

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 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700376

研究課題名（和文） ヒト脳スライス標本を用いたてんかん病態形成機序の生理学的解明

研究課題名（英文） Clarification of epileptogenicity using human brain slices in vitro

研究代表者 北浦 弘樹（KITAURA HIROKI）

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：80401769

研究成果の概要（和文）：てんかんは人口の約1%をも侵す主要な脳神経疾患のひとつである。その主な病態形成機序は大脳皮質の神経細胞の過剰興奮であるとされているが、その詳細は明らかではない。そこで、我々は手術で摘出された実際のヒトのてんかん焦点組織からスライス標本を作製し、人工脳脊髄液中で維持することで、生きたままのてんかん焦点組織における興奮動態を観察することを試み、てんかん焦点組織に特有の興奮伝播様式があることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Epilepsy is one of the major neurological disorders in Japan. It is believed that hyper-excitability of the pyramidal neurons in the cerebral cortex contributes to epileptogenicity. However, the precise mechanism of the alteration was not still clarified. We struggled to observe spatiotemporal dynamics of epileptic activities using human brain slices taken from epileptic patients. As a result, we found unique epileptiform propagation of the activities in epileptogenic tissues but not in control tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

1. 研究開始当初の背景

てんかんは人口の約1%をも侵す主要な神経疾患である。とりわけ薬剤抵抗性を示す難治性てんかんについては発作の制御が困難で、かつ若年に発症することもあり、社会的また医療上の重要課題の一つであった。近年の外科治療技術の進歩によりそうした患者においても焦点切除術が行われるようになり、切除された組織の病理学的な研究が進められるようになった。その結果、切除された

焦点組織にはなんらかの形態異常があることがほとんどであり、てんかんが器質的な疾患であることが徐々に明らかになってきた。しかしながら、そのような形態異常がどのようにてんかん発作という機能異常に結びつくのかという点についてはまだまだ未解明な点が多かった。

2. 研究の目的

ヒトのてんかん焦点組織において起きてい

る変化を、神経回路レベルで生理学的に明らかにすること、そしてその変化はどのような分子群によって調節されているのかを解明することを全体構想とする。この構想のうち、本研究では摘出されたヒトの脳組織を対象に組織の発火特性と興奮伝播特性を神経生理学的に解析することにより、異常興奮性の発現メカニズムを明らかにする。加えて、そのような異常興奮性が見られた部位において、病理組織学的な変化との対比を行い、形態と機能の変化を統合的に理解することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では具体的に以下の手順に沿って実験を進めた。

- (1) 摘出された脳組織より活性を維持したまま脳スライス標本作製。
- (2) フラビン蛍光イメージング法を用いて各症例における興奮伝播の強弱や特性を比較。
- (3) 細胞外電場電位測定により自発発火の有無や頻度を比較。
- (4) 測定した組織において免疫染色たゴルジ染色などによる病理組織学的検討。
- (5) それらの実験結果と臨床データを統合して病態形成に重要なファクターを抽出。

対象症例は腫瘍や発生異常、炎症など各種脳病変に伴うてんかん症例とし、対照群としててんかんが症候的にも脳波上も認められない脳腫瘍症例において、病巣摘出のため最小限切除された正常脳皮質を用いた。

摘出脳組織は手術室内で病理医の立会いの下、研究用組織と診断用組織に分離され、後者は直ちに人工脳脊髄液に入れられ、95%酸素・5%二酸化炭素でバブリングを行った。人工脳脊髄液の組成は以下のとおりである。NaCl, 124; KCl, 5; NaH₂PO₄, 1.24; MgSO₄, 1.3; CaCl₂, 2.4; NaHCO₃, 26; glucose, 10 (mM)。

30分以内に手術室から実験室へバブリングしたまま輸送し、500 μm厚の急性脳スライス標本作製した。作製した脳スライス標本は30°Cで1時間 incubate したあと、記録用チャンバーに移して、スライス上に刺激電極を置き、300 μA で10Hz, 1秒間の電気刺激を加えた際にみられる興奮伝播をフラビン蛍光イメージング法により解析した。フラビン蛍光イメージングは470-490nmの励起光をスライスに照射し510-550nmの蛍光の輝度変化を経時的に解析することにより行った。

