

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07970

研究課題名(和文) カイニン酸誘発てんかんモデルにおけるPGE2受容体の役割

研究課題名(英文) receptors in pathology of epilepsy induced by kainic acid

研究代表者

松尾 由理 (Ikeda-Matsuo, Yuri)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：10306657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カイニン酸(KA)誘発てんかんモデルにて、PGE2合成に関わる酵素とEP3受容体の発現が増加し、PGE2が海馬で産生された。培養海馬切片のKA毒性は、EP3作動薬が悪化させ、EP3拮抗薬が抑制した。KA投与後痙攣行動、海馬の神経細胞脱落、グリア細胞の活性化、炎症性物質の発現は、野生型に比べEP3欠損型で有意に軽度だった。以上より、EP3受容体は痙攣行動を悪化させ、痙攣後の炎症反応と神経細胞死を促進することが示唆された。EP3受容体はてんかん治療のターゲットとなりうる。

研究成果の概要(英文)：The expression of COX-2, mPGES-1 and EP3 receptors were increased in hippocampus of kainic acid (KA)-induced seizure mice. The seizure score and hippocampal neurotoxicity in EP3 knockout (KO) mice was significantly lower than that in wild-type (WT) mice. The glial activation and inflammatory responses after seizures were also less severe in EP3KO mice as compared with WT mice. These results suggest that activation of EP3 receptors after KA injection contributes to seizure susceptibility, glial activation and hippocampal neuronal loss. Thus, inhibition of EP3 receptors will be a valuable therapeutic option in treatment of temporal lobe epilepsy.

研究分野：神経薬理学

キーワード：てんかん プロスタグランジンE2 EP3受容体 カイニン酸 神経炎症 痙攣 神経細胞死 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、脳の神経細胞に突然発生する激しい電気的な興奮により発作を繰り返す、有病率の高い脳疾患であり、人口の0.5-1%にみられる。脳の興奮部位により症状が異なるが、中でも海馬を焦点とする側頭葉てんかんは最も発症率が高く、神経損傷を伴うことで記憶や感情を障害することが知られる。このため、病態解明と新たな治療法の確立が急務である。

本研究では、痙攣発症から神経細胞死の機序を明らかにすることで、痙攣や神経細胞死の原因・増悪因子を同定することを目的とする。

(1) てんかんと脳炎症

近年、痙攣後の神経損傷に、炎症反応、即ち、グリア細胞の活性化や、サイトカイン、活性酸素等が寄与することが数多く報告され、てんかんと炎症との関係が注目されてきている (Vezzani et al. 2011)。そこで我々は、炎症性メディエーターであるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) に着目した。PGE<sub>2</sub> はてんかん患者の死後脳にて増加することが知られているが (Rumià et al. 2012)、その機序や役割は不明な点が多く残されていた。

(2) PGE<sub>2</sub> と炎症

PGE<sub>2</sub> は、アラキドン酸から2段階の酵素反応、即ち、COXとPGE<sub>2</sub>合成酵素 (PGES) により合成され、4つの異なる細胞内情報伝達系を持つ受容体 (EP1-EP4) に作用する (図1)。

我々はこれまでに、リポ多糖誘発脳炎症モデルにおいて、PGE<sub>2</sub> 産生の末端酵素である膜結合型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素 (mPGES-1) がミクログリア特異的に顕著に誘導し、これが PGE<sub>2</sub> 産生に寄与することを見出した (Ikeda-Matsuo et al. 2005)。さらに、脳梗塞モデルにおいて、mPGES-1 が病態増悪因子であることを、世界に先駆けて明らかにし (Ikeda-Matsuo et al. 2006)、「創薬ターゲットとしての mPGES-1」と題された総説にも1章 (脳梗塞の章) に渡り取り上げられた (Samuelsson et al. 2007)。

さらに、mPGES-1 が上流の COX-2 と共に発現誘導し、大量の PGE<sub>2</sub> 産生に協動的に働き、脳梗塞障害を悪化させること (Ikeda-Matsuo et al. 2010a)。また、mPGES-1 から産生される PGE<sub>2</sub> の下流効果器として、PGE<sub>2</sub> 受容体の中でも EP3 受容体が脳虚血後の神経細胞死に寄与することを明らかにした (Ikeda-Matsuo et al. 2010b, 2011)。そこで、同じく患者脳で PGE<sub>2</sub> の増加が認められる、てんかんにおいても mPGES-1 が、障害に寄与する可能性が考えられた。

