

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870252

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Epileptogenesis in Hippocampal sclerosis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：内側側頭葉てんかんの主な病態である海馬硬化症について、形態と機能の両面から病態形成機序の解明に迫ることを目的として遂行した。そのために、まず、手術で摘出されたヒトの脳組織から生鮮脳スライス標本作製して、フラビン蛍光イメージング法により神経活動の解析を行った。その後、同一標本を固定・染色して苔状線維の走行や病理組織学的変化など対比して検討した。その結果、病理組織学的な海馬硬化の進展にあわせて、異なったてんかん原性機序が存在している可能性が示唆された。本研究で得られた成果は、将来内側側頭葉てんかんの新たな治療法の開発につながりうるものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the most frequent focal epileptic syndrome in adults, and the majority of complex partial seizures originate from the mesial structures of temporal lobe, including the hippocampus. Due to the sufficient localization of the seizure onset and excellent results of resection, surgery has been considered as a standard care for these patients. However, the close mechanisms of epileptogenesis in these hippocampus have not been clarified. To investigate this issue, we performed flavoprotein fluorescence imaging and field potential recordings in vitro using samples of slice preparations of hippocampus surgically taken from patients with MTLE. Hippocampal slices were prepared from surgically resected brain tissue taken from seven intractable epileptic patients. We found that electrically evoked activity was enhanced in the subiculum in all of the MTLE group. Further, we noticed that mossy fiber sprouting may occur in the severely sclerotic hippocampus.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん イメージング ヒト脳スライス標本 病態生理学 海馬硬化症

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。てんかんはバリエーションの多い症候群であるが、最も多いタイプである「内側側頭葉てんかん」は大脳辺縁系を起始とするてんかんで、頻度が多い点、定型的な海馬切除手術により圧倒的に高い軽快率を有する点において、他と一線を画している。

その内側側頭葉てんかんにおいては、海馬体自体がてんかん原性の主座であるということは概ねコンセンサスが得られていると思われる。それは摘出手術により良好な予後をもたらされること、皮質脳波などの臨床生理学的検査において、海馬体を起始とする発作波が捕捉されることなどの知見による。一方で病理組織学的には、逆に、海馬体における神経細胞の脱落と Gliosis などを特徴とする「萎縮」が起こっていることが知られている(海馬硬化)。両者を結びつけるような理路整然とした説明は未だ確立されていない。長年このパラドックスに対する解が示されなかったことは、海馬硬化症における機能と形態との融合が技術的に困難であったことに起因すると思われる。しかしながら、我々は最近その解決の糸口となりうる方法を確立し得た。それは、「手術により摘出されたヒトの脳組織から生鮮脳スライス標本作製して機能解析し、固定後、病理組織学的な形態解析を行う」というものである。この方法を用いれば、多様な背景や臨床経過を持つ実際のヒトの病理組織標本において、実際のてんかん焦点組織での異常な神経活動を細胞レベルで解析した後、病理学的な変化と関連付けて、その意義を解釈することができる。

2. 研究の目的

現在までは大脳皮質に焦点のみられる新皮質てんかんを中心として研究を進めてきた。これは主に技術的理由による面が大きい。ヒトの脳スライス標本はげっ歯類のものに比べて脆弱であるため作製・維持に困難を伴うが、なかでも海馬組織は特に脆弱であり、スライスの作製・管理が格段に困難であった。そのため、比較的耐久性のある大脳皮質で研究を進めてきたものである。しかし、その中で得られたノウハウの蓄積により、現在ではヒトの海馬組織においても高品質なスライスの作製と神経活動の記録が可能となっている。本研究では、これまでのヒト大脳皮質での実績と海馬での予備実験の結果を踏まえ、いよいよてんかん外科の中で最も早くから手術法が確立し、学術的な知見の蓄積も深い、海馬硬化症をターゲットに据えて研究を進めるものである。

以上の状況を踏まえ、特に次の点に焦点を絞って、研究を行った。

(1) 歯状回顆粒細胞の異常発芽による反響回路形成の検討

これまでの研究から歯状回顆粒細胞の苔状線維発芽による異常な回路形成がてんかん原性として有力視されている。そのため、苔状線維の投射異常による興奮性増強の有無とそれが起こる条件を形態・機能の両面から検討した。

