

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06751

研究課題名(和文) 海馬硬化症のてんかん原性：神経活動異常と3次元的形態異常の関連

研究課題名(英文) Epileptogenesis in Mesial Temporal Lobe Epilepsy

研究代表者

北浦 弘樹 (Kitaura, Hiroki)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：80401769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：内側側頭葉てんかんでは、臨床的に海馬にてんかん原性があると考えられている。切除された海馬組織における病理組織像には幾つかのパターンがあることが知られているが、これまではこうした病理組織像に対応した異常神経活動を、神経回路レベルで詳細に解析する術がなかった。そのため、てんかん患者の脳手術標本から生体外で異常な神経活動を可視化する手法を確立し、内側側頭葉てんかんの発症メカニズムを検討した。その結果、切除された海馬の中でも、海馬支脚で異常な神経活動が生じていることを見出し、さらに、この異常神経活動にはグリア細胞の機能異常が大きく関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The majority of seizures originate primarily from the hippocampus in patient of Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE). The resected hippocampal tissue often shows severe neuronal loss, a condition referred to as hippocampal sclerosis. Here we investigated epileptiform activities ex vivo using living hippocampal tissue taken from patients with MTLE. Flavoprotein fluorescence imaging and local field potential recordings revealed that epileptiform activities developed from the subiculum. Moreover, physiological and morphological experiments revealed possible impairment of K⁺ clearance in the subiculum affected by HS. Stimulation of mossy fibers induced recurrent trans-synaptic activity in the granule cell layer of the dentate gyrus, suggesting that mossy fiber sprouting in HS also contributes to the epileptogenic mechanism. These results indicate that pathophysiological alterations involving the subiculum and dentate gyrus could be responsible for epileptogenesis in patients with MTLE.

研究分野：神経科学、神経病理学

キーワード：てんかん 海馬 海馬硬化症 Kir4.1 アストロサイト ヒト脳スライス標本 苔状線維 海馬支脚

1. 研究開始当初の背景

てんかんは我が国で 100 万人以上が罹患しているとされる主要な脳神経疾患であり、その発作制御の成否は社会生活上重要な課題である。多くの患者においては投薬でてんかん発作のコントロールが可能であるが、中にはコントロールが難しい難治性てんかんの患者が 2 割程度含まれると言われている。こうした難治性てんかんの中でも主要なものが内側側頭葉てんかん (MTLE) であり、側頭葉内部の海馬からてんかん波が発生することが知られている。

MTLE では手術により原因となっている海馬を切除することで発作を良好に抑制できることが知られているため、臨床的に海馬内にてんかん原性が存在すると考えられている。しかし、臨床的にほぼ類似した難治性てんかんであっても、切除され病理組織学的には決して同一ではなく、ほとんど変化がない症例から著明に神経細胞が脱落した症例まで、幾つかのパターンがあることが理解されてきた。しかし、これまではこうした病理組織像に対応した異常神経活動の差異を、神経回路レベルで詳細に解析する術が存在しなかった。

2. 研究の目的

MTLE では臨床症状や検査所見などが概ね共通することが多く、一括りの症候群として捉えられることも多い。病理組織学的にはいくつかのタイプに分類されるが、最も変化の激しいタイプでも海馬の萎縮、すなわち神経細胞の著明な脱落とグリオーシス (海馬硬化) が見られるのみである。つまり、海馬自体にてんかん原性が内在するという臨床的示唆と病理学的所見には、ある種のパラドクスが存在しているとも考えられよう。

そこで、病理組織学的に様々なバリエーションを持つ実際の内側側頭葉てんかん患者の海馬組織標本において、そのてんかん原性機序を検討すること、さらには、病理組織学的分類に対応したメカニズムの差異が存在するかを検討することを目的とした。

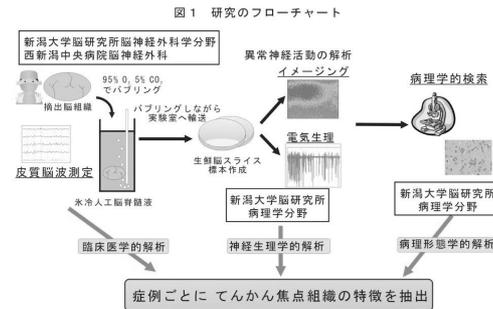
3. 研究の方法

実際のてんかん患者から切除された脳手術標本を用いて、生体外で異常な神経活動を可視化する手法を確立し、内側側頭葉てんかんの発症メカニズムを検討した。組織量が僅少である場合は実験を中止するなど、常に病理診断業務を最優先し、当該業務に影響を及ぼさないように研究を進めた。