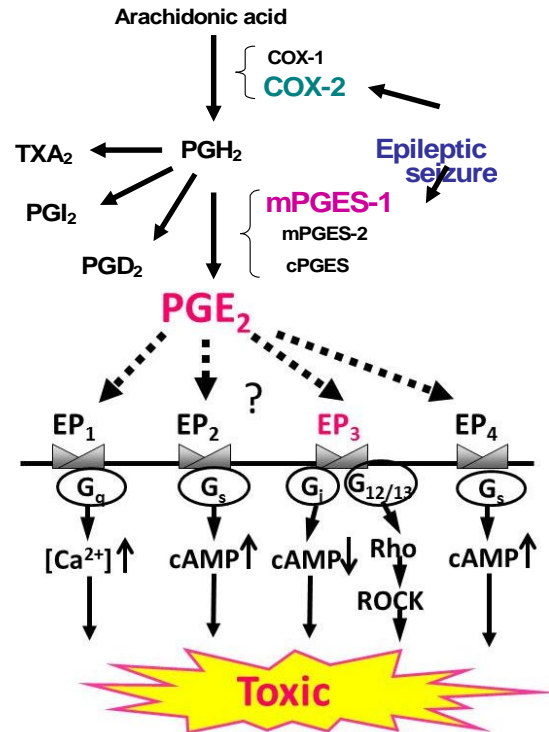


図1. PGE<sub>2</sub> 生成経路と受容体

(3) てんかんと PGE<sub>2</sub>

薬剤耐性てんかん患者の新皮質にて、PGE<sub>2</sub> 量が増加していることが報告されており (Rumià et al. 2012)、てんかんと PGE<sub>2</sub> の関係が注目されているが、未だ不明な点が多く残されている。PGE<sub>2</sub> 合成酵素のうち、上流の誘導型酵素である COX-2 の関与については、多くの報告があり、混沌としている。COX を阻害する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の臨床研究において、脳内興奮性を抑え、てんかんを生じにくくするなど、有効性を示す報告がある (Radu et al. 2017)。カニン酸誘発てんかんモデルにおいても、COX-2 阻害薬が痙攣後の神経脱落を保護するとの報告がある一方、逆に促進するとの報告もある。COX-2 欠損型マウスにおいても、カニン酸による神経の脆弱性が高いことが示されている。一方、ピロカルピン誘発てんかん重積モデルでは、COX-2 欠損型マウスで脳炎症が抑えられ、障害が軽度との報告もある。COX の関与については、痙攣の持続時間や重症度等により、悪化と保護の両面に働くことが予想される。また、その理由に、COX は各種プロスタノイドの共通の合成酵素であるため、その病態でどのプロスタノイドが産生されるかにより、保護と悪化の差異が生じる可能性が考えられる (図1)。下流の酵素である mPGES-1 の発現がカニン酸てんかんモデルにて誘導すること、また、mPGES-1 欠損型マウスで痙攣後の神経脱落が軽度であることが示されている (Takemiya et al. 2011)。従って、痙攣後に生じる PGE<sub>2</sub> は、痙攣後の傷害を促進すると考えられた。そこで、

本研究では、さらに下流の PGE<sub>2</sub> 受容体の役割を明らかにすることを目的とした。詳細な機序の解析は、病態の理解だけでなく、新規治療法の開発にも結び付くと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、てんかん後の神経細胞死機序の解明、及び、有効な治療薬ターゲット分子の同定を最終目標として、PGE<sub>2</sub> 受容体のてんかんにおける役割の解明を試みた。我々はこれまでに、脳虚血後に PGE<sub>2</sub> が過剰に産生され、PGE<sub>2</sub> 受容体のうち EP3 受容体に作用することで神経細胞死や行動障害を促進することを明らかにしている。本研究では、脳虚血と同じく興奮毒性が生じるてんかんモデルにおいて、PGE<sub>2</sub> とその受容体の役割について、以下の項目に従って解明を試みた。

- (1) *In vivo* マウスてんかんモデルを用いた EP 受容体発現、PGE<sub>2</sub> 産生の解析
- (2) *In vitro* 培養海馬切片・海馬神経細胞を用いた EP 受容体役割の解析
- (3) *In vivo* マウスてんかんモデルを用いた EP 受容体役割の解析
- (4) EP 受容体下流の神経毒性機序の解析

