

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861275

研究課題名(和文) 迷走神経刺激は脳免疫機構に作用するのか

研究課題名(英文) Does vagal nerve stimulation alter immune response in the brain?

研究代表者

クー ウイミン (Khoo, Hui Ming)

大阪大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：70591022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：High-mobility group box-1(HMGB1)によるToll-like receptor 4の活性化を介した自然免疫応答がてんかんの発生機序として注目されている。迷走神経刺激(VNS)はノルアドレナリン(NE)投射系の賦活を介しててんかん発作を抑制し、NEは脳内の自然免疫応答を抑制すると言われている。本研究ではてんかんモデルラットを用い、海馬の脳波ならびに脳内のHMGB1の変化を解析し、VNSのてんかん抑制作用が脳内自然免疫応答を介していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Increasing evidence supports the involvement of activation of Toll-like receptor 4 (TLR4), a key receptor of innate immunity, by the high-mobility group box-1 (HMGB1) in the etiopathogenesis of seizures. Vagal nerve stimulation (VNS) was proposed to alter norepinephrine (NE) release by projections to the locus coeruleus. NE is known to be an inhibitor of inflammatory responses in the brain. Using model of acute seizures in Wistar rat, we discovered a mechanism of VNS in seizure control involving suppression of HMGB1 release from neurons.

研究分野：てんかん

キーワード：てんかん 免疫 HMGB1 迷走神経刺激

1. 研究開始当初の背景

てんかんは約 0.5～1.5%の有病率を有する疾患であるが、発生機序に不明な点が多く、既存の薬物療法では約 30%の患者は難治に経過するため、病態解明、新規治療方法の開拓が期待される疾患群である。その病態には脳における神経細胞の過剰興奮が代表的な要因とされてきたが、最近では脳内の免疫系の役割も認識されるようになった。特に high-mobility group box-1(HMGB1)・Toll-like receptor(TLR)4 を介した自然免疫応答が脳内神経細胞の過剰興奮に関与し、てんかんの発生機序として注目され、新しい治療法の標的となっている^{1,2}。

近年、難治性てんかん患者に対して迷走神経刺激療法 (VNS) が新規外科的治療法として導入され、欧米では 5 万人以上の薬剤抵抗性の難治性てんかん患者に VNS が施行され、約 50%の患者に有効性を認めている³。長期刺激による効果の蓄積も報告されており⁴、てんかん発作の慢性化に対する抑制作用が考えられる。VNS のてんかん抑制作用は青斑核のノルアドレナリン(NE)投射系の賦活を介するとされている。また、NE は脳内の自然免疫応答を抑制することが知られている⁵⁻⁷。これらの報告より、VNS は脳内自然免疫応答に影響を与え、てんかん発作を抑制している可能性が推定される。

2. 研究の目的

本研究は HMGB1 を中心とした内因性リガンドで起動される自然免疫応答を解析することにより、てんかん脳における迷走神経刺激の自然免疫系に対する作用を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)てんかんモデルラットの作成

a. カイニン酸(5mg/kg)をラット (Wistar rat, 雌, 10 週齢) に腹腔内投与し、てんかんモデルを作成した。

(2) ラットの脳波および脳血流の記録と解析

a. 全身麻酔下で動物用定位的手術装置を用いてラットの右海馬に定位的に深部電極を留置し、脳波計を用いて海馬の脳波と脳表の脳波を記録した(図 1a)。また、スペckル血流計で脳表の血流も同時記録した(図 1b)。

b. BESA®を用いて脳波を解析し、てんかん波を代表する棘徐波の変化を定量的に比較した。

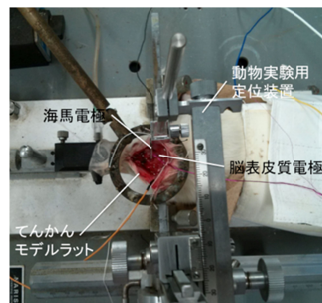


図 1a 海馬電極と脳表皮質電極による脳波測定



図 1b スペckル血流計による脳表血流の計測

Laser Speckle Blood Flow Imager
OMEGAZONE (OZ-1) (OMEGAWAVE, INC)

