

平成 21年 4月 30日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19300124
 研究課題名 (和文) 難治てんかん原性病巣の病態基盤：分子細胞生物学的解析
 研究課題名 (英文) Epileptogenic mechanisms underlying cortical lesions in patients with intractable seizures.

研究代表者

柿田 明美 (KAKITA AKIYOSHI)
 新潟大学・脳研究所・准教授
 研究者番号：80281012

研究成果の概要：

難治てんかん原性病巣における病態形成機序を知る目的から、てんかん焦点として外科的に切除された FCD と TSC の脳組織を対象に、細胞内情報伝達経路関連蛋白の発現と翻訳後修飾を解析した。その結果、FCD では *p-S6* を介した蛋白合成系が活性化しており、TSC とは異なった病態形成機序があると考えられた。FCD と TSC の脳組織を対象に、急性脳スライス標本作製し病態生理学的解析を試みた。FCD および TSC の結節周囲では、電気刺激により惹起された興奮が刺激中断後も持続し、対象に比し遷延する傾向が認められた。一方 TSC の結節部では同興奮は刺激中断後には速やかに減衰し、ベースラインに回帰した。両者の epileptogenicity は異なるものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
年度			
総計	6,900,000	2,070,000	8,970,000

研究分野：総合領域

科研究費の分科・細目：神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳発達障害

1. 研究開始当初の背景

難治てんかん患者に対する外科的焦点摘出術が広く行われるようになり、てんかん原性病巣についての組織病理学的知見が蓄積されてきている。そこには、限局性皮質形成異常(focal cortical dysplasia: FCD)や結節性硬化症(tuberous sclerosis: TSC)などの発生異常に加え、腫瘍性・炎症性・瘢痕性病変などを示唆する多彩な組織像が認められる。

本研究では、類似の組織病理学的所見が認

められる上記の二つの病態(FCD, TSC)を対象に分子細胞生物学的特徴を解析し、その病態形成機序の違いを探ろうとしたものである。両病態における臨床生理学的特徴は異なっており、FCD では病巣そのものにてんかん原性が、TSC では病巣周囲から発作波が起こる、可能性が指摘されている。

2. 研究の目的

難治てんかん原性病巣における病態形成機

序を知る目的から、てんかん焦点として外科的に切除された FCD と TSC の脳組織を対象に、細胞内情報伝達経路関連蛋白の発現と翻訳後修飾を解析した。同時に、FCD と TSC の脳組織を対象に、急性脳スライス標本作製し病態生理学的解析を試みた。

3. 研究の方法

病理組織学的に、FCD type IIB (dysmorphic neuron や balloon cell を伴う)あるいは TSC (類似の異型細胞を伴う)と診断した、順に 6 例および 7 例の凍結生組織を用いた。対照として、組織学的に異常所見を指摘できない 4 例のてんかん原生大脳新皮質切除組織を用いた。Western blotting により、mTOR を介した細胞内情報伝達系の上流: tuberin, hamartin, Akt や、下流: 4EBP, S6, p70S6K, EF2 の蛋白発現とリン酸化状態を検定した。有意差の検定は Fisher の PLSD により行った。

臨床的に、FCD あるいは TSC と診断された症例において、摘出脳組織の急性脳スライス標本作製して、5 μ M bicuculline 存在下にフラビン蛍光イメージングによる興奮伝播特性の解析を行った。対照として、3 例の深部脳腫瘍摘出のために切除された正常脳皮質を使用した。TSC 例においては MEG 上 Diepole の集積を認めた Peri-tuber 領域とそうではなかった Tuber 本体から測定を行った。また、細胞外電場電位をイメージング実験後に記録し、各スライス上での自発発火頻度を解析した。上記生理学的実験後はホルマリン固定を行い病理組織学的検索を行った。

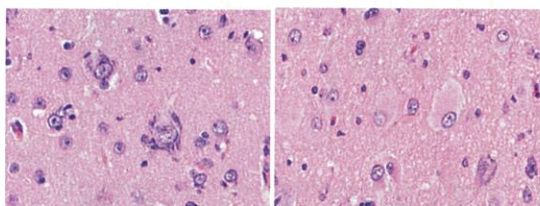


図 1 FCD で認められた異型細胞. dysmorphic neurons (左パネル) と balloon cells (右パネル)。

4. 研究成果

対照に比し、TSC では tuberin および hamartin は有意に減少していた。FCD でも両蛋白は減少傾向を示し、両疾患群間に優位差はみられなかった。p-tuberin は両群で増加傾向を示し、ここにも差は認められなかった。Akt は両者で減少し、逆に p-Akt は両者で上昇傾向を示した。対照と比較した TSC での発現量の変動は Akt/p-Akt 共に有意であった。p-4EBP, eEF2K, p-eEF2 は両疾患群間に差はみられなかった。S6 は両群共に対照より有意に減少し、FCD より TSC が更に有意に減少し

