

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14571

研究課題名(和文)3D神経病理学へのフィジビリティ研究：透明化試薬を用いたてんかん病巣の解析

研究課題名(英文)A feasibility study for 3D neuropathology

研究代表者

柿田 明美(Kakita, Akiyoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80281012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治てんかん原性病巣の外科的切除組織における脳病変をより正しく評価する目的から、脳の透明化技術とシート照明顕微鏡を使い、神経細胞やグリア細胞の配列を3次元で鮮明に捉える新規標本観察法を開発した。数百種類のケミカルスクリーニングを行いヒト脳組織専用新規CUBIC試薬と、一般蛍光染色法を開発した。本研究により、神経病理学領域におけるイノベティブな新規方法論を開発できる可能性が拓けた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the 3-dimensional cytoarchitecture of the cerebral cortex taken from patients with epilepsy, we developed new chemical protocols for clearing human brain tissue and driving methodology of the sheet-scanning fluorescence microscopy. By the methods, we were able to observe fine features of neurons and glia distributed widely within extremely thick brain blocks. The methods created by this feasibility study would open an innovative era for the neuropathology field.

研究分野：神経病理学

キーワード：神経細胞病理学 脳透明化技術 てんかん

1. 研究開始当初の背景

(1) てんかんは古くて新しい学問領域である。近年、この罹患率の高い症候群に対し文字通りメスが入られるようになったことから、その診療・研究の両面で神経病理学が関与する状況は一変した。すなわち、局在性難治てんかん患者に対する外科的切除脳を組織診断する機会が増え、このことは同時に、こうした標本リソースを用いたさまざまな研究を展開し得ることともなった。本研究代表者らは、自験例 900 例を通じ、てんかん焦点に見られる皮質形成異常の多様性の実態を知る¹⁾とともに、臨床病理学的特徴を示す症例の分子病理学的解析²⁾や、病態関連分子の生化学的解析³⁾、あるいはヒト脳スライスを用いた実験生理学的解析⁴⁾などの基礎研究を行ってきた。

(2) “現在の標本観察法では病変を正しく評価できないのではないか”。本研究代表者らは、てんかん外科病理診断の経験から、素直にそう思わざるを得ない症例の存在が気になっていた。dysmorphic neuron や balloon cell が出現する focal cortical dysplasia (FCD) type II の組織診断は問題ない。問題なのは FCD type I あるいはもっと軽微な異常が疑われる症例である。何度となく繰り返し標本を見返しても、自信を持ってそこに異形成が存在すると踏み込めない症例を何度も経験してきた。そもそも細胞配列の乱れを 40 μm 厚の切片上で評価することに無理があるのではないかと、とも思ってきた。

(3) ではどうするか。立体的な組織像をそのまま丸ごと評価する。これが自然に想起される理想的方法論ではなかろうか。最近、これを現実のものとする革新的技術：CUBIC が登場した⁵⁻⁷⁾。この水溶性溶剤系試薬は、マウスの脳全体、更にはボディ全体を透明化することができる。ただし、今のところマウスでの話である。この脳を透明化する革新技術をヒト脳組織に応用できれば、それは病理診断の現場にもイノベーションを創出する可能性がある、と考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、神経細胞の配列を 3 次元で捉える新規標本観察法を確立し、てんかん原性脳病巣における病態形成基盤を明らかにすることを目的とする。このことは、信頼性の高い病理診断指標を策定することでもあり、また同時に、生理学や生化学から得られる脳機能に関する知見を形態学的側面から理解する強力なツールとなるであろう。新皮質てんかんにおける神経細胞配列の評価に焦点を定め、その方法論を確立することに注力した。もしこうした新規方法論が確立されれば、それはてんかん病理学上の意義にとどまらない。実は、神経病理学におけるイノベティブな方法論とな

る可能性があると考えた。例えば、神経変性疾患においては異常蛋白が伝播する可能性が想定されているし、脳腫瘍の特徴は腫瘍細胞が脳実質に広く浸潤することにある。こうした病態を理解する上で、脳組織を 3 次元で可視化し蛋白局在を知ることは極めて重要なことである。

(2) 本研究は、この革新的技術を応用し、神経細胞の配列を 3 次元で捉える新規標本観察法を創出し、てんかん原性脳病巣における病態形成基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 内側側頭葉てんかん患者から採取された側頭葉外側新皮質を検索対象とし、組織の透明化と細胞の標識(染色)法を検討した。てんかん外科手術標本を生のまま新潟大学脳研究所病理学分野実験室に搬送し、本研究用組織を切り分けた。固定期間の長さの違いが透明化の効率にもたらす影響を知るために、20% buffered formalin に固定後 1 日から 5 年程度までの保存標本を用いた。標本のサイズは、5 mm - 2 cm 厚とした。

