

—— 研究功労賞受賞記念講演 ——

## てんかん原性の神経機序を求めて

丸 栄 一

要旨：てんかん基礎研究の最終的な目標は、てんかん原性の神経機序を明らかにすることである。これまでてんかん原性の獲得要因に関して多くの仮説が提唱されてきたが、てんかん原性の獲得された全ての個体にその存在が認められ、その要因が存在すれば必ずてんかんが発症するという必須のてんかん原性獲得要因は存在しなかった。しかし、それらの要因は「てんかん原性ネットワーク」と呼ぶべき動的ネットワークを構成して、複雑に相互作用をしながらてんかん原性の獲得を駆動している。このてんかん原性ネットワークの特徴の一つは、その要因群の一部が胎児期・新生児期の神経活動に戻ろうとする傾向（幼態退行：immature regression）を示していることである。てんかん神経機構の全体を正確に理解するには、この幼態退行を手がかりにてんかん原性ネットワークのシステム生物学的解析を進める必要がある。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2024；35：1-8

**Key Words：** てんかん原性、苔状線維発芽、GABA<sub>A</sub> シナプス興奮、  
てんかん原性ネットワーク、幼態退行。

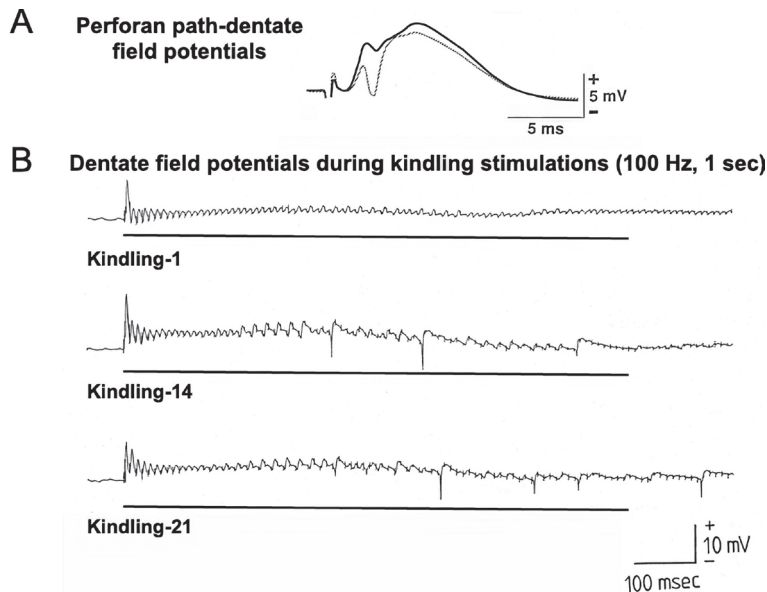
### はじめに

てんかん基礎研究の最終目標はてんかん原性の神経機序、すなわちてんかん発症の原因と発症に至る過程を解明することである。これまで半世紀以上にわたって、これこそがてんかん原性の主要因であろうと数多くの仮説が提唱されてきた。しかし、現在に至ってもわれわれはてんかん原性の獲得に必要なかつ十分な要因を決定することができていない。したがって、われわれのグループが進めてきた研究と他の研究グループの研究成果を辿りながら、「てんかん原性獲得に必須の要因はなぜ捉えがたいのか」を考えてみたい。

1970年代からこれまでに、てんかん原性獲得の主要因として60以上の仮説が提唱されてきたが、これまでのところ、てんかん原性獲得に必須の要因であると判定できるものは存在しなかった。紙幅の都合上、すべての検証例を示すのは不可能なので、次に4つの重要な仮説をとりあげて、その検証過程を説明したい。

### 1. てんかん原性の獲得に必須の要因は存在するのか？

(1) 長期シナプス伝達増強 (LTP/KIP) 仮説  
【仮説】海馬キンドリングの作成に伴って、長期シナプス伝達増強 (long-term potentiation: LTP) と類似のシナプス伝達増強 (kindling-induced synaptic potentiation: KIP) が観察される (Fig. 1A)。1日1回3週間のキンドリング期間中、KIPは累積的に増強を続け、キンドリング手続きを停止しても3週間以上にわたり異常に高いシナプス伝達効率の増強が保たれていた<sup>1)</sup>。KIPの累積的な増強と同時に、交連性 GABA<sub>A</sub> シナプス抑制も長期期的に増強し、顆粒細胞の興奮性はキンドリング期間中減少し続けた。しかし、どちらの変化もキンドリング手続きを停止して3週間以内にキンドリング前のレベルに戻った<sup>2, 3)</sup>。キンドリングに伴うこれらの変化の中で、KIPだけが数ヶ月以上にわたって維持されていたことから、KIPこそがキンドリングてんかん原性獲得の主要因であろう



