

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591299

研究課題名(和文)胎児期作成局所皮質異形成ラットの自発てんかんの病態に基づく新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the new therapy against epilepsy based on the mechanisms of spontaneous seizure in embryo freeze lesion rat model

研究代表者

重藤 寛史(Shigeto, Hiroshi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50335965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発した、胎児期ラットの頭蓋両側に冷却損傷を与えて作成する自発てんかん発症ラットでは、てんかん発作は約7割に生じ、生後47日以降(ヒトの思春期以降)に発症し、海馬起源のてんかん発作であることを明らかにした。このラットの海馬では生後2週以降に慢性炎症にかかわるToll様受容体4の経時的な増加、生後3週以降に細胞間ネットワークにて重要な役割を果たすコネクシン43の経時的な増加を認めた。また、難治性てんかん患者の髄液にも炎症性変化を来す例があることを確認した。慢性の炎症、異常ネットワークの形成がてんかん原性獲得に重要な役割を果たし、これに抗する薬剤がてんかん原性獲得を防ぐことが推定された。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new rat model, which had spontaneous seizure without any inducers such as chemical, electrical, thermal stimulations. In this study we revealed that around 70% of these model rats showed spontaneous hippocampal seizure, which appeared after 47 postnatal days. Toll like receptor 4, which plays important role in the inflammatory process, increased gradually at hippocampus of this model rat from 2 weeks after birth. Connexin 43, which is important for maintaining networks among neural cells, also increased gradually at hippocampus from 3 weeks after birth. We confirmed that several epilepsy patients had inflammatory change in their cerebrospinal fluid. These results suggest that the chronic inflammation and abnormal network may be important for the development of epileptogenesis. We speculate that anti-inflammatory and anti-connexin drugs may prevent the acquiring of epileptogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：てんかん 皮質異形成 ネットワーク 脳波 臨床神経生理学

1. 研究開始当初の背景

てんかんは脳細胞の慢性的な過剰興奮により生じるとされているが、その興奮を導く原因は、遺伝要因、脳形成異常、脳感染症、外傷や血管障害による脳損傷、神経変性症など様々である。7~8割の患者は適切な抗てんかん薬治療で発作が消失するが、2~3割は抗てんかん薬治療に抵抗性である。てんかん外科の発展に伴い難治性てんかん患者の摘出されたてんかん原性部位に皮質異形成が存在する症例が多いことがわかってきた。しかしこの皮質異形成が脳の重要な部位にある場合や、脳の広範囲に存在する場合は手術で摘出することはできない。てんかん手術で切除できない場合には、抗てんかん薬以外の治療法を見出す必要がある。新たなてんかん治療法を開発するには、てんかん発症のメカニズムを解明し、ヒントを得る必要がある。我々はこれまでの研究で、ラット胎児頭蓋に冷却外傷を与えることにより、世界ではじめて組織学的にヒト皮質異形成に類似した局所的な皮質異形成を有するラットを作成することに成功した。このラットは電気生理学的には海馬のてんかん原性が高まっており、免疫組織学的にもグルタミン酸受容体の易興奮性へのシフトを認めた。更にその後の検討で、皮質異形成を両半球に形成させることにより皮質異形成を有するモデルとしては唯一自発てんかん発作を生じさせることに成功した。このラットで重要なもう一つの点は、自発発作が幼少時には見られず、ラットが思春期を終えて性成熟期をむかえる時期に出現してくる点であり、その時間的特徴はヒトがてんかんを生じてくるタイミングに類似している。このように我々が開発したこのラットモデルは局所皮質異形成を有する実際のてんかん患者の臨床所見、脳波所見、発症時期、組織所見と酷似しており、このモデルを解析することで、てんかん発症のメカニズムや発症予防、発症した場合の治療につながる知見を得ることが期待される。今回我々は、てんかん発症のメカニズムとして、慢性的な炎症、性ホルモンに代表される発育の影響に着目した。てんかんに炎症が関係することは、難治性てんかんである West 症候群で抗炎症薬である ACTH が有効であること、脳炎でてんかんが生じることや、てんかん患者の切除皮質の免疫染色で炎症に関するインターロイキン 1 や Toll 様受容体 4 (TLR4) が増加していることなどから支持される。発育の影響に関しては、思春期から性成熟期にかけて発症するてんかんには視床下部・下垂体・性腺軸の関与が推定されており、これまでに、性ホルモンであるエストロゲンは発作閾値を下げると報告されている。エストロゲンはまた、中枢神経アストロサイトのギャップジャンクション蛋白であるコネキシン (Cx) 43 に作用することも報告されている。Cx43 はてんかん動物モデル海馬での増加や、ヒト海馬硬化組織で増加しているとの報告

