

令和元年6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09956

研究課題名(和文) 幼若期におけるてんかんモデル動物のイメージングに関する検討

研究課題名(英文) Epileptic brain imaging in young and adult animal model.

研究代表者

細井 理恵 (Hosoi, Rie)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30291446

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)：幼若期てんかんモデル動物では急性発作時にグリア細胞のエネルギー代謝は成熟期と異なり有意な変化は認められないこと、一方でグルタミン酸-グルタミンサイクルは成熟期と同様に活性化することが明らかとなった。また薬剤誘発によるキンドリング形成において、幼若期では成熟期と同条件下ではキンドリングは形成されず、幼若期のGABA-BZ複合体の機能の変遷がてんかんと深い関係があることが示唆された。さらに同一個体より複数の生体機能画像を得るために、蛍光標識プローブを用いてex-vivo生体機能画像を簡便に取得する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幼若期のてんかん発作時においてグリア細胞内の代謝反応が成熟期とは異なることを明らかにした。さらに幼若期におけるGABA-BZ複合体の機能変化とてんかん原性に関連がある可能性を示し、小児と成人におけるてんかん発症のメカニズムの解明のための知見を得ることができた。またex-vivo蛍光画像取得の方法論を確立し、同一個体における複数の生体機能画像をより簡便に取得することが可能となった。この方法を用いることにより、個体差の生じやすい疾患に関する研究がモデル動物を用いてより詳細に遂行可能となった。

研究成果の概要(英文)：In epilepsy model rat brain, ^{13}N -ammonia uptakes in adult and young rat brain showed remarkable increase. In young epilepsy model rat brain, the astrocytic TCA cycle was not enhanced, but their glutamate-glutamine cycle was remarkably activated. The chemical kindling was not developed in young animals under the same condition as adult animals. The relationship between the epileptogenicity and the functional alteration in GABA-BZ complex during young period is suggested.

And we also developed a simple ex-vivo semi-quantitative fluorescent imaging technique. This technique is applicable for multi-tracer imaging with both fluorescent-labeled and radiolabeled probes in the same animal and would allow more detailed analysis of the diseased states of the animals even with wide individual variations.

研究分野：医歯薬学

キーワード：てんかん 生体脳 イメージング 脳循環代謝 受容体結合

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

1. 研究開始当初の背景

脳はエネルギー需要の高い組織であり、グルコースは唯一のエネルギー源とされる。しかし、幼若期には alternative fuels とされるモノカルボン酸やケトン体の利用率が高いこと、疾患や飢餓状態に陥った際にはこれら alternative fuels の利用率が増加することも明らかとなっている。しかしこの代謝の変容の制御機構については明らかになっていない。

研究代表者らは幼若期から成熟期に移行するにつれて、グルコースのアナログである標識フルオロデオキシグルコース (以下、FDG) の取込みが増加すること、モノカルボン酸の一種であり、グリア細胞に選択的に取込まれる酢酸を標識基質として用いた場合、FDG の場合とは反対に脳では発達に伴い成熟動物では取込みが少なくなり、発達に伴い正常状態の脳では用いるエネルギー基質の割合に変遷が見られることを明らかにしている。

さらに成熟動物のてんかんモデル動物では急性期に alternative fuels であるモノカルボン酸の利用率が高くなることが明らかになっている。しかしこれらエネルギー基質の差異および神経グリア細胞の相互作用の成熟度と病態との関連は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では幼若期のてんかんモデル動物特有のシグナルの検出を目的とした。

第一段階は、グリア細胞における代謝シグナルをコンパートメント別に取得する方法を確立することとした。また複数の生体機能画像情報を同一個体から得るために、従来の短半減期及び長半減期の放射性核種標識プローブのダブルトレーサー法に加えて、蛍光プローブを用いた簡便な ex-vivo 生体機能画像の取得方法を確立させた。

また複数のてんかんモデル動物における生体機能画像を取得し、幼若期特有のシグナルの検出を目指した。さらにてんかん焦点の検出に用いられている標識アルファメチルトリプトファンでてんかん急性期の焦点の検出の可能性、およびケトン体および嫌氣的代謝から好氣的代謝への変遷によるてんかん原性への影響について検討を加えることを目的とした。

3. 研究の方法

動物は日本 SLC もしくは日本クレア株式会社より入手した雄性 ICR マウス、雄性 SD ラット、雄性 Wistar ラットを用いた。すべての動物実験は大阪大学医学系研究科の動物実験委員会の承認の元、実施した。

