

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462210

研究課題名(和文) Noda epileptic ratを用いた迷走神経刺激療法作用機序解明

研究課題名(英文) Research for the mechanism of vagus nerve stimulation therapy using Noda epileptic rat

研究代表者

飯田 幸治 (Koji, Iida)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：20304412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は遺伝性てんかんモデルラットであるNERに対して迷走神経刺激(VNS)を行なった。2時間の急性刺激では全般性強直間代発作に対する発作抑制効果が、4週間の慢性刺激では欠神様発作の発作抑制及び発作持続時間短縮効果が確認された。それぞれ刺激後の脳に対してc-Fos、delta-FosBを用いた蛍光免疫染色を行い、VNSによる神経活動変化について検討した。VNS群では視床を含む、上行性網様体賦活系に属する核の神経活動が亢進していた。急性刺激では青斑核が、慢性刺激では背外側被蓋核が特に活性化しており、VNSの時間依存性の抗てんかん作用の増強がこれらの核の違いにより生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed vagus nerve stimulation to genetic epileptic model rat 'NER'. Acute stimulation of 2 hours showed anti-epileptic effect to generalized tonic-clonic seizure. Chronic stimulation of 4 weeks showed anti-epileptic effect to the absence like seizure and reduced duration of the absence seizures. We also studied neuronal activity changes among the rat brains after acute and chronic stimulation using immunofluorescence staining of c-Fos and delta-FosB. In the VNS group, we observed hyper neuronal activations in the nuclei corresponding with ascending reticular activating system. Furthermore, there were specific hyper neuronal activation in the locus caeruleus after acute stimulation and in the laterodorsal tegmental nucleus after chronic stimulation. Time dependent anti-epileptic effect of VNS may be derived from the difference of these activated sites.

研究分野：Neurosurgery

キーワード：Vagus nerve stimulation Epilepsy Noda Epileptic Rat

1. 研究開始当初の背景

迷走神経刺激法 (vagus nerve stimulation: VNS) は薬剤抵抗性てんかんに対する緩和的外科治療として広く行われている。その作用機序は未解明な点が多く残されているが、視床-皮質間の神経調節の関与が疑われている。てんかん発作は傾眠状態で起こりやすく覚醒により発作が起こりにくくなることが知られている。脳波上、覚醒時には大脳での電気活動は脱同期に、睡眠時には同期的となる。また、てんかん発作時には大脳皮質で同期化が起こる。これら大脳皮質での同期・脱同期は視床により調整されている。

本研究では c-Fos、FosB を用いて短期と長期に神経活動が亢進している神経核を免疫組織化学的に同定し、迷走神経刺激術による作用点を見つけ出すことを目標にする。上述の様に VNS の作用機序には視床を含む、覚醒睡眠サイクルに関わる伝導路 (上行性網様体賦活系) の関与の可能性が考えられ、この伝導路に含まれる核を対象に免疫染色を行う。

Fos は遺伝子転写因子で神経活動亢進の解剖学的かつ機能的マーカーとして広く使用されている。c-fos は刺激から数分後には誘導され、c-fos 蛋白は 1-3 時間で発現のピークを迎え、4-6 時間後には次第に消失するため、急性の神経活動を示唆する一方、fos-B は 6 時間で発現のピークを迎え、その後何週間が残るため、慢性の神経活動を示唆する。VNS には時間依存性にその発作抑制効果が増強し、プラトーに達する特徴があり、短期・長期による神経活動の亢進状態の違いについても検討を行う。

NER (Noda epileptic rat) は自発的な強直間代発作を示すてんかんモデルラットである。VNS 作用機序解明に用いられたてんかんモデルはこれまでに電気刺激やカイニン酸などの薬物投与により作製されてきたが、よりヒトの病態に近いと思われる遺伝性モデルに対する迷走神経刺激実験はこれまでに 1 例しか報告がない(1)。遺伝子モデルのてんかん原性は後天的な要因によるものでなく作用機序解明にはより理想的な対象動物であると考えられる。今回の実験では NER に急性・慢性の迷走神経刺激をまず行ない、NER の発作に対する抗てんかん作用も併せて検討を行う。

2. 研究の目的

本研究では遺伝子変異てんかんモデルである Noda epileptic rat (NER) に対し迷走神経刺激を行ない、その抗てんかん作用を検討する。また、取り出した脳からスライスを作成し、免疫組織化学的に神経活動の亢進している神経核を特定し、これら神経核に対する脳深部刺激療法の可能性を探索する。

