

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 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591125

研究課題名（和文） 大脳皮質奇形ハムスターを用いたけいれん準備性の発現基盤の解析

研究課題名（英文） Pathogenetic basis of seizure susceptibility in a hamster model of cortical malformation

研究代表者

高野 知行（TAKANO TOMOYUKI）

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80236249

研究成果の概要（和文）：

興奮性の神経細胞障害による細胞内 Ca^{2+} の上昇は軸索の伸長や樹状突起の成長を阻害する。これは神経細胞の移動障害を惹起し、多小脳回症などの皮質形成異常の成因となる。トレーサーを用いた研究結果から、多小脳回の皮質形成過程には異常皮質領域への大脳基底核原基由来の抑制性神経細胞の細胞動員が関与し、皮質興奮性を修飾する。また、多小脳回症における抑制性の介在神経細胞の分布は不均一で外側の傍多小脳回領域に最も密に集積し、これによる興奮性および抑制性神経活動の不均衡が、本症におけるてんかん原性の発現に密接に関与する。

研究成果の概要（英文）：

Sustained elevation of the intracellular level of Ca^{2+} in response to glutamate receptor activation can result in depolymerization of microfilaments and microtubules, thus leading to dendritic outgrowth cessation and regression. These processes are suggested to be the primary mechanisms underlying the neuronal migration disorders and the resultant polymicrogyria observed in this experiment. A neuronal tracing study of progenitor cells in the ganglionic eminence using biotinylated dextran amine (BDA) demonstrated the interneurons to be mobilized to the microgyric area out of the ganglionic eminence, thus suggesting the development of new inhibitory neuronal connections after the onset of excitotoxic brain lesions. The lateral paramicrogyral area had the greatest number of parvalbumin-immunoreactive neurons, which was increased significantly in comparison to that in the control cortex ($P < 0.01$). We suggest that the callosal, thalamic and intracortical afferents to the microgyrus and paramicrogyral area may induce a remarkable imbalance between the excitatory and inhibitory activities of the cortical structures, associated with the epileptogenic mechanism in polymicrogyria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：皮質形成異常、多小脳回症、てんかん、けいれん準備性

1. 研究開始当初の背景

てんかんの病態が脳の獲得したけいれん準備性を基盤として発作を反復する状態とするならば、その病態を解明していく上で、発作そのもの（てんかん原性）と発作を反復惹起しやすい状態（けいれん準備性）の両者のメカニズムを別々に解析する必要がある。研究代表者はこれまでハムスターを用いたイボテン酸の脳内接種による皮質形成異常の実験系において、上衣下異所性灰白質、皮質下異所性灰白質、および多小脳回症の発生病態を解析してきた。この実験モデルの特徴は、1. 自発性のてんかん発作を示さない、2. 上衣下異所性灰白質、皮質下異所性灰白質、または多小脳回を含む複数の皮質形成異常を有する、3. 海馬に病変を有さない、の3点である。

2. 研究の目的

(1) 多小脳回症は難治性てんかんの重要な成因の一つであるが、多小脳回症を有するすべての患児がてんかんを発症することはない。本症のてんかん原性発現の要因については、1. グルタミン酸受容体分布の変容、2. イオンチャネル異常、3. 興奮性または抑制性神経ネットワークの再構築、4. GABA受容体サブユニットの下方制御、など多くの仮説が提出され病態の多様性が推測される。

(2) 組織病理学および電気生理学的な研究結果から、生後の脳障害によるてんかん原性の獲得過程には2つのメカニズム、即ち1. GABA作動性の介在神経細胞の選択的な消失、および2. 軸索発芽と進行性の興奮性神経ネットワークの再構築、が重要視されている。本研究は、興奮性の神経細胞障害による多小

脳回症のハムスターモデルを用い、1. 大脳基底核原基由来の抑制性神経細胞は多小脳回症の発生過程にどのような役割を有するか、2. 多小脳回症においては抑制性の神経細胞はどのような分布変容を生じているか、の2点を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

生後1日目のシリアンハムスターの右大脳皮質内に1 μ gのイボテン酸を、同側の大脳基底核原基に0.05 μ gのビオチン化デキストランアミン(BDA)を各々接種した。同様の方法で生食水を接種した検体を対照群とした。接種後1、2、5および140日目(P1、2、5、140)の両群の脳組織についてHE染色とともにBDAおよびパルブアルブミン免疫染色を行った。また、パルブアルブミン陽性細胞数を多少脳回を中心部と傍領域の部位別に算出し比較するとともに、対照群とも解析した。

