

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500342

研究課題名（和文）てんかん焦点病理診断の科学的根拠に関する探索研究

研究課題名（英文）Research for scientific evidences on diagnostic epilepsy pathology

研究代表者

新井 信隆（ARAI NOBUTAKA）

財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・参事研究員

研究者番号：10167984

研究成果の概要（和文）：本研究では、難治性てんかんを引き起こす大脳皮質にどのような病変があるのかを探索した。てんかん外科治療で切除された器質的病変に加えて、その周囲において一見正常な皮質にも、アストロサイトに鉄顆粒が取り込まれる病理変化、グリア型グルタミン酸トランスポータの表出異常を認めた。これらはアストロサイト機能異常によるてんかん原性獲得のメカニズムが存在していることを示しており、治療法開発に繋がる知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：The specific aim of this study is focused on disclosing of pathological changes, if any, causing intractable epilepsy. Both of abnormal deposit of iron granules in the astrocytes and abnormal immunohistochemical expression of glutamate transporter of glia type were observed in normal-looking area around organic lesions, taken from epileptogenic cortices by neurosurgical procedures. Those findings strongly suggest a possibility that dysfunction of the astrocytes causes epilepsy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：てんかん、脳外科治療、外科病理診断、アストロサイト、組織鉄、外傷性てんかん

1. 研究開始当初の背景

（1）てんかん（epilepsy）は大脳皮質の神経細胞の過剰興奮に起因する神経症候群であり、決して稀な疾病ではない。すなわち、

てんかんに罹患している患者は約 100 人に一人（本邦では約 100 万人）と言われており、脳梗塞（stroke）、頭痛（headache）

とともに、疾病人口という視点から三大神経疾患を構成しており、医学的、社会的にも取り組むべき大きな課題を有している。そのうち70%（約70万人）の患者は抗てんかん薬の投与により発作はコントロール（抑制）されるが、30%の患者は薬物抵抗性の難治性てんかんといわれる（約30万人）。そして、そのうちの約10～20%（約5万人）が脳外科治療の適応があると推定されている。その難治性てんかんの外科治療に際しては、焦点切除術が行われるが、それら焦点部には、脳形成異常、脳腫瘍、脳虚血後遺症、外傷後遺症、炎症性病変などの器質的な変化が観察されることは良く知られており、それらの器質的な病変に対して、診断基準のみならず、様々な角度から器質的病変自体のてんかん原性に関する検討が行われてきた。

（2）しかし一方で、てんかんを惹起させているのは、器質的に明らかな病変そのものではなく、それらの周囲に存在するニューロンネットワークに潜在する機能的な異常ではないか、あるいは、これまで知られていなかった微細な脳病変に起因するのではないか、などと考えられることも確かである。例えば、頭部外傷の病変部がてんかん原性を獲得するまでには数カ月～数年の時間経過を要するわけであり、その間、外傷病変周囲において、何らかのニューロン・グリア細胞関連の破綻が生じていると考えられる。脳血管腫の場合も同様のことが言える。また、非常に強いスパイクを発する焦点部であるにもかかわらず、病理組織学的に明瞭な器質的な変化がない場合もしばしば経験されることから、このような一見正常にも見える脳組織にこそ、てんかんを惹起させる機能的異常が潜んでいると考えるのが妥当であり、この点を検討する必要がある。

