

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591521

研究課題名(和文)小児期発症の難治てんかんにおけるてんかん原性形成機序の解明

研究課題名(英文)Study on the epileptogenesis in child-onset intractable epilepsy

研究代表者

林 雅晴(HAYASHI, Masaharu)

公益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：00280777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児期に発症する難治てんかん患者において、てんかん原性の形成機序を解明するため、剖検脳での免疫組織化学的解析と患者髄液での代謝物解析を並行して行い、West症候群の大脳皮質での電位依存性ナトリウムチャンネル発現とオートファジーの異常、ならびに乳児けいれんでの神経アミノ酸やモノアミンの代謝異常を明らかにした。

さらに日本での発生頻度が増加している亜急性のてんかん性脳症に関して、患者血清を用いた対照脳での免疫組織化学染色により新規の抗神経抗体のスクリーニングを進め、難治けいれん発症との関連を追究した。

これらの研究成果は難治てんかんに対する新規治療法開発に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the epileptogenesis in child-onset intractable epilepsy, we performed the immunohistochemical analysis in autopsy brains, and the examination of amino acids and neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid from patients, simultaneously. We succeeded in disclosing the abnormal expression of voltage-dependent sodium channels and/or the facilitation of autophagy in the cerebral cortex in cases of West syndrome, and the disturbed metabolism of amino acid and monoamines in patients with infantile convulsion.

In addition, we established the screening method of anti-neuronal antibodies in patients with subacute autoimmune encephalitis, which became to occur frequently in Japan, and explored the mechanisms of generation of refractory epilepsy in such encephalitis.

We believe that these data will give us a clue for developing new treatments in patients with refractory epilepsy.

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：医療・福祉 臨床 脳・神経 病理学 生体試料 発達障害 難治てんかん 脳症

## 1. 研究開始当初の背景

小児期発症てんかんは時に難治てんかんである West 症候群 (WS) / Lennox-Gastaut 症候群 (LGS) や進行性ミオクロヌステんかん (PME) に進展し、発達障害が後遺症としてみられ、生命予後も不良となる。本研究グループは、小児期発症難治てんかんの病態を明らかにし治療法開発に役立てることを目的とし、平成 11 年度～22 年度に基盤研究 (C) (2) において、WS / LGS と PME の病態に、大脳皮質 GABA 系抑制性神経の障害、脳幹モノアミン神経の異常、酸化ストレスが関与していることを明らかにした。さらに剖検脳と患者髄液・尿での解析を組み合わせ、代謝異常症、大脳形成異常、急性脳炎・脳症での難治てんかん発症に、GABA 系抑制性神経の異常、酸化ストレス、軸索障害、脚橋被蓋核アセチルコリン神経病変が関与することを見出した。これらの研究を進展させるため、本研究を企画した。

一方、電位依存性ナトリウムチャンネル  $Na_v1.1$  は神経細胞の活動電位発生に関与する。 $Na_v1.1$  をコードする *SCN1A* 遺伝子の変異が乳児重症ミオクロヌステんかん (SMEI) などのてんかん症候群や熱性けいれんの患者で検出される。電位依存性ナトリウムチャンネルを含むイオンチャンネルの異常は、GABA 系抑制性神経や脳幹モノアミン神経の障害や新規抗てんかん薬の作用機序にも関係する。ヒト剖検脳でのナトリウムチャンネル研究は、多発性硬化症患者での軸索表出の  $Na_v1.2 \cdot Na_v1.6$  解析が散発的に行われているのみであり、てんかん原性との関係も解明されていない。そこで上記に加えて、てんかん原性に関するヒト脳ナトリウムチャンネル研究を行うこととした。

