

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791349

研究課題名（和文）新規てんかん治療法の開発をめざして  
～脳内亜鉛のてんかん原性獲得への関与の解析～

研究課題名（英文）The role of zinc in seizure-induced epileptogenesis

研究代表者

東 洋一郎（HIGASHI YOUICHIROU）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：80380062

研究成果の概要（和文）：亜鉛はマウスに投与することで発作後に惹起される海馬の神経新生を部分的に制御し脳機能を保護する一方で、ミクログリアは細胞外亜鉛を取り込むことで活性化することが明らかになり、亜鉛がてんかん原性化に対して多様な効果を示す重要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined whether zinc effects on seizure-induced neurogenesis in mouse hippocampus, and determined whether zinc uptake is necessary for activation of microglia from which inflammatory mediators contribute to decrease in the threshold to seizures. Zinc pretreatment resulted in partially suppression of neurogenesis in the dentate gyrus of hippocampus, and protected mice from seizure-induced cognitive decline. Additionally, extracellular zinc was uptaken by microglia through zinc transporters and induced morphological changes characterized by activated microglia. These results suggest that zinc may be an important factor associated with epileptogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは「大脳神経細胞の過剰な放電による反復発作」を主徴とする慢性脳疾患である。現在では、多くの抗てんかん薬が開発され、てんかん治療の第一選択は薬物療法である。また、昨今、新しい抗けいれん薬の使用が認められるようになった。しかし、てんか

ん薬はその発作を抑えることはできるが、てんかん原性の要因である脳の構造異常や脳内の細胞や分子の異常を正常に戻したり、阻止することはできない。このようなことから、近年、てんかん原性を抑制することを目指した全く新しい概念の治療法や治療薬の開発の必要性が認識されているが、抗てんかん原

性薬の開発は未だ成功に至っていない。

## 2. 研究の目的

てんかん発作の増悪化や神経細胞死に関わることが報告されている脳内亜鉛に着目して、脳内亜鉛がてんかん原性に関与しているか否かを明らかにし、さらに脳内亜鉛が関与するてんかん原性獲得機序を分子レベルで詳細に解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 予め亜鉛を投与しておいたマウスにピロカルピンを用いて発作を誘発し、てんかん原性化の要因となる神経新生異常について抗 doublecortin 抗体を用いた免疫組織化学染色法により検討し、海馬領域の BDNF、NGF、NT3、FGF2 の発現変化についてはリアルタイム RT-PCR 法で検討した。また、発作後の認知機能の低下に関しては物体認識試験により検討した。

(2) マウス由来初代培養ミクログリアを用いて、亜鉛によるミクログリアの活性化誘導の機序を解明するため、PARP-1 と NADPH oxidase の活性化をそれぞれ抗 PAR 抗体を用いた免疫細胞染色法と DHE の蛍光発光により検討した。さらに細胞外亜鉛の取り込みを<sup>65</sup>Znを用いて検討し、細胞外への ATP 放出はヘキソキナーゼとグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼの酵素反応、Zip1 の発現はリアルタイム RT-PCR 法、ヘミチャネルと P2X7 受容体の関与について、それぞれの阻害剤またはアンタゴニストやアゴニストを用いて解析した。

(3) 頭部外傷モデルマウスを weight-drop 法により作成し、直後にエダラボンを投与することで軸索損傷と酸化ストレスの発生を抗 APP 抗体と抗 8-OHdG 抗体を用いた免疫組織化学染色法により検討した。さらに認知機能については、物体認識試験により解析した。

## 4. 研究成果

(1) マウスにピロカルピンを用いて発作を誘発すると、海馬顆粒細胞層と下顆粒細胞層における神経新生が誘導され、歯状回門において異所性の神経新生が惹起される。また、発作後に海馬の苔状繊維の異常発芽も誘導される。今回、予め亜鉛を投与したマウスに同様に発作を誘発したところ、発作2週間後の海馬顆粒細胞層と下顆粒細胞層の神経新生誘導は有意に抑制されたが、歯状回門における異所性の神経新生誘導は抑制することが出来なかった。また、亜鉛投与は苔状繊維の異常発芽に対して効果が認められなかつ

