

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 2 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460139

研究課題名(和文)漢方薬の脳浮腫抑制作用に着目した新しいてんかん治療の基礎研究

研究課題名(英文)A new strategy for epilepsy therapy and Kampo: Focusing on preventing brain edema in basic research

研究代表者

伊藤 康一 (Itoh, Kouichi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：30291149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：症候性てんかんの治療戦略上、脳浮腫発症制御は重要であるため、五苓散による予防的治療の可能性を検討した。重積発作(SE)側頭葉てんかんモデルマウスの海馬、扁桃体で、SE後初期の一過性BBB透過性亢進が血管原性脳浮腫を誘導したことを明らかにした。これらの指標に対して、五苓散はSE後、1日3回(300 mg/kg)経口投与に2日後に有意な抑制効果が認められた。さらにSE2日後、有意に増加したアクアポリン4、炎症性サイトカイン発現量は、五苓散投与で有意に抑制された。また、SRS出現はSE10日後でも観察されなかった。本研究において、五苓散のSE後脳浮腫に対する臨床適用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we determined that treatment with Kampo Gorei-san (GRS) after status epilepticus (SE) termination by diazepam might prevent the neurotoxicity induced by brain edema events via blood-brain barrier (BBB), and the possible molecular and cellular mechanisms of GRS treatment. To assess the effect of GRS against the brain alterations after SE, we focused on BBB dysfunction associated with angiogenesis and brain inflammation. The consecutive treatment of GRS inhibited the temporarily increased BBB leakage in the hippocampus two days after SE. These findings suggested that these brain alterations by SE-induced BBB failure were prevented by GRS treatment. Furthermore, in the acute phase of the latent period, these upregulations of pro-inflammatory-related molecules were inhibited by GRS treatment. These findings suggest that GRS is likely involved in neuroprotection via anti-inflammatory activities against BBB dysfunction in the acute phase of epileptogenesis after SE.

研究分野：薬物治療学

キーワード：漢方薬 てんかん 脳浮腫 BBB 脳内炎症 予防

1. 研究開始当初の背景

漢方の中で水毒症状の治療目的で臨床使用されている方剤が多くある。最近、五苓散などは、脳外科領域において脳浮腫の治療に対して有効であることから大変注目されている。てんかん分類で症候性てんかんは、脳卒中後遺症をはじめとする脳の器質性病変を原因とし、その病変に関与する脳浮腫は、生命予後を左右する重大な病態である。脳浮腫の抑制は、症候性てんかんの治療戦略上重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、症候性てんかんは原因脳疾患による「脳浮腫」で発症するものと捉え、症候性てんかんの新しい治療戦略として脳の器質性病変に伴う脳浮腫に対し、利尿作用を有する漢方方剤による予防的治療法の可能性を追求することを目的とした。五苓散は漢方の古典といわれる中国の医書「傷寒論」「金匱要略」の太陽病中編に収載されている薬方である。近年、五苓散は、様々な臨床応用が試みられており、その有効性が報告されている。特に脳神経外科領域では慢性硬膜下血腫時の治療である穿頭血腫除去術後の再発予防効果、脳浮腫抑制効果を目的として使用されており、この五苓散による利尿効果が注目されている。五苓散の成分は猪苓、茯苓、蒼朮(または白朮)、沢瀉、桂皮であり、そのうち蒼朮、猪苓には脳内の AQP(アクアポリン)阻害による細胞膜水透過性の抑制作用がある。AQP4 は、脳浮腫、視神経脊髄炎、などとの関連が知られている。更に多く発現している部位にも特徴があり、たとえば血液脳関門を形成している脳の毛細血管に近接するアストロサイトのエンドフィートや、浸透圧の調節で重要な視床下部ではグリア細胞が層状に重なったラメラ状構造をとっている部分に多く発現していることが

知られている。このことからてんかん原性初期に発現する脳浮腫に対しても AQP4 が大きく関与していると考えられる。そこで、本研究では五苓散のてんかんの予防的治療効果を検討するために、症候性てんかんである側頭葉てんかん(TLE)のモデルとして広く使用されている PILO-SE マウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

