



要旨

【目的】ベンチレテトラゾール (PTZ) 単回投与により神経活動を亢進させると、脳内では神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 依存性の過剰 NO が発生する。発生した過剰な NO は、さらなる異常興奮を誘発し、結果、全般痙攣発作を惹起する。一方、大量に発生した nNOS 由来の NO は、痙攣だけでなく血液脳関門 (BBB) の可逆的な脆弱化を誘発する。BBB の機能異常は、部分てんかん発作発症や発作増悪化の一因と考えられているが、全般てんかん発作発症への関与は不明である。そこで本研究では、全般てんかん発作獲得モデルの PTZ 誘発キンドリングマウスを用い、発作発症機構における BBB 損傷の関与を明らかにすることを目的とした。

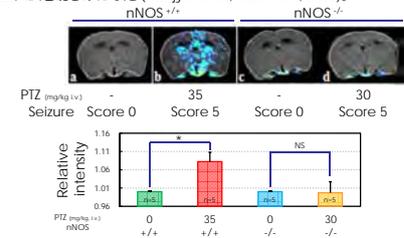
【方法】雄 ICR マウスに PTZ (40 mg/kg, ip) を 1 日 1 回反復投与し、断続的な間欠性痙攣が 5 回以上連続した時点でキンドリング獲得とした。BBB の損傷は、BBB 不透透性造影剤 Gd-HP-DO3A (ガドテリドール; プロハンス) を用い Gd 増強磁気共鳴画像 (GdEMRI) 法にて、非侵襲的かつ経時的に評価した。また、BBB 関連タンパク質や脳内炎症関連遺伝子の発現レベルを解析した。脳内に発生する NO は、スピントラップ剤を利用した *ex vivo* X-band EPR 測定法を用いて直接測定した。

【結果及び考察】キンドリング獲得後のマウスでは、痙攣が誘発されていないにも関わらず Gd-HP-DO3A の脳実質内へ漏出しが認められ、不可逆的な BBB 損傷が示唆された。一方、脳内において恒常的に発生する NO 量は正常動物と有意な差は認められず、BBB の損傷は NO 非依存性であることが示唆された。また、不可逆的な BBB 損傷がキンドリング獲得過程の早期から認められ、BBB 損傷が発作増悪化の指標になる可能性が示唆された。

背景と目的

てんかん発作の病態獲得には、血液脳関門 (BBB) の機能異常の関与が報告されている。部分発作では、神経細胞死に伴う炎症が、血管新生を伴う BBB の脆弱化を誘発し、それが食のスパイラルとなって BBB disruption (BBBD) が惹起される。それゆえ、BBBD が部分てんかん発作発症や発作増悪化の一因と考えられている。一方、全般発作では、BBBD が生じることは報告されているが、痙攣発作や全般発作発症における BBBD の関連性はいまだ不明である。

我々はこれまでに、全般痙攣発作モデルであるベンチレテトラゾール (PTZ) 単回投与マウスを用い、痙攣時に脳内に発生する多量な一酸化窒素 (NO) が、可逆的な BBB の機能異常を惹起することを示し、全般発作時に生じる BBB 脆弱化のメカニズムを明らかにした (Danjoui et al., Brain Res., 2013)。



しかし、全般てんかんの痙攣原生における BBBD の関与は未だ不明である。そこで、本研究では、PTZ 誘発キンドリングモデルを用い、痙攣発作獲得機構における BBBD の関与を明らかにすることを目的とした。

方法

PTZ 誘発キンドリングモデルマウスの作成
8-9 週齢の雄 ICR マウスに PTZ (40 mg/kg in saline) を 1 日 1 回腹腔内投与した。PTZ 投与後 30 分間の行動変化を観察し、痙攣行動を 0-5 段階に分類し、次に示す様にスコア化した。スコア 0: 正常; 1: 不動・スニッフィング; 2: 顔・前肢の間欠性痙攣; 3: ミオクローヌス痙攣; 4: ストラップ拳反心・カンガルー様姿勢; 5: 全身性の激しい間欠性痙攣・正向反射の消失・強直性痙攣。スコア 5 の断続的な全身性の激しい間欠性痙攣が 5 回 (5 日間) 以上連続した時点でキンドリング獲得とした。

Gd 増強 MRI (GdEMRI) による BBB 透過性評価
MRI の撮像には、小動物用 1.5-Tesla MRmini-SA (DS Pharma Biomedical) を用い、マウスに BBB 不透透のガドテリドール (プロハンス) Gd-HP-DO3A を尾静脈内急速大量投与し、5 分後にイソフルラン麻酔下で T₁WI を撮像した。コントロール画像として Gd-HP-DO3A を投与する前 (pre) にスピントラップ剤を注射し、液体窒素にて瞬間凍結した。EPR 測定直前に脳組織を半解凍させ、これをガラスキャピラリーに充填し、E500 X-band EPR スペクトロメーター (Bruker) を用いて測定した。

BBB 構成タンパク質の検出
マウスより抽出した脳組織は、0.32 M Sucrose を含む 3 mM HEPES-NaOH (pH 7.3) buffer にてホモジナイズ後、細胞質成分 (上清) と膜成分 (沈査) とに分離した。得られた膜成分 (沈査) を、1% NP-40、0.5% Sodium Deoxycholate を含む 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer にて可溶化し、膜タンパク質成分とシムプロットに供した。20-30 μg の膜タンパク質成分は、10% SDS-PAGE にて分離後、PVDF 膜に転写した。一次抗体には、抗 ZO-1 抗体 (1:500, rabbit IgG; Thermo Fisher Sci Inc), 抗 Occludin 抗体 (1:1,000, mouse IgG; Thermo Fisher Sci Inc), 抗 Claudin5 抗体 (1:1,000, mouse IgG; Thermo Fisher Sci Inc), 抗 VE-Cadherin 抗体 (1:5,000, goat IgG; Santa Cruz Biotech), 抗 PECAM 抗体 (1:1,000, rabbit IgG; Thermo Fisher Sci Inc) あるいは抗 Actin 抗体 (1:10,000, mouse IgG, Thermo Fisher Sci Inc) をそれぞれ用いた。二次抗体には HRP 標識された抗体を用い、化学発光基質 SuperSignal (Thermo Fisher Scientific Inc.) にて反応後、ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) にて検出した。得られたシグナルは、Quantity one (Bio-Rad Laboratories, Inc.) にて定量した。

リアルタイム PCR による BBB 制御遺伝子の定量
各脳組織からの total RNA の抽出には、RNAsiso Plus (TAKARA BIO INC, Mie, Japan) を用いた。逆転写反応は、High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて行った。標的遺伝子 [Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), Interleukin-1 beta (IL-1β)] 及び、内臓標準化 [ハウスキープ遺伝子である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)] の各プライマーは、Primer Express® Software of Real-Time PCR Version 3.0 (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて設計した。

VEGF-A (Acc.No. NM_009505.4)
5'-TGACCTCCACCAATGCCAAGT-3' (nucleotides 1068-1088: sense)
5'-CTTCGGCTGTAGACATCCATGA-3' (nucleotides 1146-1167: antisense)
IL-1β (Acc.No. NM_008361.3)
5'-TCGCTCAGGGTCCAAAGAAA-3' (nucleotides 995-1014: sense)
5'-AATCAGAAATGGCCATGCCAACAA-3' (nucleotides 1044-1066: antisense)
GAPDH (Acc.No. NM_008084)
5'-CTCGTCCCAGTAGACAAAATGGT-3' (nucleotides 34-55: sense)
5'-TGCCAACTATCCCACTTGGC-3' (nucleotides 121-141: antisense)

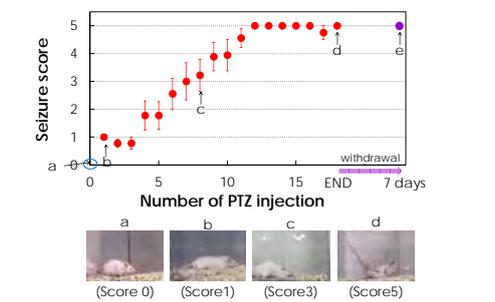
PCR は、2 ng の total RNA に相当する cDNA をテンプレートとし、sense および antisense プライマーを加え、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) にて反応させた。反応にはリアルタイム PCR システム (7300/7500/7500Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) を用いた。得られたデータは、GAPDH の Ct 値で標準化し、ΔΔCt 法を用いて定量した。

PTZ 誘発キンドリング獲得マウスにおいて、脳内で恒常的に発生する NO 量を *ex vivo* X-band EPR にて測定した。

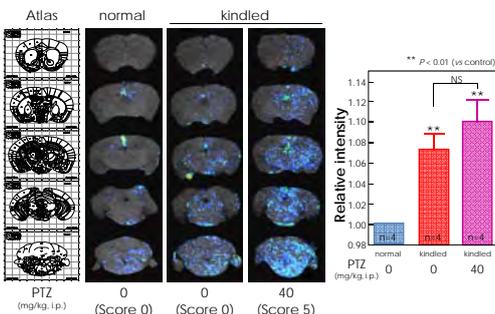
正常マウスと比べ、キンドリング獲得マウスにおける脳各部位における NO 発生量の有意な増加は認められなかった。この結果から、キンドリング形成過程に伴う BBB の破綻は、恒常的な NO 発生量の増加に起因するものではなく、他の要因によって惹起されたものと示唆された。

結果

PTZ 誘発キンドリング形成過程

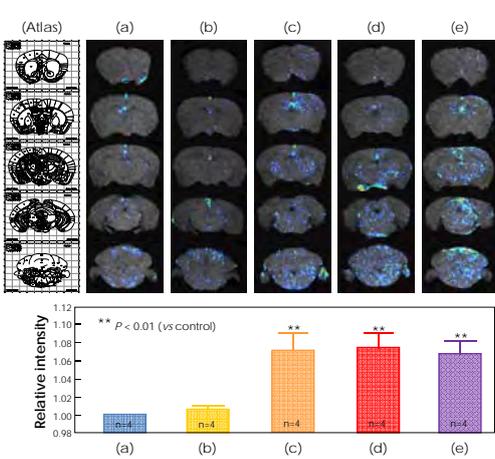


PTZ 誘発キンドリング獲得時におけるマウス脳内の Gd 透過性



PTZ 誘発キンドリング獲得時における BBB の変化を GdEMRI にて検討した。キンドリング獲得マウスでは、痙攣の有無にかかわらず脳実質内に漏出したプロハンスの高信号が認められた。この結果から、PTZ 誘発キンドリング獲得時には、恒常的な BBB の破綻が生じていることが明らかとなった。

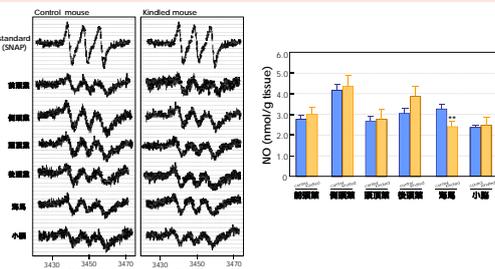
PTZ 誘発キンドリング形成過程における非痙攣マウス脳内の Gd 透過性の変化



PTZ 誘発キンドリング形成過程における BBB の変化を GdEMRI にて検討した。非痙攣 (Score 1) 時には、脳実質内へのプロハンスの漏出しは認められなかった。一方、間欠性痙攣 (Score 3) 時には、脳実質内へ漏出したプロハンスの高信号が認められ、BBB の破綻はキンドリング形成途中の段階ですでに生じていることが明らかとなった。

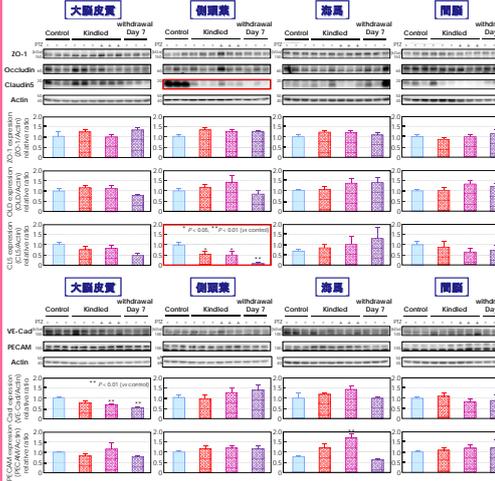
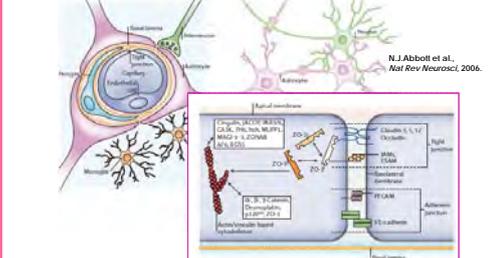
さらに、キンドリング獲得後・退薬 7 日目のマウスの GdEMRI を撮像したところ、脳実質内に漏出したプロハンスの高信号が認められ、キンドリング形成時に生じた BBB の不可逆的な破綻は、退薬後、少なくとも 1 週間は修復されないことが明らかとなった。

BBB 破綻における NO の関与



PTZ 誘発キンドリング獲得マウスにおいて、脳内で恒常的に発生する NO 量を *ex vivo* X-band EPR にて測定した。

キンドリング形成過程に生じる BBB 破綻の分子メカニズム



キンドリング獲得時における BBB 破綻を分子レベルで明らかにするために関連分子の発現量をシムプロットにて検討した。

Tight Junction 構成タンパク質の Occludin, Claudin5 およびその裏打ちタンパク質である ZO-1 の発現量に関してそれぞれ検討した。キンドリング獲得時の側頭葉において、Claudin5 の著しい発現量減少が認められた。さらにその減少は、キンドリング獲得後 7 日後でも回復しなかった。このことは、キンドリング獲得時の側頭葉において BBB が恒常的に破綻していることを示唆する。

Adherens Junction 構成タンパク質の VE-Cadherin および PECAM の発現量に関してそれぞれ検討した。キンドリング獲得 7 日後の大脳皮質において VE-Cadherin の発現量減少が認められた。一方、キンドリング獲得時の海馬では痙攣時に PECAM の発現量増加が認められた。

	VEGF-A		IL-1β	
	Control	Kindled	Control	Kindled
大脳皮質	3.89 ± 0.50	4.96 ± 0.86	1.21 ± 0.18	1.65 ± 0.24
側頭葉	2.95 ± 0.35	4.51 ± 0.74*	0.42 ± 0.06	0.82 ± 0.09*
海馬	3.06 ± 0.56	4.08 ± 0.63	0.61 ± 0.03	0.66 ± 0.12
視床	2.00 ± 0.05	2.55 ± 0.83	0.53 ± 0.13	0.88 ± 0.17
視床下部	2.31 ± 0.29	2.91 ± 0.90		

キンドリング獲得時における BBB 破綻の分子メカニズムを明らかにするために血管新生および炎症関連分子の遺伝子発現に関して検討した。

血管新生関連遺伝子である VEGF-A の mRNA 発現量に関して検討した。脳全体で VEGF-A mRNA の発現量の増加傾向が認められ、中でも側頭葉において有意な VEGF-A mRNA 発現量の増加 (1.53 倍増) が認められた。

炎症関連遺伝子である IL-1β の mRNA 発現量に関して検討した。脳全体で IL-1β mRNA の発現量の増加傾向が認められ、中でも側頭葉において有意な IL-1β mRNA 発現量の増加 (1.95 倍増) が認められた。

これらの結果は、キンドリング獲得時の側頭葉における Tight Junction の機能低下は、VEGF やサイトカインにより惹起されるものと示唆された。

結論

- ▶ PTZ 誘発キンドリング形成過程では、その形成途中において Gd 透過性亢進を伴う不可逆的な BBB の破綻が生じている。
- ▶ PTZ 単回投与マウスにおける BBB の一過性脆弱化とは異なり、PTZ 誘発キンドリング獲得マウスにおける BBB の破綻は、脳内で恒常的に発生する NO 量に依存していない。
- ▶ PTZ 誘発キンドリング獲得マウスにおける BBB の機能低下による血管透過性の亢進が関与する。

本研究では、キンドリング獲得マウスにおける BBB の機能異常を明らかにした。しかし、痙攣発作獲得機構に対する BBB 破綻の直接的関与は現在のところ不明であり、BBB 破綻が痙攣発作あるいはてんかん原生の主要因となりうるのかは更なる検討が必要である。

謝辞

本研究は JSPS 科研費基礎 (C) の助成を受けたものです。また、本研究の一部は、香川大学医学部精神神経医学講座 中村祐教授、植上園子医師との共同研究により行ったものです。