

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461273

研究課題名(和文) 海馬自発てんかんモデルにおけるコネクシンを標的とした病態の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis for mechanism of spontaneous seizures in a rat model of multiple prenatal freeze lesioning and development of novel treatment for epilepsy focusing on connexin

研究代表者

鎌田 崇嗣 (Kamada, Takashi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70614460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前、胎生期の頭蓋に凍結損傷を与えることによって、生後海馬での自発てんかんを発症する皮質異形成モデルラットを開発した。最近、てんかん発症の機序として、慢性炎症化とコネクシン蛋白群を介した過剰な細胞間ネットワークの形成の関与が指摘されている。今回、我々はこの皮質異形成モデルラットを用いて、てんかん発症後の海馬および皮質にて慢性炎症化に関連する受容体および炎症性サイトカインとコネクシン蛋白群の発現を解析し、それらが上昇していることを認めた。皮質異形成が関与した海馬てんかん発症の機序に、慢性炎症化とコネクシン蛋白群が関与した異常興奮性ネットワーク回路形成が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In a previous study we created an animal model with multiple FCD, produced by freeze lesioning during embryonic development, showing hippocampal spontaneous seizures. Recently, involvement of chronic inflammation and excessive intercellular network with connexin has been pointed out as a mechanism for development of epilepsy. In this study, we analyzed the expression of receptors and inflammatory cytokines related to chronic inflammation and connexin in the hippocampus and cortex after the onset of epilepsy in this animal model. Semiquantitative densitometry of immunoreactivity revealed increased IL-1 β , Cx32, Cx43 expression in hippocampus and GFAP, TLR4, IL-1 β , Cx32, Cx36, Cx43 expression in lesioned cortices. The mechanism for development of hippocampal epileptogenesis with cortical dysplasia was suggested to be an abnormal excitatory network circuit involving chronic inflammation and connexin.

研究分野：神経内科学(てんかん)

キーワード：てんかん 皮質異形成 コネクシン蛋白群 てんかん動物モデル

1. 研究開始当初の背景

てんかんは種々の原因によってもたらされる慢性的脳疾患であり、大脳ニューロンの過剰な発射に由来する反復性の発作(てんかん発作)を特徴とする定義されている。現在まで様々な機序を持つ抗てんかん薬が開発されてきたが、2~3割は治療に抵抗性で発作症状のために社会生活が十分に営めず大きな社会的損失となっている。その中でも内側側頭葉てんかんは、てんかん全体に占める割合が高いが、しばしば薬物治療抵抗性であり、てんかん外科手術が適応されることが多い。切除された脳標本の病理学的検討、またMRI等の画像診断の発達によって、内側側頭葉てんかんでは、海馬体病変の他にも側頭葉内あるいは側頭葉外の皮質病変がしばしば合併することが分かってきた。合併する皮質病変の中でも特に頻度が高く、てんかん発症に一番関連していると考えられているのは皮質異形成である。内側側頭葉てんかんは、動物モデルおよびヒトにおいて多数の研究がなされているにも関わらず、発症機序はほとんど分かっていない。現在まで発症機序を解明するために様々な動物モデルが用いられてきた。遺伝子改変、凍結損傷、電気刺激、高体温状態への暴露、等の様々な手法が用いられてきた。しかし、ヒトの内側側頭葉てんかんにおいては、一部に乳幼児期の熱性痙攣の既往がみられるのみで、ほとんどの患者では出生後の発症リスク要因を見出せず、遺伝的な要素もほとんどないと考えられている。そのため、従来用いられてきたほとんどのてんかん発症動物モデルは、ヒトの内側側頭葉てんかんを再現したものとは言い難い。

