

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462207

研究課題名(和文)炎症関連サイトカインはてんかん発作症状のバイオマーカーとなりうるか？

研究課題名(英文)Dose inflammatory cytokines work as biomarkers of epileptic seizure?

研究代表者

貴島 晴彦(Kishima, Haruhiko)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10332743

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)：てんかんの診療は、症状、脳波、画像診断によるが、経時的な症状の変化を客観的に捉えることは困難であり、その観察は患者や家族の訴えのみによるところが大きい。炎症性蛋白であるHMBG1がてんかん発作に関連する客観的な生化学的バイオマーカーとなる可能性について検討した。てんかん患者の血液中のHMBG1濃度を測定したところ、部分発作に関連した有意な変化は認められず、また髄液中の濃度は感度以下であった。一方、ラットてんかんモデルでは、発作後2日目に髄液中のHMBG1濃度の有意な上昇が認められた。この結果は、発作型や頻度によっては髄液中HMBG1がてんかん発作のバイオマーカーとなる可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The diagnosis of epilepsy depends on their subjective symptoms, electroencephalogram, and imaging, but it is difficult to follow up objectively their changes over time. Clinical observation mostly depends on only the complaints of patients and families. We hypothesized that High Mobility Group Box 1 (HMBG1), an inflammatory protein, would become an objective biochemical biomarker related to epileptic seizures. HMBG1 Concentration in plasma of epileptic patients showed no significant change related to partial seizure and HMBG1 concentration in cerebrospinal fluid (CSF) was less than sensitivity. On the other hand, in the rat epilepsy models, significant increase in HMBG1 concentration in the CSF was observed on the second day after the epileptic seizure. These results indicate that HMBG1 in the CSF have potential to become a biomarker of epileptic seizures, depending on seizure type and its frequency.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：てんかん バイオマーカー 炎症性サイトカイン 髄液 血液

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは人口の約1%と高い有病率を有する慢性神経疾患である。その診断は、症状、脳波、画像診断によるが、専門的な知識を要する。また心因性非てんかん発作(偽発作)の診断や経時的な症状の変化を客観的に捉えることは困難であり、その診断は患者や家族の訴えのみによるところが大きい。そこで、これまでの生理学的や解剖学的なパラダイムに加えて、定量的に数値で表すことのできる生化学的なパラダイムがてんかん診療に望まれる。これにより、薬剤、手術などの治療の評価も容易に客観化されるものと考えられる。代表研究者は、これまでに脳腫瘍に対する免疫治療法の研究を通して(Kishima et al. Br J Neurosurg 1998, Kishima et al. Br J Neurosurg 1999)、中枢神経系の免疫応答を研究を行っている。また、臨床の場ではてんかんの外科治療を主課題とし(Kishima et al., Neuro Medico Chir (tokyo) in press)、診断、手術や薬物治療を行い、さらにその後の経過を綿密に観察している。また、臨床研究として、頭蓋内電極を用いた発作焦点検索の新たな手法の開発を行っている。さらに、てんかんモデル動物を作成し、その脳波変化ならびに脳表の血流変化を解析し、てんかん発作発症の病態解析や発作伝播様式の解析を行っている。てんかんでも自己免疫が原因と考えるものや感染症に伴うもの、免疫学的機序が疑われている海馬硬化症などがあり、その発症の背景に免疫系の関与が推定されている。特に、この数年ではてんかん発作には自然免疫系のレセプターである Toll like receptor (TLR)-4/HMGB1 系が関与していることが報告されている(Marroso et al. Nat Med 2010)。さらに、興味深いことに TLR-4/HMGB1 系は大脳皮質形成に関与し、しばしばてんかん焦点の原因となる皮質形成異常症ではふつう正常皮質で認められない HMGB1 や関連タンパクの発現が認められると報告されている(Zurolo et al. Brain 2011)。一方、脳虚血モデルや脳外傷のモデルでも HMGB1 の発現が血管新生に関与すること(Hayakawa et al. Proc Natl Acad Sci USA 2012)、アストロサイトに発現する Aquaporin-4 を介して血液脳関門に関与し脳浮腫に関与すること(Okuma et al. Ann Neurol 2012)が報告されている。てんかんでもこれまではニューロンの異常発火が原因であると考えられていたが、てんかん症状発現にはアストロサイトやそこから発現する Aquaporin-4 が関与すること(Tian et al. Net Med 2005, Binder et al. Glia 2012)、また TGFβ などのサイトカインが関与しアストロサイトの機能不全が起ること(Heinemann et al. Glia 2012)が示されている。これらのことから、てんかん病態ならびに発作発現でも A. TLR-4/HMGB1 系がアストロサイトに関与しその機能を変貌させ様々

