

—— 研究功労賞受賞記念講演 ——

てんかん研究は楽しい

兼 子 直

要旨：学生時代の講義・実習から「医学、医療」は未だ研究の余地が多く、研究の必要性和その糸口をいくつか感じた。そのため学生時代から薬理学教室で机を借りて中枢神経系の勉強をしていた。卒後は基礎系の大学院に入ることを考えていたが、精神科の佐藤教授に説得されて大学院に入った。当時から「臨床から始まり、成果を臨床へ還元できる研究」を目指してきた。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2021；32：11-16

Key Words：てんかん、抗てんかん薬、妊娠、遺伝子、発病防止

1 抗てんかん薬（AED）の臨床薬理学的研究

ガスクロを用い、AEDの血液内、遊離型、髄液内、唾液内、母乳内濃度の相互関連とそれぞれの臨床的意義を検討した^{1, 2)}。単剤投与では多くのAED血中濃度は体重当たりの投与量と相関するが、phenytoin, carbamazepine (CBZ) のように血中濃度が大きくばらつく症例が問題となり、その要因として、saturation kinetics³⁾, autoinduction^{4, 5)}、薬物相互作用、遺伝的代謝能力の個人差、complianceの問題などが関与することを明らかにした。弘前大学の調査ではてんかん外来患者の約40%は不規則服薬であり、AEDの代謝酵素（CYP）の種類、CYPの遺伝的多型性が重要であった^{6, 7)}。CYPの多型性の頻度には個人差、人種差があることも判明した。

2 てんかんを持つ女性の妊娠・出産治療管理基準の設定

これは産婦人科医、小児科医など、幅広い方々との共同研究で、20年を要した研究であった。母乳濃度測定法を開発し、各AED母乳内排泄率を報告した⁸⁾。この論文がきっかけで、

Dieter Janz教授が代表を務めるILAEの「てんかん、妊娠、その子供委員会」へ参加を要請された。母親がベンゾジアゼピン系、バルビツール剤を服用しているときは最初の1週間はミルク併用が望ましいが、それ以外のAED服用者は授乳可能なことを明らかとし、奇形発現防止対策の一つとして妊娠前の葉酸補充の重要性⁹⁾も判明した。児の奇形はAEDに起因するのか遺伝に原因があるのか明確ではなかったが、drug regimenの変更で奇形発現率が減少することがわかり、AED調整で奇形は減少出来ることが明らかとした¹⁰⁾。妊娠前の避妊期間中の主な準備点として、1) AEDの単剤化、2) 必要最小限にAEDを減量すること、3) AEDの特定の併用をさけることなどがある¹⁰⁻¹²⁾。子宮内での児の発達遅延、その後の精神運動発達も胎盤を通過したAED^{13, 14)}により影響を受けるが、概ね発達は追い付く^{15, 16)}。奇形発現頻度についての具体的所見としては併用薬剤数、投与量に依存すること、併用の中でバルプロ酸（VPA）+CBZが最も危険で、CBZ併用あるいはVPAの濃度増加で毒性を有する活性代謝産物である4-en VPAが増加することが判明した。VPAは1日1000mgを超えないこと、望ましくは600mg/日に抑える

こと、VPA血中濃度は70 $\mu\text{g/ml}$ がカットオフ値になることを明らかとした¹⁷⁻¹⁹⁾。これらの結果はてんかんを持つ女性の妊娠・出産に対するILAE, JESの治療基準の設定に貢献した。

3 てんかんの遺伝子探索からてんかんの分子病態解明へ

奇形発現には薬剤要因だけでなく、遺伝要因も関与する。当初は奇形発現に対する遺伝関与の程度を参画すべく遺伝子解析を考えたが、遺伝子研究はてんかんの病因解析ひいては新たなてんかんの治療法開発にもつながると考え、アジアでは初となる「The Epilepsy Genetic Study Group, Japan」を組織した。てんかんの遺伝子解析には当時、学会が「てんかんは遺伝病ではない」とキャンペーンを張っていたため、学会の一部の方々から反発されたが、理解を頂き、本邦も遺伝子探索競争に参画した。このグループはADNFLE²⁰⁾, Chorea-acanthocytosis²¹⁾, Febrile seizure^{22, 23)}, JME²⁴⁻²⁷⁾, SMEI^{28, 29)}, BAFME^{30, 31)}, Benign familial neonatal seizure³²⁾, GEFS plus³³⁾, Dravet syndrome³⁴⁾, 等の多くのてんかん類型を解析した。これらの研究からChorein, Eln 1, CHRNA4, CHRN2, PJA1 variant³⁵⁾, valiant intestinal-cell kinase, SCN1A, GABRG2, KCNQ2, KCNQ3, LGI4, CACNA1Gなどの多数の変異を同定した。

