

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592169

研究課題名(和文) 難治性てんかんにおけるSV2Aおよびシナプス小胞放出機構障害の検討

研究課題名(英文) Investigation for abnormal distribution of SV2A and disorder of synaptic vesicle release in refractory epilepsy

研究代表者

花谷 亮典 (Hanaya, Ryosuke)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60304424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス小胞蛋白SV2Aのてんかん発現に関する役割の検討を、難治性てんかん患者の手術摘出標本を用いて行った。SV2Aは脳の広範囲で低下するのに対し、synaptotagmin-1の発現低下はてんかん焦点周囲に局限しており、不可逆的な焦点形成にはSNARE関連蛋白障害が関与していると考えられた。また、SV2Aの低下領域に一致して、脳機能不全を意味するFDG-PETの低代謝がみられた。てんかん焦点周囲に広範囲にみられる脳機能不全領域では、SV2Aを介したシナプス小胞放出機構が障害されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We immunohistochemically evaluated the role of synaptic vesicle protein, SV2A about the expression of epilepsy using specimens of surgically treated-patients. SV2A decreased in the wide area of the brain, and the decrease of synaptotagmin-1 localized around epilepsy focus, whereas SNARE-related protein disorder would participate in the formation of epileptogenicity. Hypometabolism of FDG-PET, which indicated brain dysfunction overlapped in the decrease of SV2A. SV2A mediated synaptic vesicle-releasing mechanism would be disturbed in dysfunctional brain around epileptogenic area, it was suggested that.

研究分野：脳神経外科学、てんかん学、神経薬理学

キーワード：てんかん原性 シナプス小胞蛋白 SVA2 Synaptotagmin-1 FDG-PET

1. 研究開始当初の背景

SV2A は神経前終末に存在し、脳の広範な部分に発現する。また、synaptotagmin-1 との結合部位を有し、VAMP2/synaptobrevin、SNAP25、syntaxin などと共に、SNARE complex としてシナプス小胞とシナプス前膜との結合・神経伝達物質放出に参与する。

近年、抗てんかん薬レベチラセタムがシナプス小胞蛋白 SV2A に特異的に結合する事がわかり、てんかん発現に関する SV2A の役割が注目されるようになった。SV2A knockout mice は生後すぐに致死的なけいれんを生じ、また SV2A の減少とともに GABA が減少することが報告され、てんかん発作と SV2A 発現との関連が強く示唆された。一方で、使用するモデルや標本によって、SV2A 変化の報告が異なったり、また、SV2A と GABA の変化が共役していない報告もみられるが、これは慢性に進行するてんかんとは異なる病態ともいえる。

我々はこれまでに、遺伝性てんかんモデルを用いた研究を行い、全身けいれんを繰り返す脳において、SV2A の発現が広範に減少しており、さらに、てんかん原性領域においてのみ SNARE 関連蛋白の発現が低下していることを報告した。また、ヒトの難治性てんかんにおいても、てんかん原性領域を超えた irritative zone では可逆的に減少しているのではないかと推定しうる結果を得ている。さらに、レベチラセタムの作用を検討する中で、SV2A は GABA 系の機能を促進する印象を得てきた。そこで、これまでに我々が得た動物実験での知見をもとに、詳細な術前評価の後に施行したヒト難治性てんかん切除標本を用いて、SV2A、SNARE 関連蛋白、グルタミン酸/GABA 受容体の発現を同時に検討することにより、SV2A の役割・作用を明らかにすることを計画した。

また、我々は SPECT/PET でてんかん原性領域を越えて生じる脳循環代謝や GABA 受容体分布低下が生じている部分において、SV2A の発現低下がみられることを報告してきた。FDG-PET では IMP-SPECT よりも、しばしば広範囲で所見が得られ、FDG-PET 特徴としてとらえられている。こうした、FDG-PET でのみ所見が得られる部位でも SV2A が低下することを確認しており、動物実験と同様に、過敏性を示す領域(irritative zone)で SV2A は広く低下し、FDG-PET の所見がこの変化を鋭敏に検出していることが示唆される。

2. 研究の目的

てんかん発現に際して生じる GABA・グルタミン酸の不均衡に関連して、シナプス前終末において SV2A・SNARE 関連蛋白を中心

としたシナプス小胞への放出機構に障害が生じていることが予想される。そこで、てんかん原性領域における SV2A、SNARE 関連蛋白、グルタミン酸・GABA 受容体の変化を明らかにし、SV2A の機能解明とてんかん発現における役割の解明を行った。

3. 研究の方法

(1)【研究計画】

難治性てんかん患者のてんかん原性領域において生じる SV2A 変化の意味を、他の神経伝達物質放出機構の変化との対比の中で明らかにする。さらに、臨床的検査である PET を用いた脳循環代謝との関連を検討した。

(2)【方法】

発作型の同定と組織採取

Luder s はてんかん発現に際する脳内の伝播過程を、てんかん発作が起始する epileptogenic zone、発作症状の出現する symptomatogenic zone、過敏性を有する irritative zone などとして提唱しており、我々もこれに従って発作の伝播を評価した。研究は鹿児島大学倫理委員会、藤元総合病院倫理委員会にて承認された方法による説明と同意に基づき、手術摘出組織に関する文書による承諾を得て行った。