2. 研究の目的

てんかん焦点を形成する脳の部位は、中心部から類同心円状に、①てんかん発作を惹起する発作発現領域 (ictal onset zone)、②発作間歇領域 (interictal zone)、③機能喪失領域 (functional deficit zone) が広がっていると考えられているが、それらの病理学的な背景がどのようなものであるのか、上記の全く検証されていないと言っても過言ではない。従って、本研究では、てんかん焦点部の中心部における器質的な病変の周囲に潜む、一見正常そうな脳組織において、ニューロン・グリアのネットワークにどのような変化（再構築）がおきているのかを、てんかん外科手術の焦点切除検体を用い、主に免疫組織学的な神経病理手法で検証し、真のてんかん原性病変を明らかにすることに関する基礎データを獲得することを目的とする。また、海馬歯状回顆粒細胞の神経細胞新生とてんかん原性の獲得やてんかん発作の消長との関係についても、検討対象とする。てんかん原性病変の難治性てんかんに対する脳外科手術は最近特に精力的に行われているものの、焦点部にどのような病変があるのかという基本的な知識が詳細に明らかになってきたのは1990年代のことである。このような視点をもった難治性てんかんの焦点部における検証は初めてのものである。

3. 研究の方法

（1）研究対象となる疾患：焦点切除術においてしばしば観察される以下の器質的な病変を有する疾患について、これまでラボが所有する焦点切除症例（約650例）を後方視的に検討すると共に、手術中脳波におけるてんかん焦点組織の電気的な活動の違いをも参考に前方視的に検討した；①脳形成異常（限局性皮質異形成、片側巨脳症、結節性硬化症、

微小形成不全)、②脳腫瘍(神経節膠腫、異胎児性神経上皮腫、その他のグリア細胞系腫瘍、血管腫)、③破壊性脳病変(周産期脳虚血後遺症、頭部外傷後遺症、など)、④炎症性病変(髄膜炎後遺症、ラスマッセン脳炎、など)、⑤海馬硬化病変(海馬硬化を示さないてんかん原性海馬も含む)

(2) 研究のターゲットとなる脳組織: 研究対象となる脳組織は、上記疾患の焦点切除部における器質的病変の周囲の一見正常な脳組織とした。つまり非特異的な組織像においててんかん原性に関与すると思われることを探索した。

(3) 検索指標: 神経細胞、グリア細胞の細胞構築の変化を、以下に示す細胞骨格蛋白、および興奮性/抑制性などに関する機能的蛋白などに対するモノクローナル抗体を用いて検証した。①神経細胞系: ニューロフィラメント(neurofilament-68K、-160K、-200K、phosphorylated neurofilament) 微小管結合蛋白(microtubule-associated protein-1B、-2、tau protein)、カルシウム結合蛋白(calbindin-D28K、parvalbumin、calretinin)、神経細胞型興奮性アミノ酸トランスポーター、NMDA受容体(NMDA-R)、mGluR1、3/3、GAD、GABA。②グリア細胞系: グリア性線維性酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein)、グルタミン酸合成酵素(glutamate synthetase)、アストロサイト型興奮性アミノ酸トランスポーター(excitatory amino acid transporter: GLAST、GLT-1、EAAT2)、S-100、galactocerebroside、CD68)。シナプス関連蛋白; シナプトフィジン(synaptophysin)、再生性軸索末端蛋白(SNAP-25)を用いる。④神経細胞新生や成熟マーカー: てんかん原性海馬に対して、神

経細胞新生の指標として NeuroD、PSA-NCAM、NeuN、および神経細胞成熟度の指標として NKCC1、KCC2 を用いる。⑤異型細胞の探索マーカー; Wnt-signal pathway の蛋白産物である β catenin 抗体および、mitochondria 抗体等を用いてパイロット検索を行った。