中でも注目されたのは後に孤発性の前頭葉てんかんでも見出されたが、家族性前頭葉てんかん (ADNFLE) にかかわるCHRNA4 (S248F), S252L, L776ins) 及び CHRN2 (V287L, V287M) の変異を同定した。次いで、この発見から、世界初の遺伝子改変てんかんモデルラット (S284L-TGを含む) ストレインを作出した³⁶⁾。これは発作症状、遺伝的発現、電気生理学的、組織学的、薬効的、にもてんかんモデル動物としての3基準を満たし、分子病態解析、薬効解析などに活用されている。

S284L-TG (TG) の分子病態として、前頭葉で睡眠時も覚醒時もGABA遊離は変化しないが、GLT遊離は増加する。覚醒から睡眠への移行変化によりGABA遊離に変化なく、対照

群でGLTは減少するがTG群では変化しない。fEPSPはsensorimotor cortexで、対照群では変化なく、TGのみでニコチン, MLA (nACh拮抗薬), NMDA受容体拮抗薬APVで増加し, DNQX, bicuculineでは変化がない。前頭葉てんかんの病態として睡眠・覚醒リズムに関与する視床・覚醒リズムに関連するnetwork機能異常が存在し、前頭葉の興奮性・抑制性神経伝達系のバランスが破綻したと考えられた³⁶⁾。一方TGのSensorimotor cortexのCL-ion mRNA transportersの発現とneurotrophic tyrosine kinases receptorの発現ではNKCC1は8週齢で増加, KCC1, KCC2, TrkA,B, Cは8週目になり対照群より高くなった。下流のシグナリングのタンパク発現としてGrb2, Ras, MEK1,2, ERK1,2は4週齢では変化はなかったが8週齢で増加していた。これらの結果は新薬開発のヒントとなる。

4 AEDの作用機序解析

AED作用機序解析を介して脳機能理解、抗けいれん薬ではなく新たな抗てんかん作用を有する薬剤の作出を求めている。AEDの作用点として神経細胞のモノアミンの伝達物質の遊離機構の重要性の指摘³⁷⁾、海馬におけるインターロイキン1- β のグルタメート, GABA遊離に対するCa²⁺の関与機構³⁸⁾などを明らかにし、ゾニサミド (ZNS) のCa²⁺依存性Dパミン遊離増強作用³⁹⁾、ZNSのK⁺, Ca²⁺誘発性モノアミン遊離, K⁺誘発性海馬細胞内Ca²⁺の移動⁴⁰⁾も指摘し、後年、ZNSはパーキンソンニズムの治療薬ともなった。さらにSCN1Aのミスセンス変異の位置とてんかんのフェノタイプとの関連⁴¹⁾、前頭葉てんかんに神経細胞のニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ サブユニットの変異がfaster desensitizationを起こすこと⁴²⁾、フロセミドが前頭葉てんかんの予防効果があることを見出した。

5 てんかんの発病防止プロジェクト

S284L-TGの解析から、前頭葉てんかんの分子病態はNKCC1とKCC⁺のインバランスマネジメントととらえられ、とくにNKCC1の過剰発現と考えた。S284L-TGは治療しなければんかんが

100%発病し、一方で、発病前の一定期間、病態を補正する薬剤で治療すると約60%の発病が抑制されたと考えられた³⁶⁾。

これらの分子病態の解析結果を踏まえててんかんの発病防止プロジェクトへ移行した。細胞内クロライドイオンを調整する薬剤としてフロセミドを使用し効果を確認、プロジェクトの課題は1) 最適な治療期間の同定, 2) 発病のマーカの探索, 3) 治療薬の選択, などの研究を共同研究として継続中である。

6 研究の流れと共同研究について

研究室を超えて、各地の専門家と共同研究を楽しく展開できた。若手の研究は可能な限り研究費を含め自由を保障し、論文には関与の程度を考え、若手中心に順番で書き、投稿した。それぞれが自ら目指した分野で大きな成果を上げた。留学希望の若手は留学させ、弘前での研究を望む研究者は受け入れ、国際交流を活性化することで多くの国際的な研究者が育った。研究室ではてんかん以外の研究も展開しているが、研究を有機的に継続的に追及すると「次の研究」へと発展する。共同研究は研究時間の短縮、規模の拡大と研究水準の向上につながる。「臨床家の研究だから」、と言い訳しない研究水準を求め、1つの研究課題を5年で国内一流、10年で国際一流の研究にするという目標を掲げた。私は素晴らしい共同研究者達に恵まれた。

