

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2022

課題番号：15K18947

研究課題名（和文）続発性てんかん回避に向けた早期薬物治療介入への基礎的検討

研究課題名（英文）Fundamental research for early drug intervention to avoid epilepsy after brain injury

研究代表者

小森 理絵 (Komori, Rie)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：70412400

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：高齢者のてんかん初発発症が増えている。その多くは脳障害を発端とした二次性症候性の脳障害後てんかんである。高齢者のてんかん発症には様々な問題が含まれており、発症前に予防することの意義が指摘されている。しかし、発症機構は未だ不明であり、研究方法も確立されていない。本研究では、脳障害後てんかんの発症予防法開発に向けた基礎的研究として、二次性症候性発症の一つである重積けいれん発作（SE）後の脳内変化の分子機構を解析し、SE直後から起こる炎症関連分子の発現変動誘導機構について考察した。さらに、2022年にSE発作治療薬として適応承認を得たレベチラセタムのSE後発作に対する効果についての可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本が超高齢社会へと突入して15年ほどが経過した。高齢者の生活の質（QOL）を保つことは、介護予防の観点から見ても今後の重要な課題の一つである。高齢者のQOL低下の一因として広がりつつあるのが、脳疾患の合併症（後遺症）としてのてんかん発症である。今後も脳疾患患者は増加すると予想されるため、対策は急務である。本研究は、てんかん発症に関連する脳障害後の脳内変化の分子機構を明らかにする基礎的研究である。網羅的遺伝子発現解析を行い、てんかん発症へ向けて起こる様々な脳内変化の誘導機構の一端を示した。これらの研究成果は、てんかん発症予防法の開発へつなぐと考えている。

研究成果の概要（英文）：Elderly onset of epilepsy, a chronic brain disease, is increasing. Most of them develop after damage to the brain, such as through stroke or brain trauma. The onset of epilepsy in the elderly is fraught with various problems, and the significance of preventing epilepsy before it develops has been pointed out. However, the onset mechanism is unknown and the method has not been established yet. In this research, the molecular mechanisms of changes in the brain after status seizures (SE) were analyzed as a basic study for the development of epilepsy prevention methods after brain injury. The induction mechanism of the expression changes of various inflammation-related molecules that occur immediately after SE was discussed, and the potential of the new anti-epileptic drug, levetiracetam, as a preventive drug for the onset of epilepsy was demonstrated.

研究分野：薬物治療学

キーワード：てんかん レベチラセタム 脳内炎症 Fos11 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、有病率約1%の最も一般的な脳神経疾患の一つである。脳の器質的病変が原因となって起こる「症候性てんかん」と、原因が特定できない「特発性(素因性)てんかん」に大別される。年代別では3歳以下での発症が最も多いが、すべての年代で幅広く、近年では特に高齢期での発症が顕著に増加している。高齢発症のてんかんの多くは、脳卒中をはじめとする脳血管障害、脳腫瘍、頭部外傷、アルツハイマー型認知症等の脳障害の合併症として起こる二次性症候性てんかん(脳障害後てんかん)である。

脳障害後てんかんの発症機構については、詳しいことは分かっていない。発症した場合の治療は、他のてんかんと同様に発作を抑えるための薬物療法が中心であり、適切な薬剤の選択により70~80%の患者で発作のコントロールが可能である。しかし、高齢者のてんかん発作は認知症と誤認されやすく、適切な治療開始が遅れがちである。運よく迅速に診断され、適切な薬物治療が開始されたとしても、服薬中止によって発作が再発するため、長期にわたる服薬が必要である。様々な副作用を示し、副作用治療によっててんかんが悪化する症例もある。その他、加齢により複数の病気に対して多くの薬を服用しなければならないことから引き起こされる薬物有害事象(ポリファーマシー)の発生に加え、次の発作が起こることへの不安や、てんかんと診断されることへの精神的苦痛等、対処すべき問題は多い。そこで、発症前に予防することの重要性が指摘されている。初期要因となる脳障害の発生からてんかん発症までには、長い場合には数年に及ぶ時間的猶予(「てんかん原性」と呼ばれる)があるため、この間に発症そのものを予防できれば大変有意義ではないかということである。しかし、前述の通り脳障害後てんかんの発症機構には不明な点が多く、予防的治療法の確立には至っていない。また、従来抗てんかん薬には、てんかん発症後の脳の異常興奮を抑制する「抗発作薬」としての効果はあっても、てんかん発症前からの服用による「てんかん発症予防薬」としての効果はないことが報告されている。