免疫組織学的検討

難治性てんかん患者の手術摘出標本を用いたパラフィン包埋切片として作成した。SV2A、SNARE 関連蛋白(synaptotagmin-1、SNAP25、VAMP2/synaptobrevin、syntaxin)の組織染色を行い、蛋白発現は光学密度に置き換えて算定した。SV2A 発現と SNARE 関連蛋白・各受容体発現のパターンの相違を検討した。術中脳波、あるいは頭蓋内電極における皮質脳波の所見をもとに、手術で定型的に切除される、皮質にてんかん原性がない領域(側頭葉てんかんの外側皮質)で、脳波上で過敏性の高い部位と低い部位、切除領域にてんかん焦点が含まれる新皮質てんかんの焦点、およびその周囲、とに分けて比較を行った。

SV2A/SNARE 関連蛋白と FDG-PET との関連摘出組織の検討結果と脳機能不全を意味する FDG-PET で糖代謝が低下している部位との関連を検討した。

4. 研究成果

H-E 染色により、各摘出組織における大脳皮質の構造を確認した。免疫組織学的検討に影響を及ぼすような、形成異常などの形態異常は見られなかった。

蛋白発現は解析ソフト(Image J, NIH)により、光学密度に置き換えて算定した。皮質

脳波の所見をもとに、新皮質てんかんにおける焦点近傍領域（NCE-F）と切除範囲に含まれる中で過敏性が低い部位（NCE-LI）、内側側頭葉てんかんの手術に際して切除が行われた側頭葉外側皮質のうち、最も過敏性の高い部位（TLE-LI）と最も過敏性の低い部位（TLE-LI）の4か所における蛋白発現の差を検討した。

SV2Aの発現は、TLE-LI、TLE-LI、NCE-LI、NCE-Fの順に低下した。SNARE関連蛋白では、NCE-Fでsynaptotagmin-1の優位な低下がみられた。その他のSNARE蛋白の低下は見られなかった。こうした結果は、これまで我々が以前に報告した、自然発症てんかんラットでみられたものと同様の变化であった。SV2Aは広範囲に低下するのに対し、synaptotagmin-1の発現低下はてんかん焦点周囲に限局しており、不可逆的な焦点形成にはSNARE関連蛋白障害が関与していると考えられた。

また、SV2Aの低下領域に一致して、脳機能不全を意味するFDG-PETの低代謝がみられ、てんかん焦点周囲に広範にみられる脳機能不全領域では、SV2Aを介したシナプス小胞放出機構が障害されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Yan HD, Ishihara K, Seki T, Hanaya R, Kurisu K, Arita K, Serikawa T, Sasa M: Inhibitory effects of levetiracetam on the high-voltage-activated L-type Ca²⁺ channels in hippocampal CA3 neurons of spontaneously epileptic rat (SER). Brain Res Bull 90, 142-146, 2013, 査読有
- 2) Hanaya R, Hosoyama H, Sugata S, Tokudome M, Hirano H, Tokimura H, Kurisu K, Serikawa T, Sasa M, Arita K: Low distribution of synaptic vesicle protein 2A and synaptotagmin-1 in the cerebral cortex and hippocampus of spontaneously epileptic rats exhibiting both tonic convulsion and absence seizure. Neuroscience 221, 12-20, 2012, 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 花谷亮典, 大坪俊昭, 檜田祐美, 細山浩史, 菅田真生, 丸山慎介, 飯田幸治, 中村克己, 藤元登四郎, 有田和徳: 多発脳病変における11C-Methionine PETを用いたてんかん原性領域の同定, 2015/1/15, 第38回日本てんかん学会, 都市センター

ホテル, 東京

- 2) Sugata S, Hanaya R, Serikawa T, Arita K, Sasa M: Neuroprotective effect of levetiracetam on hippocampal sclerosis-like change of spontaneously epileptic rat, 2013/6/25, International Epilepsy Congress, Montreal (Canada)
- 3) Hanaya R, Otsubo T, Kashida Y, Hosoyama H, Sugata S, Nakamura K, Fujimoto T, Iida K, Arita K: The role of 11C-Methionine positron emission tomography in evaluation for epileptogenic region, The role of 11C-Methionine positron emission tomography in evaluation for epileptogenic region, 2013/6/25, International Epilepsy Congress, Montreal (Canada)
- 4) てんかん原性領域を超えるFDG-PET低集積部位の評価, 花谷亮典, 大坪俊昭, 細山浩史, 菅田真生, 新里能成, 湯之上俊二, 中村克己, 飯田幸治, 藤元登四郎, 有田和徳, 2012/10/18, 第71回日本脳神経外科学会, 大阪国際会議場, 大阪市
- 5) 花谷亮典, 細山浩史, 菅田真生, 大坪俊昭, 藤元登四郎, 飯田幸治, 有田和徳: 難治性新皮質てんかんにおける発作間歇期FDG-PET集積低下とSV2A発現低下との関連性, 2012/10/11, 第46回日本てんかん学会, 都市センターホテル・JA 共済ビルカンファレンスホール, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ns/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花谷 亮典 (Hanaya Ryosuke)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 60304424

(2) 研究分担者

湯之上 俊二 (Yunoue Syunji)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・研究員

研究者番号: 20404478

菅田 真生 (Sugata Sei)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・研究員

研究者番号: 70437961

有田 和徳 (Arita Kazunori)

鹿児島大学・医歯（薬）学総合研究科・教授
研究者番号：90212646