

令和元年6月15日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09617

研究課題名(和文) てんかんの発症年齢と難治性要因の解明：多小脳回症モデルラットを用いた解析

研究課題名(英文) Refractory mechanisms of intractable epilepsy: an experimental analysis of polymicrogyria and clinical approaches

研究代表者

高野 知行 (Takano, Tomoyuki)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80236249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多小脳回症のラットモデルにおけるキンドリングでは多様なけいれん活動が誘発された。また、脳回の異常形成に伴う神経細胞の変性および、その後に生じる軸索伸長の活動性は主として介在神経細胞に観察された。このことから、多小脳回症のけいれん閾値の上昇は、興奮性神経細胞障害によって惹起された介在神経細胞の選択的脆弱性が関与するものと推測された。一方、重症心身障害児者を対象とした難治性てんかんの臨床解析では、発作間欠期脳波における多焦点性発作波の出現頻度が有意に高かった。このことから、高度脳障害に伴う難治性てんかんの病態基盤には、多焦点性のてんかん原生領域の形成が密接に関与するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性てんかんの動物実験モデルを利用した基礎研究と、高度の脳障害を有するてんかん症例を対象とした臨床研究を相互に関連させ、多面的にてんかんの難治性病態の解明を試みた研究課題である。両者の研究結果の考察から、てんかんの難治性病態には病理学的には介在神経細胞の脆弱性による興奮・抑制機構の不均衡が、電気生理学的には脳の広範囲な領域に分布する多焦点性の発作活動の関与が重要な要因であると推測した。

研究成果の概要(英文)：Intraperitoneal pentylenetetrazole injection elicited seizures of variable severity in the polymicrogyria rats (PMG). Neuron degeneration and reactive axonal elongation were significantly and widely distributed in the interneurons of PMG, suggesting that the relatively selective vulnerability of inhibitory interneurons constitutes the basis for the decreased seizure threshold observed in this model of polymicrogyria. In the clinical investigations of patients with severe motor and intellectual disabilities (SMID), an electroencephalogram analysis revealed that multifocal spike discharge was more frequently detected in the profound SMID group than in the non-profound SMID group. Multifocal epileptogenesis was thought to be one of the most characteristic findings in SMID patients, which may be closely associated with a factor involved in the intractability of epilepsy in these patients.

研究分野：小児神経学

キーワード：てんかん 皮質形成異常 多小脳回症 インターニューロン けいれん準備性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮質形成異常のうち多小脳回症は、発生学的には大脳皮質に多数の微小脳回が形成される神経細胞移動障害の一種で、臨床的にはてんかん、知的発達障害および痙性麻痺を主要症候とする。この内、てんかんの合併頻度は約 80%に達すると推定されているが、そのけいれん準備性の基盤となる病態形成過程の多くは不明のままである。一方、多小脳回症が他の皮質形成異常と大きく異なる点は、そのてんかん原性領域が異常脳回自体には存在せず、皮質興奮性は低く、従って外科的な皮質焦点切除術が可能な例は極めてまれであるという点である。この点は、多小脳回症の臨症例において神経病理所見を得ることの困難性の一因ともなっている。このような臨床研究上の制約ゆえに、動物モデルを用いた多小脳回症の病態研究が進められ、その代表的なものが皮質凍結障害モデルと興奮性神経細胞障害モデルである。

凍結障害モデルで提唱されている多小脳回症のけいれん準備性の主な機序は、グルタミン酸受容体分布の変容、イオンチャネル異常、新しい神経ネットワークの形成、GABA_A受容体サブユニット発現の下方制御などであり、これらの根底にある共通する病態変化は「興奮性および抑制性神経連絡の不均衡」である (Takano, Epilepsy Res, 2011)。

2. 研究の目的

以上のような学術的背景をもとに、本研究においてはてんかんの難治性要因を明らかにするため、以下の2項目の解析を行った。

- (1) 実験的解析: 難治性てんかんの成因としての皮質形成異常について、その代表的病型である多小脳回症に対し興奮性神経細胞障害による実験モデルを作成し、けいれん準備性の病理学的基盤を明らかにする。
- (2) 臨床的解析: 極めて難治性で高いてんかん合併率を特徴とする重症心身障害児者を対象にてんかん症例を抽出し、その臨床像の後方視的解析によりてんかん病態の難治性要因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験的解析

実験動物の作成: 新生児ラットの右大脳皮質内に N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のアゴニストであるイボテン酸を接種し、多小脳回症の実験モデルを作成した。同日齢のラットに同容量の Phosphate buffered saline (PBS) を接種した群を対照群、同日齢の無処置ラット群を正常群とした。