4. 研究成果

(1) イボテン酸による神経細胞移動障害：対照群においては、接種局所の皮質に微細な出血を認める以外、神経細胞壊死などの病理所見は観察されなかった。実験群においては、P1において皮質層構造の異常を、P5においては多小脳回に類似した皮質の陥入を認めた。興奮性の神経細胞障害は細胞内Ca²⁺の上昇をもたらす。これは樹状突起の成長や軸索伸長を阻害する結果、神経細胞の移動障害を惹起する。

(2) 抑制性神経細胞の皮質形成異常部位への動員：

BDA免疫染色ではP5対照群では脳室下帯（背側側方部）から放射状に伸びる突起とともに頭頂部皮質に多数のBDA陽性細胞が集積して

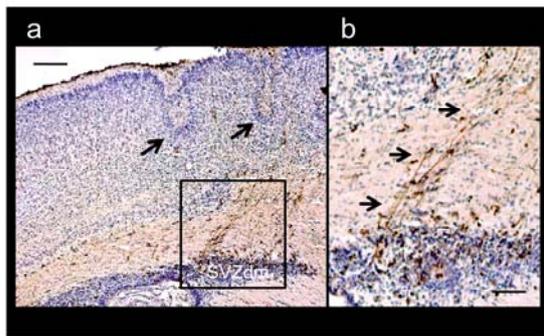


図1：生後5日目のBDA免疫組織染色（HE二重染色）。(a)頭頂葉皮質の多小脳回形成（矢印）。(b)背側正中部の脳室下帯(SVZdm)の拡大図。多小脳回領域に移動する介在神経細胞とその突起に注意（矢印）。
横線：(a)120 μ m, (b)30 μ m.

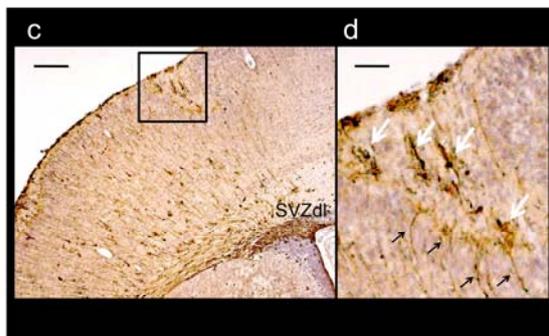


図2：生後5日目のBDA免疫組織染色（HE二重染色）。(c)背外側部脳室下帯(SVZdl)から放射するBDA陽性線維と微小脳回形成（四角）。(d)微小脳回の拡大図。BDA陽性細胞の集積（白矢印）に注意。
横線：(c)100 μ m, (d)30 μ m.

いた。実験群ではこれらの所見に加え、多小脳回を形成する異常皮質にもBDA陽性細胞が認められた（図1および2）。多小脳回の皮質形成過程には異常皮質領域への大脳基底核原基由来の抑制性神経細胞の細胞動員が関与し、皮質興奮性を修飾し得る要因の一つと推察された。

(3) 多小脳回症における抑制性神経細胞の分布変容：

対照群ではパルプアルブミン陽性細胞は大脳皮質に広範囲に分布し、視床網様核には密に集積し、海馬にも少数が散見された。実験群ではイボテン酸を接種した皮質領域を中心に、皮質層構造の異常を伴う1列または2列の微小脳回領域に不均一に分布し、異常皮質以外の領域では対照群とほぼ同様の分布を示した。