な炎症関連サイトカインが放出されていること B. またその反面 HMGB1 により TLR-4/HMGB1 系を介して産生される各種サイトカイン(IL-1β, IL-6, TNF-α, I-10, IFN-γ, TGFβ)がアストロサイトの活動を調節していることなどがてんかん発作に関与している可能性が推定される。そこで、これらのタンパクの量的な変化が、てんかん病態や発作発現のバイオマーカーになる可能性があるものと考え、今回の研究計画を着想した。

## 2. 研究の目的

High-mobility group box 1 (HMGB1)は樹状細胞、免疫関連細胞、マクロファージ、損傷細胞などから放出され、外傷、感染、癌、自己免疫疾患で重要な役割を果たす。HMGB1 はてんかんでも、その発症や発作発現に関連があるとされている。本研究では髄液中・血中の HMGB1 やそれにより誘導される炎症関連タンパクを測定し、てんかんの病態、発作との関連性を見出すことにより、それら物質がてんかんのバイオマーカーになる得る可能性について探索する。

## 3. 研究の方法

### 動物てんかんモデルでの研究

動物てんかんモデルは、カイン酸を投与することによりてんかん症状を起こさせるモデルを用いた。代表的なイオンチャネル型グルタミン酸受容体作動薬の一つであるカイン酸(3mg/kg)をラット腹腔内に投与すると、その約 1 時間後からてんかん症状を呈する。その病理学的特徴よりカイン酸モデルは側頭葉てんかんモデルと考えられている。このモデルでの脳波変化と症状、測定するタンパク濃度の変化を経時的に測定した。

この動物モデルの脳波測定は、ラット皮質脳波測定用の高密度脳表電極を作成して施行した。頭蓋骨を paper thin に切削し上記の電極で測定した。このようなモデルから得られた髄液、血液中の HMGB1 や各種サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-、I-10、IFN-、TGF)の濃度をエライザ法で測定し、てんかん症状、脳波との相関を検索した。エライザプレートは市販されているものを用いた

### てんかん患者を対象とした研究

てんかん患者あるいは非てんかん疾患の対照患者からの髄液、血液サンプルを蓄積した。患者データとサンプルあわせて蓄積する。得られた検体中の HMGB1 や各種サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-、I-10、IFN-、TGF)の濃度をエライザ法で測定し、てんかん発作との相関を検索した。こちらもエライザプレートは市販されているものを用いた。

## 4. 研究成果

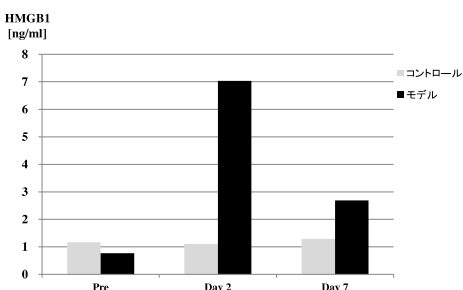
### 動物てんかんモデルでの研究

カイニン酸(10 mg/kg)を雌 SD ラットの腹腔内に投与することによりてんかんモデルを作成した。このモデルでは、投与後 2 時間後にはほぼ全例で痙攣を発症した。痙攣発症前に、頭蓋骨を paper thin に切削し、新たに作成した、ラット皮質脳波測定用電極で皮質脳波を測定したところ、てんかん性異常波が確認できた。このモデルを用いて、髄液、血液の収集を施行した。髄液採取については、腹腔に投与(ドミツール、ベトロファーム、ドルミカム)による麻酔下のもと、ラットの大槽から 100  $\mu$ l 程度の髄液が採取できることを確認した。血液は尾静脈から採取した。モデル作成前、カイニン酸投与後 6 時間、2 日後、1 週間後に髄液ならびに、血液を採取し、これらの検体中の HMGB1 の濃度を ELISA 法で測定した。その結果、2 日後で髄液中の HMGB1 濃度が上昇していた(図参照)。

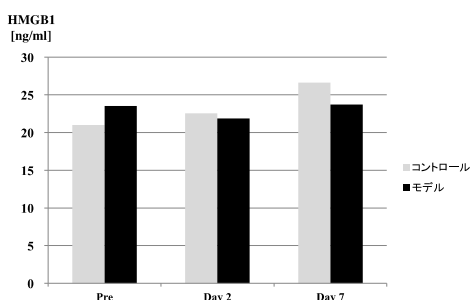
一方、血液中の HMGB1 濃度の上昇は認めなかった(図参照)。

2 日後の髄液中の HMGB1 濃度に焦点を当て、投与前およびコントロール(腹腔内 PBS 投与例)との比較、発作の強度との関連を明らかにする目的で、研究を継続している。

