

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461553

研究課題名(和文) 熱性痙攣と内側側頭葉てんかんの神経免疫学的機序の解明と新たな分子標的療法の開発

研究課題名(英文) High mobility group box 1 enhanced febrile seizures and acquired epilepsy in a rodent model of infantile febrile seizures

研究代表者

福田 光成 (Fukuda, Mitumasa)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80274330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：主要な炎症性メディエーターであるHigh-mobility group box-1 (HMGB1)が、小児期の代表的痙攣性疾患の発症に関与するかを検討した。HMGB-1は熱性痙攣モデルである温熱誘発痙攣を促進させ、更には温熱誘発痙攣重積モデルでの成熟期てんかん発症を促進させた。また病理学的検討では温熱誘発痙攣重積後にてんかんを発症したラットで、海馬と脳梁部に病的なアストログリアの増盛が認められた。よって小児でのHMGB-1の過剰産生要因は、熱性痙攣発現を促進させ、かつ熱性痙攣重積後の続発性てんかんの発症にも関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of HMGB1 in febrile seizures (FS) and secondary acquired epilepsy associated with febrile status epilepticus using hyperthermia-induced seizures (HS) in immature rats, a model of human FS. HMGB1 enhanced HS, but did not induce any hippocampal damage. HMGB1 also enhanced acquired epilepsy after febrile status epilepticus using hyperthermia-induced seizures (HS), and histological analysis showed that astrocytes were significantly increased in the hippocampus and the corpus callosum in rats having acquired epilepsy. Our results indicate that infantile prolonged febrile seizures with HMGB1 overproduction could enhance adulthood epileptogenesis and might contribute to the development of mesial temporal lobe epilepsy. Further, astrogliosis also should play an important role in acquired epileptogenesis.

研究分野：小児科学、小児神経学、てんかん学

キーワード：熱性痙攣 側頭葉てんかん HMGB - 1 分子標的 ラット 海馬 脳波 アストログリア

1. 研究開始当初の背景

脳の炎症は痙攣性疾患の重要な因子の1つだが、特定の炎症性メディエーターが痙攣性疾患の病態に与える影響については完全には解明されていない。現在 IL-1 等の炎症性サイトカインは痙攣性疾患の病態にかかわるとの知見が報告されているが、発作や外傷時等に神経細胞やグリアから遊離される代表的ヌクレオカイン High-mobility group box-1 (HMGB1)に関する報告は未だ少ない。

HMGB1はIL-1と同様に主要な炎症性メディエーターのひとつである。HMGB1は非ヒストン核蛋白の主要成分で、神経細胞が侵襲を受けると細胞外に分泌され、自然免疫における重要な受容体 Toll-like receptor 4 (TLR4)等に結合し神経細胞やグリアの機能に影響を及ぼす。近年、動物モデルを用いた研究で HMGB1-TLR4 経路は“痙攣原性”を増悪させることが指摘され、またヒト脳のてんかん発症部位でも HMGB1 と TLR4 の発現は増加しており、てんかんの病態に関与している可能性が指摘された。しかし、小児の代表的痙攣性疾患である熱性痙攣や、熱性痙攣重積後の成人期発症が疑われる難治性の内側側頭葉てんかん発症への HMGB1-TLR4 経路の関与についての報告はない。

2. 研究の目的

そこで熱性痙攣と熱性痙攣重積後の内側側頭葉てんかん動物モデル、更には熱性痙攣患児の遺伝子を用いて以下の点を解明した。(1) HMGB1 は動物モデルの熱性痙攣や内側側頭葉てんかんの発症を促進させるか？(2) HMGB1拮抗薬やTLR4拮抗薬はこれらを抑制するか？(3)熱性痙攣や内側側頭葉てんかんの患児には HMGB1 過剰産生や TLR4 機能亢進素因が存在するか？

3. 研究の方法

研究1：熱性痙攣の動物モデルを用いた「HMGB1が熱性痙攣発症に与える影響」の検討

日齢10-15のLewis雄性ラットを用いた「幼弱ラット温熱誘発痙攣モデル」を用いて研究を行った。麻酔鎮静下に頭部を定位脳固定装置に装着し、右側海馬と後頭葉硬膜上に脳波電極を装着する。温熱負荷を行うことにより、体温が 40.9 ± 0.4 でラットは痙攣発作を起こし海馬から発作波が記録される。このモデルを用いて痙攣誘発1時間前に human-HMGB1 を投与して痙攣を誘発し、HMGB1投与による痙攣閾値と持続時間の変化を評価した。HMGB1の投与量は数段階に調節し、実際の脳内移行濃度はELISAを用いて確認した。

研究2：熱性痙攣重積モデルを用いた「HMGB1が成熟期の内側側頭葉てんかん発症に与える影響」の検討

「幼弱ラット温熱誘発痙攣重積モデル」を用いて研究を行った。日齢10-15の幼弱ラットを40.5-41.5に設定した温熱負荷装置内に30分間留置し、断続的かつ継続的な温熱誘発痙攣重積を発生させた。このモデルを用いて、痙攣重積負荷直後にHMGB1を点鼻投与して成熟期の内側側頭葉てんかんの発症を評価した。HMGB1投与量は前述の実験結果を参考に数段階に調節する。

内側側頭葉てんかんの発症に関しては、日齢90と120に全身麻酔下に右側海馬と後頭葉に脳波電極を挿入し、夜間一定時間の持続的ビデオ脳波同時記録を行い自然発症発作の有無を確認することにより行った。これに先んじて、日齢85で水迷路試験やロータローッド試験による知能・運動機能評価を行った。海馬の病理学的評価に関しては、前述の全ての検査終了後に全身麻酔下に脳を取り出し、海馬細胞障害やグリオーシスについての評価を行った。

研究3：ヒト熱性痙攣患者でのHMGB1の遺伝子解析

HMGB1遺伝子領域のtag SNPであるrs3742305について、Applied Biosystems社のTaqMan SNP Genotyping Assay (C_25759077_10)を用いて、熱性けいれん群248例(単純型185例、複雑型63例、対照群225例)についてgenotypingを行った。

4. 研究成果

結果1：HMGB-1は温熱誘発痙攣の発現を促進させた

「幼弱ラット温熱誘発痙攣モデル」を用いた検討で、痙攣誘発1時間前にヒトHMGB1を点鼻投与して痙攣を誘発したところ、HMGB-1(100 μ g)投与群で痙攣閾値が低下したが($p=0.048$)、痙攣持続時間には有意な変化認められなかった。よってHMGB-1は幼弱脳の痙攣準備性を亢進させることが明らかとなった。またHMGB-1投与による海馬の組織障害を検討するために、HMGB-1投与群と対照群で海馬細胞数、GFAP染色によるアストログリオーシス、Iba1染色によるオリゴデンドロサイトーシスの評価を行ったが、明らかな細胞障害やグリオーシスは認められなかった。

結果2：HMGB1は成熟期の内側側頭葉てんかん発症を促進させた

「幼弱ラット温熱誘発痙攣重積モデル」を用いた検討で、痙攣重積負荷直後にHMGB1を点鼻投与する群(HMGB1群)と生理食塩水を投与する群(対照群)に分け成熟期の後天性てんかん発症について検討した。てんかん発

症ラットでは海馬から先進して皮質に広がる1分程度の部分発作が記録された。対照群では殆ど後天性てんかんが発症しないのに対して、HMGB1群では有意に後天性てんかん発症率が高かった($p=0.027$)。発作頻度や発作持続時間には有意差を認めなかった。一方、この2群間ではローターロッド試験やパッシブアポイダンス試験の結果に有意差は認められなかった。

このHMGB1群を更に2群に分けて、てんかん発症群と非てんかん発症群とした。2群間で脳の病理学的検討を行ったところ、CA1、CA3領域および脳梁で有意なアストロサイトの増加が認められた(CA1, $p=0.026$; CA3, $p=0.019$; 脳梁, $p=0.026$)。これに対して、同部位での神経細胞やマイクログリアについての病理変化については2群間での差は認められなかった。

結果3：ヒト熱性痙攣患者でのHMGB-1遺伝子異常の有無

HMGB1遺伝子領域のtag SNPであるrs3742305について、Applied Biosystems社のTaqMan SNP Genotyping Assay (C_25759077_10)を用いて、熱性けいれん群248例(単純型185例、複雑型63例、対照群225例)についてgenotypingを行った。遺伝子型頻度についてカイ二乗検定を行ったが有意差を認めなかった。