PILO-SE マウスの作成方法: ICR 10 週齢雄性マウスに、PILO の末梢性ムスカリン効果を低減させるため、PILO 投与 30 分前にメチルスコポラミンを腹腔内投与(1 mg/kg, ip)した。けいれん発作誘発のため PILO (290 mg/kg, ip) を投与し、その後 90 分間けいれん発作の観察を行った(図 7)。表 3 のけいれん状態の分類に従い、全身けいれん発作(Stage 3 以上)が 5 回起きたマウスにジアゼパム(DZP)(5 mg/kg, ip)を投与し、PILO-SE 終息させ、てんかん原性のモデルマウスとした。

GRS 投与スケジュールと SRS の観察方法: PILO-SE1 時間後から、水(コントロール群, 0.1 mL/10g)、GRS(30、100 または 300 mg/kg、ツムラより原末を供与)の経口投与を開始し、1 日 3 回(8:00 と 13:00 と 18:00)投与を行った。SRS 出現の有無は 8:00 から 18:00 の間ビデオモニタリングにより記録、観察した。

MRI 撮像条件: MRI 装置は、永久磁石小動物用 1.5 Tesla MRI(MRmini-SA, DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan)と直径 30 mm の RF coil を使用し、重積けいれん発作終了後 2 日、7 日後にマウス脳の MRI 撮像を行った。MRI 撮像は、1.5 ~ 2.0% イソフルラン(160 ~ 180 mL/min, Escain®, MERCK, USA)麻酔下で行った。マウスの体温は、 37.5 ± 0.2 °C となるように直腸温を熱電対で測定し、循環温水フィードバック制御装置(Yamashita Tech

System, Tokushima, Japan)を用いて維持した。MRI撮像は、2次元マルチスライススピンエコー法で行った。その撮像条件は、FOV(field of view)=20×40 mm²、マトリックス(matrix) = 128×256、voxel size = 0.234 × 0.234 × 1.0 mm で T1 強調画像(T1WI)、T2 強調画像(T2WI)、拡散強調画像(DWI)を、スライス厚 1 mm の連続前額断面画像(11 枚)とした。

MRI 所見による脳浮腫の評価

脳水分含量測定法：MRI撮像後、脳を大脳皮質(CX)、海馬(HP)、側頭葉(扁桃体、梨状皮質)(TL)に分画しそれぞれ秤量瓶に入れ、各湿重量を測定(W1)した。それを 100□で 24 時間乾燥させ、再び乾燥重量を測定(W2)した。脳水分含量率は、下記の式に従って算出した。Brain water content (%) = ((W1-W2)/W1)×100

ガドリニウム(Gd)増強 MRI を用いた

BBB 脆弱性の評価法：MRI造影効果を有する常磁性体の Gd は、陽性造影剤であり T1WI で高信号となる。Gd は BBB を透過出来ないため、通常 Gd を静脈内投与しても脳血管から脳実質内へ移行しない。しかし、BBB が損傷すると脳実質内に Gd が漏出し、損傷部位周辺で T1 高信号を示す。本研究では、非イオン性 MRI 造影剤の Gd-HP-DO3A(ガドテリドール：プロハンス[®])を用いた。Gd-HP-DO3A 投与(0.2 mmol/kg)は、尾静脈より急速静注し、Gd 増強効果が最も強く認められる投与 10~30 分後に T1WI 撮像した。

Real-time PCR：PILO 投与前及び重積けいれん発作終了 2 日目のマウス脳 MRI 撮像後に脳を摘出、CX、HP、TL に分画した。各部位から RNA を抽出し、cDNA を合成した(RT)。これを鋳型として SYBR Green I 検出による realtime PCR を行い、標的遺伝子 アクアポリン 1(Aqp1)、アクアポリン 4(Aqp4)、アクアポリン 9

(Aqp9)mRNA の発現量を解析した。標的遺伝子 Aqp1、4、9 の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である gapdh の発現量に対する相対値として算出した。