さらに近年、日本を中心に、無熱性けいれんの重積・群発エピソードが数カ月わたって複数回出現し、限局性の神経画像異常も伴うてんかん性脳症の報告が増えつつある。副腎皮質ステロイド療法、ガンマグロブリン大量療法などの免疫制御療法により症状が改善することが多い。一部の例でてんかん発作、知能障害を残すことがあるが、Rasmussen 脳症、抗 NMDA 受容体脳炎とも症状が異なるため、新たな亜急性のてんかん性脳症の存在が推定されている。抗グルタミン酸受容体抗体が陽性的こともあるが、免疫制御療法の有効性に比して既存の抗神経抗体が検出される頻度は低い。我々は、亜急性のてんかん性脳症患者の急性期・回復期の血清を用いて、年齢相当対照の脳連続切片で免疫染色を行い、臨床症状と関連した脳部位と結合する抗神経抗体が急性期にみられることを報告した。患者血清・髄液を用いた酸化ストレスについての検討も開始しており、本研究に多数例での系統的な解析を含めることとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、小児期発症難治てんかんのて

んかん原性の形成に関して、剖検脳・外科病理材料での免疫組織化学的解析と患者生体試料での解析を組み合わせ、イオンチャンネル (主として電位依存性ナトリウムチャンネル) の発現異常、興奮性・抑制性神経の不均衡、脳幹モノアミン神経障害の関与を明らかにする。

イオンチャンネル解析は、対照脳、難治てんかん剖検脳、てんかん外科病理組織の順で進める。また、神経ペプチド・モノアミン神経病変の検討では、剖検脳における興奮性グルタミン酸系神経、ドーパミン・セロトニン神経の受容体・トランスポーター表出、アセチルコリン神経に関する免疫組織化学的検討と、患者髄液での神経ペプチド、モノアミン代謝物質の定量を並行して進める。一方、亜急性のてんかん性脳症の研究では、新規の抗神経抗体のスクリーニングを進めるとともに、病態におけるサイトカインストーム、酸化ストレス、軸索障害、グリオーシスの関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

小児期発症難治てんかんのてんかん原性の形成に関して、剖検脳・てんかん外科病理材料での (1) 電位依存性ナトリウムチャンネル、(2) 興奮性グルタミン酸系神経、カテコールアミン神経の受容体・トランスポーター表出に対する免疫組織化学的解析と、患者髄液での神経ペプチド・モノアミン代謝物質の解析を並行して進め、イオンチャンネル発現異常、興奮性・抑制性神経の不均衡、脳幹モノアミン神経障害を明らかにし、新たな難治てんかん治療法の開発に役立てる。

さらには (3) 亜急性のてんかん性脳症において、患者血清の脳組織での免疫組織化学染色 (免疫染色) を通じた抗神経抗体のスクリーニング、ならびに髄液検体での酸化ストレス、軸索障害に関する研究を進め、急性脳炎・脳症での難治てんかん発症機序の解明と、てんかん難治化の予防法の開発に役立てる。

## 4. 研究成果

<平成 23 年度>

(1) 剖検脳でのイオンチャンネルに関する免疫組織化学的解析: West 症候群 (WS) で発症し Lennox 症候群 (LGS) に移行した仮死後遺症 (HIE) と滑脳症、両症候群の既往を有さない HIE 例、対照の 4 群の大脳辺縁系で市販の抗体を用いて  $Nav1.1$  表出を検討した。既往例、疾患対照で、対照と同様に、大脳皮質に  $Nav1.1$  陽性の神経細胞が少数確認された (2012 年 10 月第 46 回日本てんかん学会で発表)。一方、海馬、扁桃体での表出は一部の症例で障害されていた。

(2) 難治てんかんにおける神経ペプチド・モノアミン神経異常の解明: WS 乳児例と対照乳児において、髄液中のアセチルコリン、神経ペプチド、モノアミン代謝物を比較・測

定したところ、アセチルコリン値の上昇、抑制性神経ペプチドのグリシン・GABAならびにセロトニン代謝物(5-HIAA)の値の低下を見出した。

(3) 亜急性または再発・再燃を示すてんかん性脳症の病態解明：精神症状・不随意運動が持続する自己免疫性脳炎において、急性期・回復期の患者血清による脳切片での免疫組織化学染色を行い、症状と関連する脳部位と結合する新規抗神経抗体のスクリーニングを進めた。17例での解析結果をまとめ発表した(図書4)。10例で精神症状、不随意運動に関連して大脳皮質、大脳基底核・視床に陽性所見がみられた。