があり、Cx が関与した神経ネットワークの形成がてんかん閾値増減の要になっていることが示唆される。炎症や発育に伴い変化する神経ネットワークがてんかん発症におよぼすメカニズムを解明することにより、抗炎症薬やコネキシン作動薬の新たな抗てんかん薬としての可能性を見出すことが期待される。

2. 研究の目的

我々の開発した、てんかんを自然発症する皮質異形成ラットを用い、炎症物質、コネキシンがラットの発育に従いどのように変化するかを測定し、てんかん発症メカニズムにおけるこれらの関与を検討する。また、難治性てんかん患者における炎症の関与を推定するために、難治性てんかん患者の髄液における炎症所見の有無を調べる。

3. 研究の方法

両側大脳皮質に皮質異形成を有するモデルラットの作成：妊娠 18 日目の Sprague-Dawley ラットの腹部を麻酔下で縦に切開し、両側の子宮を腹腔内から有茎のまま取り出す。先端の半球性の金属が常に液体窒素で冷却されるように作成した専用のプローベを用い、子宮壁外からラット胎児の頭蓋部に接触させ冷却痕を確認。手術後、子宮を腹腔内に戻し、母ラットは通常通りに飼育。子ラットは胎生 22 日目で出生し、出生後 28 日目まで母ラットに飼育させた。(詳細は平成 21~23 年度科学研究費助成事業研究成果報告書参照)。すべての実験は九州大学動物実験ガイドラインに沿って行い、使用動物数と動物の苦痛を最小限にするように計画した。

(1) 皮質異形成モデルラットにおいて自発発作が出現してくる時期と割合の検討：ラットを 3 つのグループ分けた。A: 頭蓋両側複数冷却損傷群 (n=16, うち 9 匹は前頭葉に皮質内電極, 7 匹は前頭部硬膜下に皮質上電極), B: 頭蓋両側単一冷却損傷群 (n=5), C: シャム手術群 (n=6)。てんかん性活動の記録は、両側海馬 C3 領域 (プレグマから 4 mm 後方, 正中から 5 mm 外側, 皮質表面から 5.5 mm 深部, n=16) に加え、両側前頭部硬膜下皮質上 (プレグマから 2 mm 前方, 正中から 4 mm 外側, 皮質表面, n=7), 両側前頭葉皮質内 (プレグマから 2 mm 前方, 正中から 4 mm 外側, 皮質表面から 1 mm 深部, n=9) で行った。基準電極としてねじ電極を前頭骨に設置。出生後 35 日目から 77 日目までの間、3 日間毎に 12 時間、脳波とビデオにて記録し、後にラットの脳波と行動記録を解析した。脳波・ビデオ観察終了後は脳を摘出し、電極の位置、皮質や海馬の組織学的変化を HE 染色、KB 染色、Neu N 染色を用いて観察した。

(2) 皮質異形成モデルラットにおける Toll 様受容体 4 発現の経時的変化の検討：生後 2 週目, 3 週目, 5 週目, 10 週目, 各 5 匹の皮

質異形成モデルラット脳の灌流固定を行い組織標本を作製した。また、冷却損傷を加えないシャム手術ラットにおいても同様に脳組織標本を作製した。各脳組織標本に対して、ToII 様受容体 4 (TLR4) の免疫染色を行い、海馬 C1 と C3 領域の錐体細胞 (n=100) に関し Image J を用いた densitometry による半定量的解析を行った。皮質異形成モデルラットとシャム手術ラットの海馬での TLR4 の発現を各グループ間で Unpaired -t 検定を用いて比較した。