そのことより、高瀬、重藤らはよりヒトの内側側頭葉てんかに近いモデルを作製するため、凍結損傷による皮質異形成モデルに注目した。出生直後の新生児ラットの頭部に冷却損傷を加え、大脳半球に皮質異形成を作製する皮質異形成モデルが従来から用いられてきた。しかし、この皮質異形成の組織所見は、ヒトの皮質異形成とは異なり脳癩痕に近いものであった。そこで高瀬、重藤らは、胎生18日齢のラットの頭蓋に凍結損傷を加えることによりヒトの皮質異形成に極めて近似した局所大脳皮質異形成を皮質に作成することに成功し、大脳皮質を連日電気刺激することにより海馬のてんかん原性獲得(キンドリング)が促進されることを明らかにした。さらに鎌田は、この胎児期凍結損傷の皮質異形成ラットモデルで皮質異形成を多数作成することにより海馬からの自発てんかん発作を発症させることに世界で初めて成功した。これは、出生後の薬物や高体温暴露、外傷、電気刺激によるキンドリング等の介入なしに、自然に海馬からのてんかん発作を発症するヒトの内側側頭葉てんかに極めて近い動物モデルと考えられた。

動物実験モデルやてんかん患者の外科切除標本の研究により、てんかん発症のメカニ

ズムに関連するものとして、何らかの要因を契機とした脳内へのアルブミンや炎症性サイトカイン等の浸潤、炎症に関連するIL-1R1(Interleukin-1 type receptor)やTLR4(Toll-like receptor)が関与した脳内での慢性的な炎症化、ミクログリア、アストロサイトが炎症に関連した受容体および炎症性サイトカインを通じて関与していると推定されている海馬での異常ニューロン新生、ニューロンとの三者間シナプスにおいて、シナプス伝達およびニューロン機能の制御に関わっているとされているアストロサイトによるgap junction channelを形成する細胞間情報伝達に関わるコネクシン(Cx)蛋白群が関与した過剰な細胞間ネットワークの形成(異常アストロサイト・ネットワーク)等が指摘されている。すなわち、海馬でのてんかん発症には皮質異形成からの興奮性の刺激などによって、急性および慢性的な炎症性の変化が生じ、異常ニューロン新生とともに、Cx蛋白群が関与した異常アストロサイト・ネットワークが形成され、興奮性の増大の進行を促進すると推測される。

2. 研究の目的

本研究では、私たちの開発した皮質異形成モデルを用いて海馬自発てんかん発症のメカニズムを、慢性的な炎症化に関連した受容体とCx蛋白群が関与したアストロサイト・ネットワークの役割に焦点を当てて解明することを目的とした。

そのために皮質異形成モデルにて、海馬自発てんかん発症後の海馬での炎症に関連する受容体、炎症性サイトカイン、アストロサイト、Cx蛋白群の発現を解析する。また、皮質異形成部においても同様の発現の解析を行う。海馬および皮質異形成部での発現とコントロールと比較して、それぞれの役割を評価し、側頭葉てんかんのてんかん原性獲得の機序を解明していくことを目指した。

3. 研究の方法

実験の方法は使用動物数と動物の苦痛を最小限にするように計画された。すべての実験は動物実験ガイドラインに沿って行った。

妊娠したSprague-Dawley(SD)ラット(Charles River Laboratories, Sherbrooke, Quebec, Canada)が用いられた。すべての群において、妊娠したSDラットは、妊娠18日目にペントバルビタール(50mg/kg, 腹腔内投与)にて全身麻酔を行い、リドカインによる局所麻酔を下腹部皮膚、腹直筋、腹膜に行った。その後、下腹部を縦に切開し、両側の子宮を部分的に腹腔内から取り出した。液体窒素で冷却された直径2.3mmの半球性の先端を持った金属性のプローブを子宮壁の外側から4秒間、ラット胎児の頭蓋部に接触させた。その手術後、子宮を腹腔内に戻し、0.9%生理食塩水で腹腔内を満たした。腹膜、筋層、皮膚を縫合した後、母ラットをケージに戻し、

麻酔から覚醒するまで保温した。そして、母ラットは出産まで通常通りに飼育された。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育てられた。

子ラットは、以下のように分類された：グループ A，両側多巣性損傷（それぞれの脳半球に縦方向に 2ヶ所の凍結損傷，5匹）グループ B，胎生期に凍結損傷を与えないが、グループ A と同様の位置に偽凍結損傷を与えた（5匹）。

組織学および免疫組織科学的検討を行うために、グループ A と B は出生後 70 日目でサクリフェイスされた。すべてのラットは、ペントバルビタールの過量投与（60 mg/kg，腹腔内投与）後に、経心臓的に生理食塩水、続けて 4%パラホルムアルデヒド（pH 7.0，室温）にて還流固定を行った。脳は速やかに取り出され、さらに 24 時間 4%パラホルムアルデヒドで固定し、最終的にパラフィン固定された。