(2) Subiculum における過剰興奮性の検討

近年、てんかん症例の海馬硬化における特徴的な神経細胞の残存様式や電気生理学的な研究から、Subiculum がてんかん原性に重要な役割を果たしているという考えが提唱されている。そこで、どのような症例で Subiculum の興奮性増強が生じているのか、また、上記の歯状回における異常興奮性との相違点について検討を進めた。

3. 研究の方法

研究方法は大別して(a)臨床データの取得、(b)組織の採取と急性脳スライス標本の作製、(c)神経活動の生理学的解析、(d)実験を行ったスライスの病理組織学的解析、(e)臨床データ・実験結果・病理学的所見の統括、の各ステップに沿って進める。特にこの研究で主体となる(c),(d)の生理学的・組織学的解析については、さらに歯状回・CA4領域における苔状線維投射の機能的・形態的解析、Subiculum における興奮性増強の検討の2点に重点を置いて進めた。様々な程度 of 海馬硬化症の症例に対して横断的に検討を行い、形態学的な海馬硬化症の進展度合いと実験で明らかになった異常興奮性について関連を探った。

神経活動の解析は主に生鮮脳スライス標本を用いたフラビン蛍光イメージング法により行った。本法はげっ歯類などの小動物において実績がある脳機能イメージング法であるが、申請者は摘出したヒトの脳組織においても十分なクオリティをもって応用することに成功している。その結果、新皮質てんかんの焦点組織における特徴的な興奮伝播様式を発見し、報告している。具体的には以下の手順に従った。

(1) 組織の採取とスライス標本の作製:

手術室において切除された脳組織を直ちに細切し、病理診断に用いる部位および実験に用いる部位を選別した。全例、病理医の立会いの下に進め、診断業務に支障がないようにした。実験用の組織は直ちに氷冷人工脳脊髄液に入れて95%酸素でバブリングを行いながら、30分以内に実験室へ輸送し、神経細胞の活性を維持したまま生鮮スライス標本作製し incubate した。この状態で約半日程度、スライスから安定して記録が取れることを確認している。

(2) スライス標本の機能的形態学的解析:

海馬スライス標本上に刺激電極を挿入し

て、電気刺激を加え、それによって惹起される神経活動をフラビン蛍光イメージング法により画像化して解析した。この方法は酸素代謝に伴う自家蛍光変化を利用した脳機能イメージング法で、電気的な神経活動ともよく相関することが知られている。また、外因性の色素を使用しないため、染めムラなどの色素の分布不均一に伴うアーチファクトや蛍光褪色などを考慮する必要がなく、広範囲で長時間の測定を要求されるヒト脳スライス標本を用いた実験に適している。また、その時間解像度は約100ms程度まで、空間解像度は約10マイクロメートル程度まで確保できるので、てんかん病態の組織レベルでのイメージングにも十分に対応できる。

(3) 歯状回顆粒細胞の異常発芽による反響回路形成の検討

海馬硬化症におけるてんかん原性機序の可能性として有力視されている「苔状線維発芽説」について検討を加える。てんかん状態の海馬においては、苔状線維が歯状回門で異常分岐し、歯状回の内側分子層へ再投射していることがヒト剖検脳およびモデル動物の研究から示唆されている。それにより、歯状回で反響回路が形成されることが、てんかん原性獲得の要因とされている(図1)。そこで、様々な程度 of 海馬硬化症の症例において、貫通線維を刺激あるいは苔状線維を逆行性に刺激した時の顆粒細胞層の反応を、フラビン蛍光イメージングおよび電気生理学的に記録した。また、シナプス伝達の阻害剤を用いて、苔状線維刺激による顆粒細胞の興奮が逆行性伝導だけでなく、異常投射による経シナプス性の入力にも依存することを確認することとした。また、記録したスライス標本の鏡面の脳ブロックから組織標本を作製し、病理組織学的変化との対応を検討した。特に、苔状線維を特異的に染色するTIMM染色を用いて、苔状線維の走行異常を確認した。