また、イメージング用の脳スライスを切り出した鏡面の脳組織より病理標本作製し、各種染色により形態的な異常の有無や程度の検索を行った。ゴルジ染色は市販のキット

(FD Rapid Golgi Stain) を用いて行った。

4. 研究成果

対象症例は14例で、そのうち対照群が3例、てんかん群が11例であった。年齢は対照群で42.3±15.6歳、てんかん群で33±16.3歳であった (mean±SD)。また、てんかん群の平均経過年数は17.5年であった。

てんかん群から得られた脳スライスにおいては、強い水平性の興奮伝播がほぼ全例において認められた。この水平性の強い興奮伝播はスライス全域にわたるのではなく、1 Gyrus 内における限られた領域認められた (図1)。

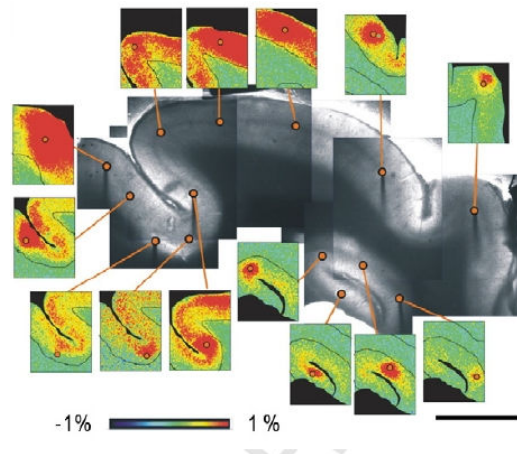


図1 てんかん焦点組織内の興奮伝播

神経細胞の自発発火は水平性興奮伝播の強い部位においてもほとんど見られなかった。興奮伝播の時間経過を解析してみると、水平性の興奮伝播は速い波 (Early phase) と遅い波 (Late phase) の2つからなっていることが明らかとなった (図2A)。また、この興奮は細胞外電場電位との同時記録によって、電気的活動に基づいた変化であることも明らかとなった (図2B)。

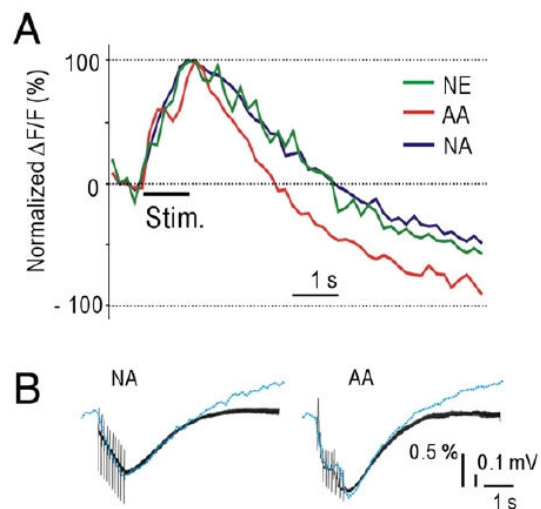


図2 水平性興奮伝播の時間経過

さらにこのてんかん組織に特徴的な水平性興奮伝播の Early phase と Late phase についてその興奮特性を詳細に検討した。その結果、Late phase は刺激点を中心に勾配を持つ波であるのに対し、Early phase は空間的に均一な波であることが明らかとなった (図 3)。

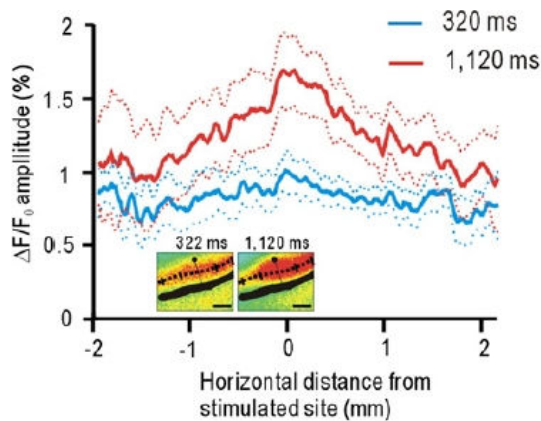


図 3 Early phase と Late phase の空間分布

また、刺激強度を変化させて興奮動態を検討してみると、Late phase は刺激強度に応じて緩やかに変化したものの、Early phase は All-or-none の反応を示した (図 4)。