(3)迷走神経刺激モデルの作成

迷走神経の刺激電極をてんかんモデルラットの左頸部迷走神経に留置固定し(図 2)、リード線は皮下トンネルを通して体外に導出した。刺激装置に接続し、刺激を行った(2mA, 500 μs, 30Hz, 30s on, 2 mins off)。

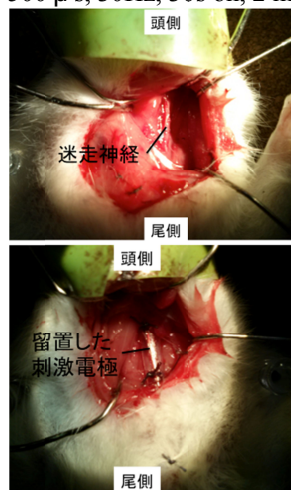


図 2 迷走神経の刺激電極の留置

(4)脳内 HMGB1 の発現を検出

蛍光免疫染色法を用いて上述てんかんモデルラットの脳内 HMGB1 の発現の検出を行った。神経細胞のマーカー(MAP2)、グリア細胞のマーカー(GFAP)、ミクログリア(Iba1)との二重染色法で脳内の HMGB1 の発現の分布と局在を検討した。

4. 研究成果

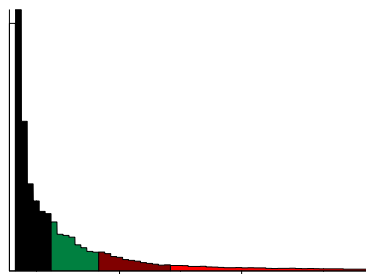
(1) 結果

(a)迷走神経刺激による脳波の変化

てんかんモデルラットの海馬電極で記録した脳波のパワースペクトルは図 3a に示した

通りである。迷走神経刺激を行った後、低周波数帯域の成分が増え、高周波数帯域の成分が減った(図 3b)。すなわち、てんかん波の代表である棘徐波が減少したことが示された。

Power fEV2



周波数 (Hz)

図 3a 海馬電極の脳波のパワースペクトル

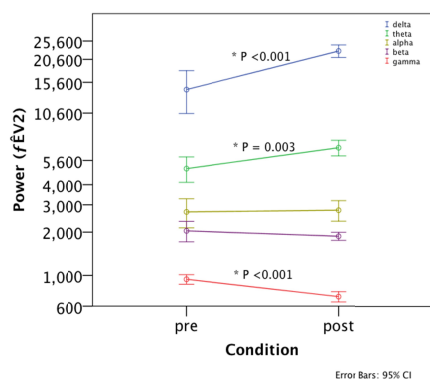


図 3b 迷走神経刺激による海馬電極の脳波の各周波数帯域のパワーの変化。pre=迷走神経刺激前、post=迷走神経刺激後

(b)迷走神経刺激による脳血流の変化

迷走神経刺激中、脳表の脳血流が一時的に増加し、その後も刺激前より血流の増加が保たれていた(図 4)。

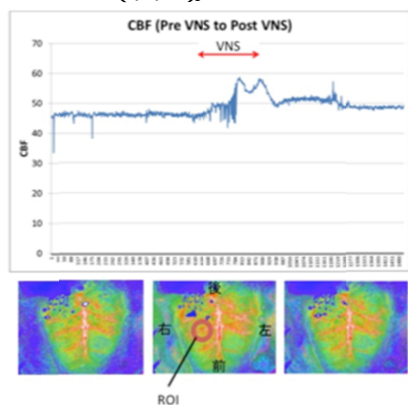


図 4 スペックル血流計での測定した脳血流

(c)迷走神経刺激による HMGB1 の発現の変化

正常ラットでは海馬の CA1 及び CA3 のいずれにおいても HMGB1 は神経細胞の核内に限局的に存在しており、細胞質は存在しなかった。てんかんモデルラットでは CA1 において HMGB1 は核内に存在せず、細胞質内にわずかに存在するかまったく存在しなかった。CA3 では正常ラットとは変わらなかった。迷走神経刺激を行ったてんかんモデルラットでは CA1 において HMGB1 は細胞質内に限局