**Fig. 1** キンドリングによる興奮性シナプス電位の長期増強

A: 歯状回顆粒細胞のキンドリング前の単シナプス性電場電位 (破線波形) とキンドリングによるEPSPの長期増強 (Kindling-induced synaptic potentiation: KIP, 実線波形)。B: Perforant pathへのキンドリング刺激 (100Hz, 1sec) 中の顆粒細胞電場電位の変化。刺激中, KIPは急激に振幅低下して消失した。その直後に発作が発生する。

という仮説を提唱した<sup>5)</sup>。

【検証】①毎日1回, 20日間, 発作波を誘発しない刺激強度で嗅内皮質をテタヌス刺激して歯状回LTPを誘発し続けても, 発作波の発生やキンドリング現象は観察できなかったと報告された<sup>5)</sup>。この結果は, LTPがてんかん原性の獲得を強く促進するとしても, その主要因ではないことを示唆している。

②Perforant path (PP) へのキンドリング刺激 (100Hz, 1秒間) 中に, 歯状回顆粒細胞のKIPがどのように変化するかを検討した。初回キンドリングにより誘発されたKIPは, その後のキンドリング刺激中, パルス列の2発目以降に振幅が急速に低下して発作発生前に消失した (Fig. 1B)<sup>6)</sup>。

したがって, これら2つの研究結果は, LTPとKIPがてんかん原性の獲得に必須の要因ではないことを示している。

## (2) GABA<sub>A</sub>シナプス興奮仮説

【仮説】齧歯類の胎児期から生後10日頃まで,

GABA<sub>A</sub>受容体チャネルの賦活は幼若ニューロンに興奮 (脱分極) を引き起こす。幼若ニューロンでは, 細胞膜上のNKCC1共役輸送体がNa<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>の細胞内流入に伴ってCl<sup>-</sup>を細胞内に取り込むため, 細胞内Cl<sup>-</sup>濃度は高い状態に保たれている。このとき, GABA<sub>A</sub>受容体チャネルが開くと, 細胞内のCl<sup>-</sup>は細胞外に流出して脱分極 (GABA性興奮) を引き起こす。ニューロンが成長するにつれNKCC1の発現は低下して, 細胞内のK<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>を細胞外に排出するKCC2と呼ばれる共役輸送体が発現するようになる。KCC2により細胞内Cl<sup>-</sup>濃度はCl<sup>-</sup>平衡電位よりも低くなっているため, GABA<sub>A</sub>チャネルが開くと, 細胞外からCl<sup>-</sup>が細胞内に流入して過分極 (抑制) が起こる。

Riveraらは, 成体マウスの海馬キンドリングに伴い海馬のKCC2発現が長期的に低下することから, GABA<sub>A</sub>シナプス興奮仮説を提唱した<sup>7)</sup>。その後, 側頭葉てんかん患者の海馬切除組織でもKCC2 mRNAの有意な低下とNKCC1 mRNAの有意な上昇が認められた<sup>8)</sup>。さらに, われわ