本研究により、海馬 EP 受容体の役割が明らかになるだけでなく、EP 受容体をターゲットとしたてんかん治療が期待される。

## 3. 研究の方法

- (1) 培養海馬切片のカイニン酸毒性評価  
生後 7 日齢の Wistar 系ラット、C57BL/6 系野生型マウス (WT) 或いは EP3 受容体欠損型マウス (KO) より海馬切片を作成し、7 日間培養した。その後、ラット切片は 5 μM、マウス切片は 2.5 μM のカイニン酸で 24 時間刺激し、海馬 CA3 野の神経細胞毒性を propidium iodide (PI) 染色により、共焦点顕微鏡にて観察した。各種 EP 受容体アゴニスト・アンタゴニスト、COX-2 阻害薬 NS398 はカイニン酸と同時に添加した。
- (2) カイニン酸誘発痙攣モデル  
C57BL/6 系雄性 WT マウス或いは EP3 KO マウスを用いた。腹腔内にカイニン酸 (30 mg/kg) を投与した後、2 時間の痙攣行動を観察し、その 1-7 日後に脳を摘出し各種実験に用いた。
- (3) 行動試験  
痙攣 3 日後に新規物体認識試験、Y 迷路、

オープンフィールド試験により、学習・不安・運動試験を行った。

- (4) Nissl 染色  
麻酔下心臓より還流固定後、脳を摘出し凍結させ、クリオスタットにて海馬を 20 μm で薄切した。後固定後、cresyl violet により Nissl 染色を行った。顕微鏡下で海馬を撮影し、海馬 CA3 野での神経細胞死を検討した。
  - (5) 脳切片の蛍光染色  
全身還流固定後、脳の凍結切片を作成し、透過処理、ブロッキング後、特異的抗体にて一次抗体反応を行った。蛍光標識二次抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。
  - (6) Real-time PCR 法  
痙攣後の海馬より RNA を抽出精製し、逆転写反応により cDNA を作成した。その後、SYBR green 法によるリアルタイム PCR 法にて、各 mRNA の発現量を内部標準 (β-actin) で補正し解析した。
  - (7) Western blot 法による蛋白質発現解析  
黒質をホモジナイズ後、15%アクリルアミドゲルにて電気泳動した。PVDF 膜に転写し、ブロッキング後、特異的抗体にて抗原抗体反応を行った。HRP 標識二次抗体を反応させ化学発光を検出した。
  - (8) PGE<sub>2</sub> 量の測定  
海馬よりプロスタノイドをメタノール抽出し、或いは、海馬切片の培養上清を用いて、市販の EIA キットにて、PGE<sub>2</sub> 量を測定した。
  - (9) 統計処理  
結果は平均値±標準誤差で表し、1 元配置分散分析後、Bonferroni 法により他群の解析を行った。*P*<0.05 で有意差ありと判断した。
- ## 4. 研究成果
- (1) *In vivo* マウスてんかんモデルを用いた EP 受容体発現、PGE<sub>2</sub> 産生の解析  
マウス腹腔内にカイニン酸を投与し、PGE<sub>2</sub> が産生されるかを調べたところ、投与 1 日後に海馬において顕著な PGE<sub>2</sub> の産生増加が認められた (図 2)。  
その機序を調べるために、PGE<sub>2</sub> 合成に関わる酵素の mRNA を Real-time PCR 法にて検討したところ、誘導型酵素である COX-2 と mPGES-1 の mRNA の顕著な発現誘導が認められた。そこで次に、EP 受容体の発現を検討したところ、EP1-4 受容体すべての発現増加が認められ、特に EP2、3、4 受容体の発現は有意に増加した。

以上より、カイニン酸てんかんモデルにて、mPGES-1 と COX-2 の発現が誘導することで PGE<sub>2</sub> の産生が増加するだけでなく、その受容体も有意に増加することで、PGE<sub>2</sub> シグナルが増強していることが示唆された。