免疫染色のために、脳切片をキシレンにて脱パラフィン化し、エタノールで再水和化、メタノール中の 0.3%過酸化水素水で 30 分間処理され、その後トリスバッファー液（0.05% Tris saline, pH 7.6, with 0.1% Triton X-100）にて 3 回洗浄された。脳切片に 5%NGS を含んだ PBS 液で希釈された一次抗体を 4 で 12 時間反応させた。一次抗体は、GFAP、TLR4、IL-1、Cx32、Cx36、Cx43 を用いた。切片は、さらにトリスバッファー液で 3 回洗浄され、適切なホースラディッシュ・ペルオキシダーゼを結合した二次抗体（Dako EnVision System-HRP; Dako, Carpinteria, CA, USA）と室温にて一時間反応させた。最後に、切片は、トリスバッファー液で再度洗浄され、0.003%過酸化水素水を含む 0.02% 3,3'-ジアミノベンジジン・テトラヒドロクロライド（DAB, D5637; Sigma, St. Louis, MO, USA）と 1-5 分間反応させた。すべての切片は、ヘマトキシリンで 20 秒間核染色、脱水を行い、カバーガラスを載せ保護した。

GFAP、TLR4、IL-1、Cx32、Cx36、Cx43 の免疫染色では、Image J version 1.43u software for Windows（based on NIH Image; Wayne Rasband, NIH, Maryland, USA）を用いたデンストメトリーによる半定量的解析を行った。解析のために、グループそれぞれのラット 5 匹の海馬 C1 と C3 領域から錐体細胞または細胞間領域が選択された（TLR4, n=125 細胞; GFAP、IL-1、Cx32、Cx36、Cx43, n=125 領域）。同様に、各グループのラット 5 匹に対しグループ A からは皮質異形成部位、グループ B からは正常皮質の細胞または細胞間領域をそれぞれ選択された。TLR4 染色に対しては、核を除いた細胞質の濃度を測定して、その濃度から正常皮質下白質の濃度を標準化のために引き算した。GFAP、IL-1、Cx32、Cx36、Cx43 染色に対しては、それぞれ約 5000 ピクセルの領域の濃度を測定して、同様に標準化のために正常皮質下白質の濃

度を引き算した。

Unpaired t test 検定が、グループ A と B 間の海馬と皮質の GFAP、TLR4、IL-1、Cx32、Cx36、Cx43 のデンストメトリーによる半定量的解析の比較に用いられた。

4. 研究成果

海馬においては、GFAP、TLR4、Cx36 の染色強度はグループ A とグループ B にて差がみられなかったが（GFAP: $p = 0.2341$; TLR4: $p = 0.8393$; Cx36: $p = 0.5867$, 図 1）IL-1、Cx32、Cx43 の染色強度においてはグループ B よりもグループ A にてより強かった（IL-1: $p < 0.0001$; Cx32: $p < 0.0001$; Cx43: $p < 0.0001$, 図 1）。

皮質においては GFAP、TLR4、IL-1、Cx32、Cx36 の染色強度はいずれもグループ B よりもグループ A にてより強かった（GFAP: $p < 0.01$; TLR4: $p < 0.1$; IL-1: $p < 0.0001$; Cx32: $p < 0.001$; Cx36: $p < 0.0001$; Cx43: $p < 0.0001$, 図 2）。

図1(海馬)