Pentylentetrazole (PTZ)によるキンドリング: 生後 15 日目の多小脳回群および対照群の各ラットの腹腔内に、けいれん閾値以下の PTZ 30mg/kg を生後 20 日目までの 6 日間連続で接種した。正常群に対しては同様な方法で同容量の生食水を接種した。各接種後 30 分間の行動様態をビデオレコーダーに記録し、Racine スケールを用いてけいれんの活動性をスコアリングした。

Growth-associated protein 43 (GAP43) 発現細胞の解析: 発達期および障害時の軸索伸長マーカーとしての GAP43 の発現が、興奮性または抑制性神経細胞のいずれかに優位な発現を示すかを明らかにするため、錐体細胞のマーカーとして Non-phosphorylated neurofilament 抗体を、抑制性の介在神経細胞のマーカーとして Parvalbumin 抗体を用いた 2 重免疫染色により解析を行なった。

Fluoro-Jade B (FJB)陽性細胞の解析: イボテン酸により惹起される興奮性の神経細胞障害の分布領域を解析するため、3 群に対して FJB 染色を行なった。

(2) 臨床的解析

対象: びわこ学園医療福祉センター野洲に長期入所中の 130 名を対象とした。対象の入所期間は 1~56 年で、全例が重度の知的または身体障害を有している。

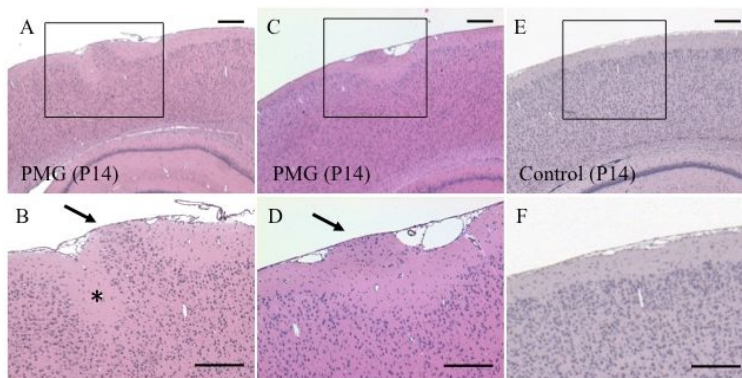
方法: 重症度区分は大島分類 (区分 1~25) を用い、区分 1~4 を重度障害群 (Profound SMID: severe motor and intellectual disability)、区分 5 以上を準重度障害群 (Less-profound SMID) とした。てんかん症例の病因分類、発作型、病型分類は ILAE (International League Against Epilepsy) の 2017 年委員会報告を基準にした。すべての臨床項目 (性、年齢、病因、大島分類区分、てんかん病態) は診療録から入手し、後方視的に解析した。

4. 研究成果

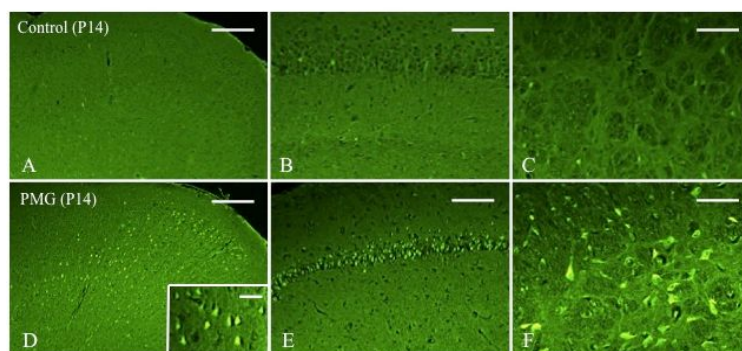
(1) 実験的解析

イボテン酸による微小脳回の形成は生後 14 日目には明確に認められ、分子層に異所性神経細胞の集団を伴っていた。皮質第 IV から VI 層には病理学的変化は観察されなかった (図 1)。PTZ の腹腔内投与によるキンドリングでは、正常群および対照群にはけいれんは惹起されなかったが、多小脳回群では Racine スケール値の有意な上昇とともに多様なけいれん活動が誘発された。FJB 陽性の変性神経細胞は正常および対照群では観察されず、多小脳回群では前頭頭頂部、海馬、線条体などに広範囲な分布が認められた。これらの FJB 陽性細胞の多くは小型で類円形または紡錘形を呈し、形態学的には介在神経細胞と推定された (図 2)。また、GAP43 陽性細胞は、正常群および対照群に比して多小脳回群において有意な発現上昇が認められた。これら陽性細胞