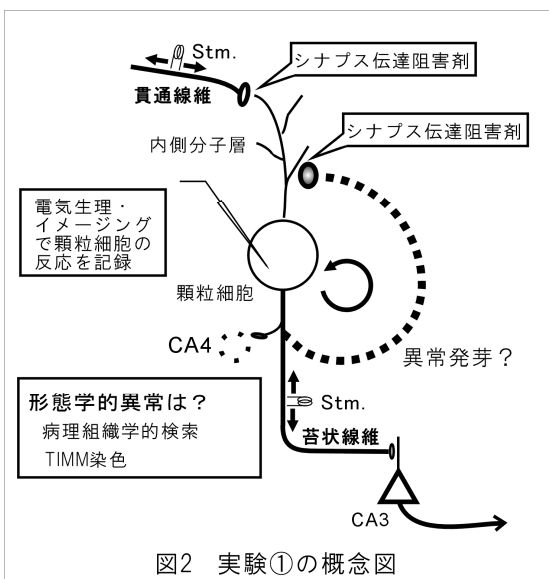


図2 実験①の概念図

(4) Subiculumにおける過剰興奮性の検討
 上記のような苔状線維発芽は有力な仮説であるが、てんかんを伴うヒトの海馬硬化において常に認められるわけではないため、歯状回顆粒細胞以外の病態変化も検討する必要がある。近年、てんかんの海馬硬化で特徴的に残存するSubiculumがてんかん原性獲得に重要な役割を果たしているという考えが提唱されている。そこで、Subiculumにおいても歯状回と同一条件で刺激を行い、興奮特性を比較した。また、歯状回・Subiculumともに無刺激の状態でのfield potentialを長時間記録し、自発発火の有無や頻度を比較した。歯状回/Subiculumの興奮性増強が、症例によって、どちらに優位性がみられるかを検討し、病理組織学的変化と突き合わせて考察した。

4. 研究成果

研究期間全体を通して、48例のてんかん手術検体を用いた脳スライスイメージング実験を行った。うち、内側側頭葉てんかんの症例は29例であった。その病理組織学的な内訳は、明確な海馬硬化が見られなかった症例9例、軽度(CA1のみ、あるいはCA3/4の神経細胞脱落が50%以下)の症例5例、高度(CA3/4の神経細胞脱落が50%以上)のもの14例であった。

これら症例について、それぞれ歯状回(DG)、CA1,3,4、海馬支脚の各領域について電気刺激をしたときの興奮動態をフラビン蛍光イメージングで測定した。その結果、全例において海馬支脚での興奮が他の領域と比して増強している傾向が明らかとなった(図3)。

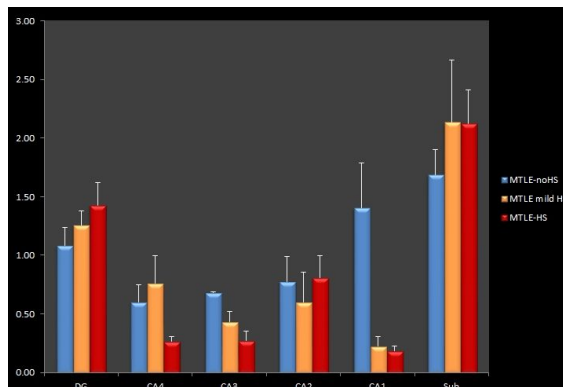
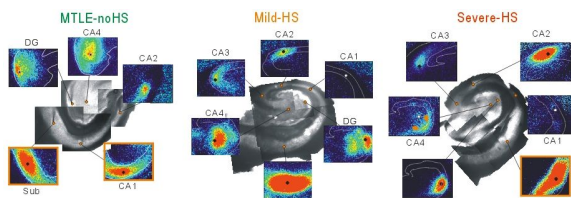


図2 各領域での興奮強度
 電気刺激により惹起された各領域での興奮強度の比較。神経細胞脱落の生じている部位での反応の欠落と海馬支脚での興奮増強が見られた。

このことは、画像上・病理組織学的にまだ海馬の委縮が明らかでない症例においても、症候学的・臨床生理学的に海馬起始の内側側頭葉てんかんに疑わせる症例においては、すでに海馬支脚を中心とした領域にてんかん原性が生じている可能性が示唆された。

