

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01061

研究課題名(和文) てんかん原性病巣の病態機序と制御：外科標本のイメージングプラクティス

研究課題名(英文) Pathomechanisms and Control of Epileptogenic Foci: Imaging Practices for Surgical Specimens

研究代表者

柿田 明美 (Kakita, Akiyoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80281012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん焦点となった脳病巣においては、異常な神経興奮がどのように惹起され伝播するのか？本研究では、外科的に切除されたてんかん焦点脳組織を対象に、生鮮脳スライスを用いた生理学的解析と脳組織の3次元病理解析を行なった。生理学的解析法としては独自に開発したフラビン蛍光イメージング法を用い、形態解析には新たに開発したひと脳組織透明化技術を用いた。ここから時空間的興奮動態の特徴を捉え、薬理作用を検証し、神経細胞やグリア細胞のネットワーク基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんは罹患率の高い症候群である。てんかん焦点が臨床的に同定される薬剤抵抗性の局在性難治性てんかん患者に対し、外科的焦点切除術が行われることがある。てんかん焦点では異常な神経興奮がどのように惹起され伝播するのか？これはいわば臨床てんかん学における古典的かつ本質的命題である。本研究では、このてんかん病態機序を理解するために、最新鋭の解析技術で機能異常と形態異常の実態を明らかにした。本研究の成果は、難治てんかん患者に対する新たな外科的/内科的治療戦略を開発するための重要な知見となった。

研究成果の概要(英文)：How is abnormal neural excitation elicited and propagated in epileptogenic brain lesions? In this study, we performed physiological analysis using fresh brain slices and three-dimensional pathological analysis of epileptic focal brain tissue that had been surgically removed. The physiological analysis was performed using an originally developed flavin fluorescence imaging method, and the morphological analysis was performed using a newly developed tissue clearing technique for human brain slices. From this analysis, we characterized the spatiotemporal excitation dynamics, verified the pharmacological effects, and clarified the network basis of neurons and glial cells.

研究分野：神経病理学

キーワード：てんかん 神経回路 3D 脳透明化 フラビン蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

脳の機能障害であるてんかんの病態を知る上で“神経病理”が出る幕はあるのか

One must not infer physiology from anatomy. (Vernon B. Mountcastle) 要するに「形態から機能を語ることなかれ」ということであろう。大脳皮質のカラム様構造を発見した大学者をして言わしむるその意味は軽くない。しかしながら、ことてんかんに関しては、形態を読み解くことを専門としている神経病理学こそが機能異常を解析し得る絶好のポジションにあると考えたい。どうゆうことか。近年、この罹患率の高い症候群に対し文字通りメスが入れられるようになったことから、その診療と研究の両面で神経病理が関与する状況は一変した。すなわち、局在性難治てんかん患者に対する外科的切除脳を組織診断する機会が増え、このことは同時に、こうした標本リソースを用いた様々な研究を展開し得ることともなったのである。

本研究らは、全国各地のてんかん診療拠点からの依頼を受け、これまでに1,100余例を病理組織学的に診断し、てんかん焦点にみられる病因論的多様性の実態を明らかにしてきた。また、限局性皮質異形成の分子病態の解析など、切除脳組織を用い、形態あるいは分子病理学的解析を行ってきた。このように神経病理フィールドは、ヒトのてんかん病巣に直接アプローチできる点は何と言っても最大の利点であろう。一方で、通常の病理標本では解析しにくい点、苦手なことがある。時間依存的变化をみることで、である。様々な各論はあるにせよ、てんかん発作とは要するに、神経興奮の時間空間的異常伝播であろう。つまり、症候論からみて、時間のファクターを解析することは病態生理を知る上で極めて重要なことと考えられる。ではどうするか。

“ヒト生鮮脳スライスを用いた生理学的解析”本研究申請者らは、フラビン蛍光イメージング法を用い、世界で初めててんかん焦点組織から神経興奮を可視化した¹⁻³。それまで誰もみたことのない驚くべき時空間的伝播特性：つまり機能異常を捉える、そうした方法論を開発した。

一方で、ある意味ももんとしていた。神経病理学的診断を行なっていると、通常の組織標本、つまり2次元平面に薄切した標本の観察では、脳病変を正しく評価できないのではないかと、思うことがある。脳は、つくりが複雑で機能単位がことさら立体的だからである。

“ヒト脳組織の3次元的病理解析”最近、本研究申請者らは、ヒト脳のイメージングに特化した水溶性透明化試薬の開発に成功した⁴。脳組織を切らずに丸ごと見る、つまり神経細胞やグリア細胞の配列やネットワークさらには微細なシナプスまで‘立地的機能ユニット’の形態異常を3次元で鮮明に捉える、そうした方法論を手にした。

機能と形態：2つの事象がいよいよ結びつき得る状況となってきた。

2. 研究の目的

機能と形態：てんかん病態理解とその制御へ

てんかん焦点では、どのように異常な神経興奮が惹起され伝播するのか？この命題はいわば、臨床てんかん学における古典的かつ本質的命題である。本研究では、ヒトてんかん焦点組織そのものを対象に、上記の機能と形態をみる最新鋭の解析技術をストラテジーとし、この命題に取り組むこととした。つまり、てんかん焦点の病態を明らかにし、新たな治療戦略を開発することを目的とした。その研究ストラテジーの柱は、“ヒト生鮮脳スライスを用いた生理学的解析”と“ヒト脳組織の3次元的病理解析”つまり機能と形態を統合するイメージング・プラクティスである。

3. 研究の方法

(1) “ヒト生鮮脳スライスを用いた生理学的解析”

難治てんかん患者から外科手術により摘出された生鮮脳組織を用いた。対照として、てんかんの既往がなく脳深部にある腫瘍摘出のために最小限切除された生鮮大脳皮質を用いた。

これらのスライス標本を人工脳脊髄液中で長時間培養し、フラビン蛍光イメージングと細胞外電場電位測定を行い、神経興奮の時空間的伝播特性を解析し、発作起始部を同定した。

次いで、共焦点イメージングにより、単一細胞解像度の神経興奮活動を可視化した。つまり(1)マクロ：脳スライス内でてんかん様自発神経活動が発生する領域を特定し、次いでそのスライスを共焦点顕微鏡上の記録チャンパーに移し、(2)ミクロ：特定された発火領域に着目し、カルシウム蛍光指示薬を用いた高速マイクロイメージングを施行し、同期性自発発火活動を示す神経細胞群を描出した。

(2) “ヒト脳組織の3次元的病理解析”

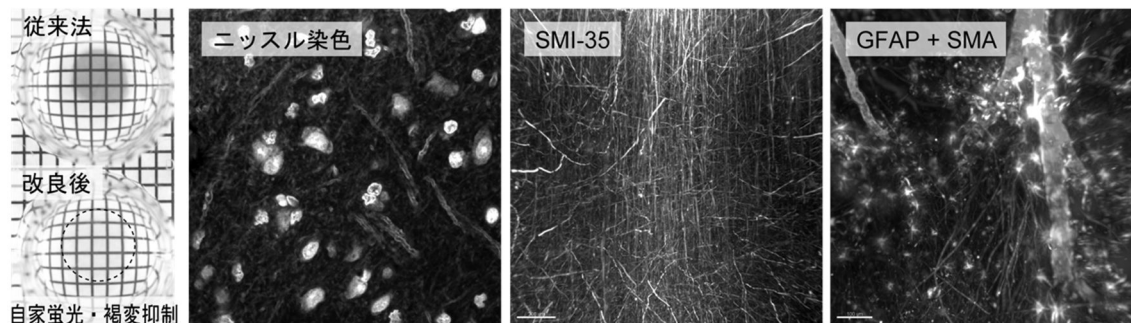
これまで本研究者らは、ヒトを含む哺乳類脳組織を透明化する技術の開発を進め、その結果、ヒト脳組織透明化における最大の光学的課題：自家蛍光および褐変、の克服に成功し、これらを高度に抑制する透明化プロトコールを開発した⁴。また、上記の生理学的観察を終えた後のスライスをホルマリン固定し、脳組織透明化技術を適用して、立体的な神経細胞やグリア細胞のネットワーク構築を解析した。

4. 研究成果

(1) 難治てんかん患者から外科手術により摘出された生鮮脳組織を用い、フラビン蛍光イメー

ジグと細胞外電場電位測定を行い、次いで神経興奮の時空間的伝播特性を解析することにより、発作起始部を同定した。次に、共焦点イメージングにより、単一細胞解像度の神経興奮活動を可視化した。

(2) ヒト脳組織を高度に透明化し、3D用各種一般蛍光染色およびホールマウント免疫染色技術を確立した⁵。



<引用文献>

- 1 Kitaura H, et al. Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations: imaging of human brain slices. *NeuroImage* 2011; 58 (1): 50-59.
- 2 Kitaura H, Kakita A. Optical imaging of human epileptogenic tissues *in vitro*. *Neuropathology* 2013; 33 (4): 469-474.
- 3 Kitaura H, et al. Pathophysiological characteristics of the subiculum associated with epileptogenesis in human hippocampal sclerosis. *EBioMedicine* 2018; 29: 38-46.
- 4 Tainaka K, et al. Chemical landscape for tissue clearing based on hydrophilic reagents. *Cell Rep* 2018; 24 (8): 2196-2210.e9.
- 5 Inoue M, et al. Rapid chemical clearing of white matter in post-mortem human brain by 1,2-hexanediol delipidation. *Bioorganic Medicinal Chem Lett* 2019; 29 (15): 1886-1890.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsui H, Ito J, Matsui N, Uechi T, Onodera O, Kakita.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin induces cytotoxicity and neurodegeneration in cellular and zebrafish models of Parkinson's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 3101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23452-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seike N, Yokoseki A, Takeuchi R, Saito K, Miyahara H, Miyashita A, Ikeda T, Aida I, Nakajima T, Kanazawa M, Wakabayashi M, Toyoshima Y, Takahashi H, Matumoro R, Toda T, Onodera O, Ishikawa A, Ikeuchi T, Kakita A.	4. 巻 36
2. 論文標題 Genetic variations and neuropathologic features of patients with PARK2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mov Disord	6. 最初と最後の頁 1634-1643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mds.28521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshitomi S, Hamano SI, Hayashi M, Sakuma H, Hirose S, Ishii A, Honda R, Ikeda A, Imai K, Jin K, Kada A, Kakita A, et al.	4. 巻 23
2. 論文標題 Current medico-psycho-social conditions of patients with West syndrome in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epileptic Disord	6. 最初と最後の頁 579-589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1684/epd.2021.1301	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitaura H, Itoh Y, Hiraishi T, Fujii Y, Fukuda M, Kakita A.	4. 巻 176
2. 論文標題 Reactive astrocytes contribute to epileptogenesis in patients with cavernous angioma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epilepsy Res	6. 最初と最後の頁 106732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.epilepsyres.2021.106732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shi Y, Zhang W, Yang Y, Murzin A, Falcon B, Kotecha A, van Beers M, Tarutani A, Kametani F, Garringer HJ, Vidal R, Hallinan GI, Lashley T, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Tanaka H, Kakita A, Ikeuchi T, Mann DMA, Kovacs GG, Revesz T, Ghatti B, Hasegawa M, Goedert M, Sheres SHW.	4. 巻 598
2. 論文標題 Structure-based classification of tauopathies.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 359-363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03911-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Y, Fukuda M, Matsuzawa H, Masuda H, Kobayashi Y, Hasegawa N, Kitaura H, Kakita A, Fujii Y.	4. 巻 178
2. 論文標題 Deep learning-based diagnosis of temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis: an MRI study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epilepsy Res	6. 最初と最後の頁 106815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.epilepsyres.2021.106815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 北浦弘樹、柿田明美.	4. 巻 15
2. 論文標題 海馬硬化症のてんかん原性.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Epilepsy	6. 最初と最後の頁 74-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Y, Hamano S, Hayashi M, Sakuma H, Hirose S, Ishii A, Honda R, Ikeda A, Imai K, Jin K, Kada A, Kakita A, Kato M, Kawai K, Kawakami T, Kobayashi K, Matsuishi T, Matuo T, Nabatame S, Okamoto N, Ito S, Okumura A, Saito A, Shiraishi H, Shirozu H, Saito T, Sugano H, Takahashi Y, Yamamoto H, Fukuyama T, Kuki I.	4. 巻 24
2. 論文標題 Burden of seizures and comorbidities in patients with epilepsy: a survey based on the tertiary hospital-based Epilepsy Syndrome Registry in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Epileptic Disord	6. 最初と最後の頁 82-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/epd.2021.1361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato M, Kada A, Shiraishi H, Tohyama J, Nakagawa E, Takahashi Y, Akiyama T, Kakita A, Miyake N, Fujita A, Saito AM, Inoue Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Sirolimus for epileptic seizures associated with focal cortical dysplasia type II.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Clin Transl Neurol	6. 最初と最後の頁 181-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.51505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirozu H, Hashizume A, Masuda H, Kakita A, Otsubo H, Kameyama S.	4. 巻 133
2. 論文標題 Surgical strategy for focal cortical dysplasia based on the analysis of the spike onset and peak zones on magnetoencephalography.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurosurg	6. 最初と最後の頁 1850-1862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2019.6.JNS191058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa A, Kakita A, Chiba Y, Kameyama S, Shimada A.	4. 巻 168
2. 論文標題 Proteomic profile differentiating between mesial temporal lobe epilepsy with and without hippocampal sclerosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epilepsy Res	6. 最初と最後の頁 106502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.epilepsyres.2020.106502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Susaki EA, Shimizu C, Kuno A, Tainaka K, Li X, Nishi K, Morishima K, Ono H, Oda KL, Saeki Y, Miyamichi K, Isa K, Yokoyama C, Kitaura H, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Saito T, Saido TC, Fukayama M, Onoe H, Touhara K, Isa T, Kakita A, Shibayama M, Ueda HR.	4. 巻 11
2. 論文標題 Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15906-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue M, Saito R, Kakita A, Tainaka K.	4. 巻 29
2. 論文標題 Rapid chemical clearing of white matter in post-mortem human brain by 1,2-hexanediol delipidation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic Medicinal Chem Lett	6. 最初と最後の頁 1886-1890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.049.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki H, Sugano H, Nakajima M, Higo T, Imura Y, Mitsuhashi T, Fusegi K, Kakita A, Otsubo H, Arai H.	4. 巻 21
2. 論文標題 The epileptogenic zone in pharmacy-resistant temporal lobe epilepsy with amygdala enlargement.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epileptic Disord	6. 最初と最後の頁 252-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/epd.2019.1075.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumura N, Nobusawa S, Ito J, Kakita A, Suzuki H, Fujii Y, Fukuda M, Iwasaki M, Nakasato N, Yominaga T, Natsume A, Mikami Y, Shinojima N, Yamazaki T, Nakazato Y, Hirato J, Yokoo H.	4. 巻 143
2. 論文標題 Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis is useful for detecting a copy number gain of the FGFR1 tyrosine kinase domain in dysembryoplastic neuroepithelial tumors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurooncol	6. 最初と最後の頁 27-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03138-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柿田明美
2. 発表標題 てんかんの外科病理.
3. 学会等名 第54回 日本てんかん学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿田明美
2. 発表標題 若手の神経化学会員の皆様へのメッセージ：神経病理学会から.
3. 学会等名 第64回日本神経化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北浦弘樹、柿田明美
2. 発表標題 神経病理からのてんかん病態へのアプローチ.
3. 学会等名 第62回 日本神経学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kitaura H, Itoh Y, Fukuda M, Tainaka K, Fujii Y, Kakita A.
2. 発表標題 Morphological and functional features associated with epileptogenesis in the hippocampus of MTLE.
3. 学会等名 第62回 日本神経病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 放上萌美, 遠山潤, 小林悠, 大野武, 岡崎健一, 平岩明子, 増田浩, 福多真史, 柿田明美.
2. 発表標題 経過中に発作型と脳波所見の変容を示した側頭葉astrocytomaの小児例.
3. 学会等名 第54回日本てんかん学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北浦弘樹、柿田明美.
2. 発表標題 海馬硬化症のてんかん原性：外科病理標本を用いた機能異常と形態異常の接点.
3. 学会等名 第54回日本てんかん学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inoue M, Saito R, Kakita A, Tainaka K.
2. 発表標題 3D pathology of cerebral amyloid antipathy based on tissue clearing technique.
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北浦弘樹、福多真史、藤井幸彦、柿田明美.
2. 発表標題 結節性硬化症のてんかん焦点組織特性.
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿田明美
2. 発表標題 小児神経疾患の病理学：症例に学ぶ病態
3. 学会等名 日本小児神経学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿田明美
2. 発表標題 てんかん外科病理学の実際：症例から学ぶ病態
3. 学会等名 第11回 アルツハイマー病とてんかんを考える会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柿田明美.
2. 発表標題 てんかんの外科病理
3. 学会等名 第44回 日本てんかん外科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田井中一樹、齋藤理恵、井上雅文、柿田明美.
2. 発表標題 3D神経病理学に向けたホールマウント染色手法の開発.
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitaura H, Fukuda M, Fujii Y, Kakita A.
2. 発表標題 Visualization of epileptic activities in human brain slices ex vivo.
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitaura H, Shirozu H, Masuda H, Fukuda M, Fujii Y, Kakita A.
2. 発表標題 Epileptogenesis of the subiculum associated with hippocampal sclerosis in patients with MTLE: ex vivo optical imaging study.
3. 学会等名 SfN Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kakita A.
2. 発表標題 Pathophysiological characteristics associated with epileptogenesis: imaging of human brain slices.
3. 学会等名 Infantile Seizure Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿田明美.
2. 発表標題 精神神経機能障害としての‘てんかん’: 病態機序を神経病理学からさぐる.
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿田明美.
2. 発表標題 てんかん外科病理学の実際: 症例から学ぶ病態.
3. 学会等名 日本てんかん学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柿田明美 (共著)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 433
3. 書名 てんかん専門医ガイドブック 改定第2版 - てんかんにかかわる医師のための基本知識 -	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田井中 一貴 (Tainaka Kazuki) (80506113)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	
研究分担者	北浦 弘樹 (Kitaura Hiroki) (80401769)	新潟大学・脳研究所・特任准教授 (13101)	
研究分担者	藤井 幸彦 (Fujii Yukihiko) (40283014)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	
研究分担者	前原 健寿 (Maehara Taketoshi) (40211560)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	池田 昭夫 (Ikeda Akio) (90212761)	京都大学・医学研究科・特定教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	トロント小児病院			