

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592106

研究課題名(和文) てんかん原性を獲得する神経細胞を、活動を減弱させ細胞死へ誘導することができるか？

研究課題名(英文) Inflammatory pathways control role in epileptogenic neurogenesis

研究代表者

中島 円(Nakajima, Madoka)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50317450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではてんかんモデルマウスとヒト側頭葉てんかんの海馬(硬化症有、無)を用いて、炎症性メディエーターなどの脳内環境因子が、てんかん原性変化を有する異常興奮性神経細胞を不活化させ、神経細胞死を誘導し、てんかん原性となる内側頭葉に与える影響を観察した。てんかんに誘発させた動物に直後レベチラセタムを投与した群では、海馬で新生神経細胞が減少する現象が観察され、SV2Aがてんかん原性の成因に影響を与えることが判明した。またヒト海馬硬化症ではCA1、歯状回、海馬支台で細胞外に放出したHMGB1、Toll様受容体が観察され、局所的な炎症反応の増幅サイクルがあり、海馬硬化性変化に関与することが考察された。

研究成果の概要(英文)：Epileptic seizures cause continuous pathological and electrophysiological hippocampal (HIPP) changes, inducing epileptogenesis (EG). Control of this process has not been found until now. Aiming pharmacological control on induced EG, we evaluated treatment effect of levetiracetam (LEV) on pathological changes in epileptic mice HIPP where continuous LEV treatment suppressed epilepsy-induced neurogenesis. Preventive LEV treatment potentially inhibits such pathological changes. Cellular and molecular mechanisms of EG induction, however, remain unclear. Brain inflammatory mechanisms activation received recently broad attention as a factor in acquired EG. Our preliminary clinical study suggested elevated expression of HMGB1 and TLR4 in sclerotic HIPP, indicating HMGB1-TLR4 pathway involvement in human EG. More, in human EG HIPP, HMGB1 involved consequently TLR4, probably in relation to HIPP sclerosis induction (CA1> DG> CA2) and atrophy,

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：側頭葉てんかん てんかん原性 神経細胞新生 炎症メディエーター 海馬硬化症 パッチクランプ
トル様受容体

1. 研究開始当初の背景

海馬歯状回では成体になっても神経細胞の新生が続いている事象は、既にコンセンサスのある事実である。神経細胞新生は、虚血やてんかん発作などの刺激で誘発され、それらの侵襲による神経細胞壊死やアポトーシスによる神経細胞の脱落を補っていると考えられている。一方、海馬におけるてんかん原性獲得の機序には神経細胞新生が原因をなしているともいわれ、新生による神経細胞のターンオーバーの機構や意義については未だ不明な点が多い。

難治性てんかんの代表的疾患である海馬硬化症では、初回発作後の組織破壊につづく慢性的な病理組織学的・電気生理学的変化が発作の増悪と再発をもたらすことで海馬がてんかん原性を獲得し、難治化するとされている。病理学的変化には多様な要素が関与するが、我々は発作後の神経新生もまたてんかん原性に強く関与していると考え、先行研究で側頭葉てんかん患者より摘出海馬を用いて、神経細胞新生の確認と新生におよぼす環境因子の解析を行ない、またピロカルピンによるてんかんモデルマウスを用いて、てんかんによって惹起される海馬新生神経細胞の経時的变化を機能的・形態学的特徴を検証してきた(平成20~22年基盤研究)。具体的にはてんかん発作誘発24時間後に、レトロウィルスをベクターとし green fluorescent protein (GFP; Lewis and Emerman, 1994)を導入しマーキングされた細胞(EGFP)に対し、whole cell patch-clamp法にて発火パターンを直接記録し細胞興奮性を検討する観察をおこなっている。結果、誘発された多くの神経細胞は脆弱で自然消退するが、少数ながら易興奮性を獲得する新生細胞が存在し、この新生細胞はてんかん発作に惹起されたてんかん原性形成過程の主因のひとつであると考えている。