切除された脳組織は手術室内で直ちに病理診断用組織と研究用組織に切り分けられ、研究用組織については冰冷人工脳脊髄液に入れられ、95%O₂5%CO₂ でパプリングしながら実験室へ輸送した。実験室において 500 μm 厚の急性スライス標本を作成し、incubate した。記録用チャンバーにスライスを移し、海馬内の各領域を電気刺激した際の

神経活動の広がり、フラビン蛍光イメージング法により動的に画像化して解析した。また、細胞外電位記録を多点から同時に行い、自発発火活動の解析を行った。

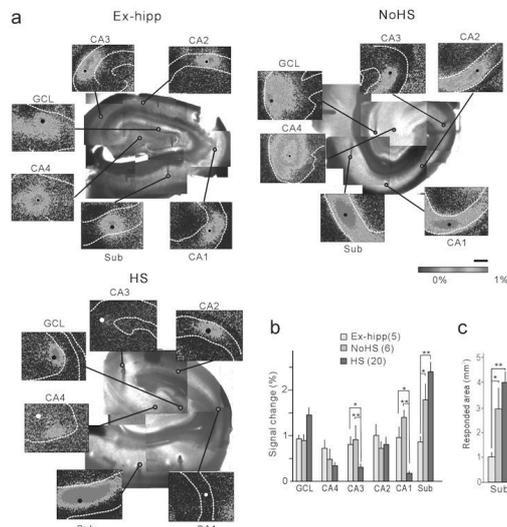
神経活動の解析を終えた後のスライス標本および、スライスを作成した鏡面のブロックからパラフィン包埋標本を作成し、免疫染色を含む病理組織学的解析を行い、生理学的実験の結果と対比して検討を行った (図 1)。



4. 研究成果

対象を 3 群に分けて研究を進めた。1 つ目は Control 群に相当するもので、臨床的に海馬からは明らかな発作起始を認めず、海馬外に primary な発作起始部位が疑われたグループ (Ex-hipp)、2 つ目は臨床的に海馬に発作起始を認める典型的な MTLE であったが病理組織学的にはほとんど異常を認めなかったグループ (MTLE without HS: No-HS)、3 つ目は同様に臨床的に明らかな MTLE であり、病理組織学的にも著明な海馬硬化をみとめたグループ (MTLE with HS: HS) である。

まず各グループにおいて、海馬内の各小領域 (歯状回顆粒細胞層: GCL, CA4, CA3, CA2, CA1, 海馬支脚: Sub) を順に電気刺激して惹起された興奮をフラビン蛍光イメージング法で画像化して定量評価した。その結果、MTLE 群 2 者 (No-HS, HS) とともに MTLE でなかった群 (Ex-hipp) に比べて、海馬支脚 (Sub) での興奮が有意に増強していることが明らかとなった (図 2)。



さらに細胞外電場電位記録による自発放電の解析においては、フラビン蛍光イメージング実験の結果と合致して、やはり MTLLE 群両者において、Sub からの高頻度な自発発火を認めた (図 3a)。さらに No-HS においては Sub のみならず CA1 から自発発火が見られ、それらは Sub の発火にペアリングしていた。しかしながら、より詳細に見てみると、全ての CA1 における発火は Sub からのもに一定の delay を伴って生じており、Sub に primary なてんかん原性が存在していることを伺わせるものであった (図 3b)。

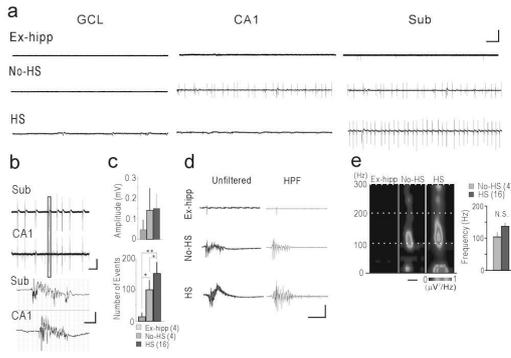


図 3 細胞外電位記録による自発発火解析

また興味深いことに、ここで見られた自発神経活動を周波数解析すると、各イベントにおいて 100Hz 付近の高周波数振動 (HFO) の Spot を、MTLE 群の両者 (No-HS, HS) において、明瞭に認めた (図 3e)。このことは、臨床脳波上 Seizure onset zone のバイオマーカーの一つとして HFO が捕捉されることとよく一致するものである。