的に存在し、核内には存在しなかった(図 5)。グリア細胞やミクログリアではこの現象は認められなかった。この結果より、てんかんモデルラットでは HMGB1 が神経細胞核内より細胞質、そして細胞外に放出されることが推測された。迷走神経刺激は HMGB1 が核内から細胞質内への移行に影響しないが、細胞外への放出を阻止している可能性が考えられた。

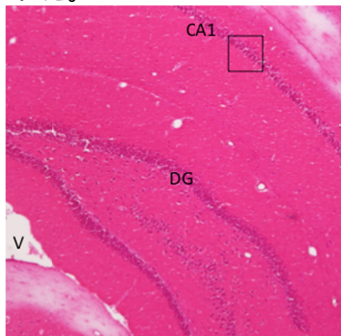


図 5a てんかんモデルラットの海馬の HE 染色 (X40)。CA=cornu ammonis, DG=dentate gyrus, V=ventricle

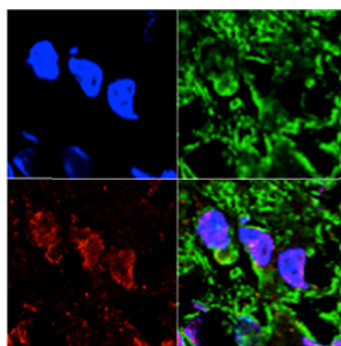
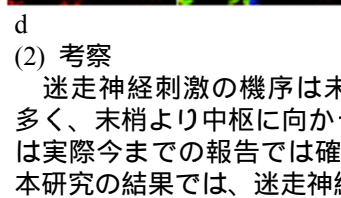
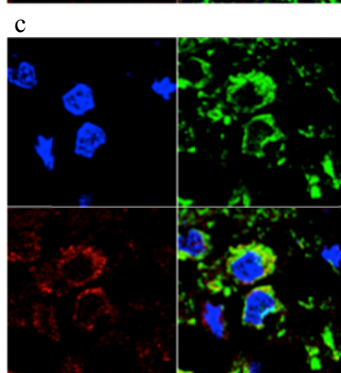
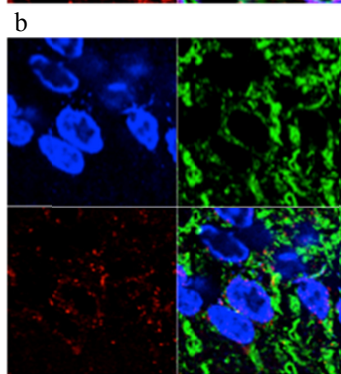


図 5b-d ラットの海馬 CA1 の蛍光免疫染色。b) 正常ラット、c) てんかんモデルラット、d) 迷走神経刺激を行った後のてんかんモデルラット



DAPI	MAP2
HMGB1	merge

(2) 考察

迷走神経刺激の機序は未だに不明な点が多く、末梢より中枢に向かった afferent 刺激は実際今までの報告では確認されていない。本研究の結果では、迷走神経刺激中の脳血流

が増加した。これは迷走神経の刺激による action potential が中枢に向かって送信された結果であると考えられ、当研究での迷走神経刺激モデルでは迷走神経に加わった刺激が中枢に向かった afferent 刺激であることが示唆された。また、迷走神経刺激を行うと、海馬の脳波の高周波数帯域のパワーが減少し、低周波数帯域のパワーが増加した。これはてんかん波の代表である棘徐波が減少し、脳波の正常化を現しており、当研究で行った迷走神経刺激療法の効果を示したものだと考えられた。

てんかん発作によって、HMGB1 が核より細胞質そして細胞外に放出されると報告されている。HMGB1 の放出は自然免疫カスケードの一連の応答を起動する²。本研究の結果では、迷走神経刺激を行わなかったラットでは、HMGB1 が核内には存在せず細胞質にはごくわずかに存在するかほとんど存在しなかったことより、細胞外へ放出されていることが示唆された。この点に関しては今までの報告に一致した結果であった。一方、迷走神経刺激を行ったラットで、HMGB1 が細胞質に目立って存在したことが観察され、てんかん発作によって核より細胞質に放出された HMGB1 は、迷走神経刺激を行ったことで細胞質より細胞外への放出が抑制されたと考えられる。この点は今まで報告されたことなく新たな見知である。