2. 研究の目的

てんかん発作が誘導する新生神経細胞は、どのような条件下(環境因子)で、慢性期肥大した突起など、形状の異なった神経細胞へと変性し異常発火活動を呈するのか検証し、逆にアポトーシスはどのような条件下で生じ、環境因子により誘導することは可能かを検討した。また難治性側頭葉てんかんにて焦点切除を行なったヒト海馬病変に対し、免疫学的な考察を行ない、海馬萎縮性変化における炎症性メディエーターの発現の相違を明らかにすることで、海馬硬化症の原因検索を行なった。本研究成果を基盤とし、薬剤投与や慢性炎症の抑止など脳内環境因子の干渉により、新生細胞の異常興奮性を不活化させ最終的に神経細胞死へと誘導する治療法を考慮し、新たなてんかん原性の形成を予防しててんかんの根治を目指す治療法を確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1)てんかん原性形成機序に関与する脳内環境因子として、シナプス終末のシナプス小胞蛋白に結合し神経伝達物質の放出を調整し抗てんかん作用を発揮するlevetiracetam (LEV)に着目した。てんかんモデル動物に初回発作誘発後からLEVを継続的に投与し、神経新生をはじめとする病的変化に影響を及ぼしうるかを検証した。8週齢のC57BL6雄マウスにピロカルピン(280mg/kg)を腹腔内投与し、けいれん重積(status epilepticus: SE)を誘発しててんかんモデル動物作成し、以下の3群を分類し比較検討を行なった。A:SE(+)-saline群ではSE誘発後、生理食塩水を5日間腹腔内投与、B:SE-LEV群ではSE誘発後、LEV(200mg/kg/day)を5日間腹腔内投与、C:SE(-)群ではピロカルピンを投与せず、生理食塩水を5日間腹腔内投与した。すべての動物はRacineの分類(Racine, 1972)に基づいてSEを判定後、ジアゼパム(DZP, 5mg/kg i.p.)にて発作を鎮静し、SE誘発から48時間後、GFPで標識したレトロウィルスを定位手術にて両側歯状回(DG)に注入しSE後の新

生細胞を可視化した後、SE誘発後14日での海馬検体を比較した。てんかん発作後の神経細胞は異所性遊走や樹状突起や軸索の異常な蛇行を示すことが知られるが、GFP陽性新生細胞を中心に3群間に免疫学的・形態学的な差違があるかを検証した。SE誘発後14日摘出した脳を4% paraformaldehydeにて還流固定後、冷凍脳組織を30 μm厚の冠状スライスにし、0.01M PBSにて切片を洗浄1.0% normal donkey serum、20% SEA block添加0.01M PBSにてblockingし一時抗体添加後、4 下overnight incubationを施行後、PBS-Triton下に二次抗体を添加し2時間bufferingを行なっている。一次抗体としてGFP、Doublecortin、GFAP、NG2を用い、顆粒細胞層と下顆粒層に存在しGFPとDoublecortinに共染色するものを新生ニューロンとし、GFPとNG2に共染色を示す細胞をオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell ; OPC) とした。それぞれの細胞数を顆粒細胞層(GCL)・下顆粒層(SGZ)とhilus層にあるもので区別し、計量、片側DGの平均GFP陽性細胞数を記録し、ANOVAを用いてマウス3群間で平均新生細胞数を解析した。

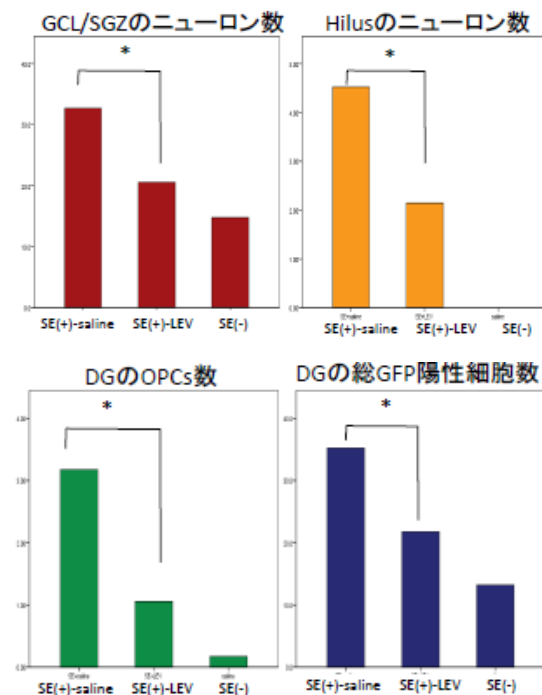
(2) 一方ヒト海馬病変に対する免疫組織学的な検討においては、難治性側頭葉てんかんの治療として海馬、側頭葉の摘出手術がおこなわれた21人(男:女比10:11、平均年齢35.4歳)を対象とした。MRI画像所見で海馬硬化が確認される11名(平均34.5歳)と判別困難であった10名(平均38.2歳)に分け、2群間の海馬CA1、CA2、DG、海馬支台(SC)各部位の免疫組織染色について以下のKluver-Barrera (KB)、GFAP、トル様受容体 (TLR4)、high-mobility group box-1 (HMGB1)、receptor for advanced glycation end products (RAGE)を比較解析した。

