

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500498

研究課題名(和文)側頭葉てんかん・海馬硬化と局所皮質異形成との関連性の解析

研究課題名(英文)A study of the correlation between hippocampal sclerosis of temporal lobe epilepsy and focal cortical dysplasia

研究代表者

高瀬 敬一郎(Takase, Kei-ichiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00467903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：胎生18日目、胎児頭蓋に冷却プローブで傷害を加え局所皮質異形成モデルを作製した。皮質異形成モデルは両側前頭葉にそれぞれ2カ所(group A)、両側前頭葉にそれぞれ1カ所(group B)を作成した。出生後28日齢(P28)に皮質と海馬に電極を設置し、P35からP77まで脳波・ビデオ同時期記録を行ったところ、group Aの68.8%から自発てんかん発作を生じ、皮質ないし海馬からてんかん発作波を認めた。組織学的には、group Aに皮質異形成が認められ、さらに免疫染色ではNMDA受容体、グルタミン酸トランスポーターが上昇しており、皮質異形成でのてんかん性興奮の増大が示唆された。

研究成果の概要(英文)：On embryonic day (E) 18, a frozen probe was placed on the frontal scalp of a Sprague-Dawley rat embryo through the uterus wall to produce multiple (two to four) freeze lesions on each hemisphere. Rats were divided into group A (four freeze lesions) and group B (two freeze lesions). EEG video monitoring for rat pups was performed from postnatal day (P) 35 to P77. Brain tissue was examined by immunohistochemistry, including semi-quantitative densitometry. 68.8% of the rats with multiple FCDs showed spontaneous hippocampal seizures which began by movement cessation and culminated in wet-dog shakes during periods of hippocampal discharge, from P47 onwards. Furthermore, immunoreactivities for N-methyl-D-aspartate receptors and glutamate transporters both in FCD lesions and in hippocampi were significantly enhanced compared to controls. Prenatal freeze-lesioning of the brain during embryonic development leads to spontaneous temporal lobe seizures in a rat model with multiple FCDs.

研究分野：基盤研究(C)(一般)

科研費の分科・細目：1201

キーワード：実験てんかん 皮質異形成 側頭葉てんかん 海馬硬化症

1. 研究開始当初の背景

てんかんは種々の病因による大脳神経細胞の過剰な発射(てんかん性放電)に由来する反復性の発作を主徴とする疾患である。100人に1人の割合で患者が存在し、発作症状のため社会生活が十分に営めない場合も多く、大きな社会問題となっている。中でも側頭葉てんかんは、てんかんの中で患者数が最も多く、手術適応の割合が高いことから、社会的にも医療的にも極めて重要であるが、一部の家族性側頭葉てんかんを除き、原因は未だ不明である。難治性側頭葉てんかんは手術による寛解率も低く、患者は多くの社会生活での困難に直面している。

てんかんの原因としては様々なものがあり、皮質異形成はてんかん焦点切除術で取り出した組織に認められることが多く、てんかんを引き起こす原因として近年注目されている (Porter BE, 2003; Fauser S, 2004)。しかし皮質異形成そのものにてんかん原性があるか否かは明らかになっていない (Palmini A, 1995; Fauser S, 2006)。皮質異形成は海馬硬化を有する側頭葉てんかんに合併することがあるが、皮質異形成と海馬硬化の関連性は未だ不明のままである。このような局在する皮質異形成のてんかん原性を解明するために、私たちは局所皮質異形成を有するラットの作成を行った。ラット胎児胎生 18 日齢の大脳に寒冷傷害を加えることで私たちは世界で初めてヒトの皮質異形成に極めて近似する局所大脳皮質異形成の作成に成功した (Takase et al, 2008; 日本てんかん学会 WADA 賞受賞: 図 1)。このモデルラットでは、大脳皮質を連日電気刺激することにより海馬のてんかん原性獲得 (キンドリング) が促進されることを明らかにした。このモデルでは、皮質異形成の組織には脳の正常な層構造が見られず、神経細胞の極性が完全に乱れており、ヒトの皮質異形成に合致する所見であり、てんかん性放電を記録することができた。免疫染色により興奮性グルタミン受容体である NMDA 受容体の過剰な発現を認めた。この結果から、皮質に正常とは異なる組織が存在する場合、大脳 辺縁系が異常なネットワークを形成し海馬の興奮性を高め、てんかん原性が惹起されると考察した。以上の学術的背景から、私たちは側頭葉てんかんに皮質異形成が寄与するとの仮説を立てた。