最近 TLR の内因性リガンドである HMGB1 による自然免疫応答が注目されており、特に、てんかんをはじめ様々な神経疾患におけるは無菌性の Neuroinflammation の関与が考えられており、内因性リガンドによって起動される免疫応答が重要である。本研究の結果より、迷走神経刺激の作用は内因性リガンドを介した自然免疫応答が重要な役割を担っていることが初めて示された。

参考文献：

- 1) Rodgers at el. Brain 2009; 132: 2478-2486.
- 2) Maroso at el. Nat Med 2010; 16: 413-419.
- 3) Mapstone at el. Neurosurg Focus 2008; 25: E9.
- 4) Elliott at el. Epilepsy Behav 2011; 20: 478-483.
- 5) Cheyuo at el. J Cereb Blood Flow Metab 2011; 31: 1187-1195.
- 6) McNamee at el. Eur J Pharmacol 2010; 626: 219-228.
- 7) McNamee at el. Neuropharmacology 2010; 59: 37-48.

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 8 件)

1. Khoo Hui Ming 報告記：第 8 回アジアてんかん外科学会(2014 年 10 月 4~6 日)脳神経外科 43 巻 4 号 p372-373, 2015 年
2. Khoo HM, Kishima H, Tani N, Oshino S, Maruo T, Hosomi K, Yanagisawa T, Kazui H, Watanabe Y, Shimokawa T, Aso T, Kawaguchi A, Yamashita F, Saitoh S, Yoshimine T. Default

mode network connectivity in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. J Neurosurgery, in press.

3. Khoo HM, Kishima H, Oshino S, Yoshimine T. Reply-to: Low-Frequency Subthalamic Nucleus Stimulation in Parkinson's Disease: A Randomized, Clinical Trial. Mov Disord. 29 (12): 1569-70, 2014.
4. Khoo HM, Kishima H, Hosomi K, Maruo T, Tani N, Oshino S, Shimokawa T, Yokoe M, Mochizuki H, Saitoh Y, Yoshimine T. Low-Frequency Subthalamic Nucleus Stimulation in Parkinson's Disease: A Randomized, Clinical Trial. Mov Disord. 29 (2): 270-4, 2014.
5. Kishima H, Oshino S, Tani N, Maruo T, Morris S, Khoo HM, Yanagisawa T, Shimono K, Okinaga T, Hirata M, Kato A, Yoshimine T. Which is the Most Appropriate Disconnection Surgery for Refractory Epilepsy in Childhood? Neurol Med Chir, 53(11):814-20, 2013
6. Khoo HM, Kishima H, Kinoshita M, Goto Y, Kagawa N, Hashimoto N, Maruno M, Yoshimine T. Radiation-induced anaplastic ependymoma with a remarkable clinical response to temozolomide: a case report. Br J Neurosurg. 27(2):259-61, 2013
7. Hosomi K, Kishima H, Oshino S, Hirata M, Tani N, Maruo T, Khoo HM, Shimosegawa E, Hatazawa J, Kato A, Yoshimine T. Altered extrafocal iomazenil activity in mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsy Research, 103(2-3), 195-204, 2013
8. クーウイミン、瀧 琢有、貴島晴彦、吉峰俊樹 基本をマスター脳神経外科手術のスタンダード・神経血管減圧術における血管移動法の工夫～A "sling swing transposition" technique～, 脳神経外科速報, 23:844-851, 2013 年

〔学会発表〕(計 33 件)

