

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462217

研究課題名(和文) てんかん発作誘導が獲得するてんかん原性と慢性炎症～てんかん原性を予防する脳内環境

研究課題名(英文) Inflammation and ischemia are Involved in the onset of epilepsy

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん発作による組織障害は、局所的に炎症性メディエーター：High Mobility Group Box 1 (HMGB1)が、Toll like receptor(TLR)の内因性リガンドとして働き、炎症の増幅サイクルが働き、てんかん発作を誘導する。てんかん発作で誘導される炎症性メディエーターは二次性に獲得されるてんかん原性部位を凌駕した領域に拡がりを見せた。血管新生調節機能を持つ糖タンパク質leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1)は脳内慢性炎症に関与し、我々は脳内にLRG1を過剰発現させた動物モデルの実験結果から神経発火の抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Inflammation of the brain has received widespread attention as an important factor in acquired epileptogenicity. Our clinical study suggested that expression of HMGB1 and TLR4 increases in epileptogenic lesion. HMGB1-TLR4 pathway also plays an important part in human epileptogenesis. It was discovered that in human epileptogenic hippocampus, HMGB1 acts chronically in localized areas and TLR4 becomes involved. On the other hand, leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1) therefore is implicated and expresses increasingly in a variety of physiological reactions, especially in inflammatory-related reactions. LRG gene [LRG1] was produced under a GFAP promoter in order to study the conditional overexpression of LRG in the brain. Electrophysiological characterization was used to analyze. The slopes of fEPSPs were significantly smaller in LRG-Tg mice than controls ( $p < 0.01$ ), indicating an impairment of synaptic transmission in LRG-Tg mice. LRG may work on epileptic seizure deterrence.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：てんかん原性 慢性炎症 海馬 パッチクランプ 糖タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

我が国のてんかん患者数は、約 100 万人とされ、そのうち 20% は多剤で薬物治療を行なってもてんかん発作のコントロールが不良であり、難治性てんかんと称される。難治性てんかんの患者は、いつ起こるかわからないてんかん発作のために就労など社会生活に大きなハンディキャップがあり、社会に順応できず生活に制約される事が多く、社会問題となっている。難治性てんかんの原因としては、先天的に脳に器質的異常を認める場合と、後天的に難治性てんかんに発展していく場合があり、後者の場合、繰り返すてんかん発作による組織損傷によって、神経細胞の脱落やグリオーシスの増生が誘導されており、このような病理学的変化が初回発作後から徐々にてんかん発作の再発や増悪を引き起こすとされている。とくに記憶力に関連した海馬においては、後天的にてんかん原性として変化しやすいことは周知されており、また一方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ことがわかっている。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を補っているとも考えられている。しかしながら一方で病的神経細胞新生は海馬のてんかん原性獲得に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。てんかんの原因については、組織炎症性反応も注目されており、てんかん発作による組織障害は、局所的に炎症性メディエーターである High Mobility Group Box 1 (HMGB1) が、Toll like receptor (TLR) の内因性リガンドとして働き、HMGB1-TLR pathway による炎症増幅サイクルが働くことで、慢性炎症環境がさらにてんかん発作を誘導しているとされる。我々の過去の研究結果では、てんかん発作により海馬で惹起された新生細胞の一部は消退せず、ニューロンの異常発火を誘発し、てんかん原性を獲得していたが、先述したような脳内環境によっててんかん原性が二次的に獲得されるのであれば、逆にこのような負のスパイラルを断ち切りてんかん原性獲得の抑止が、てんかん根治につながる考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では慢性炎症に着目し、神経栄養因子や炎症性メディエーターを阻害し、新生される異常興奮性神経細胞を不活化させ、てんかん原性獲得を阻止し、てんかん認知症、海馬萎縮を根治させる治療を構築することが最終的な目標である。そのために必要なてんかん原性形成を予防する脳内環境を問う研究では考慮した。

哺乳類ラマインシンの標的蛋白質 (mTOR) 活性は、神経細胞におけるエネルギー産生の改善や抗炎症・抗酸化作用など様々なメカニズ

ムによって、神経細胞を変性や細胞死から保護する作用があるとされている。我々は直接 mTOR 活性に関与するとされる神経アミノ酸「ロイシン」に着目し、ロイシンリッチリピート糖化蛋白である Leucine-rich alpha2 glycoprotein (LRG1) に着目した。LRG1 は、血管新生糖タンパクとして知られ、トランスフォーミング成長因子 (TGF- $\beta$ ) シグナル伝達の調節を介して作用している慢性炎症のバイオマーカーとして知られており、他の多数のシグナル経路と同様に組織発生、細胞分化、胚発育に関係するとされるが LRG1 の脳内における働きははまだ理解されていない。我々の先行研究結果によって、細胞膜に発現し主にさまざまな蛋白質と binding して神経活動の調整にも関与しており、神経活動の異常発火を起因とするてんかん重積後のてんかん原性獲得に対する阻害因子として働く可能性が予想される。本研究では、遺伝子組み換えにより LRG1 を脳内に過剰発現させたトランスジェニック動物モデル (Tg マウス) において、神経発火がどのように抑止されているかを電気生理学的にパッチクランプ法にて検証した。