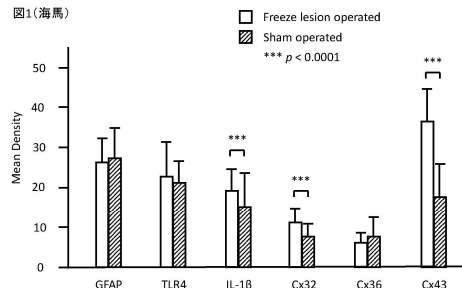
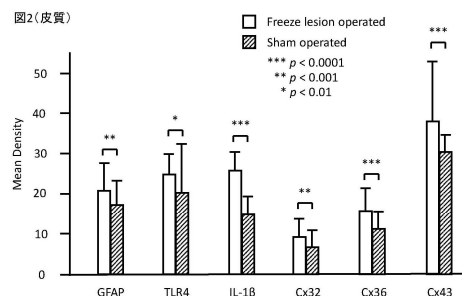
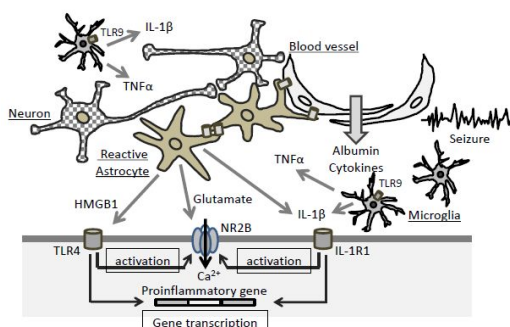


図2(皮質)



凍結損傷ラットモデルの皮質異形成部においては、顕著な層構造異常はみられているが、明らかな細胞構築異常はみられていない。前回の NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDAR）およびグルタミン酸ドパミントランスポーターの免疫染色による半定量的デンストメトリーによる解析では、生後 28 日目、78 日目で皮質異形成部において NMDAR-NR1、-2A、-2B、GLAST、GLT1 の発現の上昇がみられ、興奮性の増大が示唆された。脳波上は皮質異形成から海馬へ伝播するてんかん性放電活動はみられなかったが、皮質異形成から海馬への興奮性の間欠的な刺激が、二次的に海馬での変化を引き起こし、その結果、キンドリングの動物モデルと同じように海馬のてんか

ん原性を獲得したと考えた。実際、皮質異形成での GLAST, GLT1 の発現の変化は早期（生後 28 日目）の段階でみられているが、同時期に海馬では変化はみられていなかった。このモデルは、胎児期に放射線暴露あるいは MAM に暴露させる皮質異形成の動物モデルと比較して、海馬での形態的な異常は微小なものであるが、免疫染色による解析では、生後 28 日目から海馬にて NR2A, 2B 発現の上昇を認め、この時点で海馬にてんかん原性獲得に繋がる変化が生じていたと考えられた。さらに、生後 78 日目には NR1, -2A, -2B の発現の上昇がみられ、さらに GLAST, GLT1 の上昇も伴っていた。主要なアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターである GLAST と GLT1 の発現の継時的な変化は、てんかん原性獲得のプロセスが存在することを示唆している。



皮質異形成からの興奮性の刺激を契機としたミクログリア、炎症性サイトカイン、TLRが関与した異常ニューロン新生、及び受容体を介した炎症の慢性化

今回の研究では、海馬自発てんかん発症後の海馬の解析にて、炎症に関連する IL-1R1 (Interleukin-1 type receptor) に作用し、炎症の慢性化に寄与するとされている IL-1 の上昇を認めた。また、ニューロンとオリゴデンドロサイトの gap junction channel を形成する細胞間情報伝達に関わるコネクシン(Cx)蛋白群の Cx32 の上昇を認め、アストロサイトの gap junction channel を形成する細胞間情報伝達に関わるコネクシン(Cx)蛋白群の Cx43 の上昇を認めた。このことは、私たちがこのモデルにおける海馬自発てんかん発症のメカニズムとして推定している「皮質に作成した皮質異形成からの興奮性放電が繰り返し海馬に及ぶことによって一時的な blood brain barrier (BBB) の障害が引き起こされ、その結果、末梢血中のアルブミンや炎症性サイトカイン等が浸潤して、一時的な炎症状態が起こる。一時的な炎症状態が繰り返されると、TLR4 や IL-1R1 を介したグリア炎症が慢性化し、ミクログリア、アストロサイトが関与した異常ニューロン新生が促進される。異常ニューロン新生による異常神経回路の形成に加えて、Cx を介した異常アストロサイト・ネットワークの形成が進行することにより回路全体の興奮性が増大する。これによりてんかん発作を発症させるニューロン・オリゴデンドロサイト・ア

