

令和 3 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24047

研究課題名（和文）てんかん病態におけるアストロサイトの機能の解明

研究課題名（英文）Investigation of astrocyte function in epilepsy

研究代表者

橋本 聡華（Hashimoto, Satoka）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：40848347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：てんかんモデルマウスの脳においてトリプトファン代謝が亢進していることを、新規トリプトファンPETトレーサーである[11C]1MTを用いて可視化し、メタボローム解析によるトリプトファン代謝産物の増加により確認した。加えてトリプトファン負荷によりけいれん発症がはやまり、トリプトファン代謝の異常亢進がてんかん病態の促進につながる可能性を示した。そして、てんかんモデルマウスではアストロサイトが増加していることを確認し、てんかん病態ではアストロサイトに変化が生じている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでトリプトファンの代謝異常とてんかん病態の関係は長らく研究されてきたものの、トリプトファン代謝異常亢進がてんかん病態にどのような影響を与えるかは不明であった。今回トリプトファン代謝亢進がてんかん病態を促進する可能性を示した。本研究の結果は、これまで神経伝達物質や神経受容体など、神経にターゲットをおいた治療法が主軸であった中、脳の代謝という観点からてんかん病態をとらえなおし、今後よりアストロサイト機能との関係に関する検討をくわえることで、将来的には新たなてんかん病態の理解、治療ターゲットに迫る可能性につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research, we established abnormally accelerated tryptophan metabolism in epileptic model mouse brains by a novel tryptophan PET tracer, [11C] 1-methyl-L-tryptophan PET, and mass spectrometry analysis of tryptophan metabolites. Additionally, we showed the seizure onset was earlier in tryptophan loading mice than control diet mice. It suggested abnormal tryptophan metabolism can accelerate the pathology of epilepsy. Furthermore, the number of astrocytes in epileptic model mice was increased. Increasing number of astrocytes in epileptic mouse brains indicated the astrocytic changes in the pathology of epilepsy.

研究分野：脳神経外科

キーワード：てんかん トリプトファン イメージング アストロサイト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

てんかんはてんかん発作を繰り返す疾患であり、100人に1人が罹患する頻度の高い疾患である。てんかん患者の約3割は既存の抗てんかん薬では十分な発作コントロールを得られない薬剤抵抗性てんかんに分類される。てんかんは、神経の慢性的な異常発火によりてんかん発作を繰り返す慢性の脳疾患として定義され(てんかん診療ガイドライン 2018)、これまではニューロンに注目した研究が中心であった。従来の薬物も神経をターゲットとし、神経伝達物質やシナプスでの受容体の働きの調整に焦点を当てたものが主であった。しかし近年、てんかんはニューロンのみの問題ではなく、アストロサイトをはじめとしたグリアが重要な役割を担う可能性が指摘されている(Devinsky 2013)。てんかん病態のアストロサイトの機能として、神経興奮伝達物質であるグルタミン酸や神経興奮時シナプス間隙に放出された K イオンを取り込む buffering 機能が考えられており、アストロサイトが神経興奮時のブレーキの役割を担うという報告が近年増加しつつある(Steinhauser 2016)。

一方、これまで脳の代謝異常とてんかんの関係性は古くから報告されている。特にトリプトファン代謝とてんかん病態の関与は長らく注目され多くの研究がなされてきた。しかしこれまでトリプトファン代謝異常がどのようにてんかん病態に関与するか、そのメカニズムは解明されていない。

そこで我々は、トリプトファン代謝異常とてんかん病態をつなぐキーファクターとしてアストロサイトの異常がある可能性を検討することにした。てんかん病態においてアストロサイトがブレーキの役割を發揮するにあたり、細胞外から細胞内へ物質を取り込む際に、脳の代謝異常がその機能に関与しうると考えたためである。

### 2. 研究の目的

本研究では、てんかん病態におけるトリプトファン代謝とアストロサイトの役割を検討することを目的とする。

よって、(A)てんかん病態においてどのようなトリプトファンの代謝変化があるか、(B)トリプトファンがてんかん病態にどのような影響をもたらすか、(C)てんかん病態でどのようなアストロサイトの変化がみられるかについて問う。

### 3. 研究の方法

#### [動物モデル]

遺伝性てんかんモデルマウスである EL マウスとコントロールマウスである ddY マウスを用いて検討した。EL マウスは加齢により体位変化で全身けいれんを呈するようになるマウスである。ddY マウスは EL マウスの母系マウスであり、EL マウスのようなけいれん発作は呈さない。