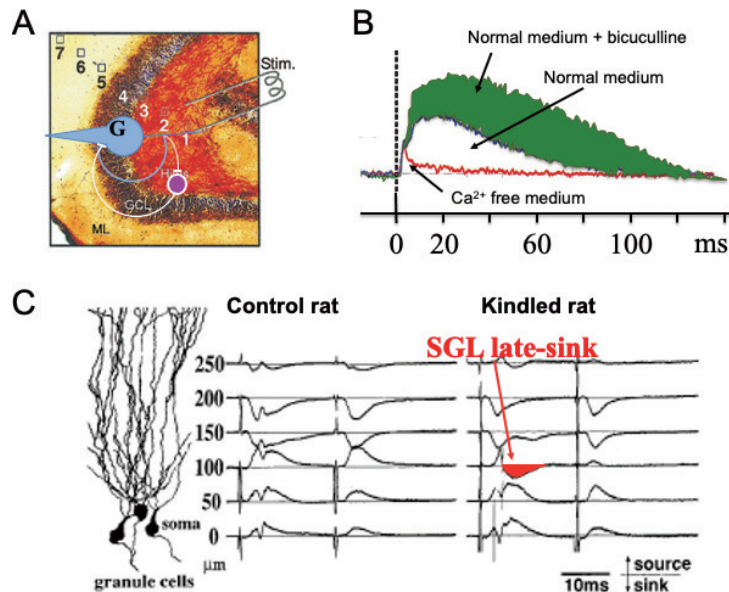


Fig. 2 苔状線維発芽 (mossy fiber sprouting) による反回性興奮循環の検討

A: “G”は歯状回顆粒細胞を、ピンクの丸はGABA性介在細胞を示す。電圧感受性色素による光学的電位計測位置は1-7の□で示される。“Stim”は顆粒細胞軸索刺激の電極位置を示す。B: 計測位置4で記録された逆行性刺激による電位変化を示す。赤トレースはCa<sup>2+</sup>除去灌流液で記録された逆行性電位を、青トレースは標準灌流液中で記録された反回性集合EPSPを、緑領域はbicucullineによる脱抑制で現れた反回性GABA抑制の領域である。C: 電流源密度解析法を用いてPerforant path刺激に対する歯状回電流の変化を検討した。キンドリング・ラットでは苔状線維発芽によるとと思われる単シナプス性EPSC (SGL late-sink) が誘発されるが、この興奮は循環しなかった。

れは遺伝子突然変異による自然発症てんかんラット (SER) の海馬CA3錐体細胞群でもKCC2の著しい発現低下を認めた<sup>9)</sup>。

【検証】Karlócai MRらは、側頭葉てんかん患者の海馬切除組織におけるKCC2の発現を免疫組織学的に検討した<sup>10)</sup>。彼らは、海馬硬化のある組織ではKCC2の発現に有意な変化はないが、海馬硬化のない組織ではKCC2の発現が有意に上昇していることを見出した。

したがって、KCC2の発現低下によるGABA<sub>A</sub>シナプス興奮は、てんかん原性が獲得された全ての脳組織で認められるわけではなく、てんかん原性獲得の必須の要因とは認められない。

### (3) 苔状線維発芽 (mossy fiber sprouting: MFS) による興奮循環仮説

【仮説】カイニン酸てんかんラットやキンドリング・ラットにおいて、歯状回顆粒細胞の軸索 (MF) が側枝発芽を起こし、自らの樹状突起起

始部に興奮性シナプス結合すると報告された。このMFSは反回性の興奮循環を引き起こして、てんかん原性獲得の重要な要因になると主張された<sup>11, 12)</sup>。

【検証】①ラット海馬内へのカイニン酸注入によりカイニン酸てんかんモデルを作成できるが、このカイニン酸注入と同時にタンパク合成阻害薬 (cycloheximide) を海馬内に注入してMFSを阻害しても、てんかん原性獲得の程度には有意な差はなかったという<sup>13)</sup>。

②MFSによる反回性興奮循環の有無を検討するため、カイニン酸てんかんラットの歯状回全域の電位変化を光学的計測法により観察した<sup>14)</sup>。顆粒細胞の軸索を逆行性に刺激すると (Fig. 2A), 3msをピークとする逆行性集合活動電位 (Fig. 2B, 赤色トレース) とMFSを介した反回性集合EPSP (Fig. 2B, 青色トレース) が誘発される。この反回性集合EPSPの振幅は、刺激後18msをピークに140msまで単調減少して反回

性興奮循環は認められなかった。すなわち、MF逆行性刺激は反回性シナプス回路を介して1回の興奮を引き起こすが興奮循環を引き起こすことはなかった。さらに、標準灌流液にbicucullineを加えてGABA<sub>A</sub>シナプス抑制を阻害すると、反回性集合EPSPの振幅は脱抑制により2倍以上に上昇した(Fig. 2B, 緑色部分)。この結果は、MFSが顆粒細胞樹状突起に単シナプス結合するばかりでなく、GABA性介在ニューロンにもシナプス結合して、顆粒細胞の興奮循環を抑制していることを示唆している。

