

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：23304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03542

研究課題名(和文) ヒト手術標本を用いたてんかん原性ネットワークのイメージング解析と制御

研究課題名(英文) Ex vivo optical imaging of human brain tissues for visualization of epileptogenic networks.

研究代表者

北浦 弘樹 (Kitaura, Hiroki)

公立小松大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80401769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬物抵抗性の難治てんかん患者において、手術による切除標本から神経活動を光学的イメージング法により解析し、病理学的所見との対比によるてんかん原性の検討を行った。主な対象患者は海綿状血管腫(CA)、限局性皮質異形成(FCD)、結節性硬化症(TSC)、海馬硬化症(HS)であった。てんかん病巣の病理学的に異なった基盤に依りて異なった異常興奮波の発生ならびにその興奮伝播様式を捉えることが可能となった。また、新規抗てんかん薬候補化合物を灌流した結果、濃度依存性に自発性の異常興奮発生頻度が抑制される様子が明らかとなった。さらにこの抑制様式はカルバマゼピンによる抑制様式とは異なるものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、実際のてんかん患者から切除された焦点組織の異常神経活動をマイクロレベルで捕捉し、その制御を検討したものである。そこから得られた成果は臨床研究と基礎研究を橋渡しする位置付けにある。こうした研究の方向性は、世界的に見ても独自性が高い。動物モデルを用いた実験系ではカバーできない病理学的多様性を対象としながらも、動物実験レベルの精密性と自由度を持った実験展開が可能である。そのため、ヒトの焦点組織を対象としながらも、まだ薬になっていない候補化合物を適用してその薬理作用の検討を行うことも可能とし、臨床的な薬物療法のエビデンスに貢献できるものである。

研究成果の概要(英文)：We conducted optical imaging in acute brain slices taken from intractable epilepsy patients ex vivo. Epileptic focus were removed by surgeon and those brain blocks were immediately immersed in ice cold artificial CSF. We investigated epileptic foci of cavernous angioma, tuberous sclerosis, focal cortical dysplasia and hippocampus os mesial temporal lobe epilepsy. We found different manners of generation and propagation in epileptiform activities consistent with histopathological features. Furthermore, we investigated pharmacological effect of new candidate of antiepileptic drugs in those focal tissues.

研究分野：病態神経科学

キーワード：てんかん 光イメージング 神経病理 海馬硬化症 限局性皮質異形成

1. 研究開始当初の背景

てんかんは人口の約1%が罹患している主要な神経疾患である。その発生機序は未だ不明であるが、発生期の脳の形成異常のほか、炎症や外傷から腫瘍に至るまで幅広い形成要因が関与する。したがって、こうした多様な形成要因を背景としながらも、てんかん焦点に共通した普遍的なてんかん原性機序が存在する、という保証はない。もし、焦点のてんかん原性機序が病態ごとに異なるとすれば、画一的な治療では不十分であり、各々のてんかん原性機序に見合った治療ストラテジーが望まれる。

実際、切除されたてんかん焦点を病理組織学的に検討すると、**gliosis** やヘモジデリンの沈着、神経細胞配列の異常、異型細胞の出現など、症例ごとに実に様々な形態学的特徴を有していることが多く、全てのてんかん焦点が同一の機序で動いているとは考えにくい。一方で、これら様々な形態学的特徴も、何が本当に重要でどのようにてんかん原性機序に関与しているのか、といった機能的意義についてはほとんど分かっていない。すなわち、てんかん焦点で病理組織学的に認められる形態異常を機能的に説明出来る研究手法が求められている状況にあった。

2. 研究の目的

本研究の核心は、「実験生理学的なてんかん原性機序に基づいて疾患分類の再構築ができれば、より最適なてんかん病態の学術的体系化も可能ではないか、そしてその体系化に基づいた治療法の提案が可能ではないか」という点にある。報告者らはこれまでに、てんかん外科手術による切除焦点組織から脳スライス標本作製して人工脳脊髄液中で incubate することにより、*ex vivo* でその神経活動を捉えるという試みを進めてきた。このようにして incubate されたヒトの脳スライス標本からは、24 時間程度その活性を保ったまま、十分に再現性のある神経活動を測定できる。そこで本申請課題ではこれまでの研究をさらに推し進めて、皮質全体にわたって多数のニューロンの活動を同時計測することにより、てんかんの動的ネットワークをマイクロレベルで描出し、機能・形態の両面からてんかん原性の解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