3. 研究の方法

実験 :

対象となる NER を急性刺激群 (2 時間) 慢性刺激群 (4 週間) に分け迷走神経刺激を行う。それぞれてんかん発作の抑制効果を行動観察・脳波記録を行い検討した。

対象 : 雌雄 NER (体重 245-390g)

VNS(A)群 : n=11 コントロール(B)群 : n=11

両群とも脳波測定用の頭蓋内電極設置及び、左迷走神経への刺激電極留置を行い、A 群には刺激装置を、B 群には同形の prosthesis を背部に設置した。また、脳波測定のため、大仙門から外側 2mm、前方 2mm に皮質電極 (Cx) を、外側 3mm、後方 3mm、3mm 深部に海馬電極 (Hip) を設置した。

NER の発作には全身性強直間代発作 (GTC: generalized tonic-clonic seizure) と欠様発作 (Abs: absence like seizure) がある (NER が Abs を呈することを本研究で初めて確認した)。これらの発作頻度と Abs についてはその発作時間を刺激前後で比較した。GTC は全身性けいれんを呈し、脳波上でも律動性徐波・棘徐波が確認できたものとし、Abs は動作停止 (眼前でペンを振るなど視覚的な刺激を加えても動かない) に一致して脳波で律動性棘波・鋭波を伴うものとした。Abs の発作時間はこの発作波の持続時間とした。

急性実験 (n=22, AA 11: AB 11) :

刺激開始 1, 2 日前 (pre)、刺激開始直後 (post) に脳波測定・行動観察を 2 時間両群に行ない各発作 (GTC, Abs) 頻度、Abs では総発作持続時間を比較し急性刺激効果 (AA 群 vs AB 群) を検討した。

慢性実験 (n=10, CA 5: CB 5) :

急性実験後、さらに両群各 5 例に刺激を継続し、同様の観察を 1, 2, 3, 4 週間 (1 週間ごとに 1 日 2 時間) に行ない、慢性刺激効果 (CA 群 vs CB 群) も検討した。

JMP genomics 7 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を用いて、各観察点の GTC、Abs の発作回数と Abs ではその総発作持続時間を多変量分散分析 (MANOVA: Multivariate Analysis of Variance) を用いて比較検討した。

迷走神経刺激条件 (急性及び慢性刺激) :

one burst of 30Hz, 500 μ s pulse width, 0.5mA output current for 30s every 5min

刺激電極 : Cyberonics Rat Lead Specifications, Cyberonics, TX, USA

刺激装置 : NS-G103, Cyberonics, TX, USA

刺激プログラマー : VNS-P201, Cyberonics, TX, USA

脳波計 : BMSI 5000 (Nicolet, WI, USA)

頭蓋内電極 : ステンレス製ネジ電極 (Cx)、ス

テンレス線(Hip)

実験 :

両群の NER に対してペントバルビタール (50mg/kg) 麻酔下に灌流固定 (4%PFA) を行い脳を取り出した。取り出した脳からクリオスタットを用いて 40 μm 厚の連続した凍結切片を作成した。各 Bregma level につき 3 枚の切片を採用し、浮遊法で c-fos (SC-52; 1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (緑色蛍光), fosB(SC-48, 1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) に対する二重蛍光免疫染色を行った。c-Fos に対する二次抗体 (緑色蛍光) は Alexa Fluor 488(A-21206, 1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、ΔFosB に対する二次抗体 (赤色蛍光) は Alexa Fluor 594 (A11058, 1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。

観察を行なった脳切片の Bregma level と観察対象の神経核は以下の通りである。

Bregma -13.30mm :

孤束核 (NTS:nucleus of solitary tract) 外側網様核 (LRt:lateral reticular nucleus)

Bregma -10.04mm :

青斑核 (LC:locus caeruleus) 後背側被蓋核 (PDTg:posterodorsal tegmental nucleus)

Bregma -8.72mm :

背外側被蓋核 (LDTg:laterodorsal tegmental nucleus)

Bregma -7.80mm :

背側縫線核 (DRN:dorsal raphe nucleus)

Bregma -3.80mm :

扁桃体基底核外側部 (BLP:basolateral amygdala nucleus)

Bregma -3.14mm :