(3) 皮質異形成モデルラットにおけるコネクシン 43 発現の経時的変化の検討：実験 2 同様に、生後 2 週目、3 週目、5 週目、10 週目の皮質異形成モデルラットおよび冷却損傷を与えないシャム手術ラット、各 5 匹に対してコネクシン 43 (Cx43) の免疫染色を行い、海馬 C1 と C3 領域の錐体細胞間領域を選択し (n=100 領域)、Image J を用いた densitometry による半定量的解析を行った。皮質異形成ラットモデルとシャム手術ラットの海馬での Cx43 の発現を各グループ間で Unpaired -t 検定を用いて比較した。

(4) てんかんの診断あるいは難治性てんかんの術前評価のため長時間ビデオ脳波モニターを行った患者のうち、髄液検査が必要と判断され、患者の了解が得られた場合に髄液検査を行い、髄液中の細胞数、蛋白、IgG インデックス、オリゴクローナルバンドを計測した。

4. 研究成果

(1) 皮質異形成モデルラット 16 匹中 11 匹 (68.8%) でてんかん発作の自然発症を認め、発症時期は出生 47 日以降で、1 匹あたり平均 2.7 回 (標準偏差 1.95 回、範囲 1~6 回)、発作持続時間 58.0 ± 38.9 秒 (平均 ± 標準偏差、範囲 26~199 秒) であった。発作起始部は海馬であることを確認した。海馬からは発作間欠期てんかん性放電を認めたが、皮質由来のてんかん性放電は発作時、発作間欠期とも認められなかった。これらのうち、皮質異形成部に深部電極を設置した 9 匹で NeuN 染色を用いて皮質異形成の分布を調べたが、皮質に局所皮質異形成が存在するにもかかわらず海馬には大きな形態学的変化は無いことが確認された。片側皮質に異形成を有するラットおよびシャム手術を行ったラットではてんかん発作は認めなかった。

(2) TLR4 免疫染色での densitometry による半定量的解析では、シャム手術ラットと比較して皮質異形成モデルラットの海馬にて TLR4 の染色強度の有意な上昇が生後 2 週目、3 週目、5 週目、10 週目でみられた (図 1)。

(3) Cx43 免疫染色での densitometry による半定量的解析では、シャム手術ラットと比較して皮質異形成モデルラットの海馬にて Cx43 の染色強度の有意な上昇を生後 3 週目、5 週目、10 週目で認めた (図 2)。

図 1

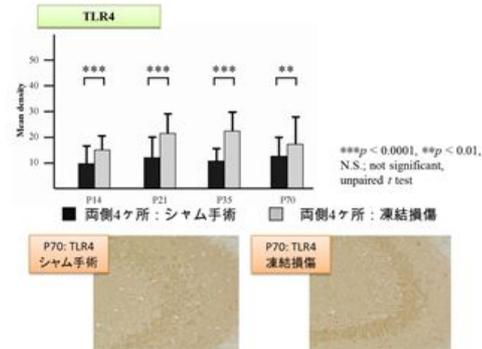
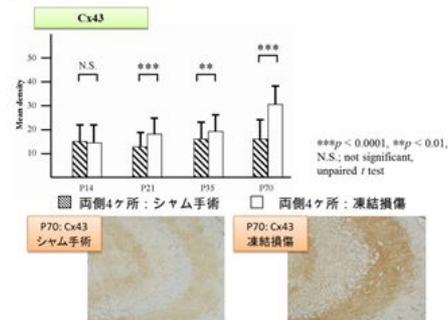


図 2



(4) てんかんの診断あるいは難治性てんかんの術前評価のため長時間ビデオ脳波モニターを行った患者は 3 年間で 100 人であった。このうち 27 人で髄液検査を行った。髄液蛋白は 36.5 ± 22.6 mg/dl (平均 ± 標準偏差) で、4 人で上昇 (>40) を認めた (80 ± 34.9 mg/dl、範囲 45~117)。うち 1 名は IgG index 0.74 と上昇を認め、他の 1 名はオリゴクローナルバンド陽性であった。