そこで、この HFO を有する過剰神経活動がどのようなメカニズムにより引き起こされるのかを調べるために、細胞外 K⁺濃度を段階的に上昇させてその影響を観察した。てんかん重積時には、てんかん焦点脳組織での細胞外 K⁺濃度は 12mM を超えるとされる。そのため、通常の細胞外 K⁺濃度である 3mM から 12mM まで変化させて見た。その結果、通常状態では No-HS, HS とも 100Hz 付近に見られた HFO の Spot が、HS では細胞外 K⁺濃度の上昇に伴って、中心周波数が上昇していく様子が明らかとなった。他方、No-HS においては、このような変化は明らかでなかった (図 4b, c)。

このことは、HS においては細胞外 K⁺のバッファリング機構が障害されていることを示唆するものである。そのため、同機構において重要な役割を果たす K⁺チャネルである Kir4.1 の発現様式を免疫染色にて検討した。その結果、上記神経活動の周波数解析の結果と一致して、HS 群でのみ Sub において、有意にアストロサイト上の Kir4.1 の減少を認めた (図 4d, e)。以上の結果は、内側側頭葉てんかんの患者においては、海馬硬化の有無にかかわらず、Sub において神経活動が増強し

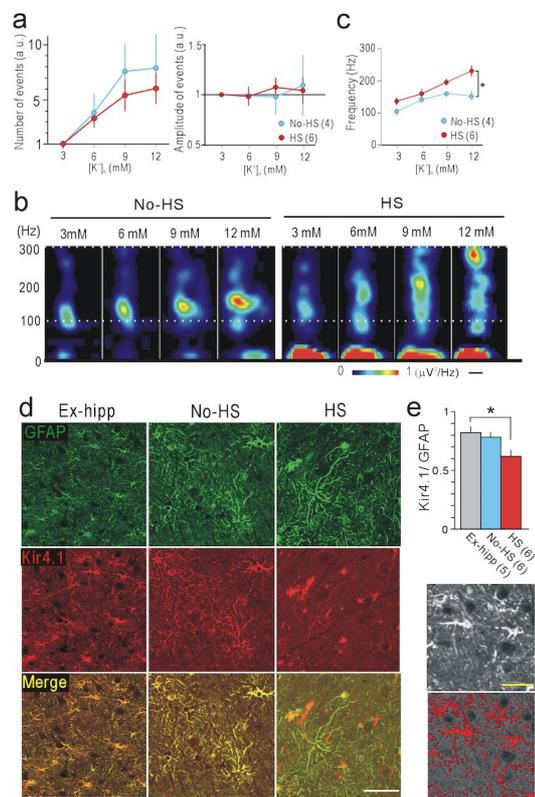


図 4 細胞外 K⁺濃度と HFO

ているものの、HS においてはさらにアストロサイトの K⁺バッファリング機能不全により、てんかん原性が強力に固定化している可能性がある。

さらに HS 群においては、Sub の神経活動増強に加えて、歯状回顆粒細胞層 (GCL) の神経活動亢進もスクリーニング実験で疑われた (図 2)。そのため、この機序をより詳細に調べるために、CA4 領域で mossy fiber を刺激して惹起される神経活動をイメージングおよび電気生理学的に調べた (図 5)。

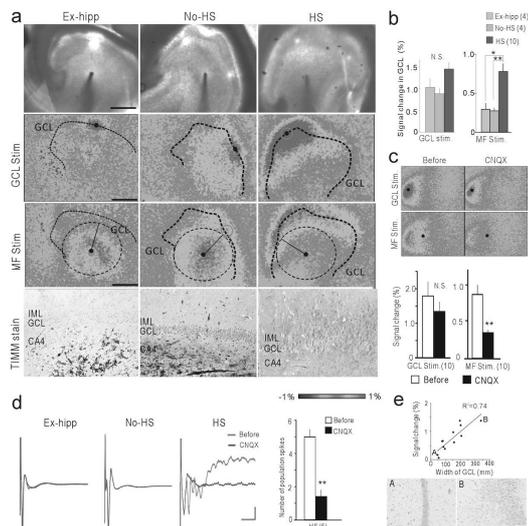


図 5 Mossy fiber 刺激による反応

その結果、やはり HS 群においては、Mossy

fiber 刺激により、逆行性に GCL に神経活動が惹起されることが明らかとなり (図 4 a,b)、しかもその逆行性神経活動はシナプスを經由するものであることが明らかとなった (図 4 c,d)。このことは、従来動物モデルなどで示されている、顆粒細胞の軸索である Mossy fiber が Sprouting を起こして、自己へ再投射することによる反響回路が形成されていることを示唆している。