4. 研究成果

(1) てんかん焦点部の疾病構造と非特異的所見を示す割合

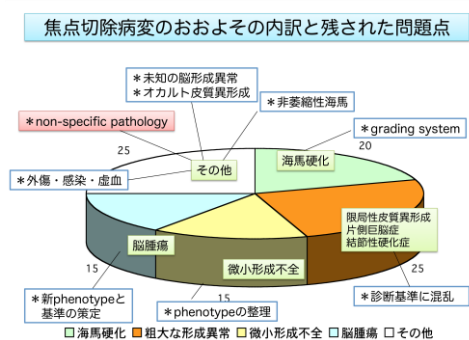


図1

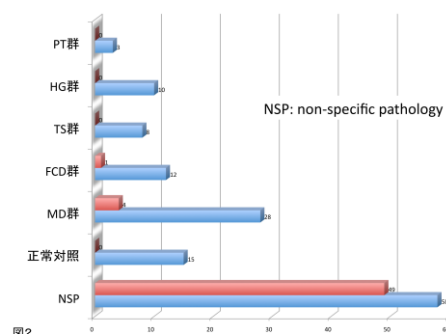


図2

ラボで保有するてんかん原性脳組織を病理組織学的に再分類した結果、器質的な変化を認めない非特異的变化を約10%に認めた(図1)。そのような非特異的病変(non-specific pathology; NSP)では、その他の器質的病変との比較において、突起が長く明瞭な斑状アストロサイトの出現量が有意に高かった。このことは、一見正常に見える焦点部では、てんかん原性獲得に伴うアストロサイト異常が生じていることを示している。

(2) てんかん焦点部でのグルタミン酸トラ

ンスポーターの表出異常

脳形成異常（限局性皮質異形成、片側巨脳症、結節性硬化症、微小形成不全）、破壊性脳病変（周産期脳虚血後遺症、頭部外傷後遺症、など）、炎症性病変（髄膜炎後遺症、ラスマッセン脳炎、など）について、前記の多種多様な抗体を用いてパイロット染色を行った結果、脳形成異常症例、ラスマッセン脳炎、外傷脳の焦点形成性の大脳皮質の周辺部において、グリア型グルタミン酸トランスポーターの表出異常（まだら様染色）が認められ（図3）、ヒトてんかん焦点組織におけるアストロサイト異常とてんかん原性との正の関連が示唆された。このことは、てんかん外科治療にあたっては、器質的な病変のみならず、周辺部においても術中皮質脳波を駆使することにより、機能的遮断術を施すことが重要であることを示唆した貴重な知見である。

(2) 頭部外傷後てんかんにおけるアストロサイトへの鉄沈着によるてんかん原性獲得現象

てんかん原性脳組織における鉄の暴露、およびそれによるアストロサイトの形態異常を、主に頭部外傷後てんかんの脳外科焦点切除検体を用い検討した結果、頭部外傷後の海馬において鉄イオン陽性の微細顆粒の沈着、およびアストロサイト細胞体内への蓄積が認められ、加えて歯状回顆粒細胞の乖離現象（dispersion）を伴う定型的な海馬硬化を生じていた（図4）。陳旧性脳挫傷の周辺でも同様の鉄沈着に加えて、アストロサイトの特殊な形態異常である foamy spheroid body が多数形成されており、グリア型興奮性アミノ酸トランスポーターの表出異常が確認された。これらの外傷後てんかん原性領域におい

ては、アストロサイトの鉄過剰蓄積が生じていることが明らかとなり、また、それによるアストロサイト機能異常が本来の役割（アミノ酸トランスポーターを介するエネルギーリサイクル）が破綻し、神経細胞の過剰興奮が引き起こされていることが示唆された。これらにより、鉄過剰暴露によるアストロサイトの機能異常が背景にあると想定されている疾患群（ニューロフェリチノパチー、無セルプラスミン血症による脳障害など）に、鉄起因性てんかんが新たに追加されるべきであることを明らかにした。

(3) 鉄暴露性てんかん原性病変における可塑性異常

表1 Reactive zoneの染色性

	GFAP	EAAT	AQP	SYP	NF	MAP2	CRMP	ArcD	Arc	Rheb	GLUT3
1	+	-	±	-	±	±	±	±	±	±	±
2	++	-	±	--	±	-	±	±	±	±	±
3	+	-	±	--	-	-	±	±	±	±	±
4	+	±	+	-	±	±	±	±	±	±	±
5	++	-	±	-	±	±	±	±	±	±	±
6	+	-	±	-	±	±	±	±	±	±	±
7	++	-	±	-	-	-	±	±	±	±	±
8	+	±	+	--	±	±	±	±	±	±	±
9	+	-	±	--	-	±	±	+	+	±	±
10	+++	-	±	-	-	-	±	±	±	±	±
11	+	-	±	--	±	-	±	+	±	±	±
12	++	-	+	-	-	±	±	±	±	±	±
13	++	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
14	+	±	±	-	-	-	±	±	±	±	±
15	+	-	±	±	-	±	±	±	±	±	±
16	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表2 Minimal zoneの染色性