共同研究施設において、てんかん外科を施行された難治てんかん症例である海綿状血管腫、限局性皮質異形成 (FCD type II)、結節性硬化症 (TSC)、内側側頭葉てんかん (MTLE) の各症例を対象として研究を行った。切除前に手術室内であらかじめ待機しておき、切除された組織を直ちに氷冷人工脳脊髄液中でバブリングしながら実験室へ輸送した。実験室において脳組織ブロックの活性を維持したまま急性スライス標本作製し incubate を行った。作製したスライス標本は、カルシウム蛍光指示薬である Oregon Green 488 BAPTA-AM (OGB) または Fluo-4 を Loading し、神経活動を画像的に解析した。

各症例で観察面の対面のブロックからパラフィン標本作製し、病理組織学的検討を行った。特にてんかん様興奮活動はスライス標本上の特定の部位から常に生じるか、またその伝播様式に病態ごとの特徴があるかについて検討を進めた。またこれら異常神経活動が病理組織学的特徴と空間的にどのように対応するかについて検討を進めた。同時にてんかん様興奮が発生するスライス部位から凍結生標本を準備し、マイクロアレイハイブリダイゼーションを用いた RNA 解析を進めることで、同部位に特徴的な遺伝子発現解析を行った。さらに、新規抗てんかん薬候補化合物を灌流することでその効果の検証も行った。

4. 研究成果

(1) 海綿状血管腫に伴うてんかん焦点組織の病態生理学的特徴

海綿状血管腫周囲から高頻度にてんかんを生じることが臨床的に知られている。脆弱な血管壁より漏出したヘモジデリンの脳実質内への沈着がてんかん原性を有するものと考えられてきた。しかしながらその機序については、ヘモジデリンそのものの酸化還元反応に伴う化学的刺激によるなど、いくつかの仮説が提唱されてきたものの、いずれも細胞レベルでの実験科学的根拠は不十分な状況にあった。そこで、海綿状血管腫を含む周囲てんかん焦点組織を一塊として切除し、スライスイメージングを行うことで、血管腫およびヘモジデリンの沈着範囲と空間的に対応した興奮増強を検討した。その結果、肉眼的に黄変したヘモジデリン沈着領域よりも、顕微鏡的にはかなり広い範囲で鉄イオンの沈着が生じていることを明らかにした。しかしながら、イメージング実験で得られた興奮増強領域はそれよりも限局しており、むしろ Gliosis が生じている領域に一致していた。このことは、神経細胞の過剰興奮は鉄イオンによる化学的な刺激というよりも反応性に増殖したグリア細胞による生物学的な刺激による影響が大きいと考えられた (図 1)¹。

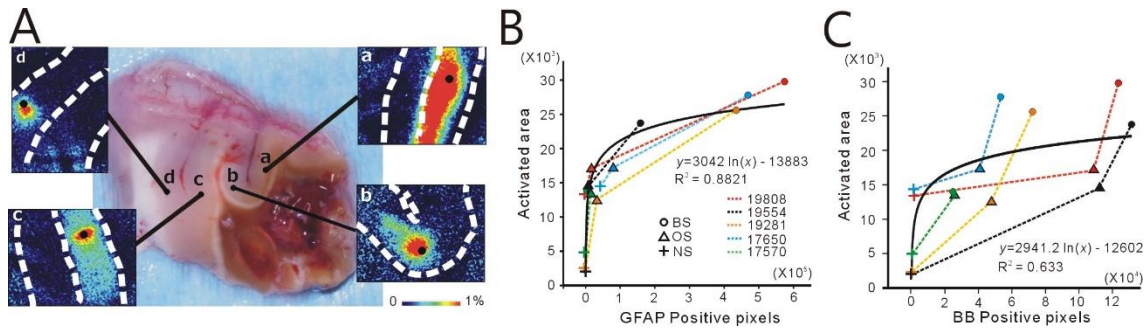


図1 A 海綿状血管腫を含むてんかん焦点組織における興奮伝播特性. B アストロサイトの空間分布 X 軸と興奮伝播領域. C 微細鉄イオンの沈着領域と興奮伝播領域.