は大脳皮質および白質の広範囲な領域に分布し、多くは Parvalbumin 陽性の介在神経細胞に観察された。これらの結果から、多小脳回症のけいれん閾値の上昇は、興奮性神経細胞障害によって惹起された介在神経細胞の選択的脆弱性が関与するものと推測された。



(図1) 多小脳回群 (PMG) および対照群 (Control) の生後 14 日目 (P14) の組織所見 (ヘマトキシリン・エオジン染色)。A, C, E の正方形の各拡大図を下段 (順に B, D, F) に示した。微小脳回 (B の矢印) と異所性神経細胞の集団 (D の矢印) に注意。対照群では脳回異常は認められない (E, F)。



(図2) 対照群 (Control) および多小脳回群 (PMG) の生後 14 日目 (P14) の FJB 染色。多小脳回群の前頭頭頂部 (D)、海馬 CA1 領域 (E)、線条体 (F) に多数の FJB 陽性細胞が観察された。対照群の同領域には陽性細胞は観察されなかった (順に A, B, C)。

(2) 臨床的解析

対象 130 名の内、非てんかん群は 63 名 (48.5%)、てんかん群は 67 名 (51.5%) (Table 1) で、てんかん群の内、重度障害群は 48 名 (71.6%)、準重度障害群は 19 名 (28.4%) (Table 2) であった。主な解析結果は以下の 4 点である。運動および知的障害の重症度は非てんかん群よりてんかん群に有意に高度であった ($p = 0.001$)。病因分析では新生児高ビリルビン血症は非てんかん群に多く ($p = 0.005$)、外傷性脳損傷はてんかん群に高率であった ($p = 0.027$)。抗てんかん薬の平均内服数は準重度障害群より重度障害群に高かった ($p = 0.0008$)。発作間欠期の脳波解析では多焦点性発作波の出現頻度が準重度障害群より重度障害群において高率であった ($p = 0.031$)。難治性てんかんのメカニズムには不明な点が多いが、多焦点性のてんかん原生領域の形成は重症心身障害に伴うてんかんの特徴の一つと思われ、難治性要因と密接に関連するものと推測された。以上の主な解析結果を以下の Table 1 および Table 2 に示した。

Table 1. The age, Ohshima's classification score and etiological classification of the Epilepsy (-) and Epilepsy (+) patients

	Total	Epilepsy (-)	Epilepsy (+)	P value
Number of patients (%)	130	63 (48.5)	67 (51.5)	
Male/Female	73/57	32/31	41/26	
Mean age, years (SD)	51.1 (13.9); range 11-85	56.4 (12.3); range 15-85	46.1 (13.5); range 11-70	
Mean score of Ohshima's classification (SD)	4.49 (4.55); range 1-18	5.79 (5.11); range 1-18	3.26 (3.57); range 1-17	0.001
Etiology (%)				
Chromosomal abnormalities	4 (3.1)	1 (1.6)	3 (4.5)	
Gene abnormalities	13 (10.0)	6 (9.5)	7 (10.4)	
Malformation of cortical development	9 (6.9)	4 (6.3)	5 (7.5)	
Hypoxic-Ischemic brain injury	40 (30.8)	22 (34.9)	18 (26.9)	
Traumatic brain injury	5 (3.8)	0 (0)	5 (7.5)	0.027
Brain tumors	1 (0.7)	1 (1.6)	0 (0)	
Porencephalic cyst	1 (0.7)	0 (0)	1 (1.5)	
Metabolic disease	7 (5.4)	7 (11.1)*	0 (0)	0.005
Infectious disease	13 (10.0)	4 (6.3)	9 (13.4)	
Unknown	37 (28.5)	18 (28.6)	19 (28.4)	

SMID: severe motor and intellectual disabilities, SD: standard deviation, (-): negative, (+): positive.

*All cases were patients with neonatal hyperbilirubinemia.

Table 2. The characteristics of epilepsy in patients with profound and non-profound SMID