### 3. 研究の方法

CAG-loxP-GFP-loxP-LRG1 ベクターの作製と遺伝子導入

本ベクターは CAG プロモーターと LRG1 との間に lox 配列で挟まれた poly (A) シグナルを有する GFP が存在しているため、転写が終了し、LRG1 は発現しないで、GFP が発現しグリーンに光るベクターを作製した。次にこのベクターをマウスに卵に遺伝子導入し、CAG-loxP-GFP-loxP-LRG1 遺伝子導入マウスを作製した。このマウスを hGFAP-Cre マウスと交配し、このマウスを GFAP promoter 下に LRG1 を高発現するマウスを作製した。脳内に LRG1 過剰発現させた動物モデル (CAG-loxP-GFP-loxP-LRG1 遺伝子導入マウス) は、加齢により脳内 LRG1 発現の増加を認め、LRG1-Tg マウスの海馬に着目し、海馬スライスを作成しフィールドパッチクランプを行ない、下記の如く\*電気生理学的評価を行った。

\*シナプスの短期可塑性は、海馬苔状線維 (MF)-CA3 シナプスで記録した paired pulse facilitation (PPF) で評価した。これはシナプス前細胞を連続して刺激した際に、1 回目のシナプス伝達と比較して 2 回目のシナプス伝達が促進 (facilitation) または抑圧 (depression) され、短い時間間隔で連続刺激を行うと、1 回目の応答 (field excitatory postsynaptic potential; fEPSP) と比較して 2 回目の応答が増加する。fEPSP の立ち上がり相の傾き (slope) 値が、シナプス活動の強さを測定する上で、信頼しうるパラメータとなるとされる。一方で集合スパイクの大きさは、閾値に到達して発火した神経細胞の

おおよその数を表すとされる。長期可塑性の評価は CA1 シーフター側枝にて長期増強:Long-term potentiation (LTP)の評価を行なった。海馬での刺激電流の大きさと興奮性シナプス後場電位 (fEPSP) の傾きのグラフと fiber volley 活動電位, paired pulse は wild type のコントロール群と比較した。てんかんモデルはムスカリンアゴニストであるピロカルピン酸を用いた側頭葉てんかんモデルを作製した。

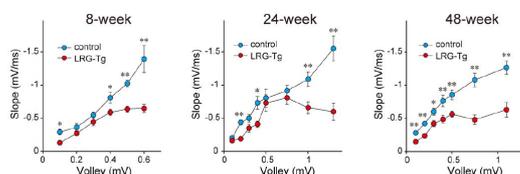
#### 臨床研究

薬剤難治性てんかんで、焦点性てんかん(海綿状血管腫, スタージウェバー症候群(虚血), 非海馬硬化性側頭葉てんかん(扁桃体腫大)などの臨床的に難治性てんかんを有す疾患群において、てんかん外科治療として、てんかん焦点切除が行われた病理組織を用いて、免疫組織染色による炎症メディエーターの分子生物学的検証を行ない、頭蓋内脳波記録によるてんかん原性と炎症反応の範囲による評価を行い、てんかん原性形成と炎症の関係性について考察した。

#### 4. 研究成果

動物モデルを用いた基礎研究は、生後 8 週齢, 24 週齢, 48 週齢の LRG1-Tg マウス, および wild type を対称(コントロール)群として経時的な変化を免疫組織染色, 免疫沈降によって観察した結果, 両群間に発現の有意差を認め, また両群とも加齢によって LRG1 は脳内で発現量が増加していた。そこで各年齢で脳スライスを作成し, 海馬でのシナプス伝達をパッチクランプの技法を用いて電気生理学的な検証を行なうと, 8 週齢, 24 週齢, 48 週齢と加齢(老化)とともに LRG-Tg マウスで以下のように海馬での神経伝達が障害された。LRG-Tg マウスの fEPSP の傾きは, すべての年齢で対照群よりも有意に小さく, ( $p < 0.01$ ), これにより LRG-Tg マウスにおけるシナプス伝達の障害が示された。