また、歯状回における苔状線維発芽の可能性を検証するために、CA4 領域を刺激した時の歯状回での興奮強度を解析した。その結果、CA3/4 領域の神経細胞脱落が著明な高度の海馬硬化症例において、苔状線維発芽を疑わせる結果を得た。また、この生理学的な検討結果は TIMM 染色による形態学的結果により裏付けを得ることが可能であった。

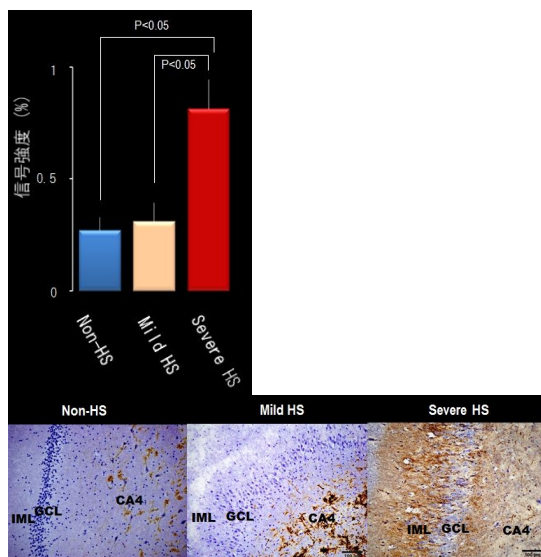


図3 苔状線維発芽の可能性の検討結果
CA4 領域で苔状線維を電気刺激した時の歯状回顆粒細胞層における反応結果。高度海馬硬化を生じている症例については有意にその反応が増強していた。この結果は形態学的に TIMM 染色による内側分子層の染色性の発現とほぼ相同な結果であった。

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 6 件)

1. Kimura T, Kitaura H., (以下 13 名): “Characteristic expression of p57/Kip2 in balloon cells in focal cortical dysplasia.” *Neuropathology*. 2015, in press 査読有
2. Tomonoh Y, (以下 20 名、16 番目): “The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy.” *PLoS One*. 2014 Feb 19;9(2):e88549 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0088549
3. 北浦弘樹、柿田明美: 「目で見るてんかん: 結節硬化症」 *Epilepsy*, 2014 (17), 4-5 査読有

4. Suzuki K., Igarashi H., Huber V. J., Kitaura H., Kwee I. L., Nakada T.: “Ligand based molecular MRI: O-17 JJVCPE amyloid imaging in transgenic mice.” *J Neuroimaging*, 24(6): 595-598, 2014 doi: 10.1111/jon.12091 査読有
5. Kitaura H. and Kakita A.: “Optical imaging of human epileptogenic tissues in vitro.” *Neuropathology*, 33(4): 469-474, 2013 doi: 10.1111/neup.12017 査読有
6. Hiraishi T, Kitaura H., Oishi M, Fukuda M, Kameyama S, Takahashi H, Kakita A, Fujii Y.: “Significance of horizontal propagation of synchronized activities in human epileptic neocortex investigated by optical imaging and immunohistological study.” *Epilepsy Res.*, 104(1-2): 59-67, 2013, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2012.09.014 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Kitaura H., et al., “Epileptogenic mechanisms in mesial temporal lobe epilepsy.” 2014.11.17., Washington DC, USA
2. 北浦弘樹他: 「視床下部過誤腫におけるてんかん原性の *in vitro* 脳スライス標本を用いた検討」, 第 55 回日本神経病理学会総会、平成 26 年 6 月 6 日、学術総合センター(東京都・千代田区)
3. 北浦弘樹他: 「ヒト脳スライス標本を用いたてんかん焦点組織の病態生理学的解析」, 新潟脳研・生理研合同シンポジウム、平成 26 年 2 月 25 日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)
4. Kitaura H., et al., “Characteristic neuronal activities of patients with mesial temporal lobe epilepsy an in vitro imaging study of the resected non-sclerotic hippocampus.” 2013.11.11., San Diego, USA
5. 北浦弘樹他: 「海馬近傍に生じた Periventricular nodular heterotopia の一例」, 第 54 回日本神経病理学会総会、平成 25 年 4 月 25 日、タワーホール船橋(東京都・江戸川区)

6. 研究組織

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