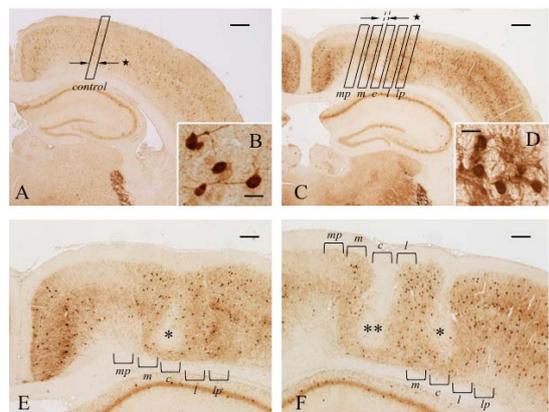


図3：生後140日目のパルプアルブミン(Pv)免疫組織染色(A,B:対照群,CからF:多小脳回群)。(A)皮質弱拡大、(B)皮質のPv陽性細胞(C)皮質弱拡大、(D)視床網様核のPv陽性細胞(E)一つの微小脳回形成(星印)(F)二つの微小脳回形成(星印)。Pv陽性細胞の定量解析は、A,Cに示した皮質幅400 μ mの長方形内の陽性細胞数を算出した。測定領域は多小脳回(c:中心部,m:正中部,l:外側部)および傍多小脳回(mp:正中部,lp:外側部)の5つの領域を設定した。
横線：(A,C)800 μ m, (B,D)25 μ m. (E,F)400 μ m

多小脳回領域におけるパルプアルブミン陽性細胞数の解析では、多小脳回を中心部に比し、側方の傍多小脳回領域において有意に増加していた。これは対照群における同一領域

との比較においても同様で、側方の傍多小脳回領域におけるパルブアルブミン陽性細胞数は有意に高かった。多小脳回症における抑制性の介在神経細胞の分布は不均一で外側の傍多小脳回領域に最も密に集積し、これによる興奮性および抑制性神経活動の不均衡が、本症におけるてんかん原性の発現に密接に関与することを推測した。

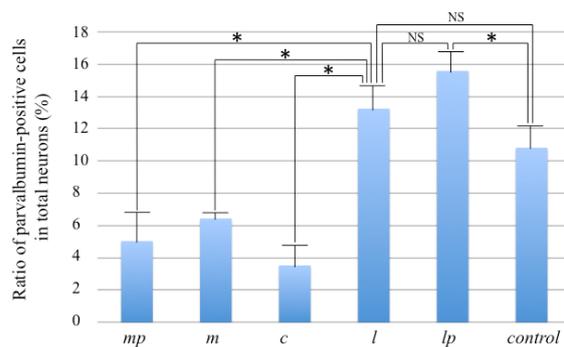


図4：全神経細胞数に対するパルブアルブミン (Pv) 陽性細胞数の比率の定量解析。Pv 陽性細胞数は外側部の傍多小脳回領域 (lp) に最も密に集積していた ($p < 0.01$)。略語は図3と同様。NS：有意差なし。

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13件)

- ① Azukizawa T, Yamamoto M, Narumiya S, Takano T. Oral-facial-digital syndrome type 1 with hypothalamic hamartoma and Dandy-Walker malformation. *Pediatr Neurol* 48: 329-332, 2013. [査読有] doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2012.12.016 .
- ② Takano T. Altered distribution of inhibitory interneurons in polymicrogyria. *Epilepsy Res* 102: 113-116, 2012. [査読有] doi: 10.1016/j.eplepsyres.2012.05.001.
- ③ Yoshioka S, Takano T, Ryujin F, Takeuchi Y. A pediatric case of reversible cerebral vasoconstriction syndrome with cortical subarachnoid hemorrhage. *Brain Dev* 34: 796-798, 2012. [査読有] doi: 10.1016/j.braindev.2012.01.001.
- ④ Yoshioka S, Takano T, Matsuwake K, Sokoda T, Takeuchi Y: A Japanese patient with Kabuki syndrome and unilateral perisylvian cortical dysplasia. *Brain Dev* 33: 174-176, 2011. [査読有] doi: 10.1016/j.braindev.2010.04.001.
- ⑤ Maruo Y, Ozgenc F, Mimura Y, Ota Y, Matsui K, Takahashi H, Mori A, Taga T, Takano T, Sato H, Takeuchi Y: Compound heterozygote of a novel missense mutation (p.K402T) and a double missense mutation (p.[G71R;Y486D]) in type II Crigler-Najjar syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 52: 362-365, 2011. [査読有] doi: 10.1097/MPG.0b013e3181fcafb8.
- ⑥ Hayashi A, Takano T, Suzuki A, Narumiya S: Group A streptococcal brain abscess: a case report and a review of the literature since 1988. *Scand J Infect Dis* 43: 553-555, 2011. [査読有] doi: 10.3109/00365548.2011.564648.
- ⑦ Ohta M, Taga T, Nomura A, Kato H, Takano T, Maruo Y, Takeuchi Y, Ishida M, Ohta S: Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disorder, cytomegalovirus reactivation, and varicella zoster virus encephalitis

- during treatment of medulloblastoma. *J Med Virol* 83: 1582-1584, 2011. [査読有] doi: 10.1002/jmv.22136.
- ⑧ Takano T: Seizure susceptibility in polymicrogyria: clinical and experimental approaches. *Epilepsy Res* 96: 1-10, 2011. [査読有] doi: 10.1016/j.eplepsyres.2011.06.010.
- ⑨ Takano T, Sakaue Y, Sokoda T, Sawai C, Akabori S, Maruo Y, Taga T, Ohno M, Takeuchi Y: Seizure susceptibility due to antihistamines in febrile seizures. *Pediatr Neurol* 42: 277-279, 2010. [査読有] doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2009.11.001.
- ⑩ Takano T, Matsuwake K, Yoshioka S, Takeuchi Y: Congenital polymicrogyria including the perisylvian region in early childhood. *Congenit Anom (Kyoto)* 50: 64-67, 2010. [査読有] doi: 10.1111/j.1741-4520.2009.00253.x.
- ⑪ Takano T, Kinoshita N, Narumiya S, Takeuchi Y. Aprosencephaly with rhombencephalosynapsis and hamartomatous midbrain dysplasia. *Neuropath Appl Neuro* 36: 353-355, 2010. [査読有] doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01066.x.
- ⑫ Takano T, Sawai C, Akabori S, Takeuchi Y. Polymicrogyria without epilepsy by aberrantly migrating inhibitory interneurons. *Epilepsy Behav* 18: 505-506, 2010. [査読有] doi: 10.1016/j.yebeh.2010.05.014.
- ⑬ Taga T, Itoh E, Noda Y, Kato H, Maruo Y, Takano T, Ohta S, Takeuchi Y, Kumaki S: Successful unrelated umbilical cord blood cell transplantation without conditioning for a neonate with severe combined immunodeficiency. *Pediatr Transplant* 2010 Jun 7. [査読有] doi: 10.1111/j.1399-3046.2010.01344.x.
- [学会発表] (計 5 件)
- ① Takano T, Ryujin F, Yoshioka S, Sawai C, Sakaue Y, Takeuchi Y: Characteristics of the neurological manifestations of paediatric perisylvian polymicrogyria. The 12th International Child Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (Brisbane) 2012. 5.27-6.1
- ② Yoshioka S, Takano T, Ryujin F, Sakaue Y, Takeuchi Y: A case of neonatal Sturge-Weber syndrome presenting with cortical calcification at birth. The 12th International Child Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (Brisbane) 2012. 5.27-6.1
- ③ Sakaue Y, Takano T, Yoshioka S, Nishizawa K, Narumiya M, Takeuchi Y: The impact of antihistamine administration on the clinical characteristics of febrile seizure. The 12th International Child Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (Brisbane) 2012. 5.27-6.1
- ④ Takano T, Sawai C, Takeuchi Y: Polymicrogyria including aberrantly migrating inhibitory interneurons. The 15th Congress of the European

Federation of Neurological Societies
(Budapest) 2011. 9.10-9.13

- ⑤ Takano T, Sakaue Y, Sawai C, Akabori S, Yoshioka S, Takeuchi Y: Seizure susceptibility due to antihistamines on febrile seizures. The 11th International Child Neurology Congress (Kairo) 2010. 5.2-5.7

[図書] (計4件)

- ① Watanabe H, Takano T: Neural Tube Defects - Role of Folate, Prevention Strategies and Genetics (Narasimhan KL ed) pp31-46, InTech, Croatia, 2012.
- ② Takano T: Pediatric Neurology (Lawson PN, McCarthy EA eds) pp165-174, Nova Science Publishers Inc, New York, 2012.
- ③ Watanabe H, Takano T: Advances in medicine and biology (Berhardt LV ed) pp187-199, Nova Biomedical Books, New York, 2012.
- ④ Takano T: Epilepsy in Children - Clinical and Social Aspects (Gadze ZP ed) pp3-12, InTech, Croatia, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 知行 (TAKANO TOMOYUKI)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80236249

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：