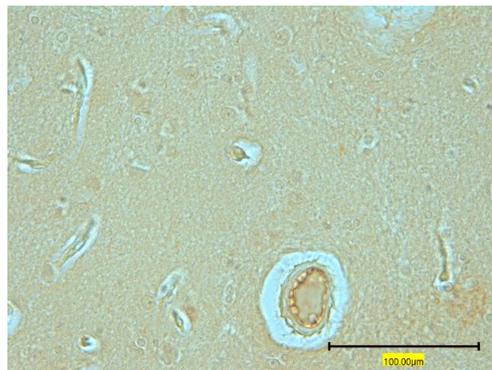
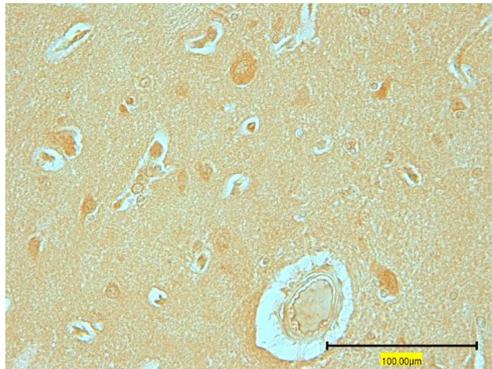


図1 大脳基底核炎症例の血清による対照脳切片での免疫組織化学染色。急性期血清(上写真)では被殻の大型細胞が陽性だったが、症状がみられなくなった回復期血清(下写真)では陽性所見は消失した。

<平成24年度>

(1) 剖検脳でのイオンチャンネルに関する免疫組織化学的解析：West症候群(Ws)で発症しLennox症候群(LGS)に移行した仮死後遺症(HIE)と滑脳症の大脳辺縁系で市販の抗体を用いてNav1.1表出を検討し、2012年10月第46回日本てんかん学会で発表した。さらにPMEの病因として重要な歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の剖検例でNav1.1表出を検討したが、PME既往との関係を見出せなかった。以前、DRPLAでPME発症での関与を解明した酸化ストレスとの関連で注目されているautophagyに関する解析を開始した。

| Age/Sex                                       | Cause of death<br>Brain disorders | Cerebral<br>cortex | Hippocampus |
|---|-----------------------------------|--------------------|-------------|
| <b>Controls</b>                               |                                   |                    |             |
| 9yM   | Leukemia                          | 1+                 | n/A         |
| 16yM  | Myopathy                          | 1+                 | 1+          |
| 20yM  | MH                                | 1+                 | 1+          |
| 29yF  | GBS                               | 1+                 | 1+          |
| 35yM  | Myopathy                          | 1+                 | 1+          |
| 36yF  | TTP                               | (-)                | (-)         |
| <b>Cases of WS and LGS</b>                    |                                   |                    |             |
| 10yF  | HIE                               | (-)                | (-)         |
| 13yM  | HIE                               | 1+                 | 1+          |
| 18yM  | HIE                               | 1+                 | 1+          |
| 24yM  | HIE                               | 1+                 | 1+          |
| 5yF   | Lissencephaly                     | 1+                 | (-)         |
| 8yM   | Lissencephaly                     | 1+                 | 1+          |
| 10yF  | Lissencephaly                     | 1+                 | (-)         |
| 21yM  | Lissencephaly                     | 1+                 | 1+          |
| <b>HIE cases without history of WS or LGS</b> |                                   |                    |             |
| 6yM   | HIE                               | 1+                 | (-)         |
| 13yF  | HIE                               | 2+                 | 1+          |
| 13yM  | HIE                               | 1+                 | (-)         |
| 20yF  | HIE                               | 1+                 | 1+          |
| 20yM  | HIE                               | 1+                 | (-)         |
| 25yF  | HIE                               | 1+                 | (-)         |