(2) FCD および TSC に伴うてんかん焦点組織の病態生理学的特徴

FCD と TSC は両社とも病巣内に病理学的に Dysmorphic Neuron や Balloon cell と呼ばれる特徴的な異型細胞が出現するなどよく類似した病理組織増を呈する。しかしながら臨床的には、FCD では病巣内からてんかん波が発生するのに対し、TSC では病巣に隣接した周囲組織よりてんかんが発生することが知られていた。そこで、両者において病巣と周囲組織を含む切片からイメージング記録を取り、その興奮増強の差異を検討した。その結果、FCD では Dysmorphic Neuron を含む病巣内から強い興奮波が発生し周囲へ拡散していく様子が捉えられたのに対し、TSC では病巣に隣接した皮質領域から微弱な自発発火が発生していた。この微弱な興奮波は隣接した TSC 病巣内へ侵入し、そこで十分に増強されてから再度周囲皮質へ戻される様子が明らかとなった。これらの結果は、FCD では Seizure generator と Amplifier の両者が病巣内に存在する「自己完結型」の焦点組織であるが、TSC は Generator と Amplifier が別の部位に存在する「相互依存型」の焦点組織と考えられた。異常得られた成果は、臨床的にとらえられる Seizure onset の所見に矛盾しないものであり、その組織レベルでの興奮動態を明らかにするものであると思われる。

(3) 新規抗てんかん薬化合物 X の薬理作用検証

最後にこれら異常神経活動に対する制御の可能性を検討した。新規に開発された抗てんかん薬化合物 X を FCD および MTLT の組織に灌流してその薬理作用を検証した。対照薬として局在てんかん症例に広く処方されているカルバマゼピン (CBZ) を用いた。FCD type II の焦点組織において、病理学的な Dysmorphic Neuron の分布領域と一致した領域より頻回な自発発火を認めた。CBZ, 化合物 X とともに自発発火の減少を認め、200 μM ではほぼ消失したが、その作用はやや異なっていた。CBZ では 100 μM で自発発火の頻度はあまり変わらず、振幅が低下する傾向にあったが、化合物 X では振幅はあまり変わらずに頻度を減少させる作用を認めた (図2)。また、MTLE で海馬硬化を認めた症例においては、化合物 X は直接的な神経細胞の興奮性にはほとんど影響しないものの、苔上線維発芽による反響回路網の形成に由来する異常神経活動のみが著明に抑制されることを確認した。

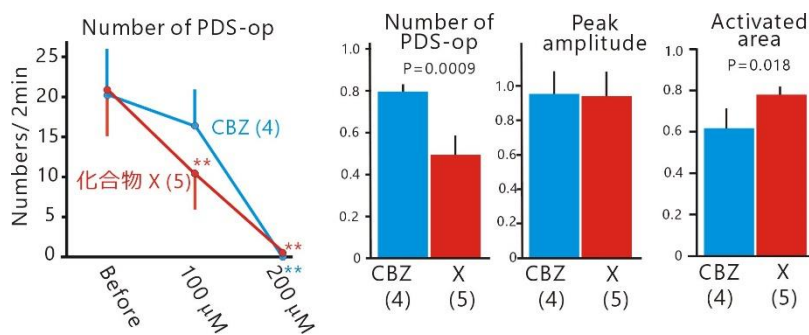


図2 新規抗てんかん薬化合物 X の FCD type II 焦点組織に対する薬理作用 (左) スライス上での PDS 様自発発火に対する CBZ, 化合物 X の抑制効果. (右) 100 μM における各検討項目の比較. Unpaired t-test

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

実際のでんかん患者から切除された焦点組織の異常神経活動をマイクロレベルで捕捉し、その制御を検討した本研究で得られた成果は臨床研究と基礎研究を橋渡しする位置付けにある。機能脳神経外科学・実験生理学・神経病理学の知見を融合して、症例ごとの固有性に着目したてんかん原性の解明を目指したものであり、こうした研究の方向性は、世界的に見ても独自性が高い。動物モデルを用いた実験系ではカバーできない病理学的多様性を対象としながらも、動物実験レベルの精密性と自由度を持った実験展開が可能である。そのため、ヒトの焦点組織を対象としながらも、まだ薬になっていない候補化合物を適用してその薬理作用の検討を行うことが可能であった。今後はさらに各種抗てんかん薬およびその候補化合物の薬理作用と病理組織学的基盤の関連を検討することで、臨床的な薬物療法のエビデンスに資することを目指すものである。

