

令和元年5月17日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10329

研究課題名(和文) 超高磁場MR装置を用いたグルタミン酸興奮毒性の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of glutamate excitotoxicity evaluated with MR spectroscopy

研究代表者

高梨 潤一 (TAKANASHI, JUNICHI)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：00302555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：7テスラMR spectroscopy (MRS)を用いグルタミン酸(Glu)が中枢神経系に及ぼす病態を検討した。グルタミン酸トランスポーター欠損マウスではグルタミン(Gln)高値、Glu正常であった。過剰なGluを無害なGlnに転換させる生体防御メカニズムが想定された。Pnpla7変異マウスでNAA, Cho, Glu低値が認められた。PNPLA7は髄鞘形成、Glu-Glnサイクルに関与する可能性が考えられた。ヒト急性脳症の検討からMRIで異常がなく、一過性にGln高値を呈するmild encephalopathy with excitotoxicity (MEEX)を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタミン酸(Glu)は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、その過剰は神経疾患の原因となりうる。7テスラMRI装置を用いたMR spectroscopyによる解析から、シナプス内の過剰なGluをアストロサイトで無害なグルタミンに転換させる生体防御メカニズムが示された。小児急性脳症の一部は、興奮毒性が関与する軽症脳症(mild encephalopathy with excitotoxicity [MEEX])であり、けいれん重積型(二相性)脳症(AESD)と一連のスペクトラムを呈すると考えられる。これらの知見は興奮毒性の関与する神経疾患の診断・治療効果判定に有用である。

研究成果の概要(英文)：Glutamate (Glu) is a major excitatory neurotransmitter in the central nervous system, and its excess is considered to be the cause of various neurological diseases. We elucidated the pathogenesis of Glu from neurochemical analysis by MR spectroscopy (MRS) using a 7 Tesla magnet.

Glutamate transporter (GLT1) iKO mice have reduced GLT1 activity to 30-40% compared to normal, leading to accumulation of Glu in the synapse. MR spectroscopy showed an increase in glutamine (Gln) and normal Glu. The biomechanism that converts excess Glu into harmless Gln was assumed. MRS in Pnpla7 mutant mice showed low N-acetylaspartate (NAA), Cho and Glu. PNPLA7 contributes to myelination in the central nervous system, and it is considered that the defect may cause neuronal and Glu-Gln cycle abnormality. From the examination of human patients with acute encephalopathy, we found mild encephalopathy with excitotoxicity (MEEX), which shows no abnormality on MRI and transiently high Gln value.

研究分野：小児神経放射線

キーワード：MRスペクトルスコピー グルタミン酸 モデルマウス 急性脳症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

- 1). MR spectroscopy は非侵襲的な脳代謝の解析を可能とする。高梨らは、種々の中枢神経変性・代謝・感染性疾患における MRI, MR spectroscopy による診断能向上、病態解明、治療効果判定を報告してきた。
- 2). 近年の実験動物用超高磁場 MR 装置の開発に伴い実験動物に対する MRI 報告が散見される。しかし MR spectroscopy による神経化学的研究は少ない。高梨らは、7 テスラ MR 装置を用い PMD モデルマウス(Msd マウス), ミエリン塩基性タンパク (myelin basic protein; MBP) 欠損マウス (Shiverer マウス) の MR spectroscopy による脳代謝解析を行った。これら髄鞘形成不全モデルマウスでは乏突起膠細胞の機能不全を反映した Cho 低値、多くの神経疾患で低下する NAA 高値が認められた。
- 3). グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、その過剰は様々な神経疾患の原因と考えられている。しかし、過剰なグルタミン酸が引き起こす脳化学変化は十分に解明されていなかった。

#### 2. 研究の目的

グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、その過剰は様々な神経疾患の原因と考えられている。しかし、過剰なグルタミン酸が引き起こす脳化学変化は十分に解明されていない。本研究では、7 テスラ超高磁場 MRI 装置を用いてモデルマウスの脳代謝を非侵襲的・経時的に解析し、過剰なシナプス内グルタミン酸が中枢神経系に及ぼす病態の解明、候補治療薬の有効性の検討、ならびにグルタミン酸興奮毒性が想定されている神経疾患における脳病態の解明を目指す。また MR spectroscopy を用い、ヒト神経疾患におけるグルタミン酸興奮毒性の関与を検討する。

#### 3. 研究の方法

モデルマウス実験は放射線医学総合研究所の動物用 7 テスラ MR 装置を用いて施行する。MRI 画像として T1, T2 強調画像、拡散強調画像( apparent diffusion coefficient; ADC, fraction anisotropy; FA を測定) を撮像する。MR spectroscopy は視床ないし大脳皮質に関心領域を設定し PRESS 法 (TR/TE=4000/20) で施行、LCModel を用いて定量化する。神経細胞( NAA )、グリア細胞( mIns )、髄鞘( Cho )、エネルギー状態( Cr )評価の他、グルタミン( Gln )、グルタミン酸( Glu )、GABA、乳酸( Lac)などを測定し脳代謝を解析する。脳病理との比較検討も施行する。

- 1). グルタミン酸トランスポーターコンディショナルノックアウト (GLT1 iKO) マウスの解析を施行する。本マウスは GLT1 活性が正常に比べて 30-40%に減少している。そのためシナプス内グルタミン酸のアストログリアへの取り込みが障害され、シナプス内グルタミン酸の蓄積が想定される。
- 2). リン脂質代謝酵素欠損マウス (Pnpla7 変異マウス) の脳代謝を検討する。PNPLA7 はリポホスファチジンコリンをグリセロホスホコリンに変換するリゾフォスホリパーゼであり、内因性のコリン成分を産生する経路の一部である。
- 3). 2015年1月から2017年4月にかけて東京女子医科大学八千代医療センター小児科に入院し、急性脳症と診断した 27 例を対象に MRI, MR spectroscopy を後方視的に検討する。

#### 4. 研究成果

- 1). GLT1 iKO マウスで Gln 上昇、Cr・Cho・mIns・Tau 低下が認められた。Gln が高値となる機序として、有害な Glu でなく 無害な Gln として蓄積させる生体メカニズムが想定された。mIns, Cho, Tau の低下は、Gln が同様に増加する肝性脳症・尿素サイクル異常症でも認められる変化

である。Gln 蓄積によるアストロサイト浸透圧上昇に対応し、放出された結果と解釈される。

2). Wtマウス(図A)に比してPnpla7変異マウスの視床(図B)で NAA, Cr, Cho, Glu 低値、mIns 高値が認められた。PNPLA7は中枢神経において髄鞘形成に寄与し、その欠損は髄鞘低形成(LFB染色、図C)に加えて神経細胞障害、Glu-Glnサイクル異常をきたす可能性が考えられた。