た(図1)。また、神経新生に関与する神経栄養因子(BDNF、NT3、NGF、FGF2)の海馬領域における mRNA レベルの発現を検討したところ、亜鉛非投与群では発作1日後に BDNF と FGF2 の発現が増加し NT3 と NGF の発現が減少していた。その一方で、亜鉛投与群では BDNF の発現誘導が抑制されていた。その他の神経栄養因子に関しては亜鉛投与の効果は認められなかった。これらの結果は、亜鉛投与が発作後の BDNF 発現誘導を抑制することで顆粒細胞層と下顆粒細胞層における神経新生誘導を抑制した可能性が考えられる新しい知見である。

てんかん発作後に認知機能障害が惹起されることはよく知られている。ピロカルピンによるてんかん発作誘発後、亜鉛非投与群では学習・記憶能力が低下していたが、亜鉛投与群ではその低下が抑えられていた。この結果は、亜鉛投与が発作後の認知機能障害、特に学習・記憶能力の低下に対する治療薬になりうる可能性を示した大変興味深い知見である。

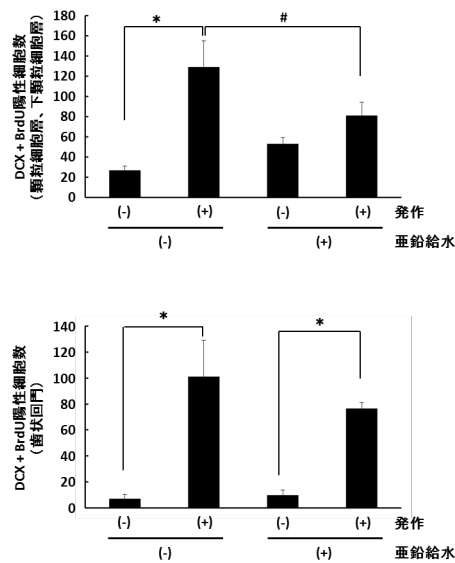


図1 発作後の神経新生に対する亜鉛給水の効果

(2) Resting ミクログリアは突起を枝状に伸ばした特徴的な形態をしているが、活性化するとアメーバ状の形態へと変化する。今回、resting ミクログリアに対し、細胞膜透過型亜鉛キレート剤である TPEN または BAPTA-AM を亜鉛に特異的とされる濃度で前処置したところ、亜鉛によるミクログリアの形態変化ならびに NADPH oxidase および PARP-1 の活性化が抑制された。次に、ミクログリアによる亜鉛取り込み機構を放射標識した亜鉛を用いて精査した。細胞外に亜鉛を添加したと

ころ、37°Cにおいて細胞内亜鉛量は反応時間に依存して増加したが、0°Cでは変化しなかった。また、この取り込みの速度論的解析の結果、ミクログリアによる亜鉛取り込みには少なくとも2つの輸送系が関与することが示された。ミクログリアにおける亜鉛トランスポーターである ZIP ファミリーの発現を調べたところ、細胞膜に分布する ZIP1 とゴルジ体に分布する ZIP7 の発現が最も多く、ZIP1 の良好な基質阻害剤であるニッケルはミクログリアによる亜鉛取り込みに対して *cis*-および *trans*-inhibition 効果を示した。さらに亜鉛添加した後のミクログリア細胞外液中の ATP 濃度が経時的に上昇し、TPEN はこれを抑制することを見出した。非選択的 hemichannel 阻害剤である carbenoxolone は、TPEN の場合と同様に、この細胞外 ATP 濃度の上昇、さらに亜鉛によるミクログリアの形態変化ならびに NADPH oxidase および PARP-1 活性化を抑制した。亜鉛刺激によりミクログリア細胞外へ放出された ATP によるミクログリアの活性化機構を明らかにするため、P2 受容体の発現を検討した。マウス初代培養ミクログリアにおいて、P2X1、P2X4、P2X7、P2Y2、P2Y6 および P2Y12 受容体が高発現することが確認され、亜鉛によるミクログリアの形態変化ならびに NADPH oxidase および PARP-1 の活性化は、P2X7 受容体の選択的拮抗剤である oxATP によって抑制された。また、P2X7 受容体の特異的的刺激剤である BzATP は、亜鉛の場合と同様にミクログリアの活性化を惹起した。以上の結果から、ミクログリア活性化因子の一つである亜鉛は、ZIP1 を介してミクログリア内に取り込まれることで hemichannel を介した細胞外 ATP 放出を誘導し、オートクラインまたはパラクライン的に P2X7 受容体を活性化することで、NADPH oxidase および PARP-1 を活性化し、ミクログリアを活性化することが示された (図 2)。

この亜鉛による活性化経路は全く新しい亜鉛誘導細胞内シグナル伝達経路であり、ATP はミクログリアの走化性を惹起することから、亜鉛がミクログリアの走化性を制御する因子の一つである可能性が考えられる。この亜鉛によるミクログリアの走化性誘発が、脳傷害時の神経細胞死に対してどのような役割を担うかは不明であるが、その解明はミクログリアを標的とした脳虚血などに対する新しい治療法の開発に繋がるものと期待される。

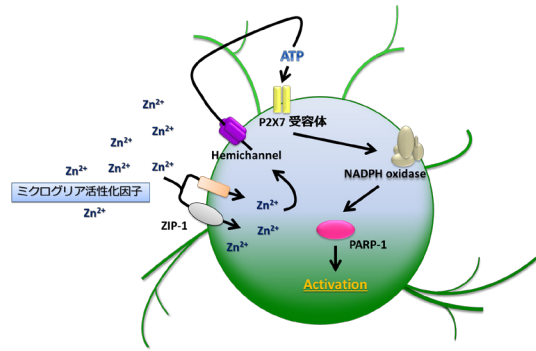


図 2 亜鉛によるミクログリアの活性化経路

(3) 頭部外傷後てんかん原性化について検討する目的で、weight-drop 法により頭部外傷モデルを作成した。頭部外傷 1 日後の sham 群、頭部外傷群の両群に顕著な組織学的な損傷や硬膜下血腫、大脳皮質および脳梁、海馬における出血は認められなかった。頭部外傷 1 日後の大脳皮質や脳梁、海馬の神経細胞では膨張した軸索ならびに核周辺に局所的な APP 陽性シグナルが顕著に認められた。頭部外傷直後のマウスにエダラボンを投与したところ、頭部外傷モデルマウスの大脳皮質ならびに脳梁、海馬では外傷によって惹起される軸索や核周辺の顕著な APP の蓄積が減少し、sham 群とほぼ同じであった。また、頭部外傷 1 日後の大脳皮質、脳梁、海馬において顕著な 8-OHdG 陽性細胞が認められ、エダラボン投与により 8-OHdG 陽性細胞が減少して、sham 群とほぼ同程度になった。頭部外傷 8 日後の認知機能傷害に対するエダラボンの効果を検討したところ、頭部外傷+saline 投与群は物体認識能力が低下していたが、頭部外傷+エダラボン投与群は sham 群とほぼ同程度の物体認識能力であった。

以上の結果から、エダラボンはラジカルスカベンジャーとして機能して閉鎖性頭部外傷による軸索損傷を抑制し、さらに認知機能障害に対しても有用な治療薬になりうることを示した興味深い知見である。今後はこのモデルマウスを用いて、頭部外傷後てんかん原性化の機序と亜鉛の関与について検討していく計画である。

## 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1件)

- ① Youichirou Higashi, Shohei Segawa, Takaaki Matsuo, Shogo Nakamura, Yukiko Kikkawa, Kentaro Nishida, Kazuki Nagasawa. Microglial zinc uptake via zinc transporters, induces ATP release and the activation of microglia. *Glia*, 査読有, 59, 2011, 1933-1945

[学会発表] (計4件)

- ① 東 洋一郎、てんかん発作による海馬歯状回神経新生異常に対する亜鉛投与の効果、第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ② 東 洋一郎、てんかん発作による海馬歯状回神経新生異常に対する亜鉛投与の効果、日本薬学会第131年会、2011年3月30日、学会中止のため要旨集にて発表成立
- ③ 東 洋一郎、てんかん発作による海馬歯状回神経新生異常に対する亜鉛投与の効果、第44回日本てんかん学会、2010年10月15日、岡山コンベンションセンター(岡山県)
- ④ 東 洋一郎、てんかん発作による海馬歯状回神経新生異常に対する亜鉛投与の効果、第33回日本神経科学大会、2010年9月4日、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 洋一郎 (HIGASHI YOUICHIROU)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：80380062