	Total	Profound SMID Ohshima's classification score ≤ 4	Non-profound SMID Ohshima's classification score ≥ 5	P value
Number of patients (%)	67	48 (71.6)	19 (28.4)	
Male/Female	41/26	28/20	13/6	
Mean age, years (SD)	46.1 (13.5); range 11-70	43.2 (13.7); range 11-70	53.6 (10.1); range 35-67	0.001
Mean score of Ohshima's classification (SD)	3.26 (3.57); range 1-17	1.47 (0.65); range 1-4	7.78 (3.95); range 5-17	1.802×10^{-6}
Number of AEDs (%)				
1	21 (31.3)	11 (22.9)	10 (52.6)	0.018
2	16 (23.9)	11 (22.9)	5 (26.3)	
3	13 (19.4)	10 (20.8)	3 (15.8)	
4	11 (16.4)	10 (20.8)	1 (5.3)	
5	6 (9.0)	6 (12.5)	0 ()	
Mean number of AEDs (SD)	2.4 (1.3); range 1-5	2.7 (1.3); range 1-5	1.7 (0.9); range 1-3	0.0008
EEG paroxysm (interictal discharges) (%)				
No spike discharge	26 (38.8)	16 (33.3)	10 (52.6)	
Focal spike discharge	24 (35.8)	18 (37.5)	6 (31.6)	
Hemispheric spike discharge	2 (3.0)	1 (2.1)	1 (5.3)	
Multifocal spike discharge	10 (14.9)	10 (20.8)	0 (0)	0.031
Generalized spike discharge	5 (7.5)	3 (6.3)	2 (10.5)	

SMID: severe motor and intellectual disabilities, SD: standard deviation, LGS: Lennox-Gastaut syndrome, AEDs: antiepileptic drugs, EEG: electroencephalogram

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Takano T, Matsui K. Increased expression of GAP43 in interneurons in a rat model of experimental polymicrogyria. *J Child Neurol* 30: 716-728, 2015.
2. Takikita S, Takano T, Narita T, Maruo Y. Increased apoptosis and hypomyelination in cerebral white matter of macular mutant mouse brain. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 4: 25-29, 2015.
3. Takano T. Role of microglia in autism: Recent advances. *Dev Neurosci* 37: 195-202, 2015.
4. Takano T. Interneuron dysfunction in syndromic autism: Recent advances. *Dev Neurosci* 37: 467-475, 2015.
5. Nishikura N, Takano T, Ryujin F, Yoshioka S, Maruo Y, Takeuchi Y, Tamura K, Sakakibara T, Itoh M. Remissive epilepsy with dysembryoplastic neuroepithelial tumor involving the thalamus. *Pediatrics International* 58: 496-500, 2016.
6. Lange KW, Hauser J, Lange KM, Makulska-Gertruda E, Nakamura Y, Reissmann A, Sakaue Y, Takano T, Takeuchi Y. The role of nutritional supplements in the treatment of ADHD: What the evidence says. *Current Psychiatry Reports*. Published online Feb 7; 19: 8, 2017.
7. Takano T, Okumura K, Yamazaki S, Ogawa K, Harada Y, Yorifuji J, Ando R, Hayashi A. Epilepsy with multifocal spike discharge in patients with severe motor and intellectual disabilities. *J Neurol Disord* 6: 391, 2018. DOI:10.4172/2329-6895.1000391
8. Takano T, Okumura K, Yorifuji J, Ando R, Ogawa K, Ito M, Yamazaki S. Epilepsy in cases of severe motor and intellectual disabilities syndrome: the relationship between the extent of disabilities and the characteristics of epilepsy. *Epilepsia* 59 (S3): S183, 2018. DOI: 10.1111/epi.14612

[学会発表] (計 5 件)

1. Morimune P, Matsui J, Nishikura N, Yoshioka S, Takano T, Takeuchi Y. A neonatal case of dural sinus malformation with spontaneous regression. The 13th Asian and Oceania Congress of Child Neurology (Taipei) 2015. 5.14-5.17
2. Matsui J, Takano T, Takeuchi Y, Yoshida S, Nishizawa K. The efficacy of intravenous carnitine administration for pyruvate dehydrogenase complex deficiency. The 13th Asian and Oceania Congress of Child Neurology (Taipei) 2015. 5.14-5.17
3. Matsui J, Nishikura N, Sawai C, Sakaue Y, Sokoda T, Takano T, Takeuchi Y. Characterization of

early and later onset epilepsy in individual with autism. The 17th Annual Meeting of Infantile Seizure Society “International Symposium on Benign Infantile Seizures (ISBIS)” (Tokyo) 2015. 9.25-9.26

4. Takano T. Interneuron dysfunction in syndromic autism. The 46th Annual Meeting of Neuroscience (San Diego) 2016. 11.12-11.16
5. Takano T, Okumura K, Harada Y, Yorifuji J, Ando R, Ito M, Ogawa K, Yamazaki S. Epilepsy in cases of severe motor and intellectual disabilities syndrome: The relationship between the extent of disabilities and the characteristics of epilepsy. 13th European Congress on Epileptology (Vienna) 2018. 8.26-30

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解

や責任は、研究者個人に帰属されます。