考察・結論

3年間の動物実験を用いた検討では、HMGB-1は熱性痙攣モデルである温熱誘発痙攣を促進させ、更にHMGB-1は温熱誘発痙攣重積モデルでの成熟期てんかん発症を促進させることが明らかとなった。また病理学的検討では温熱誘発痙攣重積後にてんかんを発症したラットで、海馬と脳梁部に有意なアストログリオーシスが認められ、単なる温熱誘発痙攣では明らかな病理変化は認められなかった。よって小児でのHMGB-1の過剰産生素因は、熱性痙攣発現を促進させ、かつ熱性痙攣重積後の続発性てんかんの発症にも関与する可能性が示唆された。また続発性てんかん発症の病態として異常なアストログリオーシスの関与が推定された。今回の研究では、有意なアストロサイトの増盛が続発性てんかんの原因なのか結果なのかについては明らかな結論は得られず、今後の検討課題となった。

また熱性痙攣患者の遺伝子検査では、HMGB-1遺伝子多型と熱性痙攣発症との遺伝的関連性が認められなかった。HMGB-1は熱性痙攣感受性よりもその後のてんかんへの進展(epileptogenesis)に関連のある経路の可能性があり、今後の検討課題となった。

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)

Fukuda M, Ito M, Yano Y, Takahashi H, Motoie R, Tano A, Suzuki Y, Ishii E. Postnatal IL-1 administration after experimental prolonged febrile seizures enhances epileptogenesis in adulthood. *Metabolic Brain Disease* 2015; 30: 813-819. 査読有, DOI: 10.1007/s11011-014-9648-7

Fukuda M, Hino H, Suzuki Y, Takahashi H, Morimoto T, Ishii E. Postnatal IL-1 enhances adulthood seizure susceptibility and neuronal cell death after prolonged experimental febrile seizures in infantile rats. *Acta Neurol Belg* 2014; 114: 179-185. 査読有, DOI: 10.1007/s13760-013-0246-y

[学会発表](計5件)

Ito M, Fukuda M, Yano H, Yano Y, Tanaka J, Suzuki Y, Ishii E. HMGB-1 after infantile experimental prolonged febrile seizure enhances acquired epileptogenesis in adulthood, 第49回日本てんかん学会学術集会、2015年10月30-31日、長崎県長崎市、長崎ブリックホール他

Fukuda M, Ito M, Yano Y, Sakuma H, Hayashi M. Toll-like receptor 3 activation enhances hyperthermia-induced seizures in immature rats. 第57回日本小児神経科学学会学術集会、2015年5月28-30日、大阪府大阪市、帝国ホテル大阪

Fukuda M, Ito M, Yano Y, Takahashi H, Suzuki Y, Morimoto T, Ishii E. Postnatal IL-1 after experimental prolonged febrile seizures enhances epileptogenesis in adulthood, 2014年8月7-10日, Singapore.

Ito M, Fukuda M, Suzuki Y. HMGB-1 enhances hyperthermia-induced seizures in developing rats. 第56回小児神経学会学術集会、2014年5月29-31日、静岡県浜松市、アクトシティー浜松他

Ito M, Fukuda M, Yano Y, Talahashi H, Suzuki Y, Morimoto T, Ishii E. HMGB-1 enhances hyperthermia-induced seizures in developing rats, 2014年2月21日、東京都世田谷区、公益財団法人 東京都医学総合研究所

〔図書〕(計4件)

福田光成. テオフィリン中毒、小児疾患診療のための病態生理 2 改訂第 5 版 2015:954-958. 5 頁.

福田光成. 熱性けいれん、日本臨牀 別冊「神経症候群 VI - その他の神経疾患を含めて - (第 2 版)」2015:261-265. 5 頁.

日野ひとみ、福田光成. 熱性けいれん、特集「保護者への説明マニュアル」小児科診療 2014;77:1597-1603. 7 頁.

福田光成. 発熱とけいれんのメカニズム、愛媛医学 2014;33:1-6.6 頁.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/pediatrics/group-shinkei.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 光成 (Fukuda, Mitsumasa)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80274330

(2)研究分担者

鈴木 由香 (Suzuki, Yuka)
愛媛大学・大学院医学系研究科
・寄附講座准教授

研究者番号：00304634
削除：平成 26 年 4 月 14 日

田中 潤也 (Tanaka, Junya)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70217040

(3)連携研究者

石崎 義人 (Ishizaki, Yoshito)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20572944