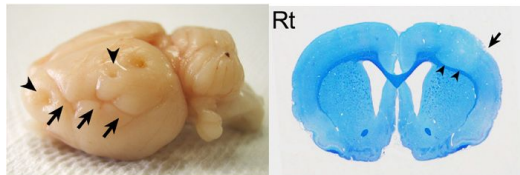


図 1

2. 研究の目的

上記仮説を証明するために、本研究ではキンドリング刺激を行わずに皮質異形成モデルラットの長期脳波ビデオモニターにより自発てんかん発作を証明し、海馬の電気生理

学的異常を明らかにする。さらに、海馬の神経細胞のレセプター蛋白異常を明らかにする。これらにより実験的側頭葉てんかんの原因たり得ることを立証する。

3. 研究の方法

胎生 18 日目 (E18)、母ラットから子宮を有茎のまま取り出し子宮壁外から胎児頭蓋に冷却プローブで傷害を加え、再び母ラットの腹腔内に戻した上で出産させ、局所皮質異形成モデルを作製した (図 2)。



図 2

皮質異形成は両側前頭葉にそれぞれ 2 カ所 (group A)、両側前頭葉にそれぞれ 1 カ所 (group B)、sham ラットモデルとして両側前頭葉にそれぞれ 2 カ所 (group C) 作成した (図 3)。

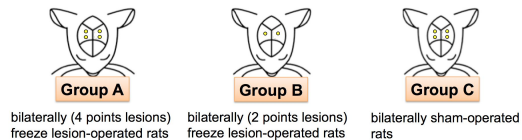


図 3

	n	Operation during the embryonic period	EEG monitoring
A1-subdural	7	Bilaterally (4 point lesions) freeze lesion operated	+
A1-depth	9	Bilaterally (4 point lesions) freeze lesion operated	+
A2	5	Bilaterally (4 point lesions) freeze lesion operated	-
B	5	Bilaterally (2 point lesions) freeze lesion operated	+
C1	6	Bilaterally sham operated	+
C2	5	Bilaterally sham operated	-

図 4

Group A はさらに両側前頭葉にそれぞれ 1 カ所ずつ硬膜外電極を設置した群 (A1-subdural)、両側海馬にそれぞれ 1 カ所ずつ深部電極を設置した群 (A1-depth)、組織標本用の電極を設置しない群 (A2) に分類した。Group C は両側海馬にそれぞれ 1 カ所ずつ深部電極を設置した群 (C1)、組織染色用の群 (C2) に分類した。各群の n 数は図の通り (図 4)。各ラットは出生後通常通り生後 28 日目 (P28) まで飼育した。

出生後 28 日齢 (P28) のラット (A1-subdural, A1-depth, B, C1 各群) に対し、左右前頭葉に硬膜外電極、左右海馬に深部電極を設置した。10 日後の P35 から脳波・ビデオ同時期記録をこれらのラットに対し開始した。記録はそれぞれ 1 日 12 時間で週に 2 日間、P77 まで 43 日間にわたって行った。皮質ないし海馬からの脳波上てんかん発射とビデオ上てんかん発作を生じた個体をカウントし、その脳波所見とてんかん所見を分類した (脳波上皮質/海馬発作、持続時間、発作所見等)。

次に A2, C2 各群のラットの組織切片に対し、HE, KB, NeuN 染色にて形態を判断した上で、新皮質・海馬の組織に対し免疫染色を行った。抗体はそれぞれ NMDAR1、NMDAR2A、

NMDAR2B、GAD65/67、GLAST、GLT-1を行い、NMDA 受容体、GABA ニューロン、グルタミン酸トランスポーターの変化を観察すると共に、画像処理ソフトを用いた Semi-quantitative densitometric analysis を用いて定量し、各群間で比較検討した。

#### 4. 研究成果

A1-subdural 群の7匹中5匹 (71.4%) に P50 以降計 15 回、A1-depth 群の 9 匹中 6 匹 (66.7%) に P45 以降計 15 回の自発てんかん発作の出現を認めた (図 5)。

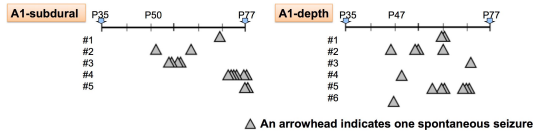


図 5

これらの発作は全て同一で、まず長時間続く無動状態 (staring) から口周囲の動き (mastication, slobbering at the mouth) が出現し、その後強く体幹全体を振るわせる動き (wet dog shakes) に進展した。発作波は必ず両側海馬から生じ、平均持続時間は  $58 \pm 38.9$  秒 ( $\pm$ S.D.) であった (図 6)。

