

—— 研究褒賞受賞記念報告 ——

てんかん病態・病態生理の神経科学・薬理学的解析研究

Exploring pathomechanisms of epilepsy using post hoc pharmacodynamic study and genetic animal models.

岡 田 元 宏

要旨：偶然に発見されたてんかん治療薬のpost hoc薬効薬理学的解析結果から、効率的な抗けいれん薬スクリーニング法が開発され、多くの抗てんかん薬の開発の成功に貢献してきた。しかし、新規作用機序を有する抗てんかん薬の開発が困難となり、前臨床試験結果の標準化（信頼性基準）と、モデル動物の妥当性基準の整備が進められている。しかし、病態が未だ明らかにされていないてんかんのモデルとしての妥当性は、病態解明に応じた修正・改善を繰り返す必要があるように思える。本項では、post hoc解析と遺伝子改変モデル動物を用いた遺伝性てんかんの病態解析を通じて、モデル動物の表現的妥当性、構造的妥当性、予測的妥当性が、確固たる基準となることができない原因について概説する。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2021；32：17-26

1. 緒言

歴史的に、てんかん薬物治療は、偶然に発見された治療薬のpost hoc薬力学的解析から得られた治療薬の特性を標的とし、効率的なスクリーニング法を構築し、てんかん治療薬（AED）の候補物質を前臨床試験として探索を実施してきた。最終的に、その後の臨床試験（治験）で評価された、認可された低分子化合物をAEDとして処方してきた。この一連の流れは、National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) の、Anticonvulsant Screening Program (ASP) に従った前臨床試験が、Food and Drug Administration (FDA) の承認要件であり、ASPが40年間の長きにわたり、AEDのゴールドスタンダードスクリーニング法に位置付けられてきた歴史的事実がある¹⁾。

ASPは多くのAEDの開発に貢献してきたが、その多くは、電位依存性ナトリウムチャネ

ル（VDSC）阻害を主要機序としたAEDであった。例外的なAEDとして、VDSC阻害以外を作用標的とするlevetiracetamやGabapentinが有名であるが、やはり、ASPでスクリーニングされている。現在ASPは、Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP) に修正された^{2,3)}。この流れに伴い、従来の、臨床的にてんかん治療に承認された低分子化合物をantiepileptic drug (AED)、前臨床的な痙攣発作抑制効果を有する低分子化合物をanticonvulsantとして表記されてきたが、総称としてanti-seizure drug (ASD) と表記されることが、海外文献でも多くなってきている。

一方、臨床試験の実施基準の標準化に伴い、meta-analysisの精度が向上しているが、前臨床試験結果は、ASP/ETSPによる標準化にもかかわらず、大きなばらつきがあり、これが新たなASD開発の大きな障害となっているのではないかと懸念が高まりつつある。この懸念に対し、International League Against Epilepsy

(ILAE), American Epilepsy Society (AES)とNINDSのタスクフォースが、前臨床試験の標準化を、信頼性基準 (reliability criteria) として、Epilepsia Open誌面で報告した⁴⁻⁹⁾。この信頼性基準は、国家間、学会間、研究施設間、研究者間の実験手法と解析法のばらつきを抑えることで、前臨床試験のmeta-analysisを可能にすることもできる可能性を秘めている。もう一つの近年の話題として、ASD治療薬スクリーニングで記載されているモデルは、薬理学モデル、電気生理学的モデルと自然発症欠損てんかんモデルのみであり、遺伝子改変モデル動物のスクリーニングでの運用は議論対象に留まっている。

前臨床試験で使用されるモデルの妥当性は、妥当性基準 (validation criteria) となるが、確立された妥当性基準は、自然発症欠損てんかんモデルのみであり¹⁰⁾、遺伝子改変モデル動物の妥当性基準は、各研究者の提唱レベルであり¹¹⁻¹³⁾、コンセンサスが得られた妥当性基準はない¹⁴⁾。

本報告では、本邦の前臨床てんかん研究における実情も考慮して、報告者がこれまで行ってきた、てんかん病態・病態生理の神経科学・薬理学的解析研究に基づいた、てんかんモデルの妥当性基準について、若干の意見を述べたい。