#### [PET イメージング (Positron emission tomography imaging)]

トリプトファンの新規トレーサーである  $[^{11}\text{C}]1\text{-methyl-L-tryptophan}$  ( $[^{11}\text{C}]1\text{MT}$ ) による  $[^{11}\text{C}]1\text{MT}$  PET を、5 週齢(けいれん出現前)から 28 週齢(けいれん発作出現後長期経過後)の発作間欠期の EL マウスと同週齢の ddY マウスに対し、経時的に麻酔下に小動物 PET カメラ (Focus220) で撮像した。PET の結果は PMOD を用いて解析し、トレーサー集積量を %injected dose/cc(%ID/cc)として算出した。

#### [メタボローム解析]

9 週齢(痙攣出現前)の EL マウス(n=8)と同週齢の ddY マウス(n=8)の海馬を摘出し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)により海馬内のトリプトファン及び関連する代謝産物の濃度を定量した(ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社(HMT))。

#### [トリプトファン投与実験]

5 週齢の EL マウスを 5.0% トリプトファン摂餌群および通常(約 0.1%)摂餌群に分け(それぞれ n=14)、6 週齢より週一回尾懸垂刺激を行い、けいれん感受性スコアおよびてんかん発作発現までの日数を計測した。一回当たりの尾懸垂試験は 4 回の尾懸垂刺激を含み、30 秒の尾懸垂刺激後 2 分安静(ホームケージでのフリームービング)、15 秒の尾懸垂刺激後 30 分の安静、30 秒の尾懸垂刺激後 2 分安静という構成である。けいれん感受性スコアは、初回刺激で痙攣した場合は 4 点とし、以降の刺激で痙攣した場合は順に 3 点、2 点、1 点と割り振り、4 回の刺激の点数を合算することで算出した。

#### [免疫組織染色]

16 週齢(けいれん出現後)の EL マウスと同週齢の ddY マウスの脳を摘出し(それぞれ n=3)、4% パラホルムアルデヒドで固定した。切片を作成し、抗 GFAP 抗体で免疫染色を行った。250x250mm の関心領域(region of interest, ROI)を設定し、定量的な解析を行った。

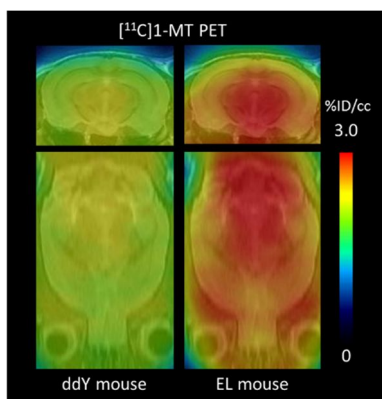
#### [統計解析]

GraphPad Prism 6 を用いて統計解析を行った。有意性の検定は、t 検定ないしは two-way ANOVA

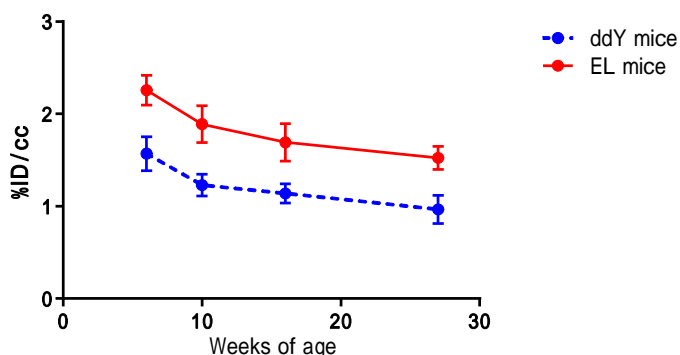
(Bonferroni 法による多重比較)を用いた。

#### 4. 研究成果

けいれん発症前からけいれん発症後長期にわたり、EL マウスでは ddY マウスに比べ、 $[^{11}\text{C}]1\text{MT}$  の脳内への取り込みが有意に高かった。これにより、けいれん出現以前 EL マウスの脳へのトリプトファンの取り込みが上昇していることが示された。

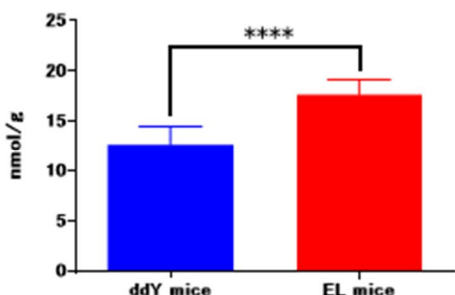


Radio concentration(Whole brain, 30-90min)