(結論・考察)

これまでの研究で、胎児期ラットの頭蓋両側に冷却損傷を与えることにより、誘発薬剤、電気刺激や熱刺激を使うことなく、一定の年齢を越えるとてんかんを発症してくるモデルラットを作成することに成功しており、今回の研究では、発作を生じる頻度、発作出現の年齢、発作の性質に関して、より詳細に検討した。その結果、自発性のてんかん発作は生存ラットの約 7 割に生じ、生後 47 日以降、人間で言えば思春期以降に発症していることを明らかにした。症状、脳波の観察からは海馬起源のてんかんを生じていると断定できるが、海馬自体には組織学的な変化は無かった。一方、冷却損傷を与えた皮質には、皮質異形成類似の組織を認めた。形態学的には海馬自体に損傷や異形成が無いにも関わらず、脳波および症候上、海馬起源のてんかん発作を認めるという結果が再確認された。ついで、このモデルラットの自発てんかん発症に炎症が関連していると想定し、TLR4 の免疫染色を行ったが、生後 2 週以降に海馬において TLR4 の経時的な増加がみられており、てんかん原性形成に、早い時期から免疫が関与していることが推定された。またこのモデルでは神経ネットワークの変化を生じていると仮定して、アストロサイト-神経間の細胞

間結合を担い、細胞間ネットワークにおいて重要な役割を果たすコネクシン 43 の変化を観察した。その結果、海馬において、Cx43 の経時的な増加が生後 3 週以降に認められた。皮質異形成モデルラットの海馬自発てんかん発作の出現に先立ち、Cx43 の発現の上昇に関連した興奮性の異常神経ネットワークの形成が背景にあることが示唆された。難治性てんかん患者の髄液に炎症所見を示すものが存在することも確認した。皮質異形成モデルラットにおいて、慢性の炎症、異常ネットワークの経時変化がてんかん原性を獲得に影響を及ぼすことを踏まえ、これらの変化に抗する薬剤がてんかん原性獲得を防ぐことが推定され、我々の開発した皮質異形成モデルラットは、それらの効果の検証にも有効であることが示唆された。

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 21 件)

Mukae N, Shigeto H(6 番目), et al: ILAE focal cortical dysplasia type IIIc in the ictal onset zone in epileptic patients with solitary meningioangiomas. *Epileptic Disord* 査読有 16: 533-539, 2014, DOI: 25366924

Hagiwara K, Shigeto H(6 番目), et al: Age-related changes across the primary and secondary somatosensory areas: An analysis of neuromagnetic oscillatory activities. *Clin Neurophysiol* 査読有 125: 1021-1029, 2014, DOI: 24189210

上原 平, 重藤寛史, 吉良潤一: てんかんと脳機能的ネットワークの関連. *臨床神経* 査読有 54: 1139 - 1141, 2014 DOI: 25672730

鎌田崇嗣, 高瀬敬一郎, 重藤寛史: 自発てんかん発作を有した皮質異形成ラットモデル. *臨床神経* 査読有 54: 1132 - 1135, 2014 DOI: 25672728

宇根隼人, 重藤寛史(4 番目)ら: B 型インフルエンザ罹患後に非痙攣性てんかん重積状態をきたした 1 例. *臨床神経* 査読有 54: 227 - 230, 2014 DOI: 24705838

森岡隆人, 重藤寛史(6 番目)ら: 迷走神経刺激療法目的で紹介され開頭手術治療を行った難治性てんかん患者. *脳神経外科* 査読有 42: 1137-1146, 2014 DOI: 25433062