申請者が所属する研究グループでは、「脳障害後てんかんの発症機構を明らかにすることにより、てんかん発症回避のための薬物治療法を探索する」という目的で研究を行ってきた。二次性症候性発症の一つである重積けいれん発作(SE)モデルマウスを用いた研究の成果として、SE後に脳内炎症、血液脳関門(BBB)機能不全、脳浮腫等の様々な脳内変化が起こることを示した。また、新規抗てんかん薬レベチラセタム(LEV)投与によりこれらの変化が抑制され、その後のてんかん発症率が有意に低下することも明らかにしている。

このような背景を踏まえ、脳障害後てんかんの有効な発症予防法確立に向けた基礎的研究として、SE後のてんかん原性期に起こる脳内変化の分子機構を解析するという本研究を開始した。

2. 研究の目的

脳障害後てんかんの発症は高齢者の生活の質(QOL)低下の一因となるため、迅速に対応すべき社会問題の一つである。また、ますますの高齢化により今後も高齢発症のてんかん患者は増加すると考えられるため、発症予防が重要な課題となる。本研究は、脳障害後てんかんの予防的治療法の確立に向け、発症準備段階であるてんかん原性期における脳内変化の分子機構を明らかにし、発症予防薬の候補を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 重積けいれん後てんかん発症モデルマウス(PILO-SEマウス)作製と抗てんかん薬レベチラセタム(LEV)投与

PILO-SEマウスは、常法に従い、ICR 10週齢雄性マウスにピロカルピン(PILO, 290 mg/kg)を投与し、90分間に5回の全身けいれん発作(SE)を観察した後、ジアゼパム(DZP, 1 mg/kg)腹腔内投与により発作を終息させて作製した。このSEマウスでは、約7日間のてんかん原性期を経て自発けいれん発作が出現する。LEV投与群では、DZP投与後30分以内にLEV(360 mg/kg)の経口投与を開始し、その後はサンプル回収時まで1日2回(午前9時と午後5時)の投与を継続した。

(2) 遺伝子発現解析

PILO-SE誘発前(pre-SE)、PILO-SE誘発後LEV非投与(SE)及びLEV投与(SE+LEV)群それぞれのマウス海馬を摘出後にRNAを抽出し、Cap Analysis of Gene Expression(CAGE)法を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した(株式会社ダナフォーム)。また、リアルタイムPCR法を用いて個々の遺伝子発現様式の解析を行った。

(3) 炎症関連タンパク質発現解析

各処理群のマウスより海馬を摘出後、Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array Kit(ARY028 R&D Systems)を用い、111種類のマウスサイトカイン関連タンパク質の発現変動を解析した。

(4) 脳細胞（ミクログリア、ニューロン、アストロサイト、血管内皮細胞）の分取

各処理群のマウスより海馬を摘出し、コラゲナーゼ（400 U/mL）、及び Adult Brain Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) により処理し、細胞懸濁液を得た。抗 CD11b-FITC 抗体、抗 CD90.2-PE 抗体、抗 EAAT2-Alexa Fluor 647 抗体、抗 CD144-BV421 抗体で蛍光免疫染色後、FACS Aria II を用いて解析、分取した。

4. 研究成果

(1) PIL0-SE マウスのでんかん原性期に変動する因子の解析と抗てんかん薬レベチラセタム (LEV) 投与による影響

PIL0-SE マウスのでんかん原性初期における脳内変化の分子機構を明らかにするため、CAGE 法を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。SE 後 6 時間、2 日における遺伝子オントロジー (GO) 解析の結果、多くの炎症関連遺伝子、血管新生関連遺伝子、及び BBB 透過性関連遺伝子群の発現が上昇していた。個々の遺伝子につき、リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現解析を行い、てんかん原性期全体にわたる経時的な発現変動様式を明らかにした。同様に、炎症関連タンパク質の発現解析を行い、SE 後に多種のインターロイキン、ケモカイン等において発現が亢進することを示した。これら因子の発現亢進は、SE 直後からの LEV 投与により有意に抑制された。本研究で明らかにした各種因子の発現変動は、既に申請者の研究グループが報告している PIL0-SE 後のでんかん原性初期における脳内現象（脳内炎症、血管新生、脳浮腫、BBB 透過性亢進等）の進行と LEV 投与による抑制を説明できるものであり、これら因子の発現変動がその後のでんかん発症に重要であることが示された。