正中中心核 (CM:centeral medial nucleus) 視床背内側核 (MDM:mediodorsal thalamic nucleus)

Bregma -1.80mm :

マイネルト基底核 (B:nucleus basalis of Meynert)

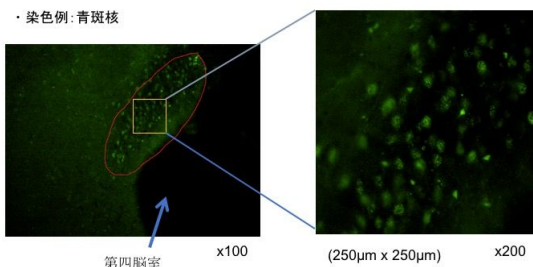
Bregma -0.40mm :

分界条床核 (BST:bed nucleus of stria terminalis)

Bregma 1.20mm :

外側中隔核 (LSV:lateral septal nu. venral part) 内側中隔核 (MS:medial septal nucleus)

各スライス 2~3 枚を蛍光顕微鏡により 200 倍で観察した。縦横 250 μm の正方形内の陽性細胞を ImageJ を用いてカウントした (下図)



各神経核の陽性細胞数を平均し、JMP genomics 7 (SAS Institute Inc, Cary NC, USA) で統計解析 (Mann-Whitney 検定) を行なった。

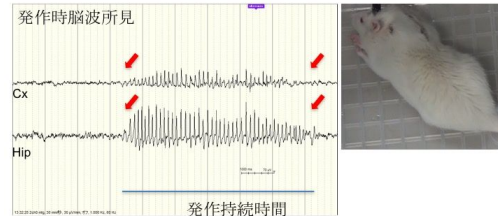
4. 研究成果

(1) 結果

実験 :

図 1

欠神様発作時の脳波所見と発作様式

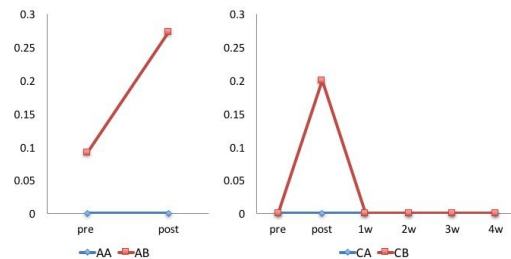


Motion arrest corresponding with repetitive spikes

従来 NER が全身性強直間代発作を起こすことは知られていたが、新たに欠神様発作を起こすことが明らかになった (図 1)。

図 2

結果 (全身性強直間代発作:発作回数)



GTC については急性刺激では VNS による発作抑制効果を認めた ($F(1,20)=0.286$, $P=0.027$) が、慢性刺激では、効果を認めなかった ($F(1,8)=0.125$, $P=0.347$) (図 2)。

図 3

結果 (欠神様発作:発作回数)

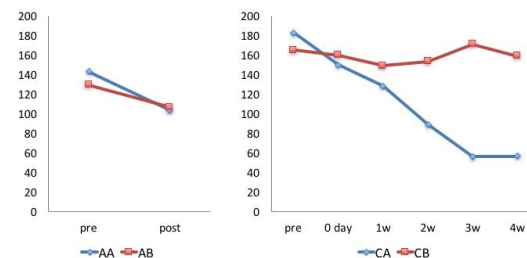
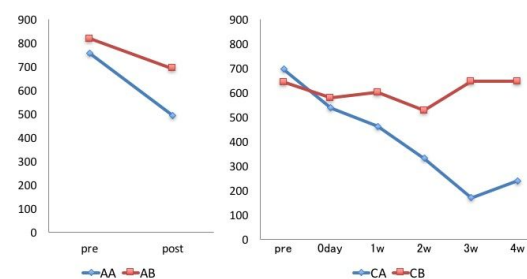


図 4

結果 (欠神様発作:総発作持続時間)



Abs に対して VNS の発作抑制効果を検討したところ、急性刺激では発作回数に有意な変化は認めなかった ($F(1,20)=0.006, P=0.741$) が、発作持続時間の短縮効果を認めた ($F(1,20)=0.228, P=0.045$)。慢性刺激では発作回数 ($F(1,8)=1.196, P=0.0148$)、発作持続時間 ($F(1,8)=1.368, P=0.011$) 共に有意に時間依存性に減少していた。

