

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15533

研究課題名（和文）続発性てんかん予防に向けた新規てんかん治療薬の探索

研究課題名（英文）Search for new antiepileptic drugs for prevention of symptomatic epilepsy

研究代表者

松尾 平 (Taira, Matsuo)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：90509267

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：続発性てんかんは脳卒中などの脳障害が発端となり、その後発症する症候性てんかんのひとつである。本研究では、その発症機構を調べるために脳障害後の脳内変化を詳細に調べた。その結果、脳障害発生後、血液脳関門の破綻と同時期に多数の炎症関連サイトカインの発現が誘導されてくることがわかった。またそれらのサイトカインの発現に合わせて、炎症誘導や組織修復に関わる白血球が脳内に浸潤してくることもわかった。これらの白血球の浸潤を阻害できる薬剤には、てんかん発症を抑制できるものがあり、白血球の浸潤を抑制することで、てんかん発症そのものを予防できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんは、身近な慢性の脳疾患のひとつであり、その発症率は100人に1人とされている。その中でも脳卒中などの脳疾患が原因となり発症する続発性てんかんは、高齢者に多く見られる。ますます高齢化が進む我が国において今後さらに高齢者てんかん患者は増加していくと予想され、その対策が必要である。本研究により、脳障害発生後の経時的な脳内変化について明らかになった。これにより、てんかん発症そのものを抑制するためのターゲット候補が見つかり、てんかん患者の減少に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of epilepsy following brain insults, such as traumatic brain injury and stroke, remains unknown. In this study, we investigated epileptogenicity using status epilepticus model mouse and searched for new drugs to prevent the development of epilepsy. In the early phase of epileptogenicity, the expression of many inflammatory cytokines such as IL-1b, Ccl5, TNFa, were increased. The infiltration of leukocytes into the brain was also increased according to the increase of cytokines. These cells are involved in the regulation of brain inflammation, angiogenesis and tissue repair. One of these drugs that can inhibit the infiltration of leukocytes can suppress the epileptogenicity, suggesting that suppression of leukocyte infiltration could prevent the epileptogenicity.

研究分野：薬物治療学

キーワード：症候性てんかん サイトカイン プロテオーム解析 CAGE-seq 骨髄由来抑制細胞

## 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、身近な慢性の脳疾患のひとつであり、その発症率は 100 人に 1 人とされている。てんかんはその発症原因により、原因となる異常が特定できない「特発性てんかん」と、脳の器質的病変によって起こる「症候性てんかん」に大別される。脳の器質的病変は、外傷性脳損傷、脳卒中などの脳血管障害、脳腫瘍、アルツハイマー病などが主な原因となっており、それらの脳障害発生後に、てんかんに発症することがある。しかし、脳疾患罹患後から症候性てんかん発症までの詳しいメカニズムはわかっておらず、その予防法についても未だ見つかっていない。

症候性てんかんは、脳血管障害などの疾患罹患後に一定期間経過した後に突然発症する。このとき最初にてんかん発作が発現するまでの過程は「てんかん原性」と呼ばれ、通常数日～数年かかる。てんかん原性期間には、脳障害が原因となっており、脳に何らかの時空間的变化が起こり、発作を起こす新たなニューロンネットワークが形成される。つまり、このてんかん原性期間に脳内の変化を食い止めるための治療を行うことができれば、その後のてんかん発症を回避することができるはずである。しかし、既存の抗てんかん薬は、てんかん発作を抑制するためのものであり、抗てんかん原性効果はない。また、てんかん原性の進行過程についても明確にわかっておらず、抗てんかん原性薬を開発するためにも、てんかん原性機構をさらに理解することが必要である。

近年、重積けいれんモデルマウス (PILO-SE マウス) を用いて、重積けいれん後にてんかん発作が現れるまでの脳変化を解析し、血液脳関門 (BBB) の機能不全と脳浮腫の質的变化が、てんかん発作発症の重要な機構の一つであることが報告された。さらに脳内で産生されるケモカイン及び炎症メディエーター (プロスタグランジン、NO など) に加え、TNF- $\alpha$  や IL-1 などの炎症性サイトカインが、BBB 透過性に影響を与え、神経障害を媒介する炎症細胞の浸潤に関与することも明らかになった。申請者は、事前実験として PILO-SE マウスの脳を用いて 111 種のサイトカインについてプロテオーム解析を行った。その結果、SE 後 2 日目に炎症関連サイトカインを含む 20 種のサイトカインの発現が優位に上昇していることがわかった。