③PPキンドリング・ラットを用いて、MFSによる顆粒細胞興奮循環の可能性を電流源密度解析法により検討した<sup>15)</sup>。ラット歯状回に先端間隔が50 $\mu$ mの多極微小電極を植え込み、電流源密度解析法を用いて顆粒細胞層から樹状突起層先端までの6部位の電流変化データを得た(Fig. 2C)。コントロール・ラットの顆粒細胞樹状突起起始部(SGL)ではPP刺激により誘発されたEPSCの受動的な吹き出し電流(source current)が観察された。これに対して、PPキンドリング・ラットのSGLではMFSによると思われるEPSCが誘発された(Fig. 2C, SGL late-sink)。しかし、そのEPSCの発生は一度だけで興奮の循環は認められなかった。

以上の結果は、MFSがてんかん原性の獲得に必須の要因ではないことを示している。

#### (4) アストロサイト spatial K<sup>+</sup> buffering機構の障害仮説

【仮説】1発の活動電位発生により細胞膜の近傍(約400Å以内)ではK<sup>+</sup>濃度が1mMほど上昇する。通常の活動電位発生による細胞外K<sup>+</sup>濃度の上昇はNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ポンプにより直ちに正常に戻る。しかし、高頻度発射が持続したり発作電気活動が発生すると細胞外K<sup>+</sup>濃度は25mMを越えてNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ポンプだけでは対処できない。この状態では、アストロサイトによるspatial K<sup>+</sup> buffering機構が働いて細胞外K<sup>+</sup>濃度の上昇を速やかに低下させる。この緩衝機構では、アストロサイトは、K<sup>+</sup>チャネル(Kir4.1)を介して多量の細胞外K<sup>+</sup>を細胞内に取込み、アストロサイト網を使って細胞外K<sup>+</sup>濃度の低い領域に

排出する。

側頭葉てんかん患者の海馬切除組織ではコントロールに比べてKir4.1チャネルの発現が半分ほどに低下していると報告され<sup>16)</sup>、このKir4.1チャネルの低下による細胞外K<sup>+</sup>濃度の異常な上昇こそてんかん発症の原因ではないかと注目された。

【検証】Heuserらは、側頭葉患者の海馬切除組織を海馬硬化の有無に分けて、Kir4.1チャネルの発現量を免疫組織染色により比較検討した<sup>17)</sup>。コントロールは、神経障害のない患者の死後直後に切除された海馬組織である。Fig. 3Bは、報告された数値データ(table 3)<sup>17)</sup>の一部を散布図にしたものである。コントロール組織のKir4.1発現量(Fig. 3B, 緑丸)と比べて、海馬硬化のある組織ではKir4.1発現量(Fig. 3B, 赤丸)はCA1でも歯状回hilusでも有意に低下している。しかし、海馬硬化のない組織でのKir4.1発現量(Fig. 3B, 青丸)はコントロール組織と有意な差は認められなかった。

したがって、側頭葉てんかんにおけるKir4.1の発現低下は、海馬硬化と密接な関係があるとしても、てんかん原性獲得における必須の要因ではないといえる。

以上、4つのてんかん原性獲得要因に関する仮説を詳しく検討したが、どれもてんかん原性の獲得に必須の要因ではないと判断された。以上の検討と同様の方法でこれまで60以上のてんかん原性獲得要因を検討してきたが、てんかん原性の獲得された全ての個体にその存在が認められ、その要因が存在すれば必ずてんかん原性が獲得されるという必須のてんかん原性獲得要因は存在しなかった。

## 2. てんかん原性ネットワークの構築の必要性

これまでわれわれは「てんかん原性の獲得に必要な要因は何か」と問いかけてきたが、これは暗にてんかんの発症が決定的な一つの原因によっているということを前提にした問であった。古典物理学や初期分子生物学の成功は、すべての科学において「最終的にsimpleで美しい唯一の解答が存在する」という信念をわれわれ

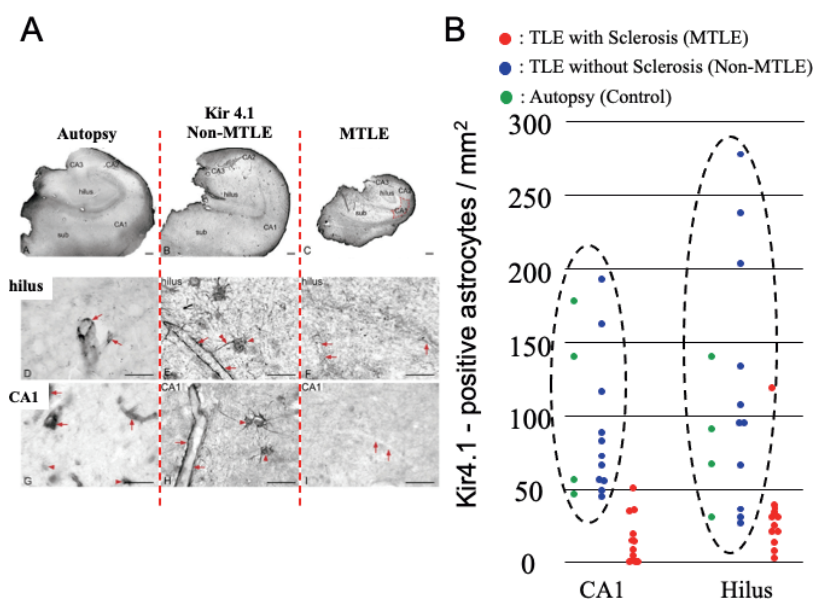


Fig. 3 側頭葉てんかん患者の海馬におけるKir 4.1免疫染色像

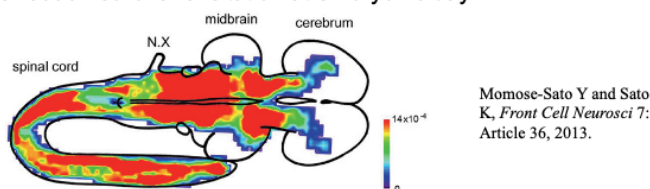
“Autopsy”はコントロール組織を，“MTLE”は海馬硬化のある患者の組織を，“Non-MTLE”は海馬硬化のない患者の組織を示す。A：上段は海馬全域を，中斷は海馬hilusを，下段はCA1野を示す。赤の矢印と矢頭は，それぞれアストロサイトの血管周囲エンドフィートと細胞体のKir 4.1発現を指す。B：コントロール（緑），MTLE（赤），Non-MTLE（青）のKir 4.1発現量（1mm<sup>2</sup>当たりのKir 4.1を発現したアストロサイトの数）を，文献<sup>17)</sup>の表3からグラフ化した。

に与えてきた。しかし，こうした解答の存在する研究課題は少なく，複雑系を対象とする課題の方が圧倒的に多い。てんかんの神経機構もその一つであろう。一人のてんかん患者の脳内では，MFSやGABA性興奮，興奮性シナプス伝達の異常賦活，細胞外K<sup>+</sup>濃度の持続的上昇など複数の要因が同時に引き起こされ，複雑に相互作用をしながらてんかん原性の進行を促進，あるいは抑制しているものと思われる。たとえば，MFSは反回性GABA抑制を増強して歯状回顆粒細胞の興奮循環を抑制しているという研究結果を紹介したが，ここでGABA性介在細胞が抑制性から興奮性に逆転した途端にMFSは顆粒細胞群の激しい興奮循環を引き起こして，強力なてんかん原性促進効果を生むことになる。したがって，われわれはてんかん原性獲得の単独の要因ではなく，多要因から成る動的なネットワーク，すなわちてんかん原性ネットワーク（epileptogenic network）モデルを構築して，シ

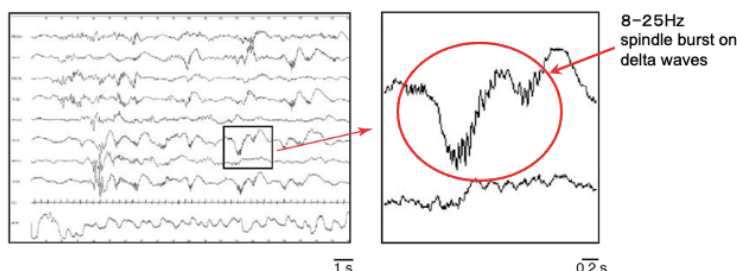
ステム生物学的な解析を進めるべきであろう。

2017年，ILAEのNeurobiology committeeで組織される“Workshop on the neurobiology of epilepsy (WONOEP)”は，てんかんの原因を1つの要因（分子）に求める研究体制を改め，システム生物学的研究戦略に基づくてんかん研究を進めるよう提言した<sup>18)</sup>。このWONOEPの提言は，2017年夏に「てんかんをcomplex diseasesとして理解する」ことを目的に開かれたワークショップの成果をまとめたもので，てんかんのゲノミクスやトランスクリプトームなどのオミクス解析研究（システム生物学的研究）の研究例や有効性を詳細に論じている。しかし，てんかんのシステム生物学的な研究をすすめるには，上述した「てんかん原性ネットワーク」の具体的な構造を部分的にでも正確に決定しなくてはならない。困難さが予想される課題ではあるが，てんかん基礎研究とてんかん診療のつぎのステージに進むためには必須の研究である。

### A Spontaneous neuronal excitation at embryonic day 14



### B Human neonate aged 33 weeks post-conception during quiet sleep



EEG recorded by Kaminska, A. in "Khazipov, R. and Luhmann HJ., *TRENDS in Neurosciences* 29: 414-418, 2006."

**Fig. 4** 胎児期における中枢神経系における過剰興奮

A：電圧感受性色素で計測した胎生14日目のマウス中枢神経活動<sup>20)</sup>。脊髄から脳幹部・間脳にいたる広い領域に赤・黄・緑で示される過剰興奮が広がっている。B：ヒト妊娠33週目の正常胎児の睡眠時新皮質脳波<sup>21)</sup>。8-25Hzのspindle burstが重畳したデルタ波群発が観察される。脳波はDr. A.Kaminskaによって提供されたものである。

てんかん原性ネットワークのシステム解析は容易ではないが、その作動の方向性に関しては1つの手がかりがある。それはてんかん原性促進要因の多くが「胎児期・幼児期の神経活動への退行」と考えられる傾向を持つことである。このてんかん原性促進要因の傾向を「幼態退行 (immature regression)」と呼ぶことにする。

### 3. 「もう一度、やり直させて下さい」仮説

てんかん原性獲得に伴うLTP/KIPの発生は胎児期のgiant EPSPsと類似の電気活動であり、GABA性興奮やMFSもみな幼態退行である。

DNA microarray analysisによって、てんかん原性獲得中に発現する特異的な遺伝子群と発達期に特異的なそれらにはどの程度共通した遺伝子があるのが検討された<sup>19)</sup>。8000以上のDNA塩基配列を検討した結果、成体コントロール・ラットと比較して生後3日目のラット海馬歯状回で特異的に発現制御されていた遺伝子は509個、ピロカルピンてんかんラット (成体) の歯状回で特異的に発現制御されていた遺伝子は

129個であった。この638遺伝子うち、新生児ラットでもピロカルピンてんかんラットでも共通して発現促進されていた遺伝子は14個、共通して発現抑制されていた遺伝子は23個であった。すなわち、てんかん原性獲得期に特異的な遺伝子129個のうち、23個は新生児期に特異的な遺伝子と共通なもので、少なくともこの23個の遺伝子は幼態退行を担っているものと考えられる。

それでは、これら一群のてんかん原性要因は胎児期・新生児期のどのような神経活動状態に戻ろうとしているのであろうか。Fig. 4Aは、胎生13日目のマウス中枢神経系の電気活動を電圧感受性色素で記録したものである<sup>20)</sup>。脊髄から脳幹部・間脳までの広い領域に過剰興奮が発生している。迷走根 (N.X) 近傍の脳幹部は興奮していないように見えるが、この領域が過剰興奮の発生源で、すでに興奮が収まった状態を示している。また、Fig. 4Bは、ヒト妊娠33週目の正常胎児の睡眠時新皮質脳波である。平坦な脳波の合間に、8-25Hzのspindle burstが

重畳したデルタ・ブラッシュ(delta brushes)と呼ばれるデルタ波群発が認められる。これらの記録は、胎児の中枢神経系ではてんかん発作と見間違えるほどの過剰興奮が広域に発生していることを示している。

まとめ：てんかん原性の獲得過程に陥ると、脳はあたかも「もう一度やり直させてください」といっているように思える。

#### 文献

- 1) Maru E. and Goddard VG. Alteration in dentate neuronal activities associated with perforant path kindling : I. Long-term potentiation of excitatory synaptic transmission. *Exp Neurol* 1987, **96** : 19-32.
- 2) Maru E. and Goddard VG. Alteration in dentate neuronal activities associated with perforant path kindling : II. Decrease in granule cell excitability. *Exp Neurol* 1987, **96** : 33-45.
- 3) Maru E. and Goddard VG. Alteration in dentate neuronal activities associated with perforant path kindling : III. Enhancement of synaptic inhibition. *Exp Neurol* 1987, **96** : 46-90.
- 4) Goddard GV. and Maru E. Forces for and against the kindled state as revealed by EEG and field potential analysis in the hippocampal dentate area of perforant path kindled rats. In : Wada JA. Ed. *Kindling 3*. New York : Raven Press, 1986 : 1-16.
- 5) Sutula T. and Steward O. Facilitation of kindling by prior induction of long-term potentiation in the perforant path. *Brain Res* 1987, **420** : 109-117.
- 6) 丸 栄一, I. 神経生理学ー in vivo研究を中心にー, J.A. Wada, 佐藤 光源, 森本清 編著, てんかんの神経機構ーキンドリングによる研究ー, 大阪, 世界保険通信社, 1993 : 11-26.
- 7) Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, et al., BDNF-induced TrkB activation down-regulates the  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporter KCC2 and impairs neuronal  $Cl^-$  extrusion. *J Cell Biol* 2002, **159** : 747-752.
- 8) Palma E, Amici M, Sobrero F, Spinelli G, Di Angelantonio S, Ragozzino D. Anomalous levels of  $Cl^-$  transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. *PNAS* 2006, **103** : 8465-8468.
- 9) 丸 栄一, 洲鎌 秀永, 芝崎 保, てんかんの病態生理ー抑制から発作へー. *神経進歩* 2004, **48** : 917-927.
- 10) Karlocai MR, Wittner L, Tóth K, Maglóczy Z, Katarova Z, Rásonyi G, et. al., Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. *Brain Structure and Function* 2016, **221** : 3601-3615.
- 11) Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 1985, **5** : 1016-1022.
- 12) Stula T, He X-X, Cavazos J, Scott G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 1988, **239** : 1147-1150.
- 13) Longo BM, Mello LEAM. Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. *Epilepsy Res* 1998, **32** : 172-182.
- 14) Otsu Y, Maru E, Ohata H, Takashima I, Kjiwara R, Iijima T. Optical recording study of granule cell activities in the hippocampal dentate gyrus of kainate-treated rats. *J Neurophysiol* 2000, **83** : 2421-2430.
- 15) 大畠久之, 丸 栄一. キンドリングラットの発作波誘発における海馬苔状線維発芽の役割. *日医大誌* 1997, **64** : 154-162.
- 16) Das A, Wallace GC IV, Holmes C, McDowell ML, Smith JA, Marshall JD, et al. Hippocampal tissue of patients with refractory TLE is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience* 2012, **220** : 237-246.
- 17) Heuser K, Eid T, Lauritzen F, Thoren AE,

Vindedal GF, Tauboll E, et al. Loss of perivascular Kir4.1 potassium channels in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012, **71** : 814-825.

- 18) John M. Mahoney JM, Mills JD, Muhlechner A, Noebels J, Potschka H, Simonato M, et al, 2017 WONOEP appraisal : Studying epilepsy as a network disease using systems biology approaches. *Epilepsia* 2019, **60** : 1045-1053.
- 19) Elliott RC, Miles MF, Lowenstein DH. Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. *J Neurosci* 2003, **23** : 2218-2227.
- 20) Yoko Momose-Sato Y, Nakamori T, Sato K. Spontaneous depolarization wave in the mouse embryo : origin and large-scale propagation over the CNS identified with voltage-sensitive dye imaging. *Eur J Neurosci* 2012, **35** : 1230-1241.
- 21) Khazipov R, Luhmann HJ. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *TRENDS in Neurosci* 2006, **29** : 414-418.