(2) PIL0-SE マウスのでんかん原性期における海馬 *Fos11* 発現の変動

抗てんかん薬 LEV の主な作用機序は、シナプス小胞タンパク質 2A (SV2A) に結合してグルタミン酸放出を抑制するというものである。しかし、この作用機序から脳内炎症等の抑制を説明することは難しい。そこで、研究成果(1)の網羅的遺伝子発現解析の結果をもとに、LEV の新規ターゲットの探索を行っていたところ、本研究期間中に、マウスミクログリア BV-2 細胞株を用いた *in vitro* 実験により、LEV の新規ターゲットとして AP-1 転写因子 *Fos11* (*Fra1*) が同定され、LEV が LPS 刺激後に起こる *Fos11* 発現誘導を阻害することでミクログリアの活性化、及び炎症反応を抑制することが報告された [1]。本研究の SE 後の海馬における解析でも、同様に *Fos11* の顕著な発現上昇と LEV 投与による有意な発現抑制が認められたため、*in vivo* における LEV と *Fos11* の関係について調べた。海馬 *Fos11* 発現は、SE 後 3 時間で有意に上昇し、SE 後 2 日目まで高発現が継続した。これは、神経活動との関連性から最初期遺伝子としてよく研究されている同じ Fos ファミリーに属する *Fos* とは全く異なる特徴的な発現様式であった。どちらの遺伝子発現も LEV 投与により有意に抑制されており、*in vivo* においても LEV が *Fos11* 制御を介して炎症抑制に働く可能性が示唆された。

(3) PIL0-SE マウスのでんかん原性期における海馬 *Fos11* 発現細胞の同定

SE 後の海馬 *Fos11* 発現細胞を同定するため、FACS Aria II を用いて CD11b⁺、CD90.2⁺、EAAT2⁺、CD144⁺ の 4 集団を分取した。ミクログリアマーカー *Tmem119*、ニューロンマーカー *Grin1*、アストロサイトマーカー *Slc1a2*、血管内皮細胞マーカー *Cdh5* の発現解析を行い、それぞれの集団が適切に分取できていることを確認した。各集団における *Fos11*、及び *Fos* 発現をリアルタイム PCR 法を用いて解析した結果、*Fos* 発現はどの細胞にも検出されたのに対し、SE 後 2 日目に発現誘導される海馬 *Fos11* は、大部分がアストロサイトに局在していることが明らかとなった。また、LEV 投与によるアストロサイト *Fos11* 発現の抑制傾向が認められた。このことから、*in vivo* における LEV の炎症反応抑制効果は、ミクログリアではなくアストロサイトの *Fos11* 発現制御を介して発揮されることが示唆された。

(4) PIL0-SE マウスのでんかん原性期におけるアストロサイトマーカー遺伝子発現変動に対する LEV 投与の効果

SE 後の海馬 *Fos11* が主にアストロサイトで増加していたことから、SE 後のでんかん原性期における代表的アストロサイトマーカー (*Gfap*, *P2ry1*, *Ndr2*, *Slc1a2*) の発現変動を解析した。その結果、活性化アストロサイトマーカーとして知られる *Gfap* 発現が誘導されること、及び LEV 投与により発現誘導が有意に抑制されることを示した。近年の研究から、アストロサイトは脳損傷に迅速に反応して活性化され、炎症性(神経障害性)の A1 アストロサイト、及び抗炎症性(神経保護性)の A2 アストロサイトという異なる 2 つの特性を示すことで、神経障害にも保護にも関わると考えられている。そこで、SE 後の A1 アストロサイトマーカー (*C3*, *H2-D1*, *Ggta1*, *Gbp2*, *Amigo2*)、及び A2 アストロサイトマーカー (*Ptx3*, *S100a10*, *Ptgs2*) の発現様式をリアルタイム PCR 法を用いて解析した (図 1)。A1 アストロサイトマーカーについては、*Amigo2* を除く 4 遺伝子で SE 後に発現が有意に上昇していたが、LEV 投与による影響は認められなかった (図 1A)。一方、A2 アストロサイトマーカーについては、解析した 3 遺伝子のすべてにおいて発現上昇がみられ、*Ptgs2* を除く 2 遺伝子では LEV 投与により発現上昇が有意に抑制された (図 1B)。