図A

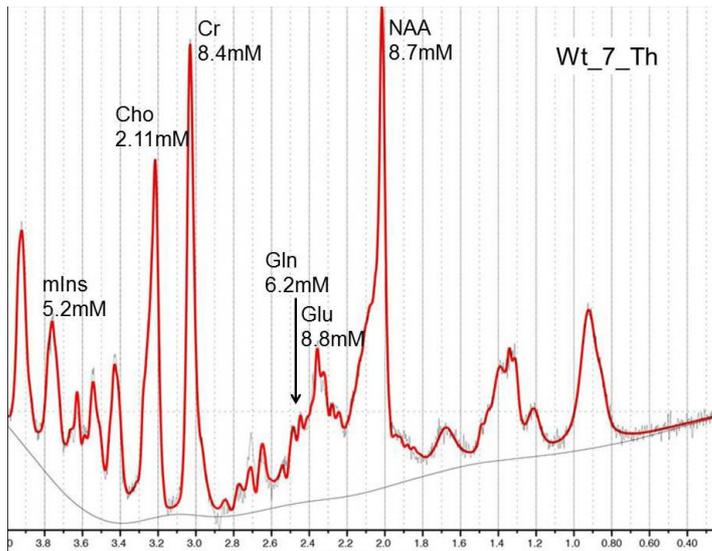


図 B

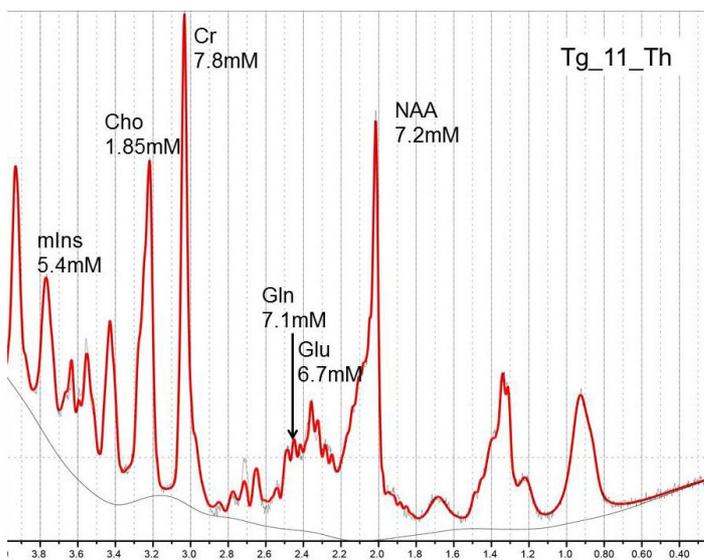
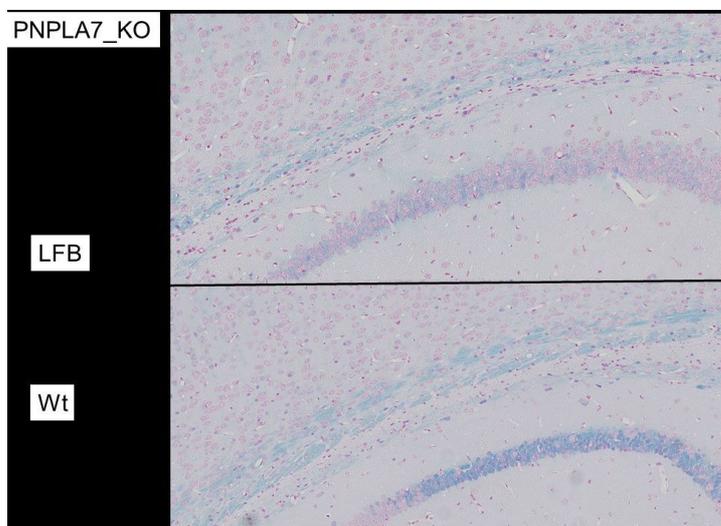


図 C



3).同時期に診断された急性脳症は 27 例であり、そのうち頭部 MRI で異常がなく、MR スペクトルスコピーで一過性にグルタミンが高値であった症例は 7 症例であった。いずれの症例も 6 ~ 10 病日に臨床症状は軽快し、後遺症なく退院した。従来 of 脳症分類で分類不能とされる軽症脳症例の一部は、興奮毒性が関与する軽症脳症 ( mild encephalopathy with excitotoxicity [MEEX] ) であり、AESD と一連のスペクトラムを呈する可能性がある。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 20 件 )

1. [Takanashi J](#), Yasukawa K, Murofushi Y, Masunaga A, Sakuma H, Hayashi M. Loss of myelinated axons and astrocytosis in an autopsy case of acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev* 2018; 40: 947-951 doi.org/10.1016/j.braindev.2018.06.004. 査読あり
2. Yokota K, Sano K, Murofushi Y, Yoshimaru D, [Takanashi J](#). Neurochemistry evaluated by MR spectroscopy in a patient with xeroderma pigmentosum group A. *Brain Dev* 2018; 40: 931-933. Doi, 10.1016/j.braindev.2018.06.013 査読あり
3. Shimada S, [Takanashi J](#), et al ( 11 人中 9 番目 ). An episode of acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion followed by hemiplegia and intractable epilepsy observed in a patient with a novel frameshift mutation in HNRNPU. *Brain Dev* 2018; 40: 813-818. doi: 10.1016/j.braindev.2018.05.010. 査読あり
4. Takase N, Igarashi N, Taneichi H, Yasukawa K, Honda T, Hamada H, [Takanashi J](#). Infantile traumatic brain injury with a biphasic clinical course and late reduced diffusion. *J Neurol Sci* 2018; 390: 63-66. doi: 10.1016/j.jns.2018.04.010 査読あり
5. Ishida S, [Takanashi J](#), et al ( 9 人中 9 番目 ). Excitotoxicity in encephalopathy associated with STEC O-157 infection. *Brain Dev* 2018; 40: 357-360. doi: 10.1016/j.braindev.2017.11.008 査読あり
6. Shimojima K, [Takanashi J](#), et al ( 8 人中 5 番目 ). A novel *DARS2* mutation in a Japanese patient with leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement but no lactate elevation. *Hum Genom Var* 2017; 4: 17051 doi:10.1038/hgv.2017.51 査読あり
7. Hirai N, Yoshimaru D, Moriyama Y, Yasukawa K, [Takanashi J](#). A new infectious encephalopathy syndrome, clinically mild encephalopathy associated with excitotoxicity (MEEX). *J Neurol Sci* 2017; 380: 27-30. 10.1016/j.jns.2017.06.045 査読あり
8. Hirai N, Yoshimaru D, Moriyama Y, Honda T, Yasukawa K, [Takanashi J](#). Clinically mild infantile encephalopathy associated with excitotoxicity. *J Neurol Sci* 2017; 373: 138-141. 10.1016/j.jns.2016.12.043 査読あり
9. Iwama K, Mizuguchi T, [Takanashi J](#), et al ( 26 人中 3 番目 ). Identification of novel SNORD118 mutations in seven patients with leukoencephalopathy with brain calcifications and cysts. *Clin Genet* 2017; 92: 180-187. 10.1111/cge.12991 査読あり
10. Yamamoto T , [Takanashi J](#), et al ( 14人中8番目 ). The first report of Japanese patients with asparagine synthetase deficiency. *Brain Dev* 2017; 39: 236-242, 10.1016/j.braindev.2016.09.010 査読あり
11. Hayashi S, [Takanashi J](#), et al ( 10 人中 7 番目 ). Comprehensive investigation of CASK mutations and other genetic etiologies in 41 patients with intellectual disability and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). *PLoS One* 2017; 12(8):e0181791 査読あり
12. Yamaguchi Y, [Takanashi J](#), et al ( 24 人中 12 番目 ). A nationwide survey of pediatric acquired demyelinating syndromes in Japan. *Neurology* 2016; 87: 2006-2015. 査読あり