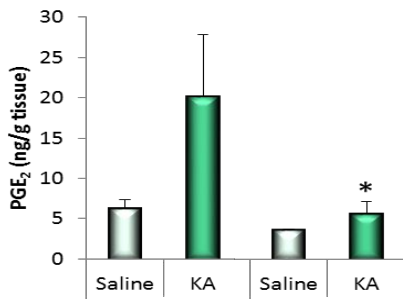


図2 . カイニン酸 (KA) 投与後の PGE<sub>2</sub> 産生

(2) *In vitro* 培養海馬切片・海馬神経細胞を用いた EP 受容体役割の解析

培養海馬切片にカイニン酸を暴露すると CA3 野において顕著な神経細胞死が認められた。この細胞死は、EP1, 3, 4 アンタゴニストのうち、EP3 アンタゴニストによってのみ有意に抑制された。

また、COX-2 阻害薬の NS-398 によっても有意に抑制され、そこへ更に EP1~4 のアゴニストを添加すると、EP3 アゴニストによってのみ有意に毒性が促進された。また、野生型マウスの海馬切片で見られるカイニン酸誘発毒性は、EP3KO では有意に軽度だった(図3)。

従って、カイニン酸による海馬神経細胞死に、EP3 受容体は促進的に働くことが示唆された。

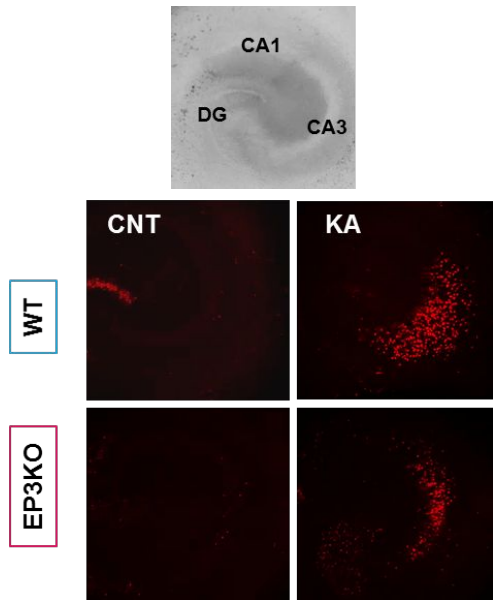


図3 . 海馬切片培養におけるカイニン酸 (KA) 暴露後の神経細胞死 (PI 染色像) ~ WT と EP3KO の比較検討 ~

(3) *In vivo* マウスてんかんモデルを用いた EP 受容体役割の解析

痙攣誘発後の EP3 受容体の関与が示唆されたため、カイニン酸投与 2 時間の痙攣行動を、WT と EP3KO で比較したところ、KO で有意に痙攣が弱かった(図4)。

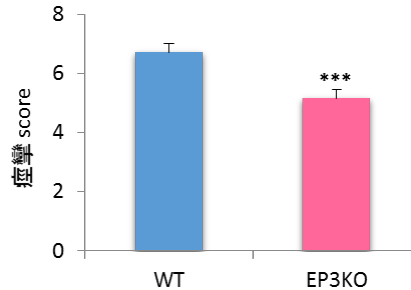


図4 . カイニン酸 (KA) 投与後の痙攣スコア ~ WT と EP3KO の比較検討 ~

また、カイニン酸投与 4 時間後の海馬歯状回にて、神経興奮性を示す c-fos 蛋白質の発現も EP3KO で軽度であった。さらに、カイニン酸投与 3 日後の海馬 CA3 野での神経細胞脱落も、WT に比べ EP3KO で有意に軽度であった(図5)。

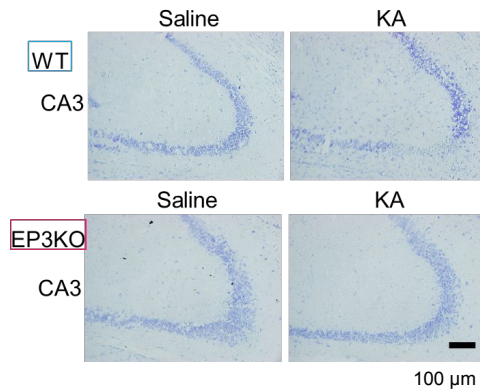


図5 . カイニン酸 (KA) 投与後の海馬 CA3 野の神経細胞脱落 ~ WT と EP3KO の比較検討 ~

Open field 試験において、WT では中央滞在時間が痙攣群では延長しており、不安異常が認められたが、EP3KO では、正常と同程度であり、有意に症状が弱かった。また、Y 迷路、新規物体、新規位置認識試験の 3 種の記憶学習試験を行ったところ、WT で痙攣誘発後に記憶学習の低下傾向が認められ、KO で改善傾向が認められたが、有意なものではなかった。