#### 髄液中HMGB1値



#### 血漿中HMGB1値



#### てんかん患者を対象とした研究

侵襲を有する前向き研究として、倫理委員会の承認を得た。てんかん発作前後での血液サンプル、ならびに髄液採取を施行するてんかん以外の患者から髄液ならびに血液サンプルを収集し測定を行った。てんかん患者からの髄液採取はその侵襲性から血液データを収集してから、改めて行うこととした。ヒト検体からの髄液中の HMGB1 濃度は用いた ELISA プレートでは、感度以下であった。また、血液からのデータは得られたが、軽度の発作では血漿中の HMGB1 の上昇を認めな

った。

#### 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 12 件)

1. Kishima H, Kato A, Oshino S, Tani N, Maruo T, Khoo HM, Yanagisawa T, Edakawa K, Kobayashi M, Tanaka M, Hosomi K, Hirata M, Yoshimine T Navigation-assisted trans-inferotemporal cortex selective amygdalohippocampectomy for mesial temporal lobe epilepsy; preserving the temporal stem. *Neurol Res.* 39(3):223-230 査読有 2017 DOI: 10.1080/01616412.2016.1275458
2. Edakawa K, Yanagisawa T, Kishima H, Fukuma R, Oshino S, Khoo HM, Kohayashi M, Tanaka M, Yoshimine T. Detection of Epileptic Seizures using Phase-Amplitude Coupling in Intracranial Electroencephalography. *Sci Rep.* 6 : 25422, 査読有 2016 DOI:10.1038/srep25422
3. Yanagisawa T, Fukuma R, Seymour B, Hosomi K, Kishima H, Shimizu T, Yokoi Y, Hirata M, Yoshimine T, Kamitani Y, Saitoh Y Induced sensorimotor brain plasticity controls pain in phantom limb patients *Nat Commun.* 7: 13209. 査読有 2016. DOI:10.1038/ncomms13209
4. Fukuma R, Yanagisawa T, Yorifuji S, Saitoh Y, Koichi H, Kishima H, Shimizu T, Sugata H, Yokoi H, Hirata M, Kamitani Y, Yoshimine T. Real-Time Control of a Neuroprosthetic Hand by Magnetoencephalographic Signals from Paralyzed Patients. *Sci Rep.* 6:21781, 査読有 2016. DOI: 10.1038/srep34970.
5. Tani N, Kishima H, Khoo HM, Yanagisawa T, Oshino S, Maruo T, Hosomi K, Hirata M, Nomura KT, Kazui H, Ali M, Kato A, Yoshimine T. Electrical stimulation of the parahippocampal gyrus for prediction of post-hippocampectomy verbal memory decline. *J Neurosurgery.* 125(5):1053-1060. 査読有 2016 .DOI:10.3171/2015.7.JNS15408.
6. Fukuma R, Yanagisawa T, Yorifuji S, Kato R, Yokoi R, Hirata M, Saitoh Y, Kishima H, Kamitani Y, Yoshimine T. Closed-Loop Control of a Neuroprosthetic Hand by