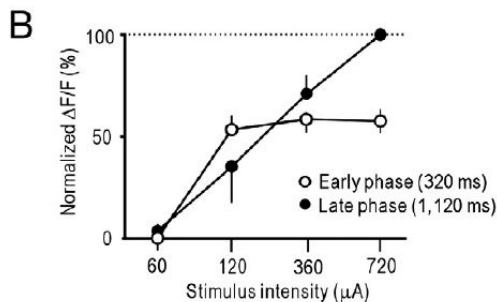
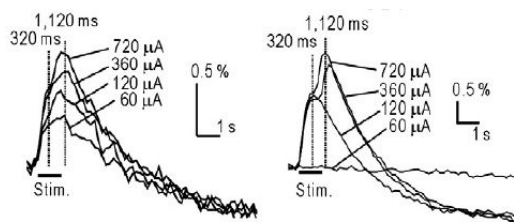


図 4 Early phase と Late phase の刺激強度変化に対する反応性の違い

すなわち、これらの結果から Early phase は時空間的に均一な波であるのに対し、Late phase は Heterogeneous な波であることが示唆された。

さらに、これらの波の皮質内回路における Pathway を検討するために、スライスの一部を切断してその影響を検討した。その結果、

Early phase は皮質の V 層を切断するとその伝播が抑制されるのに対して、Late phase では II/III 層の切断により抑制されることが明らかとなった (図 5)。

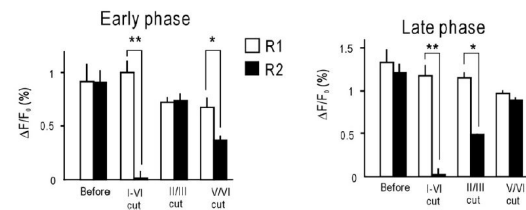
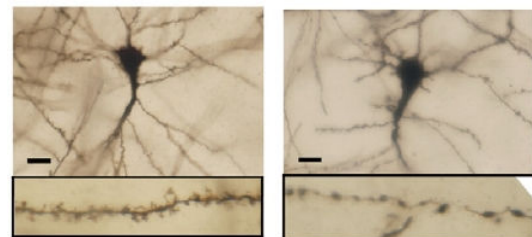


図 5 Early phase と Late phase の興奮伝播にかかわる主な Pathway の違い

この結果からも、Early phase と Late phase は異質なものであり、異なった神経回路を基盤とする可能性が高いことが示された。

最後にこれらの特徴を持つ水平性興奮伝播のみられた部位における形態学的な変化を検討した。水平性興奮伝播の見られた部位においては錐体神経細胞の細胞体が肥大し、樹状突起の棘が減少しているという結果を



得た (図 6)。

図 6 水平性興奮伝播の見られた部位における形態学的な変化

・成果の位置づけとインパクト

本研究では世界で初めてヒトの脳スライス標本を用いた高解像度のイメージングに成功したという点において、重要な成果を挙げたと思われる。さらにてんかんを有する症例では *in vitro* の脳切片においても興奮特性に明らかな違いが見られたということは、てんかんを引き起こす異常神経回路網が局在性てんかんにおいては焦点組織自体に含まれることを指し示しており、外科手術による焦点切除でてんかん発作が軽快するという臨床上的知見を強力にサポートするものである。

・今後の展望

難治てんかんの多くを占める内側側頭葉てんかんについては今回の対象とはなっていない。今後海馬においても脳スライス標本の作製も進め、その全貌を明らかにしていく必要があると思われる。

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 6 件)