図2 Na<sub>v</sub>1.1陽性の神経細胞の分布。対照、WS+LGS既往を有する周産期仮死後遺症(HIE)例・滑脳症例、HIE疾患対照(両てんかん症候群の既往なし)の3群で、海馬を含む大脳皮質にNa<sub>v</sub>1.1陽性の神経細胞が確認された。

(2) WS乳児での髄液中アセチルコリン、神経ペプチド、モノアミン代謝物のHPLC測定結果を英文論文6)にまとめた。

(3) 亜急性または再発・再燃を示すてんかん性脳症の病態解明：急性期・回復期の患者(17例)血清による対照脳切片での平成24年度の免疫組織化学的解析結果をオーストラリアで開催された国際小児神経学会議(第12回)・アジア大洋州小児神経学会議(第11回)合同会議で発表した。免疫組織化学染色を17例から30例に増やして進め、加えて市販の脳抗原添加メンブレインでimmunoblottingも行った。免疫染色陽性の19例中7例で陽性バンドを認めた。

<平成25年度>

(1) 剖検脳でのautophagyに関する免疫組織化学的解析：West症候群(Ws)の既往を有する仮死後遺症と滑脳症の大脳、ならびに進行性ミオクロームステんかんの病因として重要な歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の小脳で、パラフィン固定ヒト脳におけるautophagyマーカーLC3・p62に関する免疫組織化学的解析を行い、2013年10月11日第46回日本てんかん学会で口演発表した。WS既往例の大脳では、LC3染色では異常はなかったが、約半数で病因とは無関係にp62陽性astrocyte増加を認めた。DRPLAの小脳では、Purkinje細胞のLC3染色性低下とp62陽性astrocyteの増加を見出した。

(2) 髄液中の神経ペプチド・神経伝達物質の代謝研究：乳児けいれんのでんかん原性を解明するため、乳児けいれん患者の髄液においてアミノ酸とモノアミン代謝物をHPLC測定により定量した。予後良好な胃腸炎関連けいれん患者における抑制性・興奮性アミノ酸の上昇と、モノアミン代謝物の低下を見出し、2014年4月12日第117回日本小児科学会で口演発表した(現在、投稿中)。

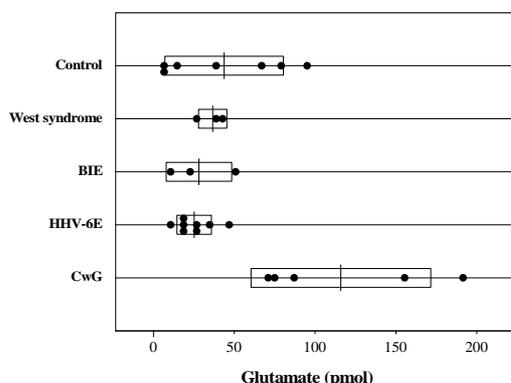


図3 髄液中の glutamate 濃度。対象、WS、良性乳児けいれん (BIE)、ヒトヘルペスウイルス6型脳炎 (HHV-6E) に比べて、胃腸炎関連けいれん (CwG) では高値がみられた。

(3) 亜急性または再発・再燃を示すてんかん性脳症の病態解明：80例前後の患者血清・髄液において、ラット・ヒト脳切片ならびにラット培養細胞での免疫組織化学染色によるスクリーニング、細胞内抗原に関するImmunoblot、細胞表面抗原に関するCell based assay、ELISAを組み合わせた網羅的解析を進め、約40%の症例で病態における抗神経抗体の関与を明らかにした。研究成果の一部を論文2)に発表した。