- Magnetoencephalographic Signals. PLOS ONE. 10(7):e0131547, 査読有 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0142287
7. Ohnishi YI, Maruo T, Shinzawa K, Iwatsuki K, Moriwaki T, Oshino S, Kishima H, Yoshimine T. Olfactory sphere cells are a cell source for  $\gamma$ -aminobutyric acid-producing neurons. J Neurosci Res. 15(1):23-9, 査読有 2015. DOI: 10.1002/jnr.23585
  8. Morris S, Hirata M, Sugata H, Goto T, Matsushita K, Yanagisawa T, Saitoh Y, Kishima H, Yoshimine T. Patient Specific Cortical Electrodes for Sulcal and Gyral Implantation. IEEE Trans Biomed Eng. 62(4):1034-41, 査読有 2015 DOI:10.1109/TBME.2014.2329812
  9. Kishima H, Nakamura H, Oshino S, Tanaka H, Yoshimine T. Adult hemimegalencephaly associated with multiple cerebral aneurysms. Neurology. 84(24):2460-1, 査読有 2015. DOI:10.1212/WNL.00000000000001685
  10. 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, 査読有 2014. DOI:10.1002/mds.25810
  11. 押野悟、貴島晴彦 X: 難治てんかんに対する迷走神経刺激術 新 NS NOW I から XII まで 脳神経から見た脳神経外科手術 5:132-141 2016
  12. 押野悟、貴島晴彦、吉峰俊樹 非痙攣性てんかん重積の病態と治療 脳神経外科ジャーナル別冊 229-235 2016
- [学会発表](計 39 件)
1. 小林真紀、貴島晴彦、他. 小児の頭蓋内電極を用いた機能解析 ポスター 第 40 回日本てんかん外科学会 2017.1.26 大阪
  2. 谷直樹、貴島晴彦、他. 非言語優位半球側頭葉てんかん患者の言語性記憶障害に関する脳内ネットワーク研究 ポスター 第 40 回日本てんかん外科学会 2017.1.26 大阪
  3. 柳澤琢史、貴島晴彦、他. 側頭葉てんかんにおける発作間欠期てんかん性活動のネットワーク ポスター 第 40 回日本てんかん外科学会 2017.1.26 大阪
  4. 枝川光太郎、貴島晴彦、他. 頭蓋内電極を用いた異なる電極間の Phase-Amplitude Coupling ミニシンポジウム 第 40 回日本てんかん外科学会 2017.1.26 大阪
  5. 貴島晴彦、他. 前頭葉てんかんに対する外科治療の工夫 シンポジウム 第 40 回日本てんかん外科学会 2017.1.27 大阪
  6. 押野 悟、貴島晴彦、他. 小児難治性てんかんに対する半球・多脳葉離断術の長期機能予後 シンポジウム 第 40 回日本てんかん外科学会 2017.1.26 大阪
  7. Haruhiko Kishima et al. Functional Mapping for Children with Intractable Epilepsy. Lecture The 10th Asian Epilepsy Surgery Congress 2016.11.5 Incheon. Korea
  8. Haruhiko Kishima et al. The features of pediatric epileptic surgery. Lecture 44th Annual Meeting of the international Society for Pediatric Neurosurgery 2016.10.23-27 Kobe
  9. 枝川光太郎、貴島晴彦、他. 頭蓋内脳波を用いた異なる電極間の発作時 Cross-Frequency Coupling ポスター 第 50 回日本てんかん学会学術集会 2016.10.8 静岡
  10. 押野悟、貴島晴彦、他. 迷走神経刺激療法の発作抑制効果 口演 第 50 回日本てんかん学会学術集会 2016.10.7 静岡
  11. 柳澤琢史、貴島晴彦、他. 側頭葉てんかんにおける機能的ネットワーク 口演 第 50 回日本てんかん学会学術集会 2016.10.7 静岡
  12. Edakawa K, Kishima H, et al. Detection of Epileptic Seizures Using Phase-Amplitude Coupling in Intracranial Electroencephalography. Poster 12TH EUROPEAN CONGRESS ON EPILEPTOLOGY 2016.9.12 Prague.Czech
  13. Tani N, Kishima H et al. Altered functional connectivity in temporal lobe epilepsy patients with verbal memory impairment. Poster 12TH EUROPEAN CONGRESS ON EPILEPTOLOGY 2016.9.12 Prague.Czech
  14. 谷直樹、貴島晴彦、他. 傍海馬回電気刺激による海馬切除術後言語性記憶障害予測 シンポジウム 第 39 回日本てんかん外科学会 2016.1.21 仙台
  15. 枝川光太郎、貴島晴彦、他. Phase Amplitude Coupling によるてんかん脳波解析 シンポジウム 第 39 回日本てんかん外科学会 2016.1.21 仙台
  16. 平田雅之、貴島晴彦、他. 脳律動にもとづいた脳磁図・硬膜下電極による脳機能検査 シンポジウム 第 39 回日本てんかん外科学会 2016.1.21 仙台
  17. 押野 悟、貴島晴彦、他. 頭蓋内電極留置の pitfall と工夫 ビデオミニシンポ