ストロサイト興奮性回路が完成する。」を示唆する結果である。

また、皮質異形成部においてはアストロサイトのマーカーである GFAP、慢性炎症化に関与する受容体および炎症系サイトカインである TLR4、IL-1、ニューロンとオリゴデンドロサイトの gap junction channel を形成する細胞間情報伝達に関わるコネクシン(Cx)蛋白群の Cx32、アストロサイトの gap junction channel を形成する細胞間情報伝達に関わるコネクシン(Cx)蛋白群の Cx43 の上昇に加え、ニューロン活動の同期化に関わるとされている Cx36 の上昇を認めた。この結果からも、皮質異形成部では、凍結損傷という侵襲によって、より慢性炎症化や異常なニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトのネットワークが形成されやすくなっていると考えられる。しかし、皮質異形成部では、胎生 18 日目の皮質の層構造がほぼ完成された時期に凍結損傷によって層構造が破壊され、その後再構築されることとなる。結果、顕著な層構造異常が形成される。脳波上、皮質異形成部からはてんかん性異常波は認めなかったが、異常なネットワークが形成され、局所的な興奮性の増大があっても、元々の顕著な層構造異常のためにてんかん性放電を出力するような回路は形成されにくいと推定される。

今回の研究によって、海馬自発てんかん発作を発症する皮質異形成モデルラットのてんかん発症のメカニズムには海馬での慢性炎症化とニューロンおよびアストロサイトの異常ネットワーク回路の形成が関与していることが示唆された。

<引用文献>

Fauser S, Schulze-Bonhage A, Honegger J, et al. Focal cortical dysplasias: Surgical outcome in 67 patients in relation to histological subtypes and dual pathology. Brain 2004;127:2406-2418.

Blümcke I, Thom M, Aronica E, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. Epilepsia 2011;52:158-174.

Francione S, Nobili L, Cardinale F, et al. Intra-lesional stereo-EEG activity in Taylor's focal cortical dysplasia. Epileptic Disorder 2003;5(suppl 2):S105-S114.

Scantlebury M.H, Gibbs S.A, Foadjo B, et al. Febrile seizures in the predisposed brain: A new model of temporal lobe epilepsy. Ann. Neurol 2005;58:41-49.

Kellinghaus C, Möddel G, Shigeto H, et al. Dissociation between in vitro and in vivo epileptogenicity in a rat model of cortical dysplasia. *Epileptic Disord* 2007;9:11-19.

Takase K, Shigeto H, Suzuki S.O, et al. Prenatal freeze lesioning produces epileptogenic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2008;49:997-1010.

Kamada T, Sun W, Takase K, et al. Spontaneous seizures in a rat model of multiple prenatal freeze lesioning. *Epilepsy Reseach* 2013;105:280-291.

Marchi, Granata, Ghosh, et al. Blood-brain barrier dysjunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches. *Epilepsia* 2012:1-10

Vezzani, Aronica, Mazarati, et al. Epilepsy and brain inflammation. *Experimental Neurology* 2011;244:11-21

Maroso, Balosso, Ravizza, et al. Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signaling in epilepsy: the importance of IL-1 beta and high-mobility group box 1. *J Internal Medicine* 2011;270:319-26

Collignon, Wetjen, Cohen-Gadol, et al. Altered expression of connexin subtypes in mesial temporal lobe epilepsy in humans. *J Neurosurg* 2006;105:77-87

Seifert, Carmignoto, Steinhäuser. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Research Reviews* 2010;63:212-221

Jin and Chen. Role of gap junctions in epilepsy. *Neurosci Bull* 2011;27:389-406

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 崇嗣 (KAMADA, Takashi)
久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科・助教
研究者番号：70614460

(2) 研究分担者

重藤 寛史 (SHIGETO, Hirosih)
九州大学大学院医学研究院神経内科学・共同研究員
研究者番号：50335965

高瀬 敬一郎 (TAKASE, Kei-ichiro)
九州大学大学院医学研究院神経内科学・共同研究員
研究者番号：00467903

真崎 勝久 (MASAKI, Katsuhisa)
九州大学大学院医学研究院神経内科学・助教
研究者番号：90612903

山口 浩雄 (YAMAGUTI, Hiroo)
九州大学大学院医学研究院神経内科学・助教
研究者番号：00701830

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

()