重藤寛史: 脳波検査. *日本臨床* 査読無 72: 809-817, 2014 DOI: 24912280

重藤寛史: ふるえブラッシュアップ ミオクローヌスをきたすてんかん. *治療* 査読無 96: 1602-1606, 2014

Miyaji H, Shigeto H(5 番目), et al: Neuromagnetic detection of the

laryngeal area: Sensory-evoked fields to air-puff stimulation. *Neuroimage* 査読有 88C: 162-169, 2013 DOI: 24246493

Shigeto H, et al: Minimum norm estimates in MEG can delineate the onset of interictal epileptic discharges: A comparison with ECoG findings. *Neuroimage Clin*. 査読有 2:663-669, 2013 DOI: 24179817

Shigeto H, et al: Systematic study of the effects of stimulus parameters and stimulus location on afterdischarges elicited by electrical stimulation in the rat. *Epilepsy Res*. 査読有 104: 17-25, 2013. DOI: 23148865

Kamada T, Shigeto H(4 番目) et al: Spontaneous seizures in a rat model of multiple prenatal freeze lesioning. *Epilepsy Res*. 査読有 105, 280-291, 2013 DOI: 23639621

Yutsudo N, Shigeto H(9 番目) et al: fosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology*. 査読 38: 895-906, 2013 DOI: 23303048

Yamashita C, Shigeto H(2 番目), et al: Transient interhemispheric disconnection in a case of insulinoma-induced hypoglycemic encephalopathy. *J Neurol Sci*. 査読有 335: 233-237, 2013. DOI: 24139556

Sanefuji M, Shigeto H(6 番目) et al: A case of childhood stiff-person syndrome with striatal lesions: a possible entity distinct from the classical adult form. *Brain Dev*. 査読有 35: 575-578, 2013 DOI: 22944247

重藤寛史: 新規抗てんかん薬の使い方特集・てんかんの新治療戦略と課題 辻貞俊 企画編集協力 医薬ジャーナル 査読無 49: 77-81, 2013

重藤寛史: 最新の抗てんかん薬治療 神経治療学 査読無 30: 291-295, 2013

Saiga T, Shigeto H(6 番目) et al: Inflammatory radiculoneuropathy in an ALS4 patient with a novel SETX mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 査読有 83: 763-764, 2012 DOI: 22577233

Isobe N, Shigeto H(5 番目) et al: First diagnostic criteria for atopic myelitis with special reference to discrimination from myelitis-onset multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 査読有 316: 30-35, 2012 DOI: 22364869

重藤寛史: てんかん患者の睡眠マネジメント いま知っておくべきてんかん - 診る・治す・フォローする てんかん診療の進展開 *Mebio* 査読無 29: 77-84, 2012.

〔学会発表〕(計 58 件)

Shigeto H: First experience and next plans, Neurology The 8th Asia Telemedicine Symposium. 2014.12.12 九州大学百年講堂

重藤寛史: てんかん診療の Q&A てんかん診療の実際 - 第 44 回日本臨床神経生理学会学術大会 (20 日) ランチョンセミナー5 2015.11.18-21 福岡国際会議場

重藤寛史: シンポジウム: てんかん発作と不随意運動発作をめぐって 心因性イベントとの鑑別. 第 48 回日本てんかん学会年次学術集会 2014. 10.3 京王プラザホテル

重藤寛史: てんかんの臨床研究に必要なものは? 第 48 回日本てんかん学会年次学術集会 2014. 10.2 京王プラザホテル

重藤寛史: 生涯教育セミナー: ビデオでみるてんかん発作 てんかんの発作症候を学ぶ. 第 55 回日本神経学会学術大会 2014.5.20-25 福岡国際会議場

重藤寛史: 公開市民講座: てんかんって何? 日本神経学会学術大会 2014.5.22 福岡国際会議場

重藤寛史ら: 側頭葉てんかん患者の側頭葉内側の高周波活動および 活動と海馬硬化の関連. 日本神経学会学術大会 2014.5.20-25 福岡国際会議場

重藤寛史: 患者背景を考慮したてんかん治療 第 31 回神経治療学会総会 ランチョンセミナー15 2013.11.23 東京ドームホテル

重藤寛史: ワークショップ 薬物投薬下の PSG. 第 43 回 日本臨床神経生理学会・学術大会 2013.11.9 高知市

重藤寛史: マラソンレクチャー 新規抗てんかん薬の使い方 第 47 回 日本てんかん学会学術集会 2013.10.12 北九州市

重藤寛史ら: シンポジウムてんかん診療における焦点検索方法の進歩とてんかん外科: 長時間ビデオ脳波モニターの役割と注意点 第 54 回日本神経学会学術大会 2013. 5.29-6.1, 東京国際フォーラム