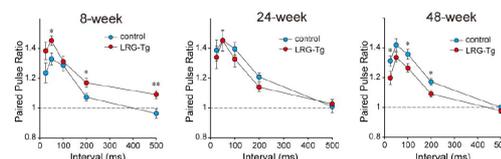
#### < 刺激反応曲線 >



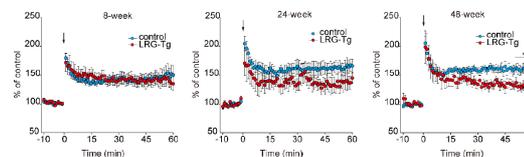
次に, 25~500ms 間隔の 2 連続刺激後の fEPSP 勾配 (第 2 勾配/第 1 勾配) の Paired-pulse ratio (PPR) を測定した。PPR 値は, LRG-Tg マウスから得られた海馬スライスにおいて, 8 週齢では対照マウスよりも大きく, 対照マウスの PPR 値は年齢とともに増加し, 逆に LRG-Tg マウスの PPR 値は減少した。これにともない対照群と LRG-Tg マウスにおける PPR 値の傾向は, 生後 24 週齢でほぼ差がなくな

り, さらに 48 週齢では逆転が認められた。

#### < Paired-pulse ratio >

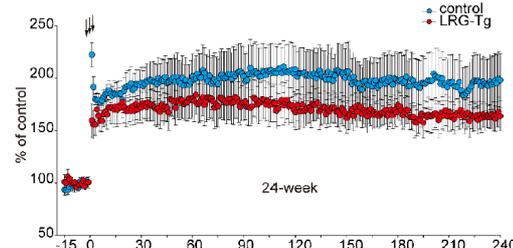


8 週齢および 24 週齢の LRG-Tg マウスにおいて刺激後 60 分で LTP の大きさは安定したままであった ( $p = 0.698, 0.130$ )。しかし 48 週齢の LRG-Tg マウスはテタヌス刺激の 60 分後に対照群と比較して有意に減少しており, このことは老齢 (LRG 発現量増) も LRG-Tg マウスにおけるシナプス可塑性の減弱を示唆した ( $p = 0.014$ )。



一方で 15 秒間 3 回の HFS をおこなった LTP (4 時間後) においては 24 週齢の時点までは対照マウスと LRG-Tg マウス両群間で統計学的な有意差は無かった ( $p = 0.324$ )。

#### LTP4 時間、テタヌス刺激 3 回



本実験結果から, 脳内 LRG 発現下では刺激反応が小さく, fEPSP が小さい傾向が認められた。テタヌス刺激を与えて LTP を測定した結果, LRG-Tg マウスは, 8 週齢, 24 週齢では記憶に関与する LTP 低下は認められないが, 48 週齢では fEPSP の傾きが下がり, シナプス機能の低下が認められることが判明した。この結果から, LRG1 は加齢とともに認知機能に影響を与えている可能性があるが, 一定量までの発現下であればシナプス機能を低下させる影響は少なく保たれることが判明した。つまり発現量をコントロールすることにより, 認知行動に変化をもたらさず, 神経発火活動に抑制的な効果が得られる可能性が示唆され, 本結果より LRG 発現コントロールはてんかん治療への応用が可能であることを示唆していると考えられた。

本研究結果は, 現在海外専門誌に投稿中であ

る。

臨床研究では、二次性てんかん原性獲得機序として、慢性炎症環境がてんかん発作を誘導し、てんかん原性形成に関与しているかを、てんかん患者の頭蓋内電極からの脳波解析と焦点切除部位の病理学的な検討を進め、組織の(慢性)炎症とてんかん原性について検証した。この研究は順天堂大学の倫理委員会の承諾を経て行われた。

海綿状血管腫を有した難治性てんかんの場合、頭蓋内電極の結果焦点を同定し、治療として海綿状血管腫を含む焦点切除を行なった組織を検討すると、血管腫周辺のヘム鉄の沈着部位を大きく含んだ周辺にお広範囲に拡散した炎症性メディエーターの存在を認めアストロサイト(reactive astrocyte)、ミクログリア(activated microglia)が増生し、HMGB1、TLR4の免疫反応が強く認められていた。脳波上てんかん脳波と考えられた棘波が同定された皮質灰白質には、酸化ストレスマーカーである4-HNEおよびHMGB1、TLR4陽性ニューロンが血管腫のさらに広範囲に確認された。脳波上spikesが同定された海綿状血管腫周辺組織には、摘出検体脳で広範囲に酸化ストレス、炎症性メディエーターが確認され、てんかん発作で誘導された炎症性メディエーターは、二次性に獲得されるてんかん原性部位を凌駕した領域に拡がりを見せさせていた。LRG1は脳内で神経細胞、グリア細胞のほか、髄液中など細胞外にも存在しており、てんかん原性を含んだ慢性炎症部位に多く発現されており、局所的なHMGB1-TLR4 pathwayに代表される炎症増幅サイクルに対する関連が認められた。同様にてんかん原性部位と炎症性メディエーターの関係は、虚血がてんかん原性と関係があるとされる、スタージ・ウェバー症候群の血管腫、周辺の大脳皮質にも変化が認められた。(Iimura et al. PLoS One, 2016)

また難治に進行した非海馬硬化性側頭葉てんかんの切除組織においても炎症性メディエーターの免疫組織染色による発現が認められており、新たな難治性内側側頭葉てんかんの発症機序として今後の研究課題とされた。

#### 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 16 件)

Sugano H, Nakanishi H, Nakajima M, Higo T, Iimura Y, Tanaka K, Hosozawa M, Niiijima S, Arai H: Posterior quadrant disconnection surgery for Sturge-Weber syndrome. *Epilepsia*. 2014 55(5):683-9. doi: 10.1111/epi.12547.