13. Matsubara K, Mori H, Hirai N, Yasukawa K, Honda T, Takanashi J. Elevated taurine and glutamate in cerebral juvenile xanthogranuloma on MR spectroscopy. *Brain Dev* 2016; 38: 964-967. 10.1016/j.braindev.2016.07.001. 査読あり
14. Sato R, Takanashi J, Tsuyusaki Y, Kato M, Saitsu H, Komiyama O, Takahashi T. Association between invisible basal ganglia and *ZNF335* mutations: a case report. *Pediatrics* 2016; e20160897, DOI: 10.1542/peds.2016-0897. 査読あり
15. Hoshino A, Takanashi J, et al (9 人中 5 番目). Specific *HLA* genotypes confer susceptibility to acute necrotizing encephalopathy. *Genes Immun* 2016; 17: 367-9, DOI, 10.1038/gene.2016.32.
16. Fujita Y, Takanashi J, Takei H, Ota S, Fujii K, Sakuma H, Hayashi M. Activated microglia in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *J Neurol Sci* 2016; 366: 91-93. doi:10.1016/j.jns.2016.04.050 査読あり
17. Bamba Y, Takanashi J, et al (17 人中 6 番目). In vitro characterization of neurite extension using induced pluripotent stem cells derived from lissencephaly patients with TUBA1A missense mutations. *Mol Brain* 2016; 9: 70, DOI 10.1186/s13041-016-0246-y 査読あり

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 高梨潤一：MR spectroscopy で診る小児脳病態. 第 42 回日本脳神経 CI 学会. 2019.
2. 高梨潤一：小児の神経学的予後評価における画像診断の有用性. 日本小児科学会小児救急蘇生シンポジウム, 2018.
3. 高梨潤一：興奮毒性型急性脳症スペクトラムの拡がり. 第 60 回日本小児神経学会. 2018.
4. 高梨潤一：MR spectroscopy で診る脳病態. 第 60 回日本小児神経学会. 2018.
5. 高梨潤一：神経放射線と分子遺伝学のコラボレーション. 第 60 回日本小児神経学会, 2018.
6. Takanashi Jun-ichi : Neuroimaging: How to interpret brain MRI. 14th Asian Oceanian Congress of Child Neurology, 2017.
7. 高梨潤一：興奮毒性型急性脳症 up to date. 第 72 回 神経放射線カンファレンス, 2017
8. 高梨潤一：けいれん重積型(二相性)急性脳症(AESD)における グルタミン酸-グルタミンサイクル. 第 28 回 臨床 MR 脳機能研究会 2016.
9. 高梨潤一: MR スペクトルスコピーで診る脳代謝. 第 58 回日本小児神経学会学術集会 2016.
10. 高梨潤一: 小児急性脳症画像診断 up-to-date. 第 58 回日本小児神経学会学術集会 2016.
11. Takanashi J. Neuroimaging in encephalopathy in Japan. International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders (ISAE 2016).2016.
12. 高梨潤一: 小児神経救急診療に役立つ画像検査. 第 65 回日本小児神経学会関東地方会 2016.9.24.
13. 高梨潤一: MR スペクトルスコピーで診る急性期脳病態. 第 35 回 日本蘇生学会 2016.11.11-12.

〔図書〕(計 2 件)

1. Takanashi J. Neuroimaging on Pediatric Encephalopathy in Japan. In Acute Encephalopathy and Encephalitis in Infancy and Its Related Disorders. Yamanouchi H,

Moshe SL, Okumura A, eds. Elsevier 2018; 53-62.

2. 高梨潤一：主に小児にみられる拡散強調画像高信号の鑑別. 頭部の鑑別診断のポイント. 青木茂樹、大場洋、編. 秀潤社 2018; 48-52

〔産業財産権〕なし

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：青木 伊知男

ローマ字氏名：Aoki Ichio