- ジウム 第 39 回 日本てんかん外科学会  
2016.1.21 仙台
18. 小林真紀、貴島晴彦、他. 頭蓋内電極留置術を行った難治性てんかん症例の検討 疾患の特徴と成績 ポスター 第 39 回日本てんかん外科学会 仙台 2016.1.21
  19. 貴島晴彦、他. 脳磁図によるてんかんネットワークの可視化 ポスター 柳澤琢史、第 39 回 日本てんかん外科学会 2016.1.21 仙台
  20. 柳澤琢史、貴島晴彦、他. Decoded neurofeedback による幻肢痛の病態解明と新たな治療法開発 招待講演 BMI 懇話会 2015.11.14 東京
  21. 貴島晴彦、他. てんかんの外科 - 離断手術 - Disconnection Surgery for Intractable Epilepsy マラソンレクチャー 第 49 回日本てんかん学会学術総会 2015.10.31 長崎
  22. 枝川光太郎、貴島晴彦、他. Cross-Frequency Coupling によるてんかん発作の同定 ポスター 第 49 回日本てんかん学会学術集会 2015.10.30 長崎
  23. 貴島晴彦、他. 側頭葉てんかん患者の言語性記憶障害に伴う resting state network の変化 口演 第 49 回日本てんかん学会学術総会 2015.10.30 長崎
  24. 押野 悟、貴島晴彦、他. 半球・多能葉離断術の長期機能予後 口演 第 49 回日本てんかん学会学術総会 2015.10.30 長崎
  25. Kishima H, et al. How do I do it? Selective amygdalohippocampectomy navigation-assisted trans-inferotemporal cortex selective amygdalohippocampectomy for mesial temporal lobe epilepsy. Lecture 9th Asian Epilepsy Surgery Congress (AESC2015) 2015.10.24 Udaipur, India
  26. 枝川光太郎、貴島晴彦、押野 悟、他. Cross-Frequency Coupling によるてんかん発作の同定 口演 日本脳神経外科学会第 74 回学術総会 2015.10.15 札幌
  27. 押野悟、貴島晴彦、他. 小児難治性てんかんに対する半球・多脳葉離断術の長期機能予後 シンポジウム 日本脳神経外科学会第 74 回学術総会 2015.10.15 札幌
  28. Yanagisawa T, Kishima H, et al. Modulation of phantom limb pain using neuroprosthetic hand based on real-time magnetoencephalography. Oral The 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society 2015.7.28 Tokyo
  29. 柳澤琢史、貴島晴彦、他. 脳磁図によるてんかんネットワークの可視化 口演 第 17 回ヒト脳機能マッピング学会 2015.7.3 大阪
  30. 押野悟、貴島晴彦、他. 舌の一次感覚野から摘出した難治性てんかん・海綿状血管腫の一例 口演 第 17 回 日本脳機能マッピング学会 2015.7.1 大阪
  31. 貴島晴彦他. 画像で示す高次機能障害における脳機能結合の変化 シンポジウム 第 38 回日本脳神経 CI 学会総会 愛知 2015.2.14
  32. 押野 悟、貴島晴彦、他. 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 シンポジウム 第 38 回てんかん外科学会 2015.1.15 東京
  33. 枝川光太郎、貴島晴彦、他. 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 シンポジウム 第 38 回日本てんかん外科学会 2015.1.15 東京
  34. 小林真紀、貴島晴彦他. 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 ポスター 第 38 回日本てんかん外科学会 2015.1.15 東京
  35. 柳澤琢史、貴島晴彦他. 安静時脳磁図によるてんかんネットワークの評価 ポスター 第 38 回日本てんかん外科学会 2015.1.15 東京
  36. 谷 直樹、貴島晴彦他. 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 ポスター 第 38 回日本てんかん外科学会 2015.1.15 東京
  37. 平田雅之、貴島晴彦他. 阪大学医学部附属病院における 4 年間 1424 件の脳磁図検査実績(シンポジウム) 第 38 回日本てんかん外科学会 2015.1.15 東京
  38. Khoo HM, Kishima H, et al. Frameless image-guided stereotactic implantation of depth electrodes via craniotomy for pharmacoresistant epilepsy Poster 2014 Annual Meeting of the American Epilepsy Society 2014.12.7 Seattle, USA
  39. Edakawa K, Kishima H, et al. Alternation of cross frequency coupling in the pre-ictal iEEG of epileptic patients Poster 2014 Annual Meeting of the American Epilepsy Society 2014.12.6 Seattle, USA
- 〔図書〕(計 3 件)
1. 貴島晴彦他、メジカルビュー社 神経外傷診療ガイドブック 185-194 2017
  2. 貴島晴彦他、メジカルビュー社 脳腫瘍や海綿状血管腫によるてんかん 焦点摘出は必要か 114-125 2016
  3. 貴島晴彦他、文光堂 脳神経外科医が知っておきたい薬物治療の考え方と実際 pp42-44 2016

〔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：  
出願年月日：  
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

貴島 晴彦 (KISHIMA, Haruhiko)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：10332743

##### (2)研究分担者

押野 悟 (OSHINO Satoru)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40403050

谷 直樹 (TANI Naoki)  
大阪大学・医学系研究科・特任研究員  
研究者番号：20598370

圓尾 知之 (MARUO Tomoyuki)  
大阪大学・医学系研究科・特任研究員  
研究者番号：90533810

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

枝川 光太郎(EDAKAWA Kohtaroh)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：40722806

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )

研究者番号：