このような背景のもと、本研究では、重積けいれん後に発現が上昇するサイトカインについて、BBB 透過性の亢進および脳浮腫進行との関連を調べ、てんかん原性における脳内変化の分子機構を解明することを目的とした。またてんかん発症そのものを予防するための薬の探索も目指した。

### 2. 研究の目的

脳内炎症がてんかん原性進行に大きく関わっていると考え、本研究では、重積けいれん後に発現が上昇するサイトカインについて、血液脳関門透過性の亢進および脳浮腫進行との関連を調べ、てんかん原性における脳内変化の分子機構を解明することを目的とした。さらに近年注目されているドラッグリポジショニングという考えを取り入れ、てんかん原性を抑制できる薬剤の探索を目指した。ドラッグリポジショニングとは、既承認薬の新たな薬理作用を発見し新薬として開発していくことであり、研究期間の短縮や研究費の節約の面で非常にメリットが大きい。そして抗てんかん原性候補薬のターゲット因子および作用メカニズムを明らかにし、症候性てんかん発症を抑制するための予防的治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

ピロカルピン誘発重積けいれん (SE) モデルマウスを用いて、てんかん原性期間の各種サイトカインの発現量の時空間的变化を詳細に調べた。そしてターゲット分子を絞り込み、大規模データベースを用いて抗てんかん原性候補薬を探索した。

#### 1. 重積けいれん (SE) 後の脳内での炎症関連分子マーカーの経時的発現変化の解析

PILO-SE モデルマウス作製；常法に従い、ICR 雄性マウス (10 週齢～) にピロカルピンを投与し、90 分間に 6 回以上のけいれんを重積させた後、ジアゼパム投与により重積けいれんを終息させて作製した。炎症関連分子マーカーの発現解析；重積けいれん後、経時的に (3h、6h、2d、3d、7d；7d はてんかん発症時) マウス脳を摘出し、大脳皮質および海馬から mRNA およびタンパク質を抽出後、それぞれ real-time RT-PCR とウエスタンブロット (WB) 法で検出、定量した。広く炎症マーカー分子として知られている IL-1、IL-6、TNF、iNOS について遺伝子発現の時空間的变化を調べ、さらに CAGE-Seq を用いた網羅的遺伝子発現の定量化を行った。また炎症関連分子に関しては、Proteome Profiler Array, Mouse XL Cytokine Array Kit (R&D Systems) を用いて、111 種類の炎症関連分子の発現動態を網羅的に解析した。

#### 2. 脳内浸潤白血球の解析

PILO-SE マウスにおいて、SE 後 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、7 日目において大脳皮質および海馬を摘出し、コラゲナーゼ処理後、パーコール密度勾配遠心分離法によりマイクログリアおよび白血球を含む画分を分離した。その後、抗 CD45 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 Ly6C 抗体、抗 Ly6G 抗体で蛍光免疫染色を行い、フローサイトメーターにより解析を行い、各細胞集団を回収した。そして mRNA を抽出し、real-time RT-PCR により炎症関連遺伝子の発現を調べた。

#### 3. 新規抗てんかん原性薬の探索

SE 後の海馬における遺伝子発現データをもとに LINCS プログラムを使い検索した。4 倍以上

発現変動があった遺伝子を抽出し、それらの遺伝子発現を逆に変動させるような化合物を候補薬とした。

#### 4. 研究成果

##### 1. 重積けいれん (SE) 後の脳内での炎症関連分子マーカーの経時的発現変化の解析

海馬におけるタンパク量および mRNA の発現量解析の結果、SE 後 6 時間の段階で、多くのインターロイキンやケモカインの発現が上昇していた。そして SE 後 2 日目では、さらに多くのサイトカインの発現量の増加が確認された。血液脳関門の破綻は、SE 後 2 日目で起こることが確認できており、発現上昇したサイトカインが脳内炎症に強く関わっていると考えられた。また、SE 後 6 時間の早期から発現上昇している分子 (CCL2、CCL4、CXCL1、IL-1 など) や、SE 後 2 日目で大きく発現上昇してくる分子 (IL-4、IL-6、IL-11、IL-33、CCL5 など) を確認できた。SE 後 2 日目に大きく発現上昇してくる遺伝子については、同時期に脳内への浸潤が非常に多くなる Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>細胞に由来する可能性が高いと考えられる。実際に、Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>細胞では、IL-6、CCL5 の発現が高いことは確認できている。