てんかんモデルにはリチウムピロカルピンけいれん重積モデルラット (塩化リチウム, 3 mEq/kg 投与 20-24 時間後に塩酸ピロカルピン, 25 mg/kg を投与) および低用量のベンチレンテトラゾール (PTZ) を慢性投与 (40 mg/kg, ip, everyday) することで作成する全般キンドリングを用いた。けいれん発作のスコアリングは Racine の分類に従った。

脳への薬物の微量注入は、イソフルレン吸入麻酔下で予めカニューレレーション手術を行い、数日間の回復期間後、覚醒下で脳内に注入した。

標識プローブは糖代謝の指標として ^{14}C -デオキシグルコース (DG)、グリア代謝の指標である ^{14}C -酢酸、グリア細胞のグルタミン酸-グルタミンサイクルの指標として ^{13}N -アンモニアを用いた。また局所脳血流の指標には ^{14}C -IMP を、神経受容体結合の検討にはムスカリン性アセチルコリン受容体結合には ^3H -QNB、ベンゾジアゼピン受容体結合には ^3H -フルマゼニールを用いた。またグリア細胞に選択的に取り込まれるとの報告があるスルフォロダミン B (SRB)、活性酸素種のマーカーとして用いられるジヒドロエチジン (DHE) を用いて蛍光プローブによる ex-vivo 生体機能画像の取得を実施した。

生体組織への放射性プローブの取り込みは組織摘出法およびオートラジオグラフィ法を用いた。さらに蛍光プローブの取り込みは対象組織の薄切切片を作成し、Fluoro-Imaging Analyzer System (FLA-7000) にて蛍光強度の測定を行った。

免疫組織染色は神経細胞マーカー NeuN、マイクログリア細胞マーカー OX-42、アストログリア細胞マーカー GFAP のマウスモノクローナル抗体を用いて検出し、共焦点顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

【グリア細胞内代謝のコンパートメント別イメージング】

グリア細胞における代謝イメージングのコンパートメント化を試みた。標識酢酸および標識アンモニアを用いることでエネルギー代謝およびグルタミン酸-グルタミンサイクルの活性を推定することが可能となった。

成熟期と比較すると、幼若期の正常動物では標識酢酸の取り込みは幼若期の方が高値を示すが、標識アンモニアおよび標識デオキシグルコースの取り込みは低値を示し、幼若期はエネルギー代謝の一部が高い活性を示し、TCA サイクル以降のグルタミン酸-グルタミンサイクルの機能は成熟期と比べると低いことが示唆された。

一方、側頭葉てんかん発作急性期において成熟期は脳循環代謝、グリア細胞のエネルギー代謝、グルタミン酸-グルタミンサイクルはすべて亢進するのに対し、幼若期はグリア細胞のエネルギー代謝は亢進せず、グルタミン酸-グルタミンサイクルのみが活性化することが明らかとな

った。

【標識アルファメチルトリプトファン (AMT) によるてんかんモデル動物脳イメージング】

臨床においててんかん焦点の検出に利用されている AMT の標識体を用い、モデル動物脳のイメージングを行った。側頭葉てんかんモデル急性期・慢性期、全般キンドリングモデル急性期・慢性期、グルタミン酸作動薬による脳障害モデル、グリア代謝選択的抑制モデルにおける取り込みを評価した。側頭葉てんかんモデル慢性期および全般キンドリングモデル慢性期における動物の扁桃体領域において取り込みの減少を認めた。これは慢性期の細胞障害を反映していると考えられた。本研究において既報のような取り込み増加領域は認めず、AMT によりてんかん焦点が検出されるのは脳の再構築がさらに進んだ時期であることが想定された。

【ケトン体によるてんかん発生の抑制】

PTZ による全般キンドリング形成において、ケトン体がキンドリング形成を抑制することを明らかにした。さらに糖代謝が病態および治療効果の判定に有用であることを示した。マウスにけいれん閾値以下の PTZ を反復投与し、スコア 5 以上のけいれん発作を初めて惹起したマウスにケトン体を次の PTZ 投与前に投与した。さらにスコア 5 以上のけいれん発作を 5 回連続して惹起し、キンドリング獲得した群にもケトン体を投与した。両群においてケトン体投与により PTZ により惹起されるけいれん発作は消失した。さらにケトン体を前処置した群では PTZ 休薬 1 か月後に再び PTZ をもちいて発作を誘発させたところ、半数でけいれん発作を生じなかった。一方、ケトン体および PTZ の反復投与回数の増加に伴い、通常は PTZ 投与 10 分前後でけいれんが生じるが、投与から 1 時間後に遅延してけいれん発作を生じる個体が現れた。