- ① Kitaura H, Oishi M, Takei N, Fu YJ, Hiraishi T, Fukuda M, Takahashi H, Shibuki K, Fujii Y, Kakita A: “Periventricular nodular heterotopia functionally couples with the overlying hippocampus.” *Epilepsia*, in press, (2012), 査読有, DOI : 10.1111/j.1528-1167.2012.03509.x
- ② Hiraishi T, Oishi M, Kitaura H, Ryufuku M, Fu YJ, Fukuda M, Takahashi H, Fujii Y, Kakita A: “Epidermoid cyst involving the medial temporal lobe: surgical pathologic features of the epileptogenic lesion.” *Neuropathology*, 32(2):196-201, (2012), 査読有, DOI : 10.1111/j.1440-1789.2011.01243x
- ③ Kitaura H, Hiraishi T, Murakami H, Masuda H, Fukuda M, Oishi M, Ryufuku M, Fu Y, Takahashi H, Kameyama S, Fujii Y, Shibuki K, Kakita A: “Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations: imaging of human brain slices.” *Neuroimage*, 58: 50-59. (2011), 査読有, DOI : 10.1016/j.neuroimage.2011.05.046
- ④ Miyahara H, Ryufuku M, Fu YJ, Kitaura H, Murakami H, Masuda H, Kameyama S, Takahashi H, Kakita A.: “Balloon cells in the dentate gyrus in hippocampal sclerosis associated with non-herpetic acute limbic encephalitis.” *Seizure*, 20: 87-89, (2011), 査読有, DOI : 10.1016/j.seizure.2010.09.013
- ⑤ Ryufuku M, Toyoshima Y, Kitaura H, Zheng Y, Fu YJ, Miyahara H, Murakami H, Masuda H, Kameyama S, Takahashi H, Kakita A.: “Hypertrophy of hippocampal end folium

neurons in patients with mesial temporal lobe epilepsy.” *Neuropathology*,

31(5):476-485, (2011), 査読有, DOI : 10.1111/j.1440-1789.2010.01191.x

- ⑥ Kitaura H, Hishida R, Shibuki K: “Transcranial imaging of somatotopic map plasticity after tail cut in mice.” *Brain Res*, 1319: 54-59, (2010), 査読有, DOI : 10.1016/j.brainres.2010.01.020

[学会発表] (計 5 件)

- ① 発表者名 H. Kitaura
発表標題 Pathophysiological mechanisms underlying hippocampus sclerosis for MTLE: implications of flavoprotein fluorescence imaging on human brain slices
学会名 Neuroscience 2011
発表年月日 2011年11月14日
発表場所 Washington DC, (米国)
- ② 発表者名 北浦 弘樹
発表標題 内側側頭葉てんかんにおける海馬硬化症の病態生理学的意義: ヒト脳スライス標本を用いたイメージング解析
学会名 第45回日本てんかん学会
発表年月日 2011年10月6日
発表場所 朱鷺メッセ (新潟)
- ③ 発表者名 H. Kitaura
発表標題 Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations in human partial epilepsy in vitro
学会名 Neuroscience 2010
発表年月日 2010年11月15日
発表場所 San Diego, (米国)
- ④ 発表者名 北浦 弘樹
発表標題 新皮質てんかん病巣における興奮伝播様式の解析: ヒト脳スライス標本を用いた光学的イメージング
学会名 第44回日本てんかん学会
発表年月日 2010年10月14日
発表場所 岡山コンベンションセンター
- ⑤ 発表者名 北浦 弘樹
発表標題 二次性新皮質てんかんの興奮動態: ヒト脳スライス標本を用いた解析
学会名 第51回日本神経病理学会総会
発表年月日 2010年4月24日
発表場所 シェーンバッハサポー (東京)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北浦 弘樹 (KITAURA HIROKI)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：80401769

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

柿田 明美 (KAKITA AKIYOSHI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80281012

福多真史 (FUKUDA MASAFUMI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：00361907

亀山茂樹 (KAMEYAMA SHIGEKI)

国立病院機構・西新潟中央病院・院長