実験 表 1

Structure	Acute stimulation					
	c-Fos			Δ FosB		
	VNS positive cell n	Control positive cell n	P value	VNS positive cell n	Control positive cell n	P value
B	2.71±0.58	0.83±0.63	0.126	1.00±0.61	0.77±0.66	0.247
BLP	2.83±1.57	2.17±1.57	0.700	0.17±2.13	3.75±2.13	0.200
BST	1.81±0.67	0.50±0.58	0.400	0.25±0.23	0.29±0.20	0.857
CM	4.78±1.16	0.13±1.27	*0.009	0.78±0.31	0.27±0.34	0.329
DRN	5.25±1.40	3.15±1.53	0.537	1.42±0.43	0.17±0.47	0.126
LC	7.38±1.67	0.22±2.37	*0.024	0.56±0.18	0.00±0.25	0.167
LDTg	4.08±1.37	0.90±1.50	0.126	0.72±0.29	0.05±0.32	0.329
LRI	7.30±1.36	0.78±1.75	*0.036	5.87±1.49	0.06±1.92	0.143
LSV	3.77±1.22	0.82±1.14	0.151	1.47±0.51	0.53±0.51	0.310
MDM	2.39±0.83	0.23±0.90	0.052	0.94±0.52	0.07±0.56	0.177
MSV	3.37±0.77	1.53±0.77	0.222	0.50±0.37	0.47±0.37	0.690
NTS	5.15±1.41	0.11±1.82	*0.036	0.75±0.37	0.06±0.10	0.143
PDTg	6.31±1.73	0.36±2.45	*0.048	2.08±1.60	0.28±2.26	0.905
PnC	3.40±0.76	0.42±1.08	*0.048	2.14±0.86	0.92±1.21	0.548

All values are presented as the mean ± standard error. * Significantly different from controls, where $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test). B, nucleus basalis of Meynert; BLP, basolateral amygdala nucleus; BST, bed nucleus of stria terminalis; CM, central medial nucleus; DRN, dorsal raphe nucleus; LC, locus coeruleus; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; LRI, lateral reticular nucleus; LSV, lateral septal nucleus; MDM, medial dorsal thalamic nucleus; MSV, medial septal nucleus; n, number; NTS, nucleus of solitary tract; PDTg, postdorsal tegmental nucleus; PnC, pontine reticular nucleus caudal.

表 2

Structure	Chronic stimulation					
	c-Fos			Δ FosB		
	VNS positive cell n	Control positive cell n	P value	VNS positive cell n	Control positive cell n	P value
B	6.74±1.05	4.00±1.05	0.096	11.54±2.04	6.92±2.04	0.140
BLP	12.1±1.65	6.64±1.65	*0.043	24.31±4.37	13.22±4.37	0.103
BST	9.61±1.69	4.47±1.69	0.057	19.33±4.18	9.03±4.18	0.112
CM	8.11±1.75	4.56±1.75	0.182	23.72±4.32	6.72±4.32	*0.019
DRN	8.75±1.28	4.75±1.28	0.051	13.17±2.64	6.06±2.64	0.086
LC	7.47±0.86	4.39±0.86	*0.030	10.00±2.05	6.22±2.05	0.222
LDTg	4.69±0.49	3.11±0.49	*0.046	8.25±1.17	4.14±1.17	*0.033
LRI	5.84±1.00	3.39±1.00	*0.114	9.19±1.75	6.22±1.75	0.259
LSV	7.67±1.18	4.44±1.18	0.082	18.44±2.63	8.69±2.63	*0.025
MDM	6.95±0.90	2.56±0.90	*0.006	20.86±2.55	7.50±2.55	*0.004
MSV	5.48±1.06	4.11±1.06	0.383	16.58±1.97	6.04±1.97	*0.004
NTS	13.83±2.81	5.67±2.81	0.067	21.94±3.78	9.44±3.78	*0.042
PDTg	5.03±0.36	3.64±0.36	*0.020	7.11±0.99	4.78±0.99	0.128
PnC	3.33±0.35	2.25±0.35	0.054	5.03±0.32	3.39±0.32	*0.0045

All values are presented as the mean ± standard error. * Significantly different from controls, where $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test). B, nucleus basalis of Meynert; BLP, basolateral amygdala nucleus; BST, bed nucleus of stria terminalis; CM, central medial nucleus; DRN, dorsal raphe nucleus; LC, locus coeruleus; LDTg, laterodorsal tegmental nucleus; LRI, lateral reticular nucleus; LSV, lateral septal nucleus; MDM, medial dorsal thalamic nucleus; MSV, medial septal nucleus; n, number; NTS, nucleus of solitary tract; PDTg, postdorsal tegmental nucleus; PnC, pontine reticular nucleus caudal.