#### 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) Segawa M, Nomura Y, Hayashi M. Dopa-responsive dystonia is caused by particular impairment of nigrostriatal dopamine neurons different from those involved in Parkinson disease: evidence observed in studies on Segawa disease. *Neuropediatrics* 2013;44:61-66. (査読有)
- 2) Hachiya Y, (10 authors), Hayashi M. Autoimmune neurological disorders associated with group-A beta-hemolytic streptococcal infection. *Brain Dev* 2013;35:670-674. (査読有)
- 3) 林雅晴. 抗てんかん薬治療における処方箋記載法改定の問題点. *Epilepsy* 2013;7:50-52. (査読無し)
- 4) Igarashi A, (6 authors), Hayashi M. Acute limbic encephalitis with focal

hyperperfusion on single photon emission computed tomography. *Brain Dev* 2013;35:181-184. (査読有)

- 5) 林雅晴. 抗大脳基底核抗体. *BRAIN and NERVE* 2013; 65:377-384. (査読無し)
- 6) Hayashi M, et al. Lesion of acetylcholine neurons in refractory epilepsy. In: *ISRN Neurology* (ISSN: 2090-5513 Volume 2012, 6 pages. doi:10.5402/2012/404263. (査読有))
- 7) Nakajima K, Hayashi M, Tanuma N, Morio T. An autopsy case of polymicrogyria and intracerebral calcification dying the intracerebral hemorrhage. *Neuropathology* 2012;32:107-110. (査読有)
- 8) Miyata R, Hayashi M, et al. Oxidative stress in mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012;34:124-127. (査読有)
- 9) Hayashi M, Miyata R, Tanuma N. Decrease in acetylcholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus in a patient with Prader-Willi syndrome. *Neuropathology* 2011;31:280-285. (査読有)

[学会発表](計 6件)

- 1) 林雅晴. 特別講演 脳炎・脳症の病態解明を目指して. 第60回静岡小児神経研究会. 2013.11.16, 静岡
- 2) 林雅晴. 形成異常. 第54回日本神経病理学会・第9回コアカリセミナー. 2013.4.24, 東京
- 3) 林雅晴. 特別講演 小児の急性脳炎・脳症の病態解明. 第24回城北機能神経疾患研究会. 2013.3.14, 東京
- 4) 林雅晴. 小児科医も知っておきたい脳病理～病理を知ると小児神経学がわかりやすくなる～. 第6回東海地区小児神経セミナー. 2012.9.8, 名古屋
- 5) 林雅晴. 脳炎・脳症の病理所見. 第43回日本小児感染症学会総会・学術集会シンポジウム「急性脳炎・脳症」. 2011.10.30, 岡山.
- 6) 林雅晴. 難治てんかんの治療：てんかん原性の機序から考える. 第48回神奈川小児神経懇話会「特別講演」. 2011.7.23, 横浜.

[図書](計 5件)

- 1) 林雅晴. 進行性ミオクローヌスてんかん. 一般社団法人日本てんかん学会編集, てんかん専門医ガイドブック - てんかんにかかわる医師のための基本知識 -. 診断と治療社, 2014, pp261-263. 計 303p
- 2) Nakajima K, Hayashi M, et al. Glial fibrillary acidic protein and S100 calcium-binding protein B in the cerebrospinal fluid of children with acute neurological disorders. In: Kahr C, Ling EA,

eds. Glial cells: embryonic development types/ functions and role in disease. New York: Nova Science Publishers, 2013, pp.108-116. 計 211p

- 3) 林雅晴. 結節性硬化症. 大槻泰介、須貝研司、小国弘量、井上有史、永井利三郎編集, 希少難治てんかん診療マニュアル. 診断と治療社, 2013, pp76-78. 計 170p
- 4) Hayashi M, Hachiya Y, Okumura A. Pathological examination of influenza virus-associated and autoimmune encephalitis/encephalopathy in children. Vultagione JM, Forester KN, eds. Pathology: new research. New York: Nova Science Publishers, 2012, pp73-89.
- 5) Hayashi M, Tanuma N, Miyata R. Oxidative stress in developmental brain disorders. In: Ahmad S, eds. Neurodegenerative diseases. Austin: Landes Bioscience. 2011, August 1, ISBN: 978-1-4614-0652-5/ Adv Exp Med Biol 2012;724: 278-290. 計 393p

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

林 雅晴 ( HAYASHI, Masaharu )  
公益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：00280777