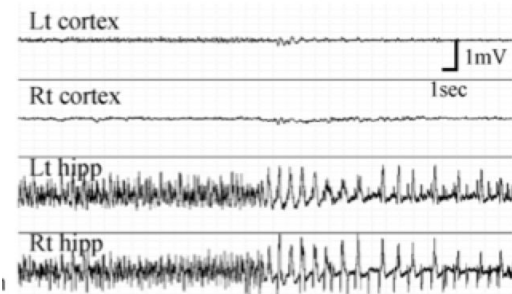


図 6

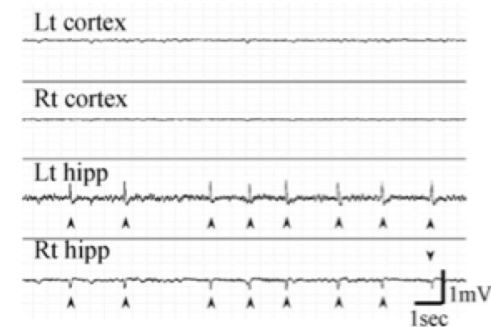


図 7

海馬から皮質に進展することはなかった。発作間欠期脳波は A1 群の海馬から時々認められたが (図 7)、肉眼的発作に進展することはなかった。皮質からの発作間欠期脳波を認めることはなかった。B 群と C1 群からはてんかん発作を認めなかった。

A2 群の組織を HE 染色、KB 染色で形態を調べたところ、異形成部位にあたる大脳皮質は肥厚しており、さらにその直下の白質は明らかに菲薄化していた。異形成部位の皮質は著明な層構造異常を伴っていた。層構造は破綻しており、極性を失った様々な大きさの神経細胞群を同部位に認めた。異常部位の内側と外側はともに正常な皮質構造を呈していた。

NeuN 染色では、異形性に当たる部位はほぼ神経細胞の異常な集簇であった (図 8)。C2 群には組織学的異常を認めなかった。

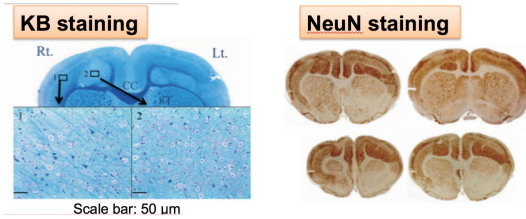


図 8

A2 群、C2 群の組織に対し、NMDA 受容体、GABA ニューロン、グルタミン酸トランスポーターの変化を画像処理ソフトを用いた Semi-quantitative densitometric analysis を用いて定量したところ、海馬では GAD64/67 に差はなかったが、それ以外の NMDA 受容体とグルタミン酸トランスポーターの染色性は著明に上昇しており、グルタミン酸を介した神経興奮活動の上昇が示唆された。また皮質では、NMDA 受容体とグルタミン酸トランスポーターの関係は海馬と同様であったが、GAD64/67 に関しては、異形性群で減少しており、GABA ニューロンの活動性が低下していることが示唆された (図 9)。

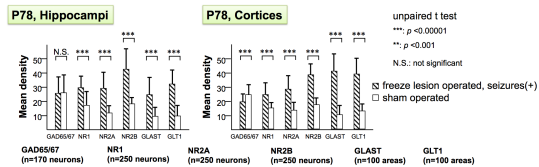


図 9

以上の結果から、グルタミン酸による興奮性が増大した異形性部位からの出力が、両側海馬に流入し、海馬より側頭葉てんかんに類似した発作が生じたものと考えられる。我々の以前の検討で、異形性が一つの場合は P77 までてんかん原性を持ち得ないことが判明している。これらのことから、異形性が複数個存在した場合は比較的容易に側頭葉てんかんを励起することが示唆された。またこの研究では、皮質起源のてんかん発作を認めなかったことから、皮質内ではてんかん励起に関するサーキットが生じることは困難であると結論づけた。

#### 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 10 件)

Yutsudo N, Kamada T, Kajitani K, Nomaru H, Katogi A, Ohnishi YH, Ohnishi YN, Takase K, Sakumi K, Shigeto H, Nakabeppu Y. *fosB*-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy behavior with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2013 38: 895-906, 2013.

Kamada T, Sun W, Takase K, Shigeto H, Suzuki SO, Ohyagi Y, Kira J.

Spontaneous seizures in a rat model of multiple prenatal freeze lesioning. *Epilepsy Res.* 105(3): 280-91, 2013

Shigeto H, Boongird A, Baker K, Kellinghaus C, Najm I, Lüders H. Systematic study of the effects of stimulus parameters and stimulus location on afterdischarges elicited by electrical stimulation in the rat. *Epilepsy Res.* 104: 17-25, 2013.