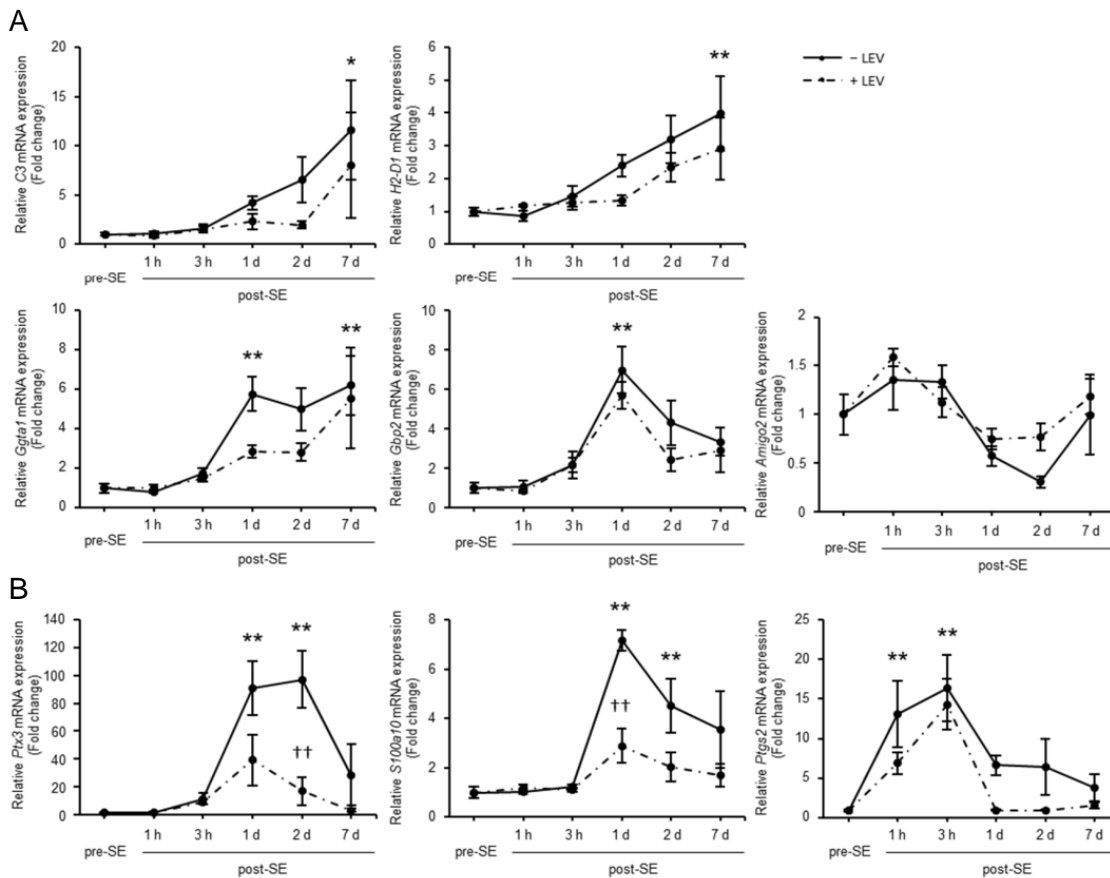


図 1. PILO-SE 後の海馬におけるアストロサイトマーカー遺伝子の発現変化

PILO-SE マウスでのてんかん原性期における A1 (A) 及び A2 (B) アストロサイトマーカー遺伝子の経時的発現変化について、リアルタイム PCR 法を用いて解析した (one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. pre-SE mice, †† $p < 0.01$ vs. without post-SE mice)。

以上の結果より、PILO-SE 直後からの LEV 投与は、SE 後の海馬 *Fos11* を介して起こるアストロサイト活性化を制御することにより、てんかん原性初期における脳内炎症 (サイトカインストーム様現象) を阻害し、その後のてんかん発症を抑制する抗てんかん原性薬として有効に働く可能性を示した。今後は、本研究の成果を基にし、超高齢社会において今後ますます深刻化すると予想される脳障害後てんかんの予防という新しい治療法の構築を目指す。