4 . 研究成果

MRI 所見による脳浮腫の評価:PILO 投与前の正常なマウス(Pre)と比べ、PILO-SE モデルマウスの海馬、扁桃体/梨状皮質では、PILO-SE 2 日後で DWI 及び T2WI で高信号が認められた(図 3 左)。この結果から、てんかん原性期に脳内で浮腫の発症が示唆された。それに対し GRS 投与マウスでは、PILO-SE モデルマウスの海馬、扁桃体/梨状皮質で確認された高信号は認められず、Pre と同程度の信号強度を示した(図 1 右)。また、てんかん原性期における脳浮腫がどちらであるかを判別するため T1WI、T2W、DWI の 3 つのパラメーターで評価した。その結果、Pre と比べ、PILO-SE2 日後では T1WI、T2WI、DWI の全パラメーターで高信号を示した(図 3 左)。この結果から評価を行うと、SE2 日後で血管原性脳浮腫が発症していること示した。一方、GRS 投与マウスにおいては、正常マウスと同等な信号強度および値を示したことから、GRS の脳浮腫抑制効果が認められた(図 1 右)。

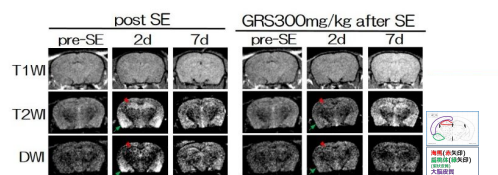


図 1 .

脳水分含量測定法：実際、脳浮腫の発症を確認するために脳水分含量測定を行った。その結果、PILO-SE 後の特に海馬、扁桃体/梨状皮質において PILO-SE 2 日後以降に顕著な脳水分含量増加が認められた(図 2)。この結果から PILO-SE 2 日後血管原性浮腫の発症を確認することができ

た。また、この脳水分含量増加に対して GRS は、特に海馬、扁桃体/梨状皮質領域において水分含量増加抑制傾向を示した(図 2)。

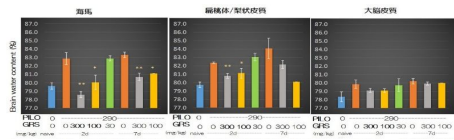


図 2 .

ガドリニウム(Gd)増強 MRI を用いた BBB 脆弱性の評価法：血管原性浮腫は BBB の損傷により発症するとされている。そのため、Gd 増強 MRI を用いた BBB 脆弱性の評価を行った。その結果、PILO-SE 2 日後の海馬、扁桃体/梨状皮質領域で Gd による T1 高信号が認められ、BBB の透過性亢進が認められた。このことから、BBB の透過性亢進によって血管性脳浮腫が誘導されていることが確認することができた。一方、GRS 投与マウスではそのような高信号は認められず、BBB 透過性亢進を抑制した(図 3)。

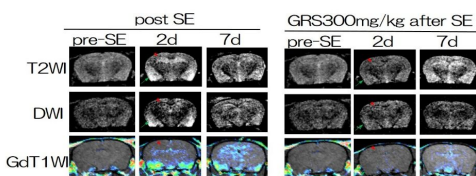


図 3 .

Real-time PCR：BBB の透過性亢進は要因の一つとして AQP4 の発現上昇が起こることによって発現するとされている。そのため、脳に存在が認められている AQP1、4、9 について海馬、扁桃体/梨状皮質領域、大脳皮質における mRNA の発現量の変化を Real-time PCR を用いて行った。その結果、PILO-SE 2 日後では AQP4 の mRNA の発現が全ての部位で有意に上昇していた。AQP1 は扁桃体/梨状皮質領域、AQP9 は海馬でのみそれぞれの mRNA の発現が有意に上昇していた。一方、GRS 投与マウスでは血管原性浮腫の発現部位であ

る海馬、扁桃体/梨状皮質領域でのみ AQP4 の mRNA の発現上昇を有意に抑制した。AQP9 は海馬でのみ AQP の mRNA の発現上昇を抑制したが、AQP1 ではどの部位でも mRNA の発現上昇抑制は認められなかった。(図 4)