1. Khoo Hui Ming、貴島晴彦、押野悟、枝川光太郎、小林真紀、柳澤琢史、圓尾知之、谷直樹、平田雅之、吉峰俊樹 思春期から青年期のてんかん患者の外科的治療後の社会的自立状況の検討 第 38 回日本てんかん外科学会 2015/01/15 都市センターホテル(東京)シンポジウム
2. 押野 悟、貴島晴彦、枝川光太郎、柳澤琢史、小林真紀、谷 直樹、圓尾知之、クーウイミン、細見晃一、平田雅之、下野九理子、青天目 信、大園恵一、吉峰俊樹 小児難治性てんかんに対する半球・多脳葉離断術の機能予後 第 38 回日本てんかん外科学会 2015/01/15 都市センターホテル(東京)シンポジウム
3. 貴島晴彦、押野 悟、柳澤琢史、枝川光太郎、小林真紀、圓尾知之、クーウイミン、谷 直樹、下野九理子、青天目 信、平田

雅之、大園恵一、吉峰俊樹 年齢による特徴に合わせた小児のてんかん外科治療 第38回日本てんかん外科学会 2015/01/15 都市センターホテル(東京)シンポジウム

4. 枝川光太郎、柳澤琢史、貴島晴彦、押野悟、Khoo Hui Ming、小林真紀、井上洋、平田雅之、吉峰俊樹 周術期てんかん患者における Cross-Frequency Coupling の観点からの発作時頭蓋内脳波解析 第38回日本てんかん外科学会 2015/01/15 都市センターホテル(東京)ポスター

5. 小林真紀、貴島晴彦、押野悟、枝川光太郎、柳澤琢史、Khoo Hui Ming、谷直樹、圓尾知之、平田雅之、吉峰俊樹 幼児てんかん患者に対する頭蓋内電極留置術における術中・周術期の工夫点 第38回日本てんかん外科学会 2015/01/15 都市センターホテル(東京)ポスター

6. 谷直樹、貴島晴彦、Khoo Hui Ming、押野悟、圓尾知之、細見晃一、吉峰俊樹 側頭葉てんかん患者の言語性機能障害に伴う resting state network の変化 第38回日本てんかん外科学会 2015/01/15 都市センターホテル(東京)ポスター

7. Khoo HM, Kishima H, Oshino S, Tani N, Maruo T, Yanagisawa T, Edagawa K, Inoue Y, Hirata M, Yoshimine T. Frameless Image-Guided Stereotactic Implantation of Depth Electrodes via Craniotomy for Presurgical Evaluation of Pharmacoresistant Epilepsy American Epilepsy Society Annual Meeting 2014 2014/12/7 Seattle ポスター

8. Edakawa K, Kishima H, Yanagisawa T, Oshino S, Inoue Y, Kobayashi M, Hosomi K, Khoo HM, Hirata M, Yoshimine T Alternation of cross frequency coupling in the pre-ictal iEEG of epileptic patients 2014 Annual Meeting of the American Epilepsy Society 2014/12/06 Seattle, USA Poster

9. Khoo Hui Ming、貴島晴彦、押野悟、谷直樹、圓尾知之、柳澤琢史、枝川光太郎、井上洋、平田雅之、小林真紀、吉峰俊樹 難治性てんかんの術前評価に対する開頭下のフレームレスイメージガイド定位手術による深部電極留置術 第48回日本てんかん学会学術集会 2014/10/02 京王プラザホテル(東京)口演

10. 押野悟、貴島晴彦、平田雅之、柳澤琢史、枝川光太郎、クー ウイミン、井上洋、谷直樹、圓尾知之、細見晃一、小林真紀、清水豪士、吉峰俊樹 てんかんの病態からみた頭蓋内脳波の有用性について 第48回日本てんかん学会学術集会 2014/10/03 京王プラザホテル(東京)口演

11. 枝川光太郎、貴島晴彦、柳澤琢史、井上洋、小林真紀、Khoo Hui Ming、細見晃一、圓尾知之、平田雅之、吉峰俊樹 周術期てんかん患者における Cross-Frequency Coupling の観点からの発作時頭蓋内脳波解

析 第48回日本てんかん学会学術集会 2014/10/02 京王プラザホテル(東京)ポスター

12. Khoo HM, Kishima H, Oshino S, Tani N, Maruo T, Yanagisawa T, Edakawa K, Inoue Y, Hirata M, Yoshimine T Frameless image-guided stereotactic implantation of depth electrodes via craniotomy for pharmacoresistant epilepsy The 8th Asian Epilepsy Surgery Congress 2014/10/05 Tokyo, Japan Poster

13. Edakawa K, Kishima H, Yanagisawa T, Oshino S, Inoue Y, Kobayashi M, Hosomi K, Khoo HM, Hirata M, Yoshimine T Alternation of cross frequency coupling in the pre-ictal iEEG of epileptic patients The 8th Asian Epilepsy Surgery Congress 2014/10/05 Poster

14. Oshino S, Kishima H, Hirata M, Yanagisawa T, Edakawa K, Khoo HM, Inoue Y, Tani N, Kobayashi M, Yoshimine T The efficacy of the study with intracranial electroencephalography in relation to epileptic pathology The 8th Asian Epilepsy Surgery Congress 2014/10/05 Tokyo, Japan Poster

15. Kishima H, Oshino S, Khoo HM, Kobayashi M, Yanagisawa T, Edakawa K, Hosomi K, Inoue Y, Shimizu T, Hirata M, Yoshimine T Surgery for refractory epilepsy with MRI positive lesions in childhood. The 8th Asian Epilepsy Surgery Congress 2014/10/06 Tokyo, Japan Plenary Session

16. 枝川光太郎、柳澤琢史、貴島晴彦、押野悟、井上洋、Khoo Hui Ming、圓尾知之、斉藤洋一、吉峰俊樹 周術期てんかん患者における Cross-Frequency Coupling の観点からの発作前の頭蓋内脳波解析 日本脳神経外科学会第73回学術総会 2014/10/10 グランドプリンスホテル新高輪(東京)口演

17. 貴島晴彦、押野悟、圓尾知之、クー ウイミン、柳澤琢史、枝川光太郎、清水豪士、井上洋、谷直樹、平田雅之、吉峰俊樹 学齢期のてんかん手術 第37回日本てんかん外科学会 2014/2/6 大阪国際会議場(大阪)シンポジウム

18. 押野悟、貴島晴彦、クー ウイミン、平田雅之、圓尾知之、柳澤琢史、枝川光太郎、井上洋、清水豪士、谷直樹、吉峰俊樹 てんかんの病態からみた頭蓋内脳波の有用性 第37回日本てんかん外科学会 2014/2/7 大阪国際会議場(大阪)口演

19. 貴島晴彦、押野悟、圓尾知之、クー ウイミン、柳澤琢史、枝川光太郎、清水豪士、井上洋、谷直樹、平田雅之、吉峰俊樹 ワイヤレス体内埋込ないし携帯型多チャンネル頭蓋内脳波計測によるてんかん焦点診断の可能性 第37回日本てんかん外科学会 2014/2/7 大阪国際会議場(大阪)口演

20. Khoo Hui Ming, 貴島晴彦、押野 悟、圓尾知之、谷 直樹、柳澤琢文、青天目 信、下野 九理子、平田雅之、吉峰俊樹 髄内巨大嚢胞性病変を伴った難治性てんかんの診断治療 第37回日本てんかん外科学会 2014/2/6 大阪国際会議場(大阪)Poster

21. 圓尾知之、貴島晴彦、押野 悟、中村 元、谷 直樹、クー ウイミン、枝川光太郎、吉峰俊樹 てんかんモデルにおける脳機能解析-レーザースペックル脳血流計と脳波同時解析を用いて- 第37回日本てんかん外科学会 2014/2/6 大阪国際会議場(大阪)Poster

22. 貴島晴彦、谷 直樹、細見晃一、押野 悟、Khoo Hui Ming、圓尾知之、柳澤琢史、枝川光太郎、平田雅之、加藤天美、吉峰俊樹 新たに見えてきた脳の機能から考えるてんかん手術の可能性 日本脳神経外科学会第72回学術総会 2013/10/18 パシフィコ横浜(横浜)口演

23. 貴島晴彦、押野 悟、クー ウイミン、柳澤琢史、谷 直樹、圓尾知之、枝川光太郎、平田雅之、青天目 信、下野 九理子、沖永剛志、吉峰俊樹 新皮質てんかんの診断検査から手術まで 第47回日本てんかん学会学術集会 2013/10/12 北九州国際会議場(福岡)特別講演(ビデオセッション)