2. Post hoc解析

ASPは、多くのVDSC阻害薬のASD開発に貢献してきた。このASP発端となったASDはcarbamazepine (CBZ) とphenytoin (PHT) である。報告者は、主にCBZと、本邦で開発されたVDSC阻害薬であるzonisamide (ZNS) のpost hoc解析を行ってきた。両剤のpost hoc解析結果は、Tab. 1とTab. 2にまとめておくが、ZNSのmonoamineとGABA遊離 (開口分泌) に対する濃度依存性二層性効果¹⁵⁻²¹⁾ が、双極性障害、パーキンソン治療薬の候補物質としてとして、国内臨床試験にまでこぎつけた。パーキンソン治療薬としての開発は、本邦の多くの脳神経内科医の努力の結果、PMDA承認に至ったが、残念ながら双極性障害に対する臨床試験は中止に至っている。また近年欧米では、双極性障害の急性期治療薬、禁煙補助薬、減酒薬、過食症治療薬として臨

床試験が実施されたが、双極性障害の急性期と体重管理、減酒には若干の補助的効果が示されるに留まっている²²⁾。

パーキンソン治療薬としての作用機序は、基底核のドーパミン合成亢進と、monoamine oxidase B (MAO-B) に対する抑制効果が想定されていたが^{15, 16, 23)}、実は、治療濃度のCBZは、ZNSよりもドーパミン合成亢進が強く^{16, 24)}、ZNSの錐体外路症状とdyskinesia改善効果には、他の機序が関与していると想定すべきである。電位依存性カルシウムチャネル (VSCC)^{17, 18, 20)}、カルシウム誘発性カルシウム遊離機構 (CICR)^{21, 25)}、soluble NSF attachment protein receptor (SNARE)^{26, 27)} に対する効果も検証したが、ZNSの適応拡大につながるような結果は得られなかった。ZNSがパーキンソン治療薬としてPMDAに承認された後に、オピオイド受容体作動性効果と、キヌレニン代謝産物の中で、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の内在性アゴニストであるキサントレン酸 (XTRA) とシンナバリン酸 (CNBA) の合成亢進を介した、グループII/IIIのmGluR機能亢進による基底核回路の機能補償を報告した^{28, 29)}。これらの研究は、承認後の報告で、結果的にはpost hoc解析ではあるが、近年問題となっている依存への治療標的として注目されている。

CBZに関しては、1980年代にCBZのアデノシン受容体結合能が報告され、アデノシン受容体のA1受容体に対する阻害効果とA2A/A2B受容体作動性効果を1990年代に報告したが、当時、抑制性A1受容体の阻害と、興奮性A2A/A2B受容体の機能亢進は、痙攣を増強することから、多くの研究グループが中断を余儀なくされた^{23, 24, 30, 31)}。しかし、このA2A受容体亢進は、グリアの炎症性作用に寄与し、これが神経グリア-神経の三者間シナプス伝達 (tripartite synaptic transmission) の長期的な安定化に寄与し³²⁾、同様の効果が末梢の腸管組織における炎症抑制も誘導することから³³⁾、adenosine A2A受容体を介した低分子化合物のinflammatory bowel diseaseに対する前臨床試験が完了している。

3. 遺伝子改変モデル動物

報告者は、adaptor protein 3B (AP3B-KO)⁴³⁾、

Tab. 1

Zonisamide					
	Basal	Depolarisation	Synthesis	Degradation	Reference
Neurotransmitter					
Monoamine	Therapeutic:↑ Suprathreshold:↓	Therapeutic:↓ Suprathreshold:↓	↑	↓ (MAO-B:↓)	[15,16,18,19,23,34,35]
Glutamate	→	Therapeutic:↓ Suprathreshold:↓			[17,35]
GABA	Therapeutic:↑ Suprathreshold:↓	Therapeutic:↓ Suprathreshold:↓			[35]
ACh	Therapeutic:↑ Suprathreshold:↓	Therapeutic:↓ Suprathreshold:↓	↑		[20]
Channel					
CICR	→	↓			[17,35]
N-type VSCC	↑	↓			[35]
P/Q-type VSCC	→	↓			[20]
Hemichannel	→	↓	↓		[36-38]
Spreading depression		↓			[17]
SNARE					
		↓			[26]
Receptor					
δ	↑				[28]
mGluR-II	↑				[29,39]
mGluR-III	↑				[29]