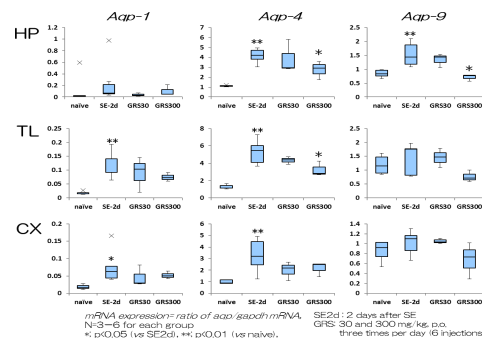


図 4 .

【考察】

脳浮腫は、初期段階で細胞障害性浮腫が発生し、それに伴って血管原性浮腫が発生する。本研究では SE2 日後において血管原性浮腫の発生が確認された。このことから SE2 日目以前において細胞障害性浮腫が発生していると考えられる。また、GRS は血管原性浮腫抑制効果があることが確認されたが、細胞障害性浮腫に対する効果は確認することができなかった。しかし、細胞障害性浮腫の発生要因として五苓散の標的作用部位であるアクアポリン 4(AQP)の促進があるため、細胞障害性浮腫抑制効果があると考えられる。

本研究では、PILO-SE 後に海馬、扁桃体/梨状皮質領域で血管原性浮腫が発生していることが MRI 所見、脳水分含量変化から確認された。これらの領域は側頭葉てんかんの発症部位であり、このことから PILO-SE 後の血管原性浮腫は続発性てんかんの発症に関与していることが示唆された。血管原性浮腫は BBB の透過性亢進・破綻やアクアポリン 4 の促進が原因となって発症すると考えられている。GRS 投与群において PILO-SE2 日後では

BBB の透過性亢進を抑制し、Gd の脳実質内への流入を抑制していた。つまり、GRS は BBB に対して保護的に作用することで血管原性浮腫を抑制していると考えられる。また、AQP4 に関しては PILO-SE2 日後において mRNA の発現上昇が血管原性浮腫の発現部位である海馬、扁桃体/梨状皮質領域で発生していることが確認された。AQP の発現上昇は BBB の透過性亢進の一因でもあるため、このことにより AQP の発現上昇が血管原性浮腫を誘導していることが示唆された。そして GRS 投与群においてその発現上昇を抑制していたことから GRS は AQP4 に作用することによって血管原性浮腫を抑制することが示唆された。しかし、GRS が AQP4 をどのようにして阻害し、血管原性浮腫を抑制しているかは現段階では不明である。

また、GRS の投与量、投与回数等を変化させることによる脳浮腫発現時間への影響については今回検討には至らなかったが、今回の結果より、脳浮腫の発現を用量依存的に抑制していることから、脳浮腫発現時間が短縮している可能性も否定できないと考えられる。最後に、GRS 投与により自発性てんかん発作 (SRS)、つまり重積発作後てんかん発症を予防できるのかという疑問が残る。そのためには GRS の長期投与、また SRS の有無を評価するために長時間ビデオ脳波実験が必要不可欠であるため、今後実施できるようにしたい。

【総括】

1. 脳浮腫 : GRS は、PILO-SE 後に発生する脳浮腫を抑制した。
2. BBB の透過性 : GRS は、PILO-SE 後に確認された BBB 透過性亢進を抑制した。
3. アクアポリン 4 の発現 : GRS はこの

アクアポリン 4 mRNA 発現量増加を抑制した。以上より、GRS は BBB 保護作用により SE により誘発された血管原性浮腫が抑制されることが示唆された。このことは、てんかん原性初期からの GRS 適用により症候性てんかん(側頭葉てんかん)の予防的薬物治療効果が期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤康一 (Itoh, Kouichi)
徳島文理大学 薬学部 教授
研究者番号 : 30291149

(2)研究分担者

石原康宏 (Ishihara, Yasuhiro)
広島大学総合科学研究科 助教
研究者番号 : 80435073

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()