24. 押野 悟、貴島晴彦、平田雅之、圓尾知之、クー ウイミン、柳澤琢史、枝川光太郎、沖永剛志、下野 九理子、石井良平、高橋正紀、大園 恵一、吉峰俊樹 てんかんセンターへの紹介目的からみたてんかん診療の問題点 第47回日本てんかん学会学術集会 2013/10/11 北九州国際会議場(福岡)口演

25. Khoo Hui Ming、貴島晴彦、押野 悟、谷 直樹、圓尾知之、柳澤琢文、枝川光太郎、沖永剛志、下野 九理子、平田雅之、吉峰俊樹 大きな髄内の嚢胞性病変に伴った難治性てんかん 第47回日本てんかん学会学術集会 2013/10/12 北九州国際会議場(福岡)口演

26. 谷 直樹、貴島晴彦、クー ウイミン、押野 悟、圓尾知之、細見晃一、柳澤琢史、平田雅之、吉峰俊樹 側頭葉てんかん脳における機能的結合の変化 第47回日本てんかん学会学術集会 2013/10/11 北九州国際会議場(福岡)Poster

27. Khoo Hui Ming、貴島晴彦、押野 悟、谷 直樹、細見晃一、圓尾知之、齋藤洋一、吉峰俊樹 パーキンソン病に対する低頻度視床下核脳刺激療法-慢性刺激の効果と安全性について 第7回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 2013/10/12 京王プラザホテル(東京)Poster

28. Khoo Hui Ming, Kishima Haruhiko, Oshino Satoru, Tani Naoki, Maruo Tomoyuki, Yanagisawa Takufumi, Hirata Masayuki, Yoshimine Toshiki, Frameless Image-Guided

Stereotactic Implantation of Depth Electrodes via Craniotomy for Presurgical Evaluation of Refractory Epilepsy. 15th World Congress of Neurosurgery (WFNS2013) 2013/9/10 Seoul, Korea 口演

29. Haruhiko Kishima, Takufumi Yanagisawa, Yuko Goto, Tomoyuki Maruo, Hui Ming Khoo, Satoru Oshino, Shayne Morris, Naoki Tani, Toshiki Yoshimine. Effects of Intrathecal Baclofen on Respiratory Dysfunction in Spastic Patients 15th World Congress of Neurosurgery (WFNS2013) 2013/9/10 Seoul, Korea 口演

30. Youichi Saitoh, Satoru Oshino, Haruhiko Kishima, Koichi Hosomi, Takeshi Shimizu, Tomoyuki Maruo, Hui Ming Khoo, Toshiki Yoshimine, Yuko Goto. Treatment of the Pain after Root Ablation-Depending on the Paroxysmal and Continuous Patterns of Pain. 15th World Congress of Neurosurgery (WFNS2013) 2013/9/13 Seoul, Korea 口演

31. Khoo Hui Ming, Kishima Haruhiko, Tani Naoki, Oshino Satoru, Maruo

Tomoyuki, Yanagisawa Takufumi, Hirata Masayuki, Katou Amami, Yoshimine Toshiki, Provocative test by electrical stimulation of the entorhinal area prevents memory impairment following amygdalohippocampectomy 30th INTERNATIONAL EPILEPSY CONGRESS 2013/6/26 Montreal, Canada Poster

32. Haruhiko Kishima, Satoru Oshino, Naoki Tani, Tomoyuki Maruo, Khoo Hui Ming, Morris Shayne, Toshiki Yoshimine Is additional amygdalohippocampectomy necessary for the intractable lesional temporal lobe epilepsy. 30th INTERNATIONAL EPILEPSY CONGRESS 2013/6/25 Montreal, Canada Poster

33. 谷 直樹、貴島晴彦、クー ウイミン、押野 悟、圓尾知之、細見晃一、柳澤琢史、平田雅之、吉峰俊樹 側頭葉てんかんにおける神経機能結合変化 Neuro2013 2013/6/20 国立京都国際会館(京都)Poster

6. 研究組織

(1) 研究代表者

クー ウイミン (KHOO, Hui Ming)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：70591022