4. 研究成果

(1) 動物モデルによる実験結果では、形態上SE(-)群のdendritelはmolecular layer (ML)

にむかい放射状に伸展しており、正常な形態を呈していた。一方SE(+)-saline群のdendritelは蛇行し、一部の細胞ではSGZと並行に伸展する線維が認められた。

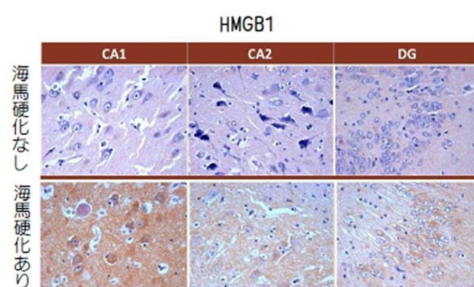
てんかん発作を誘発させた A; 対照群と比較し、B 群; SE-LEV 群の GFP 陽性細胞は、SE(-) 群とほぼ同様の形態を保つものが多く、DG における GFP 陽性新生神経細胞数が減少 ($P < 0.01$) しており、C 群; てんかん発作誘発 (-) との有意差は認められなかった。GFP、NG2 共陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞も同様にてんかん発作後の LEV 投与により有意に減少した。



LEV 持続投与は、てんかん発作に惹起される細胞新生に抑制的な影響を与え、てんかん動物モデルにおける海馬の病的変性に予防的な働きを持つ可能性が示唆された。

(2) またヒト側頭葉てんかんの海馬硬化群の皮質標本では、CA1>DG>CA2においてHMGB1、TLR4のextra nuclearの免疫反応が強く認められた。一方非海馬硬化群ではTLR4の発現は認められるものの、HMGB1は遍在グリアと神経細胞の核にわずかに検出されのみであった。てんかん発作を契機として、生体防御

機構を超えた侵襲を受けた細胞より HMGB1 が細胞外へ受動的に分泌され、細胞外に放出した HMGB1 は TLR の内因性リガンドとして働き、これによりさらなる炎症反応の増幅サイクルがおり、過剰に産生された制御不能な HMGB1 は致死性因子として働くのではと推察された。海馬硬化症では HMGB1 と TLR4 の免疫反応が増加しており、CA1、SC 等の海馬局所では慢性的に HMGB1 が働き、TLR/RAGE signaling pathway が関与し海馬硬化、海馬萎縮へ移行している可能性が見いだされた。



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 10 件)

1. M Nakajima, H Sugano, Y Iimura, T Higo, H Nakanishi, K Shimoji, K Karagiozov, M Miyajima, H Arai: Sturge-Weber syndrome with spontaneous intracerebral hemorrhage in childhood. J Neurosurg Pediatr.13(1):90-3, 2014 doi: 10.3171/2013.9.PEDS133.
2. Sugano H, Nakanishi H, Nakajima M, Higo T, Iimura Y, Tanaka K, Hosozawa M, Nijima S, Arai H: Posterior quadrant disconnection surgery for Sturge-Weber syndrome. Epilepsia. 2014. doi: 10.1111/epi.12547.
3. 菅野 秀宣, 中島 円, 肥後 琢磨, 飯村康司, 新井 一: てんかんの最新の治療法-神経調節法-. 臨床麻酔 37: 321-327, 2013
4. M Watanabe, M Miyajima, I Ogino, M Nakajima, H Arai: Cerebellar Purkinje Cells Exhibit Increased Expression of HMGB-1 and Apoptosis in Congenital Hydrocephalic H-Tx Rats, Neurosurgery 72: 459-467, 2013 doi: 10.1227/NEU.0b013e31827fcd83.
5. M Miyajima, M Nakajima, Y Motoi, M Moriya, H Sugano, I Ogino, E Nakamura, N Tada, M Kunichika, Y Hagiwara, H Arai: Leucine-rich alpha 2-glycoprotein is a novel biomarker of neurodegenerative disease in human cerebrospinal fluid and causes neurodegeneration in mouse cerebral cortex. PLOS ONE 18:8(9), 2013 doi:10.1371/journal.pone.0074453.
6. Hoshi K, Kariya Y, Nara K, Ito H, Matsumoto K, Nagae M, Yamaguchi Y, Nakajima M, Miyajima M, Arai H, Kuno A, Narimatsu H, Shirotani K, Hashimoto Y: Lectin-dependent inhibition of antigen-antibody reaction: application for measuring 2,6-sialylated glycoforms of transferrin. J Biochem. 154:229-232, 2013 doi: 10.1093/jb/mvt065.
7. 中島 円, 菅野秀宣, 肥後琢磨, 飯村康司, 荻野郁子, 新井 一, 国近美幸: ヒト難治性側頭葉てんかんにおける海馬硬化症, 非海馬硬化症の HMGB1, Toll 様受容体の発現の違い. 順天堂醫事雑誌 59 巻 6 号, p524, 2013
8. M Nakajima, M Miyajima, I Ogino, Y Hagiwara, H Arai: Brain Localization of Leucine-Rich 2 Glycoprotein and its Role, Hydrocephalus. Acta Neurochirurgica Supplement, Vol.113: 97-101, 2012

doi: 10.1007/978-3-7091-0923-6_20.

9. Limura Y, Sugano H, Nakajima M, Arai H: Stepwise synchronization through the corpus callosum is one cause of myoclonic jerks. *World Neurosurg.* 77:399, 2012
doi: 10.1016/j.wneu.2011.07.006.
10. 中島 円: てんかん薬物治療の新たな発見 - 新規抗てんかん薬「ラモトリギン」の最新のトピックス 新規抗てんかん薬がてんかん手術後の発作残存症例に与える効果の検討. *Pharma Medica* vol.29 No.2, p168 2011

[学会発表](計 20 件)

1. Madoka Nakajima, Hidenori Sugano, Takuma Higo, Yasushi Limura, Hiroharu Suzuki, Yoshinao Harada, Hajime Arai: Inflammatory mediators' role in epileptogenesis caused by cavernous angioma. 老人性疾患病態・治療研究センター研究発表会. 東京, Mar. 2014
2. 中島 円、菅野 秀宣、肥後 拓磨、飯村 康司、新井 一: 海綿状血管腫のてんかん原性について～炎症性メディエーターによる検討. 第 37 回日本てんかん外科学会, 大阪, Feb. 2014
3. 布施木景子、菅野秀宣、中島 円、肥後 拓磨、飯村 康司、新井 一: 記憶低下に苦慮し、転職を繰り返すてんかんセンター外来の 20 代男性患者への支援. 全国てんかんセンター協議会総会. 静岡, Feb. 2014
4. 中島 円、菅野 秀宣、肥後 琢磨、飯村 康司、原田 佳尚、新井 一: アンケート集計から見る迷走神経刺激療法における患者、家族の QOL 評価. 第 47 回日本てんかん学会, 北九州, Oct. 2013
5. M. Nakajima, H. Sugano, T. Higo, Y. Limura, I Ogino, M Miyajima, H. Arai: Expression of HMGB1 and Toll-like Receptors in the Hippocampus of Cases of Human Intractable Temporal Lobe Epilepsy. 30th International Epilepsy Congress, Montreal, Canada, June, 2013
6. 中島 円、菅野秀宣、肥後琢磨: 小児器質性てんかんを有する一例. 御茶ノ水てんかんカンファレンス, 東京, May. 2013
7. 中島 円、菅野 秀宣、肥後 琢磨、飯村 康司、荻野 郁子、国近 美幸、新井 一: ヒト難治性側頭葉てんかんにおける海馬硬化症、非海馬硬化症の HMGB1, Toll 様受容体の発現の違い. 老人性疾患病態・治療研究センター研究発表会. 東京, Feb. 2013
8. 中島 円、菅野 秀宣、肥後 拓磨、飯村 康司、新井 一: 強直発作、脱力発作を有する患者に対して迷走神経刺激療法は全脳梁離断より優先すべきか. 第 36 回日本てんかん外科学会, 岡山, Jan. 2013
9. 中島 円、菅野 秀宣、肥後 拓磨、飯村 康司、新井 一: ヒト難治性側頭葉てんかんにおける HMGB1, Toll 様受容体の発現から海馬硬化症を探る. 第 36 回日本てんかん外科学会, 岡山, Jan. 2013
10. Yasushi Limura, Madoka Nakajima, Hidenori Sugano, Takuma Higo, Hajime Nakanishi, Hajime Arai; Cerebral hematoma and spontaneous obliteration of cerebral angiomas Type I Sturge-Weber syndrome, the 66th American Epilepsy Society, San Diego, Dec. 2012
11. M. Nakajima, H. Sugano, T. Higo, Y. Limura, H. Arai, .: Expression of HMGB1 and Toll-like Receptors in the Hippocampus of Cases of Human Intractable Temporal Lobe Epilepsy, the American Epilepsy Society, San Diego, Dec. 2012
12. 中島 円、菅野 秀宣、肥後 琢磨、荻野 郁子、新井 一: ヒト難治性側頭葉てんかんにおける摘出海馬での HMGB1, Toll 様受容体の発現. 日本脳神経外科学