Nakashima M, Miyajima M, Sugano H, Iimura Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu

H, Arai H, Matsumoto N.

The somatic GNAQ mutation c.548G>A (p.R183Q) is consistently found in Sturge-Weber syndrome  
*J Hum Genet*.10.1038/jhg.2014.95.

中島 円, 菅野 秀宣, 原田 佳尚, 飯村 康司, 肥後 拓磨, 新井 一: 頭蓋内海綿状血管腫周辺の頭蓋内電極脳波所見と病理所見からみるてんかん原性獲得機序の仮説. *日本薬物脳波学会雑誌* 査読有 16, 2015 p35-41,

Yasushi Iimura, Hidenori Sugano, Madoka Nakajima, Takuma Higo, Hiroharu Suzuki, Hajime Arai: Analysis of epileptic discharges from implanted subdural electrodes in patients with Sturge-Weber syndrome. *PLoS One*, 査読有 2016, 1-10, doi: 10.1371/journal.pone.0152992

Takuma Higo, Hidenori Sugano, Madoka Nakajima, Kostadin Karagiozov, Yasushi Iimura, Masaru Suzuki, Kiyoshi Sato, and Hajime Arai: FDG-PET with 3D-SSP predictive value of surgical outcome in patients with temporal lobe epilepsy. *Seizure* 査読有 2016 41:127-33. DOI: 10.1016/j.seizure.2016.07.019

[学会発表](計 25 件)

M. Nakajima, H. Sugano, T. Higo, Y Iimura, H Suzuki, Y Harada, H. Arai, A Furuta: Inflammatory mediators role in Epileptogenesis caused by Cavernous angioma. 10th Asian & Oceanian Epilepsy Congress, Singapore, Aug.9,2014

T. Higo, H. Sugano, M. Nakajima, Y. Iimura, H. Arai, H. Mochizuki: Preventive effect of Levetiracetam against the pathological changes in hippocampus of temporal lobe epilepsy model mice. 10th Asian& Oceanian Epilepsy Congress, Singapore, Aug.9, 2014

M. Nakajima, H. Sugano, T. Higo, Y Iimura, H Suzuki, Y Harada, H. Arai: Inflammatory mediators' role in epileptogenesis caused by cavernous angioma, American Epilepsy Society. Seattle, Dec.5, 2014.

M. Nakajima, H. Sugano, Y Iimura, T. Higo, Y. Harada, I. Ogino, M. Miyajima, H. Arai: Activation of the HMGB1/TLR signaling pathway in surrounding tissues of a frontal lobe cavernous angioma that triggered ictal asystole. American Epilepsy Society. Philadelphia, Dec.4, 2015

Madoka Nakajima, Hidenori Sugano,  
Hiroharu Suzuki, Takumi Mitsuhashi,  
Hajime Arai: Ischemia and inflammation are  
involved in the onset of epilepsy in  
Sturge-Weber syndrome. American Epilepsy  
Society. 70th annual meeting, Houston,  
Texas, Dec.4 2016

〔図書〕(計5件)

中島 円  
基本手技 各論 3, 脳神経外科診療プラクテ  
イス, 2014 p113-117 総ページ数 318

菅野 秀宣 Sturge-Weber 症候群, 神経症候  
群(第二版), 先天異常/先天奇形 神  
経皮膚症候群(母斑病), 別冊日本臨床 新  
領域別症候群シリーズ N29  
日本臨床社, 2014, 762-765,

菅野 秀宣 MRI で病巣を確認できない焦点  
性てんかん てんかん外科手術, 臨床てん  
かん学, 医学書院, 2015, 568-569

菅野 秀宣 子供の病気とその診かた.,  
南山堂 2015, 425-431, 435-438, 524-527

菅野 秀宣 新 NS now 部分てんかん脳波の読  
み方. メディカルレビュー社, 2016 10p,

## 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: 50317450

### (2) 研究分担者

宮嶋 雅一 (MIYAJIMA, Masakazu)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60200177

新井 一 (ARAI, Hajime)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 70167229

西村 欣也 (NISHIMURA, Kinya)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 80164581

菅野 秀宣 (SUGANO, Hidenori)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90265992