文献

- 1) 兼子直, 「抗てんかん剤の体内濃度 第1報: 血清濃度および薬物相互作用」。精神神経学雑誌, **79** (12), 609-627, 1977
- 2) 兼子直, 「抗てんかん剤の体内濃度 第2報: 血清蛋白非結合型, 髄液内, 唾液内濃度について」。精神神経学雑誌, **80** (1), 29-41, 1978
- 3) Eadie MJ, Tyrer JH, Bochner F, et al. The elimination of phenytoin in man. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1976 ; **3** (3) : 217-24.
- 4) SUZUKI K, Kaneko S, Sato T., et al. Time-dependency of serum carbamazepine concentration. Folia Psychiatr Neurol Jpn. 1978 ; **32** (2) : 199-209.
- 5) Saruwatari J, Yoshida S, Tsuda Y, et al. Pregnane X receptor and hepatocyte nuclear factor 4a polymorphisms are cooperatively associated with carbamazepine autoinduction. Pharmacogenet Genomics. 2014 ; **24** (3) : 162-71.
- 6) Yasui-Furukori N, Kaneda A, Iwashima K, Saito M, et al. Association between cytochrome P450 (CYP) 2C19 polymorphisms and harm avoidance in Japanese. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 ; **144B** (6) : 724-7.
- 7) Saruwatari J, Ogusu N, Shimomasuda M, et al. Effects of CYP2C19 and P450 oxidoreductase polymorphisms on the population pharmacokinetics of clobazam and N-desmethyclobazam in Japanese patients with epilepsy. Ther Drug Monit. 2014 Jun ; **36** (3) : 302-9.
- 8) Kaneko S, Sato T, Suzuki K, et al. The levels of anticonvulsants in breast milk. Br J Clin Pharmacol. 1979 ; **7** (6) : 624-7.
- 9) Ogawa Y, Kaneko S, Otani K, et al. Y, et al. Serum folic acid levels in epileptic mothers and their relationship to congenital malformations. Epilepsy Res. 1991 ; **8** (1) : 75-8.
- 10) Kaneko S, Otani K, Kondo T, et al. et al. Malformation in infants of mothers with epilepsy receiving antiepileptic drugs. Neurology. 1992 ; **42** (4 Suppl 5) : 68-74.
- 11) Kaneko S, Otani K, Fukushima Y, et al. Teratogenicity of antiepileptic drugs : analysis of possible risk factors. Epilepsia. 1988 ; **29** (4) : 459-67.
- 12) Kaneko S, Battino D, Andermann E, et al. Congenital malformations due to antiepileptic drugs. Epilepsy Res. 1999 ; **33** (2-3) : 145-58.
- 13) Kaneko S, Otani K, Fukushima Y, Transplacental passage and half-life of sodium valproate in infants born to epileptic mothers. I. Br J Clin Pharmacol. 1983 ; **15** (4) : 503-6.
- 14) Kaneko S, Hirano T, Fukushima Y, et al. Foetal head growth retardation due to antiepileptic drugs : with reference to GH, TSH, T4, T3 and reverse T3 concentrations. Folia Psychiatr

