM のみ、細胞なし) を同量経静脈的に投与した。MSC 治療後に けいれん発作数、 潜在発作数 (臨床症状を伴わない脳波上の律動波が 10 秒以上続くもの)、 睡眠発作間欠期の 1 時間あたりのてんかん波数をカウントした。また 周波数解析を行い、D: デルタ (0.5 - 4 Hz)、T: シータ (4 - 8 Hz)、A: アルファ (8 - 13 Hz)、B: ベータ (13 - 30 Hz) 周波数の割合を各群で比較検討した。さらに投与後の評価として、重積後 91-95 日 (投与 31 - 35 日後) で、けいれん発作カウントおよび脳波測定を行い、同一個体の投与前と比較し検討した。

#### 4 . 研究成果

MSC 群 (N = 8) の対象として、けいれんなし (Intact : 正常) 群 (N = 8)、けいれん重積 + DMEM 同量投与 (Vehicle) 群 (N = 8) をおいた。Wilcoxon t-test および Mann-Whitney U-test で P < 0.05 を統計学的有意差ありとした。

##### (1) てんかん発作 (自発けいれん) 数の減少

重積後 55 日から 60 日まで (投与前)、重積後 91-95 日 (投与 31 - 35 日後) をそれぞれ 1 日 12 時間ビデオモニタリングし、自発けいれん数を Racine scale (けいれん重症度尺度) で計測した。けいれん数減少を各群で比較検討したところ、MSC 群は、Vehicle 群と比べ有意に減少していた。

##### (2) 睡眠発作間欠期の 1 時間あたりのてんかん波数

重積後 55 日から 60 日まで (投与前)、重積後 91-95 日 (投与 31 - 35 日後) をそれぞれ 1 日 12 時間ビデオ脳波モニタリングし、睡眠時 1 時間あたりの間欠期 Spike 数を計測した。間欠期 Spike 数減少を各群で比較検討したところ、MSC 群は、Vehicle 群と比べ、統計学的変化を認めなかった。

##### (3) 12 時間あたりの脳波上の潜在発作数

重積後 55 日から 60 日まで (投与前)、重積後 91-95 日 (投与 31 - 35 日後) をそれぞれ 1 日

12 時間ビデオ脳波モニタリングし、12 時間当たりの脳波上の潜在発作数を計測した。潜在発作数減少を各群で比較検討したところ、MSC 群は、Vehicle 群と比べ、減少傾向を認めた。

#### (4)周波数分析

重積後 55 日から 60 日まで（投与前）、重積後 91-95 日（投与 31 - 35 日後）をそれぞれ 1 日 12 時間ビデオ脳波モニタリングし、睡眠時 1 時間当たりの周波数分析を行った。MSC 群は、Vehicle 群、および正常群で各周波数割合を求め、デルタ域の割合を各群で比較検討したところ、MSC 群は、Vehicle 群と比べ、デルタ域の割合の減少を認めた。

MSC は、けいれん重積後の慢性期のでんかんに対し、けいれん数および脳波上の興奮性を軽減させるに有効であると考えられた。今後は、海馬苔状線維萌芽の検出を目的としたマンガン造影 MRI、全脳におけるてんかん異常神経回路の検出を目的とした Ex vivo MRI Diffusion Tensor Tractography を行う。さらに、組織学的に Timm 染色（海馬苔状線維萌芽）、海馬の神経細胞および GABA ニューロンの定量的評価のための NeuN および GABA 合成酵素免疫染色を行い、MSC の慢性てんかん治療効果のメカニズムの解明を行う。また認知および社会行動評価に目的に、モリスの水迷路試験、オープンフィールド試験を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	佐々木 祐典  (Sasaki Masanori)  (20538136)	札幌医科大学・医学部・准教授    (20101)	
研究分担者	本望 修  (Honmo Osamu)  (90285007)	札幌医科大学・医学部・教授    (20101)	
研究分担者	寺田 光次郎  (Terada Kojiro)  (80843531)	札幌医科大学・医学部・研究員    (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関