- 会第 71 回総会, 大阪, Oct. 2012
13. 中島 円, 菅野 秀宣, 肥後 琢磨, 飯村 康司, 新井 一: 転倒をともなう強直発作、脱力発作を有する患者には脳梁離断術、迷走神経刺激療法どちらを優先すべきか. 第 46 回日本てんかん学会, 東京, Oct. 2012
 14. 中島 円, 菅野 秀宣, 肥後 拓磨, 中西 肇, 新井 一: 頭蓋内出血を合併したスタージウエパー症候群の考察. 第 40 回日本小児神経外科学会. 岡山, June. 2012
 15. 中島 円, 菅野 秀宣, 肥後 拓磨, 新井 一: 難治性てんかんに対する迷走神経刺激の成績. 日本ニューロモデュレーション学会. May. 2012
 16. 中島 円: 当院でのてんかんに対する迷走神経刺激療法の治療成績. Juntendo Epilepsy Conference, Tokyo, April. 2012
 17. M. Nakajima, H. Sugano, T. Higo, H. Arai, K. Sato: Focus localization using FDG-PET in patients with temporal lobe epilepsy. the 9th Asian and Oceanian Epilepsy Congress, Manila, Mar. 2012
 18. 中島 円, 菅野 秀宣, 肥後 拓磨, 中西 肇, 新井 一, 佐藤 潔: 側頭葉てんかん患者における ^{18}F -FDG-PET による糖代謝低下部位と電気生理学的変化の検討. 第 35 回日本てんかん外科学会, 東京, Jan. 2012
 19. M. Nakajima, H. Sugano, T. Higo, H. Arai, K. Sato: Focus localization using FDG-PET in patients with temporal lobe epilepsy. American Epilepsy Society 65th Annual Meeting, Baltimore, Dec. 2011
 20. 中島 円, 菅野 秀宣, 肥後 琢磨, 中西 肇, 新井 一: 当院における迷走神経刺激療法の現況 Our experiences of Vagus Nerve Stimulation for Epilepsy,

第 45 回日本てんかん学会, 新潟, Oct. 2011

〔図書〕(計 1 件)

1. 中島 円: 脳室腹腔シャント術, 基本手術手技 各論 3, p113-117, 脳神経外科診療プラクティス 文光堂 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 円 (NAKAJIMA, Madoka)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 5 0 3 1 7 4 5 0

(2) 研究分担者

菅野 秀宣 (SUGANO, Hidenori)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 9 0 2 6 5 9 9 2

西村 欣哉 (NISHIMURA, Kinya)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 8 0 1 6 4 5 8 1

新井 一 (ARAI, Hajime)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 7 0 1 6 7 2 2 9