急性期に c-Fos は正中中心核 (CM)、青斑核 (LC)、外側網様核 (LRI)、後背側被蓋核 (PDTg)、孤束核 (NTS)、橋網様体核 (PnC) で、 Δ FosB では VNS (A) 群と control (B) 群で有意な差は認めなかった (表 1)。慢性期には c-Fos は扁桃体基底核外側部 (BLP)、LC、背外側被蓋核 (LDTg)、外側網様核 (LRI)、視床背内側核 (MDM)、後背側被蓋核 (PDTg) で、 Δ FosB は CM、LDTg、外側中隔核 (LSV)、MDM、内側中隔核 (MSV)、NTS、PnC で有意 ($p < 0.05$) に多く陽性細胞を認めた。

(2) 考察

我々は遺伝性てんかんモデルである NER に対して迷走神経刺激術を行なった。NER はこれまで全般性強直間代発作を生じることは知られているが、今回の実験により欠神様発作を呈することが、行動学的・脳波学的に確認された。NER に対して 2 時間の急性刺激と 4 週間の慢性刺激を行うことで、急性刺激では全般性強直間代の発作を抑制し、欠神様発作の発作持続時間の短縮効果が確認できた。

また、慢性刺激では欠神様発作の時間依存性の発作抑制効果と発作持続時間の短縮効果が確認できた。

現在までに遺伝性モデルに対する迷走神経刺激実験は 1 例のみで、Dedeurwaerder らは genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS) に対して急性刺激 (2 時間/日を 2 日間) と慢性刺激 (1 週間連日) を行なった (1)。この報告によると刺激開始一日目に棘徐波の持続時間が迷走神経刺激を行なった群で増加しており、2 日目の刺激では刺激群と非刺激群で棘徐波の持続時間に差はなかった。また、慢性刺激では棘徐波の持続時間に変化は認めなかった。

我々の実験結果からは NER の欠神様発作の発作持続時間の短縮 (急性・慢性) と発作減少効果 (慢性) を認めたが、GAERS の欠神様発作には迷走神経刺激は効果を示さなかった。GAERS が T-type Ca^{2+} チャンネルの遺伝子変異を示すのに対し、NER では扁桃核におけるアストロサイトの内向き整流性カリウムチャンネルが異常を示すことが報告 (2) されており、それぞれのモデルの遺伝的、病態の電気生理学的背景の違いで、VNS に対する反応性の違いを生じている可能性が考えられた。

次に上記、急性及び慢性刺激を行なった NER の脳に対して c-Fos、 Δ FosB の蛍光二重免疫染色を行なった。急性刺激により迷走神経の最初の中継核である孤束核と上行性網様体賦活系に含まれる、青斑核、後背側被蓋核、橋網様体核と正中中心核で c-Fos が非刺激群と比較して刺激群で有意に多く発現していた。 Δ FosB については有意な違いは認めなかった。一方、慢性刺激では急性刺激と同様に上行性網様体に含まれる核 (LC、LDTg、PDTg) と扁桃体基底核外側部、視床背内側核で c-Fos が、正中中心核、背外側被蓋核、視床背内側核、外側・内側中隔核、孤束核、橋網様体核で Δ FosB が有意に多く発現していた。

急性・慢性刺激ともに孤束核、上行性網様体賦活系に含まれる核での神経活動が亢進していた。視床背内側核及び正中中心核は髄板内核群に属し、非特殊投射系に含まれ、機能的には覚醒に関与している。前述の様に迷走神経刺激は視床による皮質の興奮性に関わっている可能性が報告されている。また、覚醒状態がてんかん発作を起こしにくい状態を作り出すことを考慮すると、迷走神経刺激が髄板内核群を含む、上行性網様体賦活系を通してその抗てんかん作用を発揮すると考えられた。

また、上行性網様体賦活系はコリン作動性ニューロンを投射する橋脚被蓋核/背外側被蓋核 (LDTg) を経由するものとノルアドレナリン、セロトニン、ドーパミンからなるモノアミン作動性ニューロンを投射する青斑核、縫線核、中脳水道周囲灰白質を経由する二つの経路が知られている (3)。今回の実験では急性刺激では急性の神経活動亢進状態を反映する c-Fos が青斑核で、慢性刺激では慢性

の神経活動亢進を反映するΔFosBが背外側被蓋核で非刺激群と比較して有意に多く発現していた。すなわち、VNSの急性の抗てんかん作用は青斑核を経由する経路が、慢性の抗てんかん作用は背外側被蓋核を経由する経路を経ていることが分かった。迷走神経刺激療法が時間依存性に抗てんかん作用を増強することは、これらの経路の違いにより生じている可能性が示唆された。

NERの全般性強直間代発作に対する発作抑制効果は今回の実験では認めなかった。一般的にNERの全般性強直間代発作は30時間に1回と頻度は少ないため、今回の観察時間は一日2時間であり、この発作が観察時に認められる可能性は低い。全般性強直間代発作に対する迷走神経刺激の効果を検討するには、長期かつ頻回の観察、あるいは聴覚刺激によるキンドリングや薬物投与により発作を生じやすい状態で実験を行う必要があると考えられた。

1. Dedeurwaerdere S, Vonck K, Hese P Van, Wadman W, Boon P. The Acute and Chronic Effect of Vagus Nerve Stimulation in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS). 2005;46:94-7.
2. Harada Y, Nagao Y, Shimizu S, Serikawa T, Terada R, Fujimoto M, et al. Expressional analysis of inwardly rectifying Kir4.1 channels in Noda epileptic rat (NER). Brain Res [Internet]. Elsevier; 2013 Jun 23 [cited 2013 Sep 19];1517:141-9.
3. Schwartz JRL, Roth T. Neurophysiology of Sleep and Wakefulness: Basic Science and Clinical Implications. Curr Neuropharmacol. 2008;6(4):367-78.

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)

[学会発表](計 5件)

Masaya Katagiri, Koji Iida, Kumatoshi Ishihara, Kana Harada, Kota Kagawa, Akira Hashizume, Ryosuke Hanaya, Kazunori Arita, Kaoru Kurisu, c-Fos immunoreactivity in the rat brain induced by vagus nerve stimulation, 11th Asian & Oceanian Epilepsy Congress 2016, 2016/5/15, HongKong (China)

片桐匡弥、石原熊寿、飯田幸治、香川幸太、橋詰顕、原田佳奈、庫本高志、栗栖薫、第40回日本てんかん外科学会、Noda epileptic rat のてんかん発作に対する迷走神経刺激による発作抑制効果、

2016/1/21、仙台

Masaya Katagiri, Koji Iida, Kumatoshi Ishihara, Kana Harada, Kota Kagawa, Akira Hashizume, Ryosuke Hanaya, Kazunori Arita, Kaoru Kurisu, Induction of c-Fos immunoreactivity by vagus nerve stimulation in the rat brain, 69th Annual meeting of American Epilepsy Society, 2015.12.4-8, Philadelphia (USA)

Masaya Katagiri, Koji Iida, Kumatoshi Ishihara, Kana Harada, Kota Kagawa, Akira Hashizume, Ryosuke Hanaya, Kazunori Arita, Kaoru Kurisu, Induction of c-Fos immunoreactivity by vagus nerve stimulation in the rat brain, 第49回日本てんかん学会学術集会 (English Presentation) , 2015.10.30, Nagasaki

片桐匡弥、石原熊寿、飯田幸治、香川幸太、橋詰顕、原田佳奈、庫本高志、栗栖薫、Noda epileptic rat (NER)のてんかん発作に対する迷走神経刺激による発作抑制効果、第74回日本脳神経外科学会学術総会、2015.10.15、札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯田 幸治 (IIDA, Koji)
広島大学病院・脳神経外科学・講師
研究者番号：20304412

(2)研究分担者

香川 幸太 (KAGAWA, Kota)
広島大学・大学病院・医科診療医
研究者番号：40726981
(平成27年度まで研究分担者)

(3)連携研究者

石原 熊寿 (ISHIHARA, Kumatoshi)
広島国際大学・薬学部・教授
研究者番号：20212912

(4)研究協力者

片桐 匡弥 (KATAGIRI, Masaya)
広島大学・大学病院・医科診療医
研究者番号：40793451