以上より、側頭葉てんかん後に海馬にて発現誘導する EP3 受容体が痙攣を悪化させること、さらに痙攣後の不安異常に関与することが示唆された。



#### (4) EP 受容体下流の神経毒性機序の解析

EP3 受容体による毒性促進機序として、炎症反応の増幅と神経アポトーシスについて検討した。痙攣誘発 1 日後の海馬 CA3 野の神経細胞の核凝縮と、3 日後の caspase-3 の活性化と神経細胞脱落も、WT に比べ EP3KO で有意に軽度であった。この時のグリア細胞の活性化を Iba-1、GFAP の発現にて検討したところ、EP3KO ではミクログリア、アストロサイトの活性化が有意に軽度であった (図 6)。

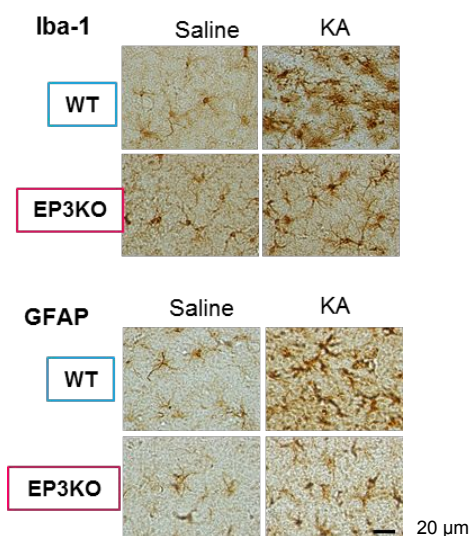


図 6 . カイニン酸 (KA) 投与後のグリア細胞活性化  
~WT と EP3KO の比較検討~

さらに、活性化したグリア細胞が産生する炎症性メディエーターについて検討したところ、iNOS や TNF $\alpha$  の痙攣後の発現増加が KO で有意に軽度であり、IL-6 や IL-1 $\beta$  の発現も低い傾向だった。

PGE<sub>2</sub> の産生と合成に関わる酵素の発現も検討したところ、EP3 欠損型では野生型に比べ COX-2 と mPGES-1 の発現誘導が弱く、海馬 PGE<sub>2</sub> 産生量も低値であった。

#### (5) まとめ

本研究より、痙攣後に海馬にて EP3 受容体が発現増加し痙攣行動を悪化させること、さらに EP3 受容体はポジティブフィードバック的に PGE<sub>2</sub> シグナルを増強し、痙攣後のグリア細胞の活性化と炎症反応、海馬神経細胞アポトーシスに寄与すること、さらにこれが不安異常にも寄与する可能性があることが示唆された。

従って、EP3 受容体の役割がさらに明らかになれば、側頭葉てんかん後の各種症状の悪化機序が明らかになるだけでなく、EP3 受容体がてんかん治療の新たなターゲットになるものと期待される。

#### < 引用文献 >

Ikedo-Matsuo Y, Ikegaya Y, Matsuki N, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microglia-specific expression of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 contributes to lipopolysaccharide-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production. *J. Neurochem.*, 94(6): 1546-1558 (2005)

Ikedo-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103(31): 11790-11795 (2006)

Ikedo-Matsuo Y, Hirayama Y, Ota A, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 are both required for ischaemic excitotoxicity. *Br. J. Pharmacol.*, 159: 1174-1186 (2010a)

Ikedo-Matsuo Y, Tanji H, Ota A, Hirayama Y, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 contributes to ischaemic excitotoxicity through prostaglandin EP<sub>3</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 160: 847-859 (2010b)

Ikedo-Matsuo Y, Tanji H, Narumiya S, Sasaki Y. Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> EP<sub>3</sub> receptors improves stroke injury via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms. *J. Neuroimmunol.*, 238(1-2):34-43 (2011)

Radu BM, Epureanu FB, Radu M, Fabene PF, Bertini G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical and experimental epilepsy. *Epilepsy Res.* 131:15-27. (2017)