	GFAP	EAAT	AQP	SYP	NF	MAP2	CRMP	ArcD	Arc	Rheb	GLUT3
1	±	-	+	±	±	±	±	±	±	±	-
2	±	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
3	±	-	+	±	±	±	±	±	±	±	-
4	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
5	±	+	++	±	±	±	±	±	±	±	-
6	+	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
7	±	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
8	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±
9	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±
10	±	-	+	±	±	±	±	±	±	±	-
11	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
12	+	±	++	±	±	±	±	±	±	±	--
13	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
14	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±
15	±	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±
16	±	±	++	±	±	±	±	±	±	±	-
17	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±	-

研究開始後2年の間に、焦点切除部に様々な程度の鉄沈着を認めることがあることを明らかにした。さらに、これらの所見がどのようなメカニズムによって発症および難治化に関連しているか否かを検証するため、鉄沈着様式と神経可塑性異常について免疫組

組織学的に検討した結果、これらの病変は境界が不明瞭な連続性を持った以下の2つのタイプに分けられた；①塊状のヘモジデリン沈着、グリオシス、アストロサイトの異常構造物 foamy spheroid body が多数出現する領域 (reactive zone)、および、②微細な鉄陽性顆粒がニューロピルに散在あるいはアストロサイトに取り込まれている領域

(minimal zone)。Reactive zone ではアストロサイトの GFAP 表出増加・EAAT2 表出低下、神経細胞の細胞骨格・シナプス蛋白の表出低下がみられ (表1)、一方、minimal zone では微細な鉄顆粒を含むアストロサイトにおいて、GFAP 表出は変化なく EAAT2 表出低下・AQP4 表出増強、血管壁 Glut3 表出低下を認めた (表2)。一部の検体で Arcadlin、Arc の神経細胞内表出の増加を認めた。両 zone ともに共通する EAAT2 表出低下はアストロサイトのグルタミン酸リサイクルの不全による神経細胞の機能異常の存在がてんかん原性に関与していると推測された。

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3件)

- ① Coras R, Boer OJ, Armstrong D, Becker A, Jaques T, Arai N, et al. pGood interobserver and intraobserver agreement in the evaluation of the new ILAE classification of focal cortical dysplasia, Epilepsia, 査読あり, in press
- ② 新井信隆、脳の微小形成不全と発達障害、医学のあゆみ、査読あり、239 巻、2011、621-626
- ③ 新井信隆、難治性てんかんの神経病理-外傷性てんかん研究の今後の課題を中心に、医学のあゆみ、査読なし、232 巻、2010、1080-1085

[学会発表] (計4件)

- ① 新井信隆、他、鉄沈着てんかん焦点部における神経可塑性異常に関する免疫組織

学的検討、第45回日本てんかん学会学術総会、2011年10月6日(新潟)

- ② 新井信隆、特別講演：側頭葉てんかんの外科病理、第29回日本脳腫瘍病理学会、2011年5月21日(東京)
- ③ 新井信隆、教育講演：てんかんの病理、第46回日本てんかん外科学会、2011年1月20日(広島)
- ④ 新井信隆、他、特異的所見を欠くてんかん焦点部の組織学的評価、第43回日本てんかん学会、2009年10月23日(弘前)

[図書] (計1件)

- ① 新井信隆、小児神経の画像診断、秀潤社、2010、76-87

[その他]

ホームページ等

<http://pathologycenter.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井信隆 (ARAI NOBUTAKA)

財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・参事研究員

研究者番号：10167984

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし