

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07129

研究課題名(和文)乳幼児熱性痙攣後の神経発達障害におけるPGE2合成酵素の役割

研究課題名(英文)Role of PGE2 synthase in neurodevelopmental disorders in neonatal febrile seizure model

研究代表者

松尾 由理 (Ikeda-Matsuo, Yuri)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：10306657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、複雑型小児熱性痙攣後の神経発達異常と脳炎症の関連を明らかにすることを目的とし、特に膜結合型PGE合成酵素-1(mPGES-1)の関与について検討を行った。

複雑型小児熱性痙攣モデルマウスでは、脳内PGE2量が有意に増加し、炎症性サイトカインの増加やグリア細胞の活性化が認められた。mPGES-1欠損型マウスでは、これらの有意な変化は認められなかった。従って、熱性痙攣後に海馬にて発現誘導するmPGES-1は、PGE2産生を介して脳炎症を促進することが示唆された。

脳炎症と癲癇の関係が明らかになれば、mPGES-1が難治性癲癇の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の癲癇の薬物治療は、痙攣を抑える対症療法であり、根治療法はない。幼少期の複雑型熱性痙攣が後の側頭葉癲癇の発症リスクを増加させることから、この間の神経発達の異常を修正出来れば、癲癇発症を予防できると期待される。

本研究より、複雑型熱性痙攣後に海馬にてPGE合成酵素が誘導することで、大量のPGE2を産生し、脳炎症を促進することが明らかとなった。炎症に伴うグリア細胞の活性化は、神経発達に影響することが知られており、これが癲癇発症に寄与する可能性がある。複雑型小児熱性痙攣後の脳炎症をターゲットとした治療が、難治性の癲癇の予防に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the relationship between neurodevelopmental abnormalities and encephalitis after pediatric febrile seizures, with a particular focus on the involvement of membrane-bound PGE2 synthase-1 (mPGES-1).

In a pediatric model of complicated febrile seizures, mice showed a marked increase in body temperature and seizures, as well as a significant increase in brain PGE2 levels, inflammatory cytokines, and glial cell activation. mPGES-1-deficient mice did not show these significant changes.

Thus, our results suggest that mPGES-1, whose expression is induced in the hippocampus after febrile seizures, promotes brain inflammation via PGE2 production. This study suggests that mPGES-1 may be a new therapeutic target for the treatment of intractable epilepsy.

研究分野：中枢薬理学

キーワード：熱性痙攣 プロスタグランジンE2 炎症性サイトカイン 神経炎症 グリア細胞 PGE2合成酵素 癲癇  
神経発達異常

## 1. 研究開始当初の背景

小児熱性痙攣は、生後6ヶ月～5歳の乳幼児期に高熱に伴って生じる発作性疾患で、日本では7～11%もの割合で発症する。単純型と複雑型に分類され、持続的或いは反復的な発作を生ずる複雑型は全体の約3割を占め、成長後の側頭葉癲癇の発症リスクが10倍以上高いことが報告されている<sup>1)</sup>。従って、癲癇発症を予防するためには複雑型小児熱性痙攣から側頭葉癲癇への進展機序の解明が必須である。これまでに、乳幼児熱性痙攣が、海馬内に異所性神経細胞を生じ、その後の癲癇発症率を増加させる可能性が報告されているが<sup>2)</sup>、複雑型熱性痙攣から癲癇発症の詳細な機序は不明である。

近年、痙攣後の神経損傷に炎症反応が寄与することが数多く報告され、癲癇と炎症との関係が注目されてきている<sup>3)</sup>。特に、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の誘導型最終合成酵素である mPGES-1 が発見されて以来<sup>4)</sup>、mPGES-1 は副作用の少ない新たな炎症治療ターゲットとして注目を集めている<sup>5)</sup>。我々はこれまでに mPGES-1 欠損型マウスを用いて、脳虚血やパーキンソン病などの脳疾患モデルにおける病態悪化に、mPGES-1 が介する PGE<sub>2</sub> 産生と脳炎症が深く関与することを報告しており<sup>6-10)</sup>、mPGES-1 の脳病態における役割の解析技術においては、世界に先駆けている。

カニン酸誘発痙攣モデルにおいても、脳の異常興奮後に海馬にて PGE<sub>2</sub> が生じること、これが痙攣後のミクログリア活性化や神経細胞死に寄与することを我々は既に見出している(投稿準備中)。今回、PGE<sub>2</sub> を介した脳炎症反応が小児熱性痙攣後にも生じ、これが海馬異所性細胞の発現や癲癇発症の一因となると考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

癲癇の発症機序の解析をすることで予防法の確立に貢献することを目的としている。幼少時に複雑型熱性痙攣を発症すると後の癲癇発症リスクが高まることから、複雑型熱性痙攣後の脳内変化を、特に炎症反応に焦点を当てて検討を行う。我々はカニン酸誘発痙攣モデルにて、脳の異常興奮後に海馬にて病態誘導型 PGE<sub>2</sub> 合成酵素である mPGES-1 が誘導して PGE<sub>2</sub> が生じること、これが痙攣後のミクログリア活性化や神経細胞死に寄与することを見出している。そこで本研究では、炎症反応の中で特に mPGES-1 に注目し、熱性痙攣後の神経発達障害への寄与を明らかにすることを目的とした。即ち、マウス熱性痙攣モデルにて mPGES-1 発現変化を解析した後、神経回路発達や機能障害、脳炎症、さらには癲癇発症リスクにおける mPGES-1 の役割を、mPGES-1 欠損型と野生型マウスを比較して多角的に評価することとした。本研究より、mPGES-1 の熱性痙攣後の役割が明らかになれば、熱性痙攣から側頭葉癲癇への進展機序が明らかになるだけでなく、癲癇への進展予防・治療における新展開が期待できる。

## 3. 研究の方法

### 1) *in vivo* マウス熱性痙攣モデル

生後10日齢の C57BL/6 系野生型マウス及び mPGES-1 欠損型マウスに赤外線を照射し、直腸温約 38.5 度以上で 15 分間維持して、熱性痙攣を誘発した。熱性痙攣を増強する目的で、起炎剤であるリポ多糖 (LPS, 100 µg/kg) を熱照射前に腹腔内投与した。1 回或いは 4 時間おきに 2 回の熱照射を行い、後者を複雑型モデルとした。痙攣の強さをスコア化して評価し、体温が 38.5 度以上にならなかったもの、痙攣が生じなかったものは除外した。

### 2) mPGES-1 及び炎症性物質等の mRNA 発現解析

熱照射の 1 時間後或いは 1 日後に脳を摘出し、海馬と視床下部を切り分け、Isogen II により RNA を抽出精製し、逆転写反応により cDNA を得た。SYBR-Green による Real-time PCR 法にて、mPGES-1, mPGES-2, cPGES, COX-1, CPX-2, IL-1β, IL-6, TNF-α, iNOS, Iba-1, GFAP の mRNA 発現を内部標準として β-actin を用いて ΔΔCt 法にて解析した (CFX-96, Bio-Rad)。

### 3) PGE<sub>2</sub> 量の測定

熱照射の 1 時間後に脳を摘出し、海馬と視床下部を切り分け、70%メタノールにて脂質抽出し、減圧乾固した後、市販の ELISA キット (Cayman) を用いて測定した。

### 4) mPGES-1 及び細胞マーカータンパク質の免疫多重染色

2 回の熱照射の 1 時間後に、ペントバルビタールを腹腔内投与し深麻酔をかけ、左心室より生理的食塩水の後、4% パラホルムアルデヒドを全身還流し、固定を行った。脳を摘出し、

OCT コンパウンドにて包埋し、40  $\mu\text{m}$  の凍結脳切片を作製した。1 次抗体 (mPGES-1、Neu-N、Iba-1、GFAP) 2 次抗体 (Alexa 546-rabbit IgG、Alexa 488-mouse IgG) 核は Hoechst にて染色し、共焦点イメージサイトメーター-CQ1 にて画像を取得した。

#### 5) 癲癇発症リスクの検討

2 回の熱照射の 18 日後 (5 週齢) で、低用量のカイニン酸 (20 mg/kg) を腹腔内投与し、2 時間の痙攣行動をカメラで撮影して観察し、改変 Racine Scale にて痙攣の強さをスコア化した。

#### 6) 統計処理

結果は mean $\pm$ SE で表し、二群の場合は t 検定を行い、多群の場合は一元配置分散分析後に Tukey 法にて検定を行った。p<0.05 で有意差ありと判断した。

### 4. 研究成果

#### 1) 熱性痙攣後の mPGES-1 の発現誘導

単回の熱照射に比べ、4 時間ごとに 2 回熱照射を繰り返した方が、海馬及び視床下部にて顕著な mPGES-1 mRNA の発現誘導が認められた。そこで、繰り返しの熱照射モデルを複雑型熱性痙攣モデルとして、以下の実験を行った。

#### 2) 熱性痙攣後に誘導する mPGES-1 の発現細胞の同定

複雑型熱性痙攣後の凍結脳切片を用いて、海馬及び視床下部での mPGES-1 タンパク質の発現を免疫染色に検討したところ、対照群に比べて複雑型熱照射群では、海馬歯状回や CA3 野の神経細胞層での mPGES-1 の染色が強くなっていった。この細胞を同定するために、各種細胞マーカータンパク質との共染色を行ったところ、神経細胞マーカーである Neu-N と共染色され (図 1)、ミクログリアマーカーの Iba-1 やアストロサイトマーカーの GFAP、血管内皮細胞マーカーの vWF とは共染色されなかった。

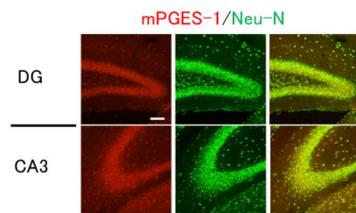


図 1 複雑型熱性痙攣後の海馬歯状回・CA3 野での mPGES-1 の発現細胞の同定  
熱照射 1 時間後の野生型マウスの海馬歯状回 (DG) および CA3 野での mPGES-1 (赤) と神経細胞マーカー Neu-N (緑) の共染色の代表例。Scale bar=100  $\mu\text{m}$

#### 3) 熱性痙攣後に誘導する mPGES-1 の PGE<sub>2</sub> 産生における役割

複雑型熱性痙攣後の野生型マウスの海馬及び視床下部において、顕著かつ有意な PGE<sub>2</sub> 産生が認められた。一方、mPGES-1 欠損型マウスでは、複雑型熱性痙攣後でもほとんど PGE<sub>2</sub> 産生は変化せず、野生型に比べ有意に低値であった。

#### 4) 熱性痙攣後に誘導する mPGES-1 の発熱及び痙攣スコアにおける役割

熱性痙攣後に誘導する mPGES-1 の役割を明らかにする目的で、mPGES-1 欠損型マウスを用いて検討を行った。まず初めに、直腸温変化を調べたところ、もともとの体温に有意な違いはなかったが、熱照射後の体温上昇は、野生型に比べて mPGES-1 欠損型マウスで有意に低値だった。また、熱照射 1 回目の痙攣スコアも、野生型に比べて mPGES-1 欠損型マウスで有意に低値だった。そこで、以降の解析では、同程度の体温上昇及び痙攣スコアが認められたマウスを用いて解析を行った。

#### 5) 熱性痙攣後に誘導する mPGES-1 の PGE<sub>2</sub> 合成関連酵素の発現における役割

熱性痙攣後の PGE<sub>2</sub> 合成関連酵素の発現を、野生型マウスと mPGES-1 欠損型マウスにて比較検討した。野生型マウスでは、2 回の熱照射後に cPGES の有意な増加、を mPGES-2 と COX-2 の増加傾向が認められたが、mPGES-1 欠損型マウスではいずれも低値であり、有意な変化は認められなかった。COX-1 については、野生型、mPGES-1 欠損型ともに、熱照射による変化は認められなかった。

#### 6) 熱性痙攣後に誘導する mPGES-1 のグリア細胞活性化における役割

熱性痙攣後のグリア細胞の活性化を、野生型マウスと mPGES-1 欠損型マウスにて比較検討した。野生型マウスでは、2 回の熱照射後にアストロサイトのマーカーである GFAP の有意な増加が認められたが、mPGES-1 欠損型マウスでは野生型に比べ低値であり、有意な増加は認められなかった。ミクログリアのマーカーである Iba-1 は、野生型マウスで変化が認められず、mPGES-1 欠損型マウスではむしろ低下した。炎症性の M1 ミクログリアマーカーである iNOS (誘導型 NO 合成酵素) の発現は、野生型、mPGES-1 欠損型ともに、熱照射により低下した。

7) 熱性痙攣後に誘導する mPGES-1 の炎症性サイトカインの発現における役割

熱性痙攣後の炎症反応を、野生型マウスと mPGES-1 欠損型マウスにて比較検討した。野生型マウスでは、2 回の熱照射後に IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  の有意な増加、IL-6 の増加傾向見られたが、mPGES-1 欠損型マウスではいずれも野生型に比べ低値であり、有意な増加は認められなかった( 図 2 )。

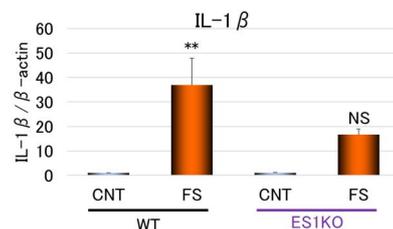


図 2 複雑型痙攣後の海馬 IL-1 発現の野生型と mPGES-1 欠損型の比較

CNT: 対照群、FS: 熱性痙攣群、WT: 野生型マウス、ES1KO: mPGES-1 欠損型マウス。WT-CNT、ES1KO-CNT の平均値をそれぞれ 1 として表した。n=4-5, \*p<0.01 vs. WT-CNT, NS (not significant) vs. ES1KO-CNT (Tukey's test)

8) 熱性痙攣後に誘導する mPGES-1 の癲癇発症における役割

複雑型熱性痙攣後の痙攣発症リスクを、野生型マウスと mPGES-1 効果を欠損型マウスで比較検討したところ、野生型マウスにおいて軽い痙攣を生じる低濃度のカニン酸により、mPGES-1 欠損型マウスではむしろ痙攣強度が高まる傾向があった。例数が少ないため、さらに検討を続けている。

5. 考察と結語

複雑型熱性痙攣は、15 分以上痙攣が持続するものや 24 時間以内に痙攣を繰り返すものを指すことから、単回の熱照射に比べ、熱照射を繰り返した方が、複雑型熱性痙攣モデルとして適当であると考えられた。単回熱照射に比べ、2 回熱照射することで、有意かつ顕著に mPGES-1 や IL-1 $\beta$  が増加しており、この炎症反応の違いが、将来癲癇を発症するかどうかを左右する可能性が考えられた。免疫染色結果から、mPGES-1 は海馬歯状回の顆粒細胞および、CA3 野の錐体細胞、即ち神経細胞で発現誘導しており、痙攣により興奮した神経細胞が PGE<sub>2</sub> を産生すると考えられた。

野生型海馬や視床下部で見られる複雑型熱性痙攣後の PGE<sub>2</sub> 産生は欠損型では完全に消失しており、複雑型熱性痙攣後の PGE<sub>2</sub> 産生に mPGES-1 は必須であることが示唆された。PGE<sub>2</sub> が熱照射による体温上昇と痙攣強度にも寄与したため、mPGES-1 阻害薬は熱性痙攣の反復や持続を抑えられる可能性が考えられた。さらに、誘導した mPGES-1 から産生する PGE<sub>2</sub> は、アストロサイトの活性化を引き起こし、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  の産生を促進して、炎症を促進することが示唆された。これらは、将来の癲癇発症リスクを高めると思われたが、予想に反し、mPGES-1 欠損型マウスでは痙攣スコアが高く、むしろリスクを高めていた。再現性の確認が必要であるが、mPGES-1 瓦解する炎症反応の一次的促進は、むしろ癲癇発症を抑制する可能性が考えられた。