ていた。p-S6 は両群共に対照より増加傾向がみられ、FCD の方が TSC より有意な増加が認められた。

TSC 原因遺伝子産生蛋白 (TSC1: hamartin, TSC2: tuberin) は複合体を形成し、その後 mTOR から 4EBP あるいは p70S6K を介した蛋白合成系に関与する。また p70S6K からは eEF2 を介した蛋白伸長系も知られている。それぞれ、リン酸化の有無による活性化/不活性化が行われている。FCD と TSC の両組織像はよく似ており、TSC1/2 の蛋白発現量の比較だけでは両者を明瞭に区別することは出来なかった。しかしながら、FCD では p-S6 を介した蛋白合成系が活性化しており、TSC とは異なった病態形成機序があると考えられた。両者に対する将来の治療戦略を考える上で、重要な基礎的知見と思われた。

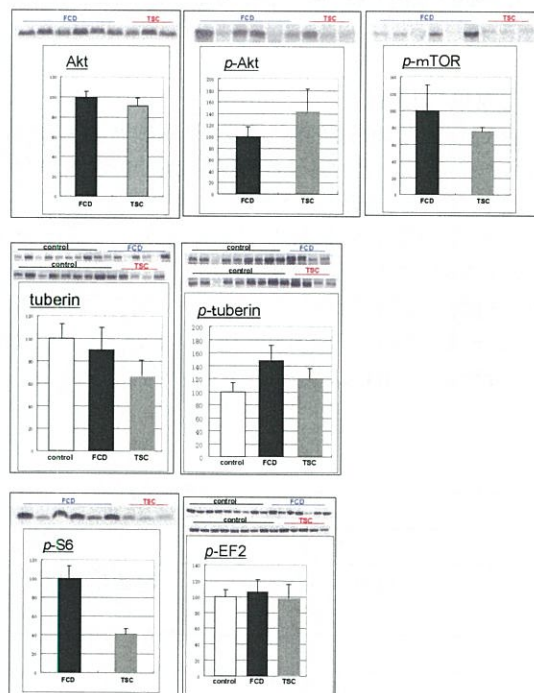


図 2 FCD, TSC, control 脳組織における mTOR 系細胞内情報伝達経路関連蛋白の発現。

FCD および TSC の Peri-tuber 領域においては、電気刺激により惹起された興奮が刺激中断後も持続し、対象に比し遷延する傾向がイメージング実験において認められた。一方 TSC の Tuber 領域では同興奮は刺激中断後には速やかに減衰し、ベースラインに回帰した。減衰の時定数は FCD: 4030 ms, Peri-tuber: 4990 ms に対し、Tuber: 970 ms で対象群: 1070 ms とほぼ同値であった。また、細胞外電場電位測定においては FCD において高頻度の自発発火を認め、Tuber 領域でも若干の自発発火を認めた。しかし、Peri-tuber 領域においてはほとんど自発発火を認めなかった。

病理組織学的にはFCDは多数のDysmorphic neuronやBalloon cellを伴うtype IIBであり、TSCではTuber領域において若干のDysmorphic neuronとBalloon cellの出現を認めた。一方でPeri-tuber領域においては明らかな病理組織学的変化を認めなかった。

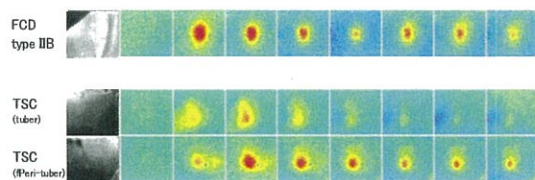


図3 フラビン蛍光イメージング。左パネルから順に、透過像、刺激前、刺激後960ms、1920ms、2880ms、3840ms、4800ms、5760ms、6720ms。刺激は100µs、300µA、10Hz-1s。

FCD type IIBとTSC tuberとは良く似た病理組織像を呈するにも関わらず、両者のEpileptogenicityは異なると考えられている。すなわち、臨床的にFCDでは病変そのものがEpileptogenicであるのに対し、TSCではCortical Tuberはそうではなく、むしろPeri-tuber領域がEpileptogenicであると考えられている。しかし、なぜそうした違いが生じるのかは不明であった。今回我々がイメージング実験で得た結果は、まさに臨床的知見に合致したものであった。

病理組織学的にDysmorphic Neuronが多数出現したFCD IIBと全く見られなかったPeri-tuber領域がほぼ同様の興奮性を呈したことは一見矛盾するようであるが、多シナプス性の神経回路特性を反映するスライスイメージングでの興奮の遷延化を考慮すると、Epileptogenicityの形成においてはDysmorphic Neuronなどの単一細胞による活動よりはむしろ、背景にある神経回路網において反響回路の形成などによる可塑的变化が生じている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① 亀山茂樹, 柿田明美, てんかんの画像と病理. 1. 限局性皮質形成異常, 脳神経外科, 35, 615-622, 2007, 査読無
- ② 亀山茂樹, 柿田明美, てんかんの画像と病理. 2. 内側側頭葉てんかんと海馬硬化, 脳神経外科, 35, 719-729, 2007, 査読無
- ③ 亀山茂樹, 柿田明美, てんかんの画像と病理. 3. Dysembryoplastic neuroepithelial tumorと腫瘍性病変, 脳神経外科, 35, 833-841, 2007, 査読無

- ④ 亀山茂樹, 柿田明美, てんかんの画像と病理. 4. 結節性硬化症, 脳神経外科, 35, 1027-1035, 2007, 査読無
- ⑤ 亀山茂樹, 柿田明美, てんかんの画像と病理. 5. 海綿状血管腫と脳動静脈奇形, 35, 1199-1206, 2007, 査読無
- ⑥ 柿田明美, てんかん外科病理学の実践, 病理と臨床, 25, 990-996, 2007, 査読無
- ⑦ Kenji Sakai, Mari Tada, Yosuke Yonemochi, Takashi Nakajima, Osamu Onodera, Hitoshi Takahashi, Akiyoshi Kakita, Marinesco-Sjögren syndrome showing cortical dysplasia and tegmental atrophy: an autopsy case. Neuropathology 28, 541-546, 2008, 査読有
- ⑧ Osamu Yokota, Kuniaki Tsuchiya, Masaharu Hayashi, Akiyoshi Kakita, Kiyoshi Ohwada, Hideki Ishizu, Hitoshi Takahashi, Haruhiko Akiyama, Glial clusters and perineuronal glial satellitosis in the basal ganglia of neurofibromatosis type 1. Acta Neuropathol 116, 57-66, 2008, 査読有
- ⑨ 増田 浩, 村上博淳, 亀山茂樹, 柿田明美, 皮質形成異常の診断と治療, 脳神経外科ジャーナル, 印刷中, 査読有

[学会発表] (計11件)

- ① 柿田明美, てんかんの分子細胞病理, 第48回日本神経病理学会 シンポジウム, 2007年5月30日, 東京
- ② 龍福雅恵, 豊島靖子, 鄭 英君, 北浦弘樹, 亀山茂樹, 高橋 均, 柿田明美, 海馬硬化症における神経細胞の形態異常: てんかん外科標本の計測学的解析, 第48回日本神経病理学会, 2007年5月30日, 東京
- ③ 柿田明美, てんかんの病理, 第8回てんかん夏季セミナー, 2007年8月25日, 新潟
- ④ 北浦弘樹, 龍福雅恵, 大石 誠, 福多真史, 藤井幸彦, 高橋 均, 柿田明美, 内側側頭葉てんかんを呈した類表皮嚢胞の一例: スライスイメージング法を用いた病態生理学的解析, 第49回日本神経病理学会, 2008年5月21日, 東京
- ⑤ 付 永娟, 増田 浩, 遠山 潤, 亀山茂樹, 高橋 均, 柿田明美, 血管周囲性に未分化細胞の配列を認めたてんかん原性側頭葉嚢胞性病変, 第49回日本神経病理学会, 2008年5月21日, 東京
- ⑥ 龍福雅恵, 豊島靖子, 鄭 英君, 北浦弘樹, 亀山茂樹, 高橋 均, 柿田明美, ヒト海馬硬化症における顆粒細胞分散: 未分化細胞の同定と神経細胞新生, 第49回日本神経病理学会, 2008年5月21日, 東京
- ⑦ 鄭 英君, 龍福雅恵, 亀山茂樹, 増田 浩, 高橋 均, 武井延之, 柿田明美, てんかん

原性病巣における mTOR 系細胞内情報伝達経路関連蛋白の発現解析第49回日本神経病理学会, 2008年5月21日, 東京

- ⑧Yongjuan Fu, Atsuko Nakagawa, Nobuhito Morota, Hitoshi Takahashi, Akiyoshi Kakita, Neurocutaneous melanosis associated with mesial temporal lobe epilepsy: histopathological features of the resected hamartomatous lesion, First Congress of Asia Society of Neuropathology, 2008年5月21日, 東京
- ⑨龍福雅恵, 豊島靖子, 鄭英君, 北浦弘樹, 亀山茂樹, 高橋均, 柿田明美, ヒト海馬硬化症における顆粒細胞分散: 未分化細胞の同定と神経細胞新生, 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9日, 東京
- ⑩柿田明美, てんかんの病理, 第9回てんかん夏季セミナー, 2008年8月23日, 新潟
- ⑪柿田明美, てんかんの分子病理, 第38回新潟脳神経夏期セミナー, 2008年8月29日, 新潟

〔図書〕(計1件)

柿田明美(分担執筆), Melanocytic tumors. 臨床病理カラーアトラス 第3版 日本脳腫瘍病理学会(編), 医学書院, 東京, 2009年5月, pp.134-136.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿田 明美 (KAKITA AKIYOSHI)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 80281012

(2) 研究分担者

北浦 弘樹 (KITAURA HIROKI)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 80401769

(3) 連携研究者

なし