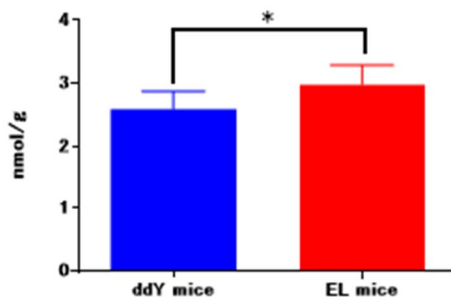


メタボローム解析では EL マウスの海馬内のトリプトファン濃度、およびトリプトファンの代謝産物であるセロトニン濃度が、ddY マウスと比較し有意に高く、EL マウスの脳内ではトリプトファン代謝が亢進していることが示唆された。

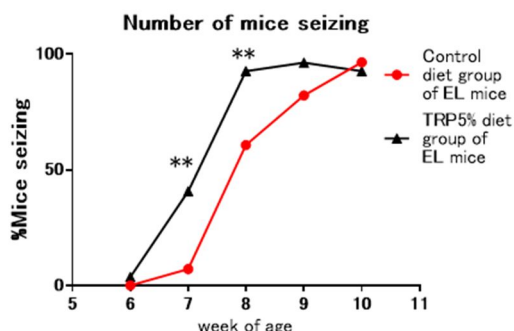
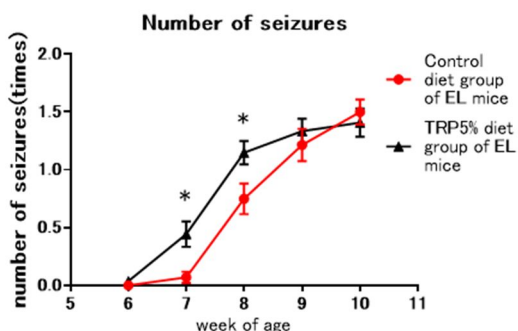
Tryptophan content in hippocampus



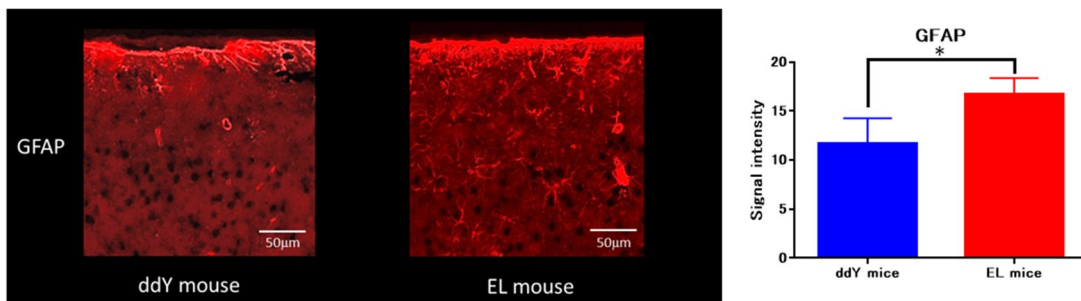
Serotonin content in hippocampus



EL マウスにトリプトファン負荷を行ったところ、体位交換刺激によるけいれん発作の発現がはやまった。トリプトファン代謝異常がてんかん発症を早める可能性が考えられた。



免疫染色では EL マウスでは、ddY マウスに比べ皮質のアストロサイトが有意に増加していた。



以上より、(A)てんかんモデルマウスである EL マウスの脳内ではトリプトファン代謝の異常亢進が認められ、(B)トリプトファン負荷によりけいれんの発現が促進されることがわかった。トリプトファン代謝の異常亢進がてんかん病態を促進している可能性が考えられた。加えて、(C) EL マウスでは ddY マウスに比べアストロサイトが増加していた。この原因として、アストロサイトの機能障害を補填する反応としてアストロサイト数が増加している可能性が挙げられる。

今後はトリプトファン代謝の亢進がアストロサイトに与える影響を、よりアストロサイトの機能に焦点を当てて検討を行う。トリプトファン代謝は主にキヌレニン経路とセロトニン経路とに分けられる。キヌレニン経路の代謝産物には、けいれん促進物質であるキノリン酸やけいれん抑制物質として知られるキヌレン酸があり、キヌレン酸は主にアストロサイトで産生されることが分かっている。よって、今後はキヌレニン経路の代謝産物の詳細な検討も行う方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoka Hashimoto
2. 発表標題 Abnormal tryptophan metabolism and astrocyte functional failure in the pathology of epilepsy.
3. 学会等名 日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本聡華
2. 発表標題 てんかん病態におけるアストロサイト機能異常とトリプトファン代謝
3. 学会等名 日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoka Hashimoto
2. 発表標題 Astrocyte dysfunction induced by abnormal tryptophan metabolism in the pathology of epilepsy.
3. 学会等名 International Epilepsy Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------