以上より、複雑型熱性痙攣後に海馬神経細胞にて発現誘導する mPGES-1 より産生される PGE<sub>2</sub> は、アストロサイトを活性化して炎症性サイトカインの産生を促進し、これは将来の癲癇発症リスクを抑える働きがある可能性が考えられた( 図 3 )。今後詳細な検討が必要であるが、mPGES-1 による一時的な炎症の促進は、癲癇発症予防に結びつく可能性がある。

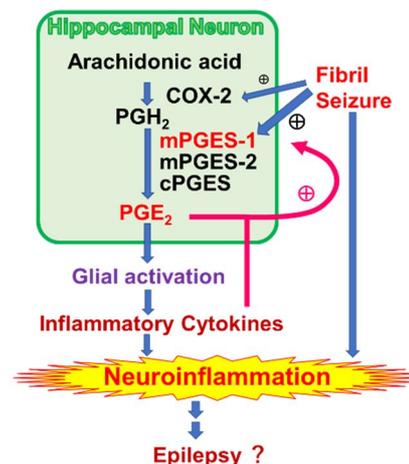


図 3 小児熱性痙攣後の mPGES-1 の役割の概略図

< 引用文献 >

- 1) Fiest KM *et al.*, *Neurology*, 88: 296-303 (2017).
- 2) Koyama R *et al.*, *Nat Med*, 18: 1271-1278 (2012).
- 3) Vezzani A *et al.*, *Nat Rev Neurol*, 7: 31-40 (2011).
- 4) Jakobsson PJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7220-7225 (1999).
- 5) Jakobsson PJ *et al.*, *Pharmacol Rev.*, 59: 207-224 (2007).
- 6) Ikeda-Matsuo Y *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 11790-11795 (2006).
- 7) Ikeda-Matsuo Y *et al.*, *Br J Pharmacol*, 159: 1174-1186 (2010).
- 8) Ikeda-Matsuo Y *et al.*, *Br J Pharmacol*, 160: 847-859 (2010).
- 9) Ikeda-Matsuo Y *et al.*, *J Neuroimmunol*, 238:34-43 (2011).
- 10) Ikeda-Matsuo Y *et al.*, *Neurobiol Dis*, 124: 81-92 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松尾由理、平野幸恵、石川弘人、内藤康仁、成宮周、高橋達雄、田辺光男
2. 発表標題 カイン酸誘発てんかんモデルマウスの痙れんと脳炎症におけるEP3受容体の役割
3. 学会等名 第51回日本神経精神薬理学会・第43回日本生物学的精神医学会合同年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 友利徳志、竹本陽祐、中村紫乃、高橋達雄、松尾由理
2. 発表標題 小児熱性けいれんモデルマウスにおけるけいれんの反復が脳炎症反応に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年回
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾由理、友利徳志、竹本陽祐、植松智、審良静男、高橋達雄
2. 発表標題 マウス幼児での反復熱性けいれん後の海馬炎症における膜結合型プロスタグランジンE合成酵素-1の役割
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾由理、山本稜真、中村柴乃、平野幸恵、石川弘人、久保祐二、成宮周、田辺光男
2. 発表標題 Involvement of prostaglandin E2 EP3 receptors in kainic acid-induced acute seizures and febrile seizures
3. 学会等名 Neuro 2019 (日本神経化学会・日本神経科学会 合同年会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上凜香、友利徳志、審良静男、植松智、高橋達雄、松尾由理
2. 発表標題 複雑型小児熱性けいれんモデルマウスにおける膜結合型プロスタグランジンE2合成酵素-1の誘導と炎症促進
3. 学会等名 日本薬学会第143年回
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuri Ikeda-Matsuo, Naruhito Tomori, Shuh Narumiya, Tatsuo Takahashi, Mitsuo Tanabe
2. 発表標題 Involvement of prostaglandin E2 in kainic acid-induced acute seizures and febrile seizures
3. 学会等名 Sfn2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------