Tab. 2

Carbamazepine					
	Basal	Depolarisation	Synthesis	Degradation	Reference
Neurotransmitter					
Monoamine	Therapeutic:↑ Suprathreshold:↓	Therapeutic:↓ Suprathreshold:↓	↑	↓ (MAO-B:↓)	[18,23,24,31,34,35]
Glutamate	→	Therapeutic:↓ Suprathreshold:↓			[17,21,35]
GABA	Therapeutic:↑ Suprathreshold:↓	Therapeutic:↓ Suprathreshold:↓			[21,35]
ACh	Therapeutic:↑ Suprathreshold:↓	Therapeutic:↓ Suprathreshold:↓	↑		[40]
Channel					
CICR	→	↓			[21]
N-type VSCC	↑	↓			[20,26,27,34,40]
P/Q-type VSCC	→	↓			[20,26,27,34,40]
Hemichannel	→	↓	↓		[36-38]
Spreading depression		↓			[17]
SNARE					
		↓			[26]
Receptor					
A1	↓				[30,32,41]
A2A/A2B	↑				[30,32,41]
CRH	↓				[42]

Phospholipase C-related, but catalytically inactive protein (PRIP-KO)⁴⁴⁾, X11/X11L (X11-KO)⁴⁵⁾ の3種類のノックアウトマウス、P/Q型VSCCのコンディショナルノックアウトマウス (CACNA1A-CKO)^{13, 46)} の解析に加え、Autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy (ADSHE) から同定された変異遺伝子を導入したトランスジェニックラット (S284L-TG, S286L-TG, V287L-TG) の機能解析実験を行ってきた^{11, 36, 37, 39, 47-50)}。催奇性が少ない valproate (VPA) の代替薬としての Arundic acid のASDとしての開発をAPSに従い¹³⁾、欧州では高い評価を得たが⁵¹⁾、最も重要な催奇性の問題を乗り越えることが出来ず、残念ながら休止している。

ADSHEモデルとしてS284L-TGでは、非公開のスクリーニングデータから、MAPK/Erkシグナリングが病態に関連している可能性が示され、MAPK/Erkシグナリングを抑制作用を有する承認治療薬の中から、有害反応が少なく、安価なフロセミド⁵²⁾を発症予防候補薬として、フロセミドの発症予防作用スクリーニングを試みた⁴⁷⁾。予想通りに、フロセミドはS284L-TGの発症を抑制し⁴⁷⁾、MAPK/Erkシグナルの抑制が、ADSHEの発症予防と標的になりうる手ごたえを得たが、フロセミドはBDNFにつながるNKCC1阻害薬でもあり^{47, 52)}、S284L-TGで用いたPDGF- β プロモーターとシグナルオーバーラップがあるため¹¹⁾、このMAPK/Erkシグナルを介したADSHE発症予防の確認には、CHRNA4のnatural promotorを導入した遺伝子改変モデル動物の作出の必要性に迫られた。

Natural promotorを考慮した場合、ノックインモデル作出が現実的な計画となるように思えたが、既存のノックインモデルマウスは、自発性けいれんを獲得したとしても、ADSHEを獲得したとは言い難く⁵³⁻⁵⁶⁾、J1 ES細胞を用いたS280FとinsLを導入したノックインモデルマウスの表現型が全く同じであったことから、マウスモデルでの作出を避けるべきと判断した^{53, 54)}。更に、W9.5 ES細胞によるS280F変異導入ノックインマウスと、R1 ES細胞を用いたCHRNA4の287L変異を導入したノックインモデルも

ADSHEは獲得しておらず、類似した発作性行動障害 (DAC) を獲得するに留まっていた⁵³⁻⁵⁵⁾。これらの知見は、ノックインモデルマウスの表現的妥当性が保証されていないだけではなく、予測的妥当性と構造的妥当性に大きな問題が内包されている可能性を示すものである。このため、rat ChRNA4のnatural promotorとS284L変異に相同するrat S286L変異を導入したS286L-TGの作出を行い、ADSHEの病態解析を実施した³⁹⁾。