Rumià J, Marmol F, Sanchez J, Carreño M, Bargalló N, Boget T, Pintor L, Setoain X, Bailles E, Donaire A, Ferrer E, Puig-Parellada P. Eicosanoid levels in the neocortex of drug-resistant epileptic patients submitted to epilepsy surgery. *Epilepsy Res.*;99:127-31. (2012)

Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.* 59:207-24. (2007)

Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K. Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates neurotoxicity by elevating astrocytic Ca<sup>2+</sup> levels. *Neurochem Int.* 58:489-96 (2011)

Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* J 7:31-40. (2011)

## 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 3 件)

- (1) Ikeda-Matsuo Y. The Role of mPGES-1 in Inflammatory Brain Diseases. **Biol Pharm Bull.** 40(5):557-563 (2017). doi: 10.1248/bpb.b16-01026
- (2) Hirayama Y, Ikeda-Matsuo Y., Notomi S, Enaida H, Kinouchi H, Koizumi S. Astrocyte-mediated ischemic tolerance. **J Neurosci.**, 35(9):3794-805 (2015) doi: 10.1523/JNEUROSCI.4218-14.2015.
- (3) Ikeda-Matsuo Y. Network activity controls adult neurogenesis. **Nihon Yakurigaku Zasshi.**, 145(1):43 (2015). DOI: [10.1254/fpj.145.43](https://doi.org/10.1254/fpj.145.43)

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 宿利美香、大内彩子、内藤康仁、岩井孝志、渡辺俊、尾山実砂、植松智、審良静男、Jakobsson Per-Johan、田辺光男、松尾由理 mPGES-1 阻害薬のマウス脳梗塞障害改善機序 日本薬学会 第 138 年会 2018
- (2) 花田美憂、佐々木萌、内藤康仁、渡辺俊、岩井孝志、尾山実砂、田辺光男、松尾由理 パーキンソン病モデルでの脳炎症反応における EP3 受容体の役割 第 138 回薬理学会関東部会 2018
- (3) 松尾由理 パーキンソン病での神経脱落・機能障害における膜結合型 PGE 合成酵素-PGE<sub>2</sub>-EP3 受容体シグナル系の役割 (シンポジウム)第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2017
- (4) 松尾由理 脳炎症モデル動物での神経障害における膜結合型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素-1 の役割 (教育講演) 第 160 回日本獣医学会学術集会 2017
- (5) 花田美憂、佐々木萌、内藤康仁、渡辺俊、岩井孝志、田辺光男、松尾由理 パーキンソン病モデルでの炎症反応における EP3 受容体の役割 第 40 回日本神経科学会 2017
- (6) 松尾由理、與澤智佳、川野早紀、水口愛香、植松智、審良静男、内藤康仁、渡辺俊、岩井孝志、田辺光男 マウス脳出血モデルにおける膜結合型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素-1 の役割 日本薬学会 第 137 年会 2017
- (7) Yuri Ikeda-Matsuo The Role of Prostaglandin E2 in ischemic brain injury China-Japan-Korea Joint Symposium 2016 (Seoul)
- (8) 松尾由理、丹治隼人、江成郁美、国恵健、岩井孝志、渡辺俊、内藤康仁、田辺光男

EP3 受容体を介する興奮神経毒性促進機序の解析 第 128 回日本薬学会北陸支部定例会 2016

- (9) 松尾由理、平野幸恵、石川弘人、内藤康仁、渡辺俊、岩井孝志、成宮周、田辺光男 カイニン酸誘発痙攣と神経細胞死におけるプロスタグランジン E<sub>2</sub> EP3 受容体の関与 第 89 回 日本薬理学会 2016
- (10) 大内彩子、宿利美香、内藤康仁、渡辺俊、岩井孝志、Jakobsson Per-Johan、田辺光男、松尾由理 mPGES-1 阻害薬は脳虚血障害を改善する 第 89 回 日本薬理学会 2016
- (11) 佐々木萌、花田美憂、内藤康仁、渡辺俊、岩井孝志、田辺光男、松尾由理 6-OHDA 誘発パーキンソン病モデルのドパミン神経細胞死における EP3 受容体の関与 第 136 年会 2016

〔その他〕

ホームページ等

<https://acoffice.jp/hruh/p/KgApp?kyoinId=yndygoegg>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 由理 (IKEDA-MATSUO, Yuri)  
北陸大学・薬学部・教授  
研究者番号：10306657