- Neurol Jpn. 1983 ; **37** (1) : 25-32.
- 15) Battino D, Kaneko S, Andermann E, et al. Intrauterine growth in the offspring of epileptic women : a prospective multicenter study. *Epilepsy Res.* 1999 ; **36** (1) : 53-60
 - 16) Hirano T, Fujioka K, Okada M, et al. Physical and psychomotor development in the offspring born to mothers with epilepsy. *Epilepsia.* 2004 ; **45** Suppl 8 : 53-7.
 - 17) Kondo T, Kaneko S, Otani K, et al. Associations between risk factors for valproate hepatotoxicity and altered valproate metabolism. *Epilepsia.* 1992 ; **33** (1) : 172-7.
 - 18) Is 2-propyl-4-pentenoic acid, a hepatotoxic metabolite of valproate, responsible for valproate-induced hyperammonemia? Kondo T, Ishida M, Kaneko S, et al. *Epilepsia.* 1992 ; **33** (3) : 550-4.
 - 19) Kaneko S. Epilepsy, pregnancy, and the child. *Epilepsia.* 2000 ; **41** Suppl 9 : 8-13.
 - 20) Hirose S, Iwata H, Akiyoshi H, et al. A novel mutation of CHRNA4 responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology.* 1999 ; **53** (8) : 1749-53.
 - 21) Ueno S, Maruki Y, Nakamura M, et al. The gene encoding a newly discovered protein, chorein, is mutated in chorea-acanthocytosis. *Nat Genet.* 2001 Jun ; **28** (2) : 121-2. 10.1038/88825.
 - 22) Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, et al. A missense mutation of the Na⁺ channel alpha II subunit gene Na (v) 1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 ; **98** (11) : 6384-9.
 - 23) Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Ito M, et al. Nav1.1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. *Neurology.* 2001 28 ; **57** (4) : 703-5.
 - 24) Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, et al. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2004 Aug ; **36** (8) : 842-9.
 - 25) Medina MT, Suzuki T, Alonso ME, et al. Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology.* 2008 ; **70** (22 Pt 2) : 2137-44.
 - 26) Tomioka NH, Yasuda H, Miyamoto H, et al. Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nat Commun.* 2014 Jul 22 ; **5** : 4501.
 - 27) Bailey JN, de Nijs L, Bai D, et al. Variant Intestinal-Cell Kinase in Juvenile Myoclonic Epilepsy. *N Engl J Med.* 2018 ; **378** (11) : 1018-1028
 - 28) Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, et al. Mutations of neuronal voltage-gated Na⁺ channel alpha 1 subunit gene SCN1A in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia.* 2004 ; **45** (2) : 140-8.
 - 29) Wang JW, Kurahashi H, Ishii A, et al. Microchromosomal deletions involving SCN1A and adjacent genes in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia.* 2008 ; **49** (9) : 1528-34
 - 30) Terasaki A, Nakamura M, Urata Y, et al. DNA analysis of benign adult familial myoclonic epilepsy reveals associations between the pathogenic TTTCA repeat insertion in SAMD12 and the nonpathogenic TTTTA repeat expansion in TNRC6A. *J Hum Genet.* 2020 10. 1038/s10038-020-00855-0.
 - 31) Mori S, Nakamura M, Yasuda T, et al. Remapping and mutation analysis of benign adult familial myoclonic epilepsy in a Japanese pedigree. *J Hum Genet.* 2011 ; **56** (10) : 742-7.
 - 32) Kurahashi H, Wang JW, Ishii A, et al. Deletions involving both KCNQ2 and CHRNA4 present with benign familial neonatal seizures. *Neurology.* 2009 ; **73** (15) : 1214-7.
 - 33) Ito M, Yamakawa K, Sugawara T, et al. Phenotypes and genotypes in epilepsy with febrile seizures plus. *Epilepsy Res.* 20 ; **70** Suppl 1 : S199-205.
 - 34) Wang JW, Shi XY, Kurahashi H, et al.

- Prevalence of SCN1A mutations in children with suspected Dravet syndrome and intractable childhood epilepsy. *Epilepsy Res.* 2012 ; **102** (3) : 195-200.
- 35) Suzuki T, Suzuki T, Raveau M, et al. A recurrent PJA1 variant in trigonocephaly and neurodevelopmental disorders. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020 ; **7** (7) : 1117-1131.
- 36) Zhu G, Okada M, Yoshida S, et al. Rats harboring S284L ChRNA4 mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype. *J Neurosci.* 2008 ; **28** (47) : 12465-76.
- 37) Okada M, Zhu G, Yoshida S, et al. Exocytosis mechanism as a new targeting site for mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Life Sci.* 2002 ; **72** (4-5) : 465-73.38)
- 38) Zhu G, Okada M, Yoshida S, et al. Effects of interleukin-1 β on hippocampal glutamate and GABA releases associated with Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing systems. *Epilepsy Res.* 2006 Oct ; **71** (2-3) : 107-16.
- 39) Okada M, Kaneko S, Hirano T, et al. A novel prophylactic effect of furosemide treatment on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE). *Epilepsy Res.* 2013 ; **107** (1-2) : 127-37
- 40) Kawata Y, Okada M, Murakami T, et al. Effects of zonisamide on K⁺ and Ca²⁺ evoked release of monoamine as well as K⁺ evoked intracellular Ca²⁺ mobilization in rat hippocampus. *Epilepsy Res.* 1999 ; **35** (3) : 173-82
- 41) Kanai K, Yoshida S, Hirose S, et al. Physicochemical property changes of amino acid residues that accompany missense mutations in SCN1A affect epilepsy phenotype severity. *J Med Genet.* 2009 ; **46** (10) : 671-9.
- 42) Okada M, Kaneko S, Hirano T, et al. Effects of zonisamide on extracellular levels of monoamine and its metabolite, and on Ca²⁺ dependent dopamine release. . *Epilepsy Res.* 1992 ; **13** (2) : 113-9