参考文献

1. Reactive astrocytes contribute to epileptogenesis in patients with cavernous angioma. Hiroki Kitaura, Tetsuya Hiraishi, Yosuke Itoh, Makoto Oishi, Yukihiro Fujii, Masafumi Fukuda, Akiyoshi Kakita. *Epilepsy research* 176 106732-106732

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Furukawa Ayako, Kakita Akiyoshi, Chiba Yoichi, Kitaura Hiroki, Fujii Yukihiko, Fukuda Masafumi, Kameyama Shigeki, Shimada Atsuyoshi	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 Research	6. 最初と最後の頁 106502 ~ 106502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eplepsyres.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 Igarashi Hironaka, Ueki Satoshi, Kitaura Hiroki, Kera Tae, Ohno Ken, Ohkubo Masaki, Terumitsu-Tsujita Mika, Kakita Akiyoshi, Kwee Ingrid L	4. 巻 2020
2. 論文標題 Longitudinal GluCEST MRI Changes and Cerebral Blood Flow in 5xFAD Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Contrast Media & Molecular Imaging	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/8831936	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 Anisimov Sergei, Takahashi Masahiko, Kakihana Taichi, Katsuragi Yoshinori, Kitaura Hiroki, Zhang Lu, Kakita Akiyoshi, Fujii Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 G3BP1 inhibits ubiquitinated protein aggregations induced by p62 and USP10	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46237-1	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 Piatnitskaia Svetlana, Takahashi Masahiko, Kitaura Hiroki, Katsuragi Yoshinori, Kakihana Taichi, Zhang Lu, Kakita Akiyoshi, Iwakura Yuriko, Nawa Hiroyuki, Miura Takeshi, Ikeuchi Takeshi, Hara Toshifumi, Fujii Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 USP10 is a critical factor for Tau-positive stress granule formation in neuronal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47033-7	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 Tsukano Hiroaki, Hou Xubin, Horie Masao, Kitaura Hiroki, Nishio Nana, Hishida Ryuichi, Takahashi Kuniyuki, Kakita Akiyoshi, Takebayashi Hirohide, Sugiyama Sayaka, Shibuki Katsuei	4. 巻 9
2. 論文標題 Reciprocal connectivity between secondary auditory cortical field and amygdala in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56092-9	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 Susaki EA., Shimizu Chika, Kuno Akihiro, Tainaka Kazuki, Li Xiang, Nishi Kengo, Morishima Ken, Ono Hiroaki, Ode Koji L., Saeki Yuki, Miyamichi Kazunari, Isa Kaoru, Yokoyama Chihiro, Kitaura Hiroki, et al.	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 Nature Communications	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 Suzuki Yuji, Kitaura Hiroki, Nakamura Yukimi, Kakita Akiyoshi, Huber Vincent J., Capozzoli Nicholas, Kwee Ingrid L., Nakada Tsutomu	4. 巻 6
2. 論文標題 Skull diplo? is rich in aquaporin-4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03259 ~ e03259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03259	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 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 4件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北浦弘樹
2. 発表標題 Epileptogenic mechanisms in resected foci are different between LEAT and TS
3. 学会等名 第10回生理研・霊長研・新潟脳研合同シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北浦弘樹
2. 発表標題 The epileptogenic mechanisms of Tuberous Sclerosis investigated by ex vivo optical imaging
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北浦弘樹
2. 発表標題 Visualization of epileptogenic activities in human hippocampal slices ex vivo.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北浦弘樹
2. 発表標題 てんかん焦点組織の生理学的多様性
3. 学会等名 愛知県医療療育総合センター発達障害研究所 公開セミナー（招待講演）
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 基礎から探るてんかん病態：臨床に役立つ知見
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019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 てんかんにおけるグリアの役割：AMED研究のシーズ
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北浦弘樹
2. 発表標題 てんかんの病理
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会 教育セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	才津 浩智 (Saitsu Tomohiro) (40402838)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	清水 宏 (Shimizu Hiroshi) (40608767)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	
研究分担者	柿田 明美 (Kakita Akiyoshi) (80281012)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	

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
---------	---------