以上の結果を踏まえると、MTLE では明らかな海馬硬化をきたさない群 (No-HS) においても、すでに Sub においててんかん原性が生じていると思われる。その状態が持続すると、CA1,3,4 の神経細胞脱落をきたすとともに、Sub のアストロサイトにも変化が生じて、強固なてんかん原性が固定化するのではないかと考えられる。さらに、CA4 の神経細胞脱落と Sub の神経活動亢進は歯状回顆粒細胞の Mossy fiber sprouting を招き、さらなるてんかん原性の増悪、固定化をきたすものではないかと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Kitaura H, Shirozu H, Masuda H, Fukuda M, Fujii Y, Kakita A. "Pathophysiological characteristics associated with epileptogenesis in human hippocampal sclerosis.", *EBioMedicine*, 査読有, vol.29, 2018, pp.38-46. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.02.013.
2. Mutoh H, Kitaura H, Kakita A, Saito H. (他 14 名, 7 番目); "Biallelic Variants in CNPY3, Encoding an Endoplasmic Reticulum Chaperone, Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy." *Am J Hum Gen.*, 査読有, vol.102, 2018, pp.321-329. doi:10.1016/j.ajhg.2018.01.004.
3. Suzuki Y, Kitaura H, Kakita A, Nakada T. (他 9 名, 7 番目); "Aquaporin Positron Emission Tomography Differentiates Between Grade III and IV Human Astrocytoma.", *Neurosurgery*, 査読有, vol. 82, 2018, pp.842-846. doi:10.1093/neuros/nyx314.
4. Nakayama Y, Kitaura H, Kakita A, Fukuda M. (他 5 名, 6 番目); "Features of amygdala in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: An MRI volumetric and histopathological study.", *Epilepsy Res*, 査読有, vol.135, 2017, pp.50-55. doi:10.1016/j.epilepsyres.2017.05.010.
5. Kitaura H, Sonoda M, Kakita A. (他 9 名, 1 番目); "Ca²⁺-permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma.", *Epilepsia*, 査読有, vol.58, 2017, pp.59-63. doi: 10.1111/epi.13700.

6. Nakashima M, Kitaura H, Kakita A, Matsumoto N. (他 14 名, 6 番目); "Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb.", *Ann Neurol.*, 査読有, 2015, vol. 78, pp.375-386. doi: 10.1002/ana.24444.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 北浦弘樹他: シンポジウム「グリアのてんかん原性」, 第 51 回日本てんかん学会総会, 2017 年 11 月 4 日, 京都国際会館 (京都府京都市)
2. 北浦弘樹他, 「海馬硬化症の病態病理: 海馬支脚における過剰興奮性とその組織所見との関連」, 第 58 回日本神経病理学会総会, 2017 年 6 月 2 日, 学術総合センター (東京都千代田区)
3. 北浦弘樹他, 「海馬硬化症におけるてんかん原性の病態生理学的解析」, 第 40 回日本てんかん外科学会, 2017 年 1 月 27 日, グランフロント大阪 (大阪府大阪市)
4. 北浦弘樹他, 「海綿状血管腫におけるヘモジデリン沈着とてんかん原性」, 2016 年 6 月 2 日, 第 57 回日本神経病理学会総会, ホテルニューキャッスル (青森県弘前市)
5. 北浦弘樹他, 「ヒト脳スライス標本を用いたてんかん病巣のイメージング解析」, 2016 年 3 月 1 日, 第 5 回新潟脳研-生理研合同シンポジウム, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
6. 北浦弘樹他, "Epileptogenesis in mesial temporal lobe epilepsy: Physiological and histological features.", 2015 年 6 月 3 日, 第 56 回日本神経病理学会総会, 九州大学 100 年講堂 (福岡県福岡市)

〔図書〕(計 1 件)

1. 北浦弘樹、武井延之、中島光子、松本直通、柿田明美: メディカルレビュー社, 「mTOR とてんかん」, 2016 年, pp.97-102.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
プレスリリース
<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/result/p ath/000988.html>
<https://www.niigata-u.ac.jp/news/2018/4 0400/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北浦 弘樹 (Kitaura Hiroki)
新潟大学脳研究所助教

研究者番号：80401769

(2)研究分担者

柿田 明美 (Kakita Akiyoshi)

新潟大学脳研究所教授

研究者番号：80281012