##### 2. 脳内浸潤白血球の解析

SE 後、大脳皮質および海馬に浸潤してくる白血球について経時的にその量を調べたと。パーコールの密度勾配を利用した分離法では、ミクログリアと浸潤白血球の両方が同じ画分に含まれる。フローサイトメトリーの結果、SE 後 1 日目で CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞と CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>細胞が確認できた(図 1A)。CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞は、コントロールも含めたすべてのサンプルにおいて確認でき、またミクログリアマーカーである TMEM119 の発現が見られたことからミクログリアであると考えられた。ミクログリアは、SE 後 2 日目において Iba1 陽性の活性化型が増加することがわかっているが、本研究により大脳皮質および海馬におけるミクログリアの数自体は減少していることが明らかになった。またこの減少は、SE 後 2 日をピークにその後回復していき、7 日目にはコントロールと同程度まで回復した。ミクログリアの減少と脳内炎症との関りは今後検討していく予定である。

CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞は、SE 後 1 日目から増加していき、海馬では 3 日目にピークとなった後、減少していき 7 日目には、ほとんど確認できなかった。さらにこの CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞を Ly6C および Ly6G の発現によって分離したところ、大部分は 2 つの細胞集団に分けることができた(図 1B)。1 つは、Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>細胞で、SE 後 1 日目の早期から海馬内への浸潤が見られ、その後 2 日目をピークにして減少し 7 日目にはほとんど検出されなかった。これらの細胞では、IL-1、IL-23a、TNF の発現が高く、脳内炎症を促進する好中球由来の細胞であると考えられた。もう 1 つは、Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>細胞で、SE 後 2 日目に急激に増加し 4 日目にはかなり減少していた。Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>細胞では、IL-6、IL-10、Arg1 の発現が高く、この特徴は単球型骨髄由来免疫抑制細胞のものと一致しており、T 細胞の活性化抑制、M2 タイプのマクロファージの誘導などを介し、血管新生の促進や組織修復に関与していると考えられた。