現在までのところ、CHRNA4のS284L変異は、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) のイオンチャネルとしての機能低下に伴う、視床内GABA抑制の低下とこれに続く視床皮質路と視床皮質下核路のグルタミン酸伝達系機能亢進がてんかん性放電伝播回路として同定できている^{36, 37, 39, 49, 50)}。しかし、前頭葉焦点と脳波非感受性のADSHE特性の機序として、予想外にグリアのギャップジャンクションとヘミチャネル構成主要タンパクであるコネキシン43 (Cx43) の機能亢進が同定され、これはnAChRの細胞内情報伝達制御機能の低下に伴うMAPK/Erkシグナルのupregulationにより部分的に説明でき、S286L-TGの予測的妥当性と構造的妥当性の評価が完了した^{36, 37, 39, 49, 50)}。予測的妥当性は、CBZ耐性ZNS感受性となるが、この予測的妥当性は容易に検証できたが、発症予防法への展開には、S286L-TGにより新たに明らかになった構造的妥当性に列挙されたCx43亢進に対する効果の検証を要した。結果は、治療濃度のCBZは、Cx43の発現・機能に影響できず、過剰濃度では若干の作用がある程度であり、ZNSは治療濃度以下でもCx43の発現と機能を抑制することから³⁸⁾、新たな予測的妥当性を列挙するに至った。このCx43の機能亢進が、ASD感受性を規定していることから、この知見は、モデル動物の妥当性基準として、予測的妥当性なのか、構造的妥当性に位置付けるべきかは、慎重に考察すべき事項であることが明らかになった。すなわち、病態が明らかではない遺伝子改変モデル動物の妥当性基準と、病態が明らかになり臨床的な治療薬開発の薬効評価前臨床試験に用いるための妥当性基準では、新たに異なる基準を策定する必要があるよ

うに感じられる¹⁴⁾。

4. 今後の展開

これまでのところ、ADSHEの発症予防には、MAPK/Erkシグナル抑制とCx43機能抑制が、それぞれ、anti-epileptogenesisとanti-ictogenesis薬として浮かび上がる。即ち、MAPK/Erkシグナル抑制薬は発症予防薬の候補物質となる。しかし、Erk阻害薬はoncology分野では、抗腫瘍薬としての標的であり、近年明らかになってきた、ADSHEの責任遺伝子としてのDEPDC5とGATOL遺伝子変異を考慮すると⁵⁷⁻⁵⁹⁾、合理的な標的であるかもしれない。しかし、小児期発症てんかんであるADSHEの発症予防に、抗腫瘍薬を投与する計画には慎重にならざるを得ず、新たな標的を探索すべきと考えている。

一方、Cx43阻害薬に関しては、既に非選択的阻害薬carbenoxolone (CBX) や選択的阻害薬としてペプチド系阻害薬であるGAP19-TATもあり、今後の開発は可能な状況ではあるが、グルアヘミチャネル機能阻害は神経系発達完了後は抑うつを誘導し、発達過程では自閉症様症状を誘導する可能性が指摘されている^{60, 61)}。加えて、選択的セロトニン阻害薬 (SSRI) はヘミチャネル阻害するが、治療抵抗性統合失調症治療薬クロザピンはCx43機能を亢進することから、risk/benefitを視野に入れた場合、臨床応用には精神神経系の有害事象の誘発を考慮した場合、慎重に前臨床試験を継続すべきと考える⁶⁰⁻⁶²⁾。

文献

- 1) Wilcox, K.S.; Dixon-Salazar, T.; Sills, G.J.; Ben-Menachem, E.; White, H.S.; Porter, R.J.; Dichter, M.A.; Moshe, S.L.; Noebels, J.L.; Privitera, M.D., *et al.* Issues related to development of new antiseizure treatments. *Epilepsia* **2013**, *54 Suppl* 4, 24-34.
- 2) Kehne, J.H.; Klein, B.D.; Raeissi, S.; Sharma, S. The national institute of neurological disorders and stroke (ninds) epilepsy therapy screening program (etsp). *Neurochemical research* **2017**, *42*, 1894-1903.
- 3) Porter, R.J.; Kupferberg, H.J. The anticonvulsant screening program of the national institute of neurological disorders and stroke, nih: History and contributions to clinical care in the twentieth century and beyond. *Neurochemical research* **2017**, *42*, 1889-1893.
- 4) Scharfman, H.E.; Galanopoulou, A.S.; French, J.A.; Pitkanen, A.; Whittemore, V.; Harte-Hargrove, L.C. Preclinical common data elements (cdes) for epilepsy: A joint ilae/aes and ninds translational initiative. *Epilepsia open* **2018**, *3*, 9-12.
- 5) Harte-Hargrove, L.C.; Galanopoulou, A.S.; French, J.A.; Pitkanen, A.; Whittemore, V.; Scharfman, H.E. Common data elements (cdes) for preclinical epilepsy research: Introduction to cdes and description of core cdes. A task3 report of the ilae/aes joint translational task force. *Epilepsia open* **2018**, *3*, 13-23.
- 6) Mazarati, A.; Jones, N.C.; Galanopoulou, A.S.; Harte-Hargrove, L.C.; Kalynchuk, L.E.; Lenck-Santini, P.P.; Medel-Matus, J.S.; Nehlig, A.; de la Prida, L.M.; Sarkisova, K., *et al.* A companion to the preclinical common data elements on neurobehavioral comorbidities of epilepsy: A report of the task3 behavior working group of the ilae/aes joint translational task force. *Epilepsia open* **2018**, *3*, 24-52.
- 7) Barker-Haliski, M.; Harte-Hargrove, L.C.; Ravizza, T.; Smolders, I.; Xiao, B.; Brandt, C.; Loscher, W. A companion to the preclinical common data elements for pharmacologic studies in animal models of seizures and epilepsy. A report of the task3 pharmacology working group of the ilae/aes joint translational task force. *Epilepsia open* **2018**, *3*, 53-68.
- 8) Gorter, J.A.; van Vliet, E.A.; Dedeurwaerdere, S.; Buchanan, G.F.; Friedman, D.; Borges, K.; Grabenstatter, H.; Lukasiuk, K.; Scharfman, H.E.; Nehlig, A. A companion to the preclinical common data elements for physiologic data in rodent epilepsy models. A report of the task3 physiology working group of the ilae/aes joint

- translational task force. *Epilepsia open* **2018**, *3*, 69-89.
- 9) Ono, T.; Wagenaar, J.; Giorgi, F.S.; Fabera, P.; Hanaya, R.; Jefferys, J.; Moyer, J.T.; Harte-Hargrove, L.C.; Galanopoulou, A.S. A companion to the preclinical common data elements and case report forms for rodent eeg studies. A report of the task3 eeg working group of the ilae/aes joint translational task force. *Epilepsia open* **2018**, *3*, 90-103.
 - 10) Coenen, A.M.; Van Luijtelaaar, E.L. Genetic animal models for absence epilepsy: A review of the wag/rij strain of rats. *Behav Genet* **2003**, *33*, 635-655.
 - 11) Zhu, G.; Okada, M.; Yoshida, S.; Ueno, S.; Mori, F.; Takahara, T.; Saito, R.; Miura, Y.; Kishi, A.; Tomiyama, M., *et al.* Rats harboring s284l chrna4 mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic gabaergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2008**, *28*, 12465-12476.
 - 12) Okada, M.; Zhu, G.; Yoshida, S.; Kaneko, S. Validation criteria for genetic animal models of epilepsy. *The European journal of neuroscience* **2010**, *3*, 109-120.
 - 13) Yamamura, S.; Hoshikawa, M.; Dai, K.; Saito, H.; Suzuki, N.; Niwa, O.; Okada, M. Ono-2506 inhibits spike-wave discharges in a genetic animal model without affecting traditional convulsive tests via gliotransmission regulation. *British journal of pharmacology* **2013**, *168*, 1088-1100.
 - 14) Okada, M. Can rodent models manifest pathomechanisms of genetic epilepsy? *British journal of pharmacology* **2021**.
 - 15) Okada, M.; Kaneko, S.; Hirano, T.; Ishida, M.; Kondo, T.; Otani, K.; Fukushima, Y. Effects of zonisamide on extracellular levels of monoamine and its metabolite, and on ca2+ dependent dopamine release. *Epilepsy research* **1992**, *13*, 113-119.
 - 16) Okada, M.; Kaneko, S.; Hirano, T.; Mizuno, K.; Kondo, T.; Otani, K.; Fukushima, Y. Effects of zonisamide on dopaminergic system. *Epilepsy research* **1995**, *22*, 193-205.
 - 17) Okada, M.; Kawata, Y.; Mizuno, K.; Wada, K.; Kondo, T.; Kaneko, S. Interaction between ca2+, k+, carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode. *British journal of pharmacology* **1998**, *124*, 1277-1285.
 - 18) Kawata, Y.; Okada, M.; Murakami, T.; Mizuno, K.; Wada, K.; Kondo, T.; Kaneko, S. Effects of zonisamide on k+ and ca2+ evoked release of monoamine as well as k+ evoked intracellular ca2+ mobilization in rat hippocampus. *Epilepsy research* **1999**, *35*, 173-182.
 - 19) Okada, M.; Hirano, T.; Kawata, Y.; Murakami, T.; Wada, K.; Mizuno, K.; Kondo, T.; Kaneko, S. Biphasic effects of zonisamide on serotonergic system in rat hippocampus. *Epilepsy research* **1999**, *34*, 187-197.
 - 20) Zhu, G.; Okada, M.; Murakami, T.; Kawata, Y.; Kamata, A.; Kaneko, S. Interaction between carbamazepine, zonisamide and voltage-sensitive ca2+ channel on acetylcholine release in rat frontal cortex. *Epilepsy research* **2002**, *49*, 49-60.
 - 21) Yoshida, S.; Okada, M.; Zhu, G.; Kaneko, S. Effects of zonisamide on neurotransmitter exocytosis associated with ryanodine receptors. *Epilepsy research* **2005**, *67*, 153-162.
 - 22) Buoli, M.; Grassi, S.; Ciappolino, V.; Serati, M.; Altamura, A.C. The use of zonisamide for the treatment of psychiatric disorders: A systematic review. *Clinical neuropsychopharmacology* **2017**, *40*, 85-92.
 - 23) Kaneko, S.; Okada, M.; Hirano, T.; Kondo, T.; Otani, K.; Fukushima, Y. Carbamazepine and zonisamide increase extracellular dopamine and serotonin levels in vivo, and carbamazepine does not antagonize adenosine effect in vitro: Mechanisms of blockade of seizure spread. *The Japanese journal of psychiatry and neurology*

- 1993, 47, 371-373.
- 24) Okada, M.; Hirano, T.; Mizuno, K.; Chiba, T.; Kawata, Y.; Kiryu, K.; Wada, K.; Tasaki, H.; Kaneko, S. Biphasic effects of carbamazepine on the dopaminergic system in rat striatum and hippocampus. *Epilepsy research* **1997**, 28, 143-153.
 - 25) Yamamura, S.; Saito, H.; Suzuki, N.; Kashimoto, S.; Hamaguchi, T.; Ohoyama, K.; Suzuki, D.; Kanehara, S.; Nakagawa, M.; Shiroyama, T., *et al.* Effects of zonisamide on neurotransmitter release associated with inositol triphosphate receptors. *Neuroscience letters* **2009**, 454, 91-96.
 - 26) Murakami, T.; Okada, M.; Kawata, Y.; Zhu, G.; Kamata, A.; Kaneko, S. Determination of effects of antiepileptic drugs on snares-mediated hippocampal monoamine release using in vivo microdialysis. *British journal of pharmacology* **2001**, 134, 507-520.
 - 27) Okada, M.; Zhu, G.; Yoshida, S.; Kanai, K.; Hirose, S.; Kaneko, S. Exocytosis mechanism as a new targeting site for mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Life sciences* **2002**, 72, 465-473.
 - 28) Yamamura, S.; Ohoyama, K.; Nagase, H.; Okada, M. Zonisamide enhances delta receptor-associated neurotransmitter release in striato-pallidal pathway. *Neuropharmacology* **2009**, 57, 322-331.
 - 29) Fukuyama, K.; Tanahashi, S.; Hoshikawa, M.; Shinagawa, R.; Okada, M. Zonisamide regulates basal ganglia transmission via astroglial kynurenine pathway. *Neuropharmacology* **2014**, 76 Pt A, 137-145.
 - 30) Okada, M.; Kiryu, K.; Kawata, Y.; Mizuno, K.; Wada, K.; Tasaki, H.; Kaneko, S. Determination of the effects of caffeine and carbamazepine on striatal dopamine release by in vivo microdialysis. *European journal of pharmacology* **1997**, 321, 181-188.
 - 31) Okada, M.; Hirano, T.; Mizuno, K.; Kawata, Y.; Wada, K.; Murakami, T.; Tasaki, H.; Kaneko, S. Effects of carbamazepine on hippocampal serotonergic system. *Epilepsy research* **1998**, 31, 187-198.
 - 32) Okada, M.; Fukuyama, K.; Shiroyama, T.; Ueda, Y. Carbamazepine attenuates astroglial l-glutamate release induced by pro-inflammatory cytokines via chronically activation of adenosine a2a receptor. *International journal of molecular sciences* **2019**, 20.
 - 33) Ochoa-Cortes, F.; Linan-Rico, A.; Jacobson, K.A.; Christofi, F.L. Potential for developing purinergic drugs for gastrointestinal diseases. *Inflammatory bowel diseases* **2014**, 20, 1259-1287.
 - 34) Kawata, Y.; Okada, M.; Murakami, T.; Kamata, A.; Zhu, G.; Kaneko, S. Pharmacological discrimination between effects of carbamazepine on hippocampal basal, ca (2+) - and k (+) -evoked serotonin release. *British journal of pharmacology* **2001**, 133, 557-567.
 - 35) Yamamura, S.; Hamaguchi, T.; Ohoyama, K.; Sugiura, Y.; Suzuki, D.; Kanehara, S.; Nakagawa, M.; Motomura, E.; Matsumoto, T.; Tani, H., *et al.* Topiramate and zonisamide prevent paradoxical intoxication induced by carbamazepine and phenytoin. *Epilepsy research* **2009**, 84, 172-186.
 - 36) Fukuyama, K.; Fukuzawa, M.; Okada, M. Upregulated and hyperactivated thalamic connexin 43 plays important roles in pathomechanisms of cognitive impairment and seizure of autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy with s284l-mutant alpha4 subunit of nicotinic ach receptor. *Pharmaceuticals* **2020**, 13.
 - 37) Fukuyama, K.; Fukuzawa, M.; Okubo, R.; Okada, M. Upregulated connexin 43 induced by loss-of-functional s284l-mutant alpha4 subunit of nicotinic ach receptor contributes to pathomechanisms of autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy. *Pharmaceuticals* **2020**, 13.
 - 38) Fukuyama, K.; Ueda, Y.; Okada, M. Effects of carbamazepine, lacosamide and zonisamide on gliotransmitter release associated with activated

- astroglial hemichannels. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*.
- 39) Fukuyama, K.; Fukuzawa, M.; Shiroyama, T.; Okada, M. Pathogenesis and pathophysiology of autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy with s284l-mutant alpha4 subunit of nicotinic ach receptor. *British journal of pharmacology* **2020**, *177*, 2143-2162.
 - 40) Mizuno, K.; Okada, M.; Murakami, T.; Kamata, A.; Zhu, G.; Kawata, Y.; Wada, K.; Kaneko, S. Effects of carbamazepine on acetylcholine release and metabolism. *Epilepsy research* **2000**, *40*, 187-195.
 - 41) Okada, M.; Kaneko, S. Pharmacological interactions between magnesium ion and adenosine on monoaminergic system in the central nervous system. *Magnesium research* **1998**, *11*, 289-305.
 - 42) Tanahashi, S.; Yamamura, S.; Nakagawa, M.; Motomura, E.; Okada, M. Effect of lamotrigine and carbamazepine on corticotropin-releasing factor-associated serotonergic transmission in rat dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology* **2012**, *220*, 599-610.
 - 43) Nakatsu, F.; Okada, M.; Mori, F.; Kumazawa, N.; Iwasa, H.; Zhu, G.; Kasagi, Y.; Kamiya, H.; Harada, A.; Nishimura, K., *et al.* Defective function of gaba-containing synaptic vesicles in mice lacking the ap-3b clathrin adaptor. *The Journal of cell biology* **2004**, *167*, 293-302.
 - 44) Zhu, G.; Yoshida, S.; Migita, K.; Yamada, J.; Mori, F.; Tomiyama, M.; Wakabayashi, K.; Kanematsu, T.; Hirata, M.; Kaneko, S., *et al.* Dysfunction of extrasynaptic gabaergic transmission in phospholipase c-related, but catalytically inactive protein 1 knockout mice is associated with an epilepsy phenotype. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2012**, *340*, 520-528.
 - 45) Saito, Y.; Inoue, T.; Zhu, G.; Kimura, N.; Okada, M.; Nishimura, M.; Kimura, N.; Murayama, S.; Kaneko, S.; Shigemoto, R., *et al.* Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: A potential molecular link between epileptic seizures and abeta generation in alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration* **2012**, *7*, 50.
 - 46) Saito, H.; Okada, M.; Miki, T.; Wakamori, M.; Futatsugi, A.; Mori, Y.; Mikoshiba, K.; Suzuki, N. Knockdown of cav2.1 calcium channels is sufficient to induce neurological disorders observed in natural occurring cacnala mutants in mice. *Biochemical and biophysical research communications* **2009**, *390*, 1029-1033.
 - 47) Yamada, J.; Zhu, G.; Okada, M.; Hirose, S.; Yoshida, S.; Shiba, Y.; Migita, K.; Mori, F.; Sugawara, T.; Chen, L., *et al.* A novel prophylactic effect of furosemide treatment on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (adnfl). *Epilepsy research* **2013**, *107*, 127-137.
 - 48) Shiba, Y.; Mori, F.; Yamada, J.; Migita, K.; Nikaido, Y.; Wakabayashi, K.; Kaneko, S.; Okada, M.; Hirose, S.; Ueno, S. Spontaneous epileptic seizures in transgenic rats harboring a human adnfl missense mutation in the beta2-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience research* **2015**, *100*, 46-54.
 - 49) Fukuyama, K.; Fukuzawa, M.; Shiroyama, T.; Okada, M. Pathomechanism of nocturnal paroxysmal dystonia in autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy with s284l-mutant alpha4 subunit of nicotinic ach receptor. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2020**, *126*, 110070.
 - 50) Fukuyama, K.; Okada, M. Age-dependent and sleep/seizure-induced pathomechanisms of autosomal dominant sleep-related hypermotor epilepsy. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*.
 - 51) Onat, F. Astrocytes and absence epilepsy. *British journal of pharmacology* **2013**, *168*, 1086-1087.
 - 52) Panet, R.; Eliash, M.; Atlan, H. Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter activates map-kinase cascade downstream to protein kinase c, and upstream to mek. *J Cell Physiol* **2006**, *206*, 578-585.
 - 53) Klaassen, A.; Glykys, J.; Maguire, J.; Labarca, C.;