(2) 透明化試薬は論文公開されたプロトコルを改良したものをを用いた。一般染色(HE, K-B, Bodian, Holzer, Gallyas-Braak)を試みた。染色液濃度や処理時間を検討し、組織への浸潤状況を把握する必要がある。そこで、組織を agar で包埋し、vibratome で 50 μm 厚の連続切片を作製し、光学顕微鏡で観察した。

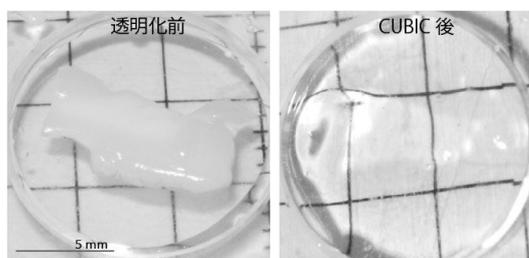
(3) 免疫組織化学染色を試みた。一次抗体には、神経細胞のマーカーとして Neu-N, SMI-31, pan-neurofilament 抗体を、アストロサイトのマーカーとして GFAP を用いた。二次抗体として、Alexa Fluor 蛍光抗体を用いた。抗体濃度や処理時間を検討し、組織への浸潤状況を検討した。上記、一般染色標本と同様に、50-100 μm 厚の連続切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で scan し、標識状況を観察した。

以下の研究を実施した。(i) <CUBIC 試薬を用いて脳組織の透明化を図る> ヒト脳組織は齧歯類等のそれと比較し、脂質の含有割合が極端に高いなど、従来の透明化試薬では本研究の目的を達成出来ないことが明らかとなった。そこで、数百種類の化学物質を対象に、ヒト脳の透明化に最適なプロトコルを探索した。(ii) <細胞標識方> ヒト脳組織は自家蛍光が極端に強い。そのため、これを完全に除去することは困難であった。そこでこの特徴を逆手にとって、自家蛍光発色構造物を捉え、次いでこれを化学的に消退させる方法を見出した。更に、

光学顕微鏡標本で一般的に使用される染色法：HE 染色、K-B 染色に匹敵する、蛍光一般染色試薬を見出した。これにより、例えばアルツハイマー病の老人斑が可視化できる事が明らかになった。(iii) <免疫組織化学染色> 透明化後の脳ブロックに免疫組織化学染色を施し、抗体が浸透し、蛍光分子を標識した二次抗体で抗原を可視化出来る条件検定を進めた。

4. 研究成果

(1) ヒト脳組織は齧歯類等のそれと比較し、脂質の含有割合が極端に高いなど、従来の透明化試薬では本研究の目的を達成出来ないことが明らかとなった。そこで、数百種類の化学物質を対象に、ヒト脳の透明化に最適なプロトコルを探索した。



(2) ヒト脳組織は自家蛍光が極端に強い。そのため、これを完全に除去することは困難であった。そこでこの特徴を逆手にとって、自家蛍光発色構造物を捉え、次いでこれを化学的に消退させる方法を見出した。更に、光学顕微鏡標本で一般的に使用される染色法：HE 染色、K-B 染色は、透明化後であっても浸透性が悪く、有効な標識像が得られないことが解った。そこでこれら一般染色に匹敵する、蛍光一般染色試薬を探索し、1 万種類を超える化学物質の中から有力な分子を見出した。これにより、例えばアルツハイマー病の老人斑が可視化できる事が明らかになった。

(3) 透明化後の脳ブロックに免疫組織化学染色を施し、抗体が浸透し、蛍光分子を標識した二次抗体で抗原を可視化出来る条件検定を進めた。

(4) 組織を固定し薄切しこれを染める。日常の顕微鏡像：すなわち透過光を通して見える視覚イメージが、いかに多くの情報を含み有用であるか。これは病理医としては疑いのない実感であり、経験知に裏打ちされた標本の読みは、医療人としての重要なスキルである。本研究はこうした現在の方法論を否定しようとするものではなく、むしろ、薄切することでどうしても犠牲となる 3 次元情報を、最新の方法で取得することにより、脳病巣における組織変化を、もう一つ別の視点で理解しようとしたものである。

(5) この新規方法論は、立体構築が複雑である脳組織の解析において最も威力を発揮すると考えられる。それは、本研究が守備範囲とするてんかん原性病巣の解析にとどまらない。例えば、タウやシヌクレイン、TDP-43 といった神経変性疾患関連蛋白質は、いまやプリオノイドとまで言われ、神経突起を伝わって伝播する可能性が示唆されている。本研究から得られた成果は、こうした異常リン酸化蛋白質の存在様式を脳のいたるところで立体的に確認することができる方法論となる可能性がある。3 次元での病変理解：それは神経変性疾患、脳腫瘍、精神疾患、免疫性疾患など、神経病理学がカバーする広い疾患カテゴリーの研究において、イノベーションとなる可能性を開くものである。