< 引用文献 >

[1] Niidome, K.; Taniguchi, R.; Yamazaki, T.; Tsuji, M.; Itoh, K.; Ishihara, Y. FosL1 Is a Novel Target of Levetiracetam for Suppressing the Microglial Inflammatory Reaction. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 10962.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Rie Komori, Taira Matsuo, Aya Yokota-Nakatsuma, Ritsuka Hashimoto, Shizuka Kubo, Chihiro Kozawa, Tomomi Kono, Yasuhiro Ishihara, Kouichi Itoh	4. 巻 23
2. 論文標題 Regulation of Inflammation-Related Genes through Fos11 Suppression in a Levetiracetam-Treated Pilocarpine-Induced Status Epilepticus Mouse Model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 7608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23147608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Taira Matsuo, Rie Komori, Minami Nakatani, Shiori Ochi, Aya Yokota-Nakatsuma, Junichi Matsumoto, Fuyuko Takata, Shinya Dohgu, Yasuhiro Ishihara, Kouichi Itoh	4. 巻 23
2. 論文標題 Levetiracetam Suppresses the Infiltration of Neutrophils and Monocytes and Downregulates Many Inflammatory Cytokines during Epileptogenesis in Pilocarpine-Induced Status Epilepticus Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 7671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23147671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kouichi Itoh, Yasuhiro Ishihara, Rie Komori, Hiromi Nochi, Ruri Taniguchi, Yoichi Chiba, Masaki Ueno, Fuyuko Takata-Tsuji, Shinya Dohgu, Yasufumi Kataoka	4. 巻 1652
2. 論文標題 Levetiracetam treatment influences blood-brain barrier failure associated with angiogenesis and inflammatory responses in the acute phase of epileptogenesis in post-status epilepticus mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2016.09.038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾平、越智詩織、中谷みなみ、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 レベチラセタムは、重積発作後の白血球の脳内浸潤を抑制する
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小森理絵、松尾平、石原康宏、伊藤康一
2. 発表標題 てんかん原性期のマウス海馬における炎症反応とFosI1発現に対するレベチラセタムの効果
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小森理絵、松尾平、石原康宏、伊藤康一
2. 発表標題 てんかん原性初期のマウス海馬におけるレベチラセタム新規ターゲットFosI1の挙動
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾平、越智詩織、中谷みなみ、小森理絵、伊藤康一、石原康宏
2. 発表標題 てんかん原性初期の脳内炎症における脳内浸潤好中球の役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小森理絵、松尾平、石原康宏、伊藤康一
2. 発表標題 てんかん原性初期のマウス海馬におけるFosI1遺伝子発現
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小森理絵、松尾平、河野智海、小澤千尋、竹上雄治郎、石原康宏、伊藤康一
2. 発表標題 てんかん原性進行に関与する遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増原朝日、片本大貴、中妻彩、小森理絵、松尾平、伊藤康一
2. 発表標題 重積発作後の脳内浸潤白血球の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤康一、小澤千尋、河野智海、松尾平、小森理絵、竹上雄治郎、石原康宏
2. 発表標題 CAGE-seq 法を用いた重積発作後てんかん原性初期の海馬内遺伝子変化の網羅的解析
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾平、中妻彩、小森理絵、伊藤 康一
2. 発表標題 重積発作後てんかん原性期における脳内浸潤白血球の解析
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小森理絵、大江優美、石原康宏、松尾平、伊藤 康一
2. 発表標題 てんかん原性初期の脳内変化とてんかん発症に対する五苓散の効果
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小森理絵、河野智海、小澤千尋、松尾平、石原康宏、伊藤 康一
2. 発表標題 てんかん原性初期における遺伝子発現変動の網羅的解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増原朝日、片本大貴、中妻彩、小森理絵、松尾平、伊藤 康一
2. 発表標題 重積発作後てんかん原性期における脳内浸潤白血球の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片本大貴、増原朝日、中妻彩、小森理絵、松尾平、伊藤 康一
2. 発表標題 重積発作後てんかん原性期におけるミクログリアの解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤康一、松尾平、小森理絵、石原康宏
2. 発表標題 レベチラセタムはてんかん原性初期の脳内炎症サイトカインストームを制御する
3. 学会等名 第52回日本てんかん学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤千尋、河野智海、松尾平、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 CAGE-seq 法を用いた重積発作後てんかん原性初期の海馬内遺伝子変化
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河野智海、小澤千尋、松尾平、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 重積発作後てんかん原性初期の海馬内脳内炎症関連遺伝子の解析
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保静香、橋本律香、松尾平、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 てんかん原性初期における脳内および血清中ケモカイン分子の網羅的解析
3. 学会等名 第58回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本律香、久保静香、松尾平、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 てんかん原性初期における脳内および血清中インターロイキンの網羅的解析
3. 学会等名 第58回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保静香、橋本律香、松尾平、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 重積発作後のてんかん発症予知因子の探索 - 脳内ケモカインとその関連分子の網羅的解析 -
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本律香、久保静香、松尾平、小森理絵、伊藤康一
2. 発表標題 重積発作後のてんかん発症予知因子の探索 - 脳内炎症とその関連分子の網羅的解析 -
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤康一、橋本律香、久保静香、松尾平、小森理絵、水野翔童、石原康宏
2. 発表標題 てんかん原性初期における脳内炎症関連サイトカインのプロファイル
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018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
---------	---------