標識 DG の脳への取り込みはキンドリング形成過程により有意に低下し、ケトン体投与により発作が消失している個体においては取り込みは回復した。以上のようにケトン体による脳の糖代謝の変容がてんかん発生および治療に関連していることを明らかにした。

一方で、動物に慢性的にジクロロ酢酸を投与した条件下で、PTZ によるキンドリングの形成を評価したところ、けいれん発作の抑制は認められなかった。

【幼若動物におけるてんかんモデル】

グルタミン酸作用を介するリチウムピロカルピン側頭葉てんかんモデルにおいて、成熟期と幼若期ではモデル形成に有意な差を認めなかった。一方で、GABA-BZ 複合体を介して発症するけいれん発作およびキンドリング形成については幼若期と成熟期で反応は明らかに異なっていた。幼若期におけるてんかん発症と GABA-BZ 複合体との関連については今後の重要な課題として残った。

【蛍光標識化合物を用いた ex-vivo 生体機能画像の取得】

放射性同位元素標識プローブを用いたオートグラフィーの手法を蛍光標識プローブに応用し、ex-vivo 生体機能画像の取得を試みた。動物に蛍光標識プローブを投与し、20 μm 厚の薄切切片を作成し蛍光イメージャーで直接読み取るにより組織内の蛍光集積を簡便に定量評価できることを明らかにした。

蛍光標識プローブにはグリア細胞に選択的に取り込まれるとの報告があるスルフォロダミン B (SRB)、活性酸素種のマーカーとして用いられるジヒドロエチジン (DHE) を用いた。脳内でフェントン反応が生じ、活性酸素種を発生させる系では神経細胞による DHE 取り込みの顕著な増加を認めたが、グルタミン酸作動薬による脳障害モデルにおいては神経細胞死が進んだ状態においてマイクログリアからの活性酸素種の産生が生じていることを明らかにした。PTZ キンドリングモデルの急性期における DHE および SRB の取り込みを検討したところ、コントロール動物との有意な変化を認めなかった。

この試みにより、同一動物に放射性同位元素標識および蛍光標識プローブを投与し、50 μm の解像度で複数の生体機能情報を取得することが可能となった。本手法の開発により ex-vivo 生体機能画像を用いた疾患研究の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hosoi R, Sato S, Shukuri M, Fujii Y, Todoroki K, Arano Y, Sakai T, Inoue O.

A Simple Ex Vivo Semiquantitative Fluorescent Imaging Utilizing Planar Laser Scanner: Detection of Reactive Oxygen Species Generation in Mouse Brain and Kidney.

Mol Imaging. 査読有、2019 Jan-Dec;18:1536012118820421. doi: 10.1177/1536012118820421.

〔学会発表〕(計 8 件)

Rie Hosoi

Ketone body prevents the induction of PTZ kindling and the reduction of glucose metabolism in mouse brain.

BRAIN & BRAIN PET 2019, accepted, 2019 年 7 月発表予定

細井理恵

キンドリングモデルマウスにおけるケトン体の発作抑制効果と ^{14}C -DG 取込みの検討
第 58 回 日本核医学会総会, 2018 年 11 月

細井理恵、宿里充穂、轟木堅一郎、荒野 泰、堺 俊博、井上 修

薬剤性腎障害モデルマウスにおける蛍光プローブを用いた reactive oxygen species の検出
第 13 回学会総会・学術集会 / JSMI 2018, 2018 年 5 月

佐藤颯太、細井理恵、宿里充穂、轟木堅一郎、荒野 泰、堺 俊博、井上 修

SNP 誘発脳障害モデルへの蛍光・RI ダブルトレーサー法の適用
第 57 回 日本核医学会総会, 2017 年 10 月

細井理恵、藤井友香、宿里充穂、轟木堅一郎、荒野 泰、堺 俊博、井上 修

スキャナータイプ画像解析装置を用いた定量的 ex-vivo 蛍光画像の取得
第 12 回学会総会・学術集会 / JSMI 2017, 2017 年 5 月

細井理恵、木下恵理子、宿里充穂

RI プローブと蛍光プローブの同一個体内における ex-vivo 取込み：脳障害モデルラットへの適用
第 137 年会 日本薬学会, 2017 年 3 月

柳本和彦、細井理恵、本行忠志

ラット脳内グルタミン酸 - グルタミンサイクルの機能異常と ^{14}C 標識酢酸の集積の変化に関する検討
第 137 年会 日本薬学会, 2017 年 3 月

細井理恵、宿里充穂

キノリン酸による脳障害モデルラットにおける ^{14}C 標識 Fluoroacetate の取込み
第 56 回 日本核医学会総会, 2016 年 11 月

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。