鎌田崇嗣ら: 自発てんかん発作を有する皮質異形成ラットモデルでのコネキシン群蛋白の役割の検討第 54 回日本神経学会学術大会 2013. 5.29-6.1, 東京国際フォーラム

Kamada T, Shigeto H (4 番目) et al: Spontaneous Temporal Lobe Seizures in a Prenatal Freeze Lesion Rat Model. 66th American epilepsy society Annual meeting, 2012.11.30-12.5, San Diego USA.

重藤寛史: シンポジウム「最新の抗てんかん薬治療」第 30 回日本神経治療学会総会 2012.11.28-30 北九州

重藤寛史ら: もの忘れ外来患者における

てんかん性異常の検討第 31 回日本認知症学会学術集会 2012 10.26-28 つくば国際会議場

重藤寛史: 初学者のための脳波第 46 回日本てんかん学会学術集会 2012.10.11-12 都市センターホテル

鎌田崇嗣ら: 自発てんかん発作を有する皮質異形成ラットモデルの皮質異形成の興奮性の検討 46 回日本てんかん学会学術集会 2012.10.11-12 都市センターホテル

Shigeto H. et al: Magnetoencephalography as a prognostic tool for epilepsy surgery in patients with hippocampal sclerosis. 18th International conference on Biomagnetism 2012 8. 26-30 Paris

重藤寛史ら: 海馬硬化を伴う内側側頭葉てんかん患者の脳磁図を用いた術後予後予測 第 53 回日本神経学会学術集会 2012 5.22-25 東京国際フォーラム

鎌田崇嗣ら: 自発てんかん発作を呈する皮質異形成ラットモデルの皮質異形成部の興奮性の検討第 53 回日本神経学会学術集会 2012 5.22-25 東京国際フォーラム

〔図書〕(計 5 件)

重藤寛史: てんかん原性と伝播 てんかん専門医ガイドブック 日本てんかん学会編集 総 303 ページ(内 11-13) 診断と治療社 東京 2014.

重藤寛史: 急性脳炎の治療経過が良好であった場合の長期的展望は 症例から学ぶ戦略的てんかん診断・治療 池田昭夫編 総 242 ページ(内 140-155) 南山堂 東京 2014

重藤寛史ら: てんかん 薬がみえる 第一版医療情報科学研究所 編集 総 469 ページ(内 140-155) メディックメディア 東京 2014

重藤寛史, 久保田由美子: 副作用軽減化新薬開発 第 2 節皮膚障害第 5 章 抗てんかん薬治療の副作用の疫学データと発現機序, 診断・治療の現状 総 938 ページ(内 363-367) 技術情報協会 東京 2012

重藤寛史: 新しい診断と治療の ABC74: 神経 5 てんかん 第 3 章診断 検査所見 辻貞俊 編集 総 282 ページ(内 92-101) 最新医学社 大阪 2012.

〔産業財産権〕

出願状況 なし

取得状況 なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重藤寛史 (SHIGETO HIROSHI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50335965

(2) 連携研究者

鈴木 諭 (SUZUKI SATOSHI)

九州大学・大学院・医学研究院・准教授

研究者番号：90294917

高瀬 敬一郎 (TAKASE KEI-ICHIRO)

九州大学・大学院・共同研究員

研究者番号：00467903

鎌田崇嗣 (KAMADA TAKASHI)

九州大学・大学院・共同研究員

研究者番号：70614460

上原 平 (UEHARA TAIRA)

九州大学・大学院・助教

研究者番号：30631585