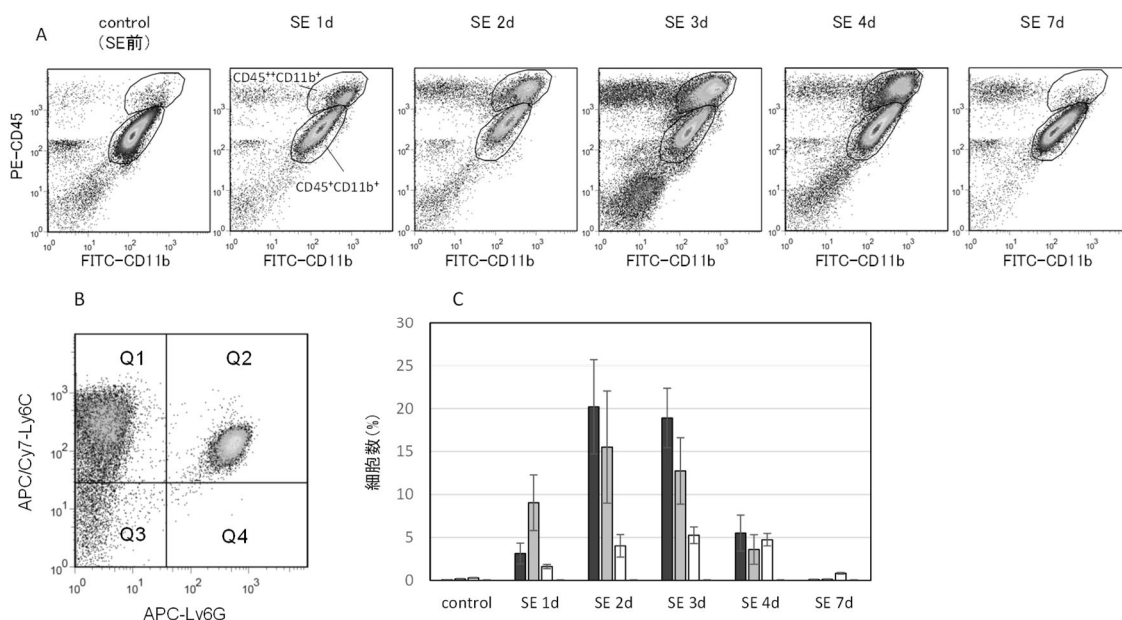


図 1. SE 後の脳内のミクログリアおよび浸潤白血球の細胞数の変化

A, 海馬から分離した白血球画分のフローサイトメトリーの結果。B, SE2 日目の海馬から分離した細胞。CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>細胞についてゲーティングを行った。C, 海馬から分離した細胞。縦軸は、分離した生細胞中に含まれる各細胞集団の割合。黒色; Q1 (Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>)、灰色; Q2 (Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>)、白色; Q3 (Ly6C<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>)

### 3. 新規抗てんかん原性薬の探索

SE 後、6 時間、2 日のサンプルについて CAGE-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、SE 後 6 時間において IL-1 $\beta$ 、IL-17A、IL-23a などを含む約 400 個、SE 後 2 日では IL-6、IL-33、CCL5 などを含む約 1000 個の遺伝子が 4 倍以上上昇していた。これらの結果は、これまでのプロテオーム解析とも一致していた。CAGE-seq による遺伝子発現情報から、様々な薬物投与時の遺伝子発現プロファイルが収納されているデータベース (LINCS) を使い、てんかん原性期に起こる遺伝子変化を抑制する候補薬を検索した。その結果、SE 後 6 時間のデータを使用した場合は、14 個、SE 後 2 日のデータを使用した場合は 35 個の候補薬が見つかった。さらにこれらのうち重複するものは、1 つのみであった。候補薬の作用機序については、EGFR 阻害薬や JAK2 阻害薬、MEK 阻害薬など細胞増殖に関わる酵素の阻害薬が多数見られた。現在までのところ、抗てんかん原性効果を確認できているものは見つかっていない。

SE 後の海馬における経時的遺伝子発現解析の結果から、血液脳関門の障害時期に発現上昇してくる炎症関連サイトカインが明らかになり、またそれらを放出していると予想される浸潤白血球の存在も確認できた。本研究で用いた SE モデルマウスにおいて、その後のてんかん発症を抑制できるレベチラセタムを報告している。レベチラセタムを投与した PILO-SE マウスでは、SE 後 2 日目で見られたような脳内への白血球の浸潤は起こっていなかった。つまり、SE 後の脳内への白血球の浸潤を阻害することができれば、Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>細胞などによる血管新生などが抑制され、てんかん原性期の異常な神経回路の形成を抑制できる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kouichi Itoh Ruri Taniguchi Taira Matsuo Ami Oguro Christoph F.A.Vogel Takeshi Yamazaki Yasuhiro Ishihara	4. 巻 708
2. 論文標題 Suppressive effects of levetiracetam on neuroinflammation and phagocytic microglia: A comparative study of levetiracetam, valproate and carbamazepine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.134363	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 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

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
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 -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 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 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤康一、松尾 平、石原 康宏
2. 発表標題 重積発作後の脳内サイトカインストームと抗てんかん薬
3. 学会等名 第13回 日本てんかん学会中国・四国地方会
4. 発表年 2019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 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 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 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 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、石原康広
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 第138年会 日本薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤康一、松尾平、石原康宏
2. 発表標題 重積発作後の脳内サイトカインストームと抗てんかん薬
3. 学会等名 第13回 日本てんかん学会中国・四国地方会
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 中国四国支部学術大会
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 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019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 第140年会 日本薬学会
4. 発表年 2020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 第140年会 日本薬学会
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 第140年会 日本薬学会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島文理大学 香川薬学部 薬物治療学講座  
<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph02/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----