Kamada T, Sun W, Takase K, Shigeto H, Suzuki SO, Ohyagi Y, Kira J. Spontaneous seizures in a rat model of multiple prenatal freeze lesioning. *Epilepsy Res.* 105: 280-91, 2013.

Yutsudo N, Kamada T, Kajitani K, Nomaru H, Katogi A, Ohnishi YH, Ohnishi YN, Takase K, Sakumi K, Shigeto H, Nakabeppu Y. fosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. *Neuropsychopharmacology.* 38: 895-906, 2013

Isobe N, Kanamori Y, Yonekawa T, Matsushita T, Shigeto H, Kawamura N, Kira J. First diagnostic criteria for atopic myelitis with special reference to discrimination from myelitis-onset multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2012 May 15;316(1-2):30-5. Epub 2012 Feb 25.

Isobe N, Kanamori Y, Yonekawa T, Matsushita T, Shigeto H, Kawamura N, Kira J. First diagnostic criteria for atopic myelitis with special reference to discrimination from myelitis-onset multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 316: 30-35, 2012.

Takase K, Shigeto H, Furuta K, Sakae N, Ohyagi Y, Kira J. Transient vocal cord palsy caused by hypoperfusion of unilateral hemisphere. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 102: 273-6, 2011.

Takase K, Murai H, Tasaki R, Miyahara S, Kaneto S, Shibata M, Takashima N. Initial MRI findings predict progressive lacunar infarction in the territory of the lenticulostriate artery. *Eur Neurol.* 65: 355-60, 2011.

Shigeto H, Sakata A, Morioka T, Takase K, Hagiwara K, Kamada T, Kanamori Y, Hashiguchi K, Tobimatsu S, Yamashita N, Kira J. Peri-orbital electrodes as a supplemental recording for detection of ictal discharges in medial temporal lobe epilepsy. *Neurology Asia,* 16: 303-307, 2011.

[学会発表](計10件)

高瀬敬一郎。脳梗塞急性期における症

候性てんかん発作の検討。第39回日本脳卒中学会総会，2014年3月13日-3月15日，大阪府大阪国際会議場

Kei-ichiro Takase, Takashi Kamada, Taira Uehara, Hiroshi Shigeto, Satoshi O. Suzuki, Hiroyuki Murai, Jun-ichi Kira. Prenatal Lesioning Cortical Dysplasia Rat Model with Spontaneous Temporal Lobe Seizures. XXI World Congress of Neurology, Vienna, Austria, September 21-26, 2013.

高瀬敬一郎。非ヘルペス性良性辺縁系脳炎の多様性について：当科で経験した10症例の検討。第9回日本てんかん学会九州地方会，2013年7月13日，福岡市九州大学百年講堂

高瀬敬一郎。モデルラットを用いた実験的局所皮質異形性の形成に関する組織学的検討。第54回日本神経学会学術大会，2013年5月29日-6月1日，東京都東京国際フォーラム

高瀬敬一郎。レンズ核線条体動脈支配領域の進行性ラクナ梗塞を初診時MRIで予測する試み。第53回日本神経学会学術大会，2012年5月22日-5月25日，東京都東京国際フォーラム

高瀬敬一郎。レンズ核線条体動脈支配領域の進行性ラクナ梗塞を初診時MRIで予測する試み。第36回日本脳卒中学会総会，2011年7月30日-8月1日，京都市国立京都国際会館

(講演)

高瀬敬一郎。虚血性脳血管障害と抗血小板療法。筑豊 ATIS サミット，2013年9月2日 福岡県飯塚市のがみプレジデントホテル

高瀬敬一郎。動脈硬化症疾患予防ガイドラインに準じた脳梗塞治療。筑豊 CREST MEETING，2013年6月17日 福岡県田川市医師会館

高瀬敬一郎。脳梗塞治療における血圧管理。慢性神経疾患外来管理勉強会，2013年6月7日 福岡市九州厚生年金病院

高瀬敬一郎。よくわかる！脳梗塞。第19回地域医療サポーター養成講座，2013年3月22日 福岡県飯塚市飯塚コスモスコモン

高瀬敬一郎。てんかんとは？第1回筑豊てんかん市民公開講座，2012年10月6日 飯塚市飯塚コスモスコモン

[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

<https://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/6> . 研究組織

(1)研究代表者

高瀬 敬一郎 (TAKASE KEI-ICHIRO)

九州大学 大学院 医学研究院 臨床準教授  
研究者番号：00467903

(2)研究分担者

重藤 寛史 (SHIGETO HIROSHI)  
九州大学 大学病院 講師  
研究者番号：50335965

鎌田 崇嗣 (KAMADA TAKASHI)  
九州大学 大学病院 術研究員  
研究者番号：70614460