- Mody, I.; Boulter, J. Seizures and enhanced cortical gabaergic inhibition in two mouse models of human autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 19152-19157.
- 54) Teper, Y.; Whyte, D.; Cahir, E.; Lester, H.A.; Grady, S.R.; Marks, M.J.; Cohen, B.N.; Fonck, C.; McClure-Begley, T.; McIntosh, J.M., *et al.* Nicotine-induced dystonic arousal complex in a mouse line harboring a human autosomal-dominant nocturnal frontal lobe epilepsy mutation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2007**, *27*, 10128-10142.
- 55) Xu, J.; Cohen, B.N.; Zhu, Y.; Dzieczapolski, G.; Panda, S.; Lester, H.A.; Heinemann, S.F.; Contractor, A. Altered activity-rest patterns in mice with a human autosomal-dominant nocturnal frontal lobe epilepsy mutation in the beta2 nicotinic receptor. *Molecular psychiatry* **2011**, *16*, 1048-1061.
- 56) O'Neill, H.C.; Laverty, D.C.; Patzlaff, N.E.; Cohen, B.N.; Fonck, C.; McKinney, S.; McIntosh, J.M.; Lindstrom, J.M.; Lester, H.A.; Grady, S.R., *et al.* Mice expressing the adnfl valine 287 leucine mutation of the beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit display increased sensitivity to acute nicotine administration and altered presynaptic nicotinic receptor function. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **2013**, *103*, 603-621.
- 57) Ishida, S.; Picard, F.; Rudolf, G.; Noe, E.; Achaz, G.; Thomas, P.; Genton, P.; Mundwiller, E.; Wolff, M.; Marescaux, C., *et al.* Mutations of depdc5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat Genet* **2013**, *45*, 552-555.
- 58) Baldassari, S.; Licchetta, L.; Tinuper, P.; Bisulli, F.; Pippucci, T. Gator1 complex: The common genetic actor in focal epilepsies. *J Med Genet* **2016**, *53*, 503-510.
- 59) Boillot, M.; Baulac, S. Genetic models of focal epilepsies. *Journal of neuroscience methods* **2016**, *260*, 132-143.
- 60) Okada, M.; Oka, T.; Nakamoto, M.; Fukuyama, K.; Shiroyama, T. Astroglial connexin43 as a potential target for a mood stabiliser. *International journal of molecular sciences* **2020**, *22*.
- 61) Okada, M.; Fukuyama, K.; Shiroyama, T.; Murata, M. A working hypothesis regarding identical pathomechanisms between clinical efficacy and adverse reaction of clozapine via the activation of connexin43. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*.
- 62) Okada, M.; Kawano, Y.; Fukuyama, K.; Motomura, E.; Shiroyama, T. Candidate strategies for development of a rapid-acting antidepressant class that does not result in neuropsychiatric adverse effects: Prevention of ketamine-induced neuropsychiatric adverse reactions. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*.

Summary

Exploring pathomechanisms of epilepsy using post hoc pharmacodynamic study and genetic animal models.

Motohiro Okada

In the past three decades, we have identified several functional abnormalities of epilepsy through pharmacodynamic and molecular biological studies. To standarize the preclinical demonstrations, reliability and validation criteria have been proposed. However, the validation criteria should be improved according to the elucidation of pathomechanisms of epilepsy syndromes. This report introduces the historical interaction between post hoc pharmacodynamic study and molecular biological study on exploring of pathomechanisms of epilepsy and validation criteria of epilepsy, including face, constructive and predictive criteria.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2021 ; 32 : 17-26