<引用文献>

1. Kakita A. Surgical pathologyc features of cerebral cortical lesions taken from 600 patients with intractable epilepsy. *Brain Dev* 2013; 35: 793-801.
2. Nakashima M, et al. Somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia. *Ann Neurol* 2015; 78: 375-386.
3. Miyahara H, et al. Suppressed expression of autophagosomal protein LC3 in cortical tubers of tuberous sclerosis complex. *Brain Pathology* 2013; 23: 254-262.
4. Kitaura H, et al. Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations: imaging of human brain slices. *NeuroImage* 2011; 58: 50-59.
5. Susaki EA, et al. Whole-brain imaging with single-cell rresolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 2014; 157: 726-739.
6. Tainaka K, et al. Whole-body imaging with single-cell resoluteion by tissue decolorizeation. *Cell* 2014; 159: 911-924.
7. Susaki EA, et al. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protocol* 2015; 10: 1709-1724.

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)

Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shizimu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Lino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukuyama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical landscape for tissue clearing based on hydrophilic reagents. *Cell*

Reports, in press. 査読有.
Xu C, Li Q, Efimova O, He L, Tatsumoto S, Oishi T, Udono T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Kakita A, Nawa H, Khaitovich P, Go Y. Human-specific features of special gene expression and regulation in eight brain regions. *Genome Res*, in press. doi: 10.1101/gr.231357.117. 査読有.
北浦弘樹, 柿田明美. フラビン蛍光イメージングによるてんかん原性の解析. *Clin Neurosci* 2018; 36 (8):, in press. 査読有.
Mutoh H, Kato M, Akita T, Shibata T, Wakamoto H, Ikeda H, Kitaura H, Aoto K, Nakashima M, Wang T, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Kakita A, Miyake K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitu H. Biallelic variants in *CNPY3*, which encodes an endoplasmic reticulum chaperone, cause early-onset epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet*, in press. 査読有.
Sumitomo N, Ishiyama A, Shibuya M, Nakagawa E, Kaneko Y, Takahashi A, Otsuki T, Kakita A, Saito Y, Sato N, Sugai K, Sasaki M. Intractable epilepsy due to a rosette-forming glioneuronal tumor with dysembryoplastic neuroepithelial background. *Neuropathology* 2018; 38 (3): 300-304. doi:10.1111/neup.12450. 査読有.
Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Kawabe Matsukawa M, Toyoda A, Fujiyama A, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Suzuki Y, Sugano S, Yurino H, Higasa K, Tanaka M, Ichikawa Y, Takahashi Y, Date H, Matsukawa T, Nakamoto F, Kanda J, Higashihara M, Abe K, Koike R, Sasagawa M, Kurohane Y, Hasegawa N, Kanazawa N, Kondo T, Tada M, Takano H, Saito Y, Sanpei K, Onodera O, Nishizawa M, Nakamura M, Sakiyama Y, Ohtsuka M, Ueki A, Kaida K, Shimizu J, Hanajima R, Hayashi T, Terao Y, Terada S, Hamada M, Shiota Y, Kubota A, Ugawa Y, Koh K, Takiyama Y, Ohsawa-Yoshida N, Ishiura S, Kira J, Tamaoka A, Akiyama H, Otsuki T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S. Intronic TTTCA and TTTTA repeat expansions in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2018; 50 (4): 581-590. doi: 10.1038/s41588-018-0067-2. 査読有.
Kitaura H, Shirozu H, Masuda H, Fukuda M, Fujii Y, Kakita A. Pathophysiological characteristics of the subiculum associated with epileptogenesis in human hippocampal sclerosis. *EBioMedicine*

2018; 29: 38-46. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.02.013. 査読有.
Kitamura Y, Komori T, Shibuya M, Ohara K, Saito Y, Hayashi S, Sasaki A, Nakagawa E, Tomio R, Kakita A, Nakatsukasa M, Yoshida K, Sasaki H. Comprehensive genetic characterization of rosette-forming glioneuronal tumors: independent component analysis by tissue microdissection. *Brain Pathology* 2018; 28 (1): 87-93. doi: 10.1111/bpa.12468. 査読有.
Nakayama Y, Masuda H, Shirozu H, Ito Y, Higashijima T, Kitaura H, Fujii Y, Kakita A, Fukuda M. Features of amygdala in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: an MRI volumetric and histopathological study. *Epilepsy Res* 2017; 135: 50-55. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.05.010. 査読有.
Kitaura H, Sonoda M, Teramoto S, Shirozu H, Shimizu H, Kimura M, Masuda H, Ito Y, Takahashi H, Kwak S, Kameyama S, Kakita A. Ca²⁺-permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma. *Epilepsia* 2017; 58 (4): e59-e63. doi: 10.1111/epi.13700. 査読有.

〔学会発表〕(計 20 件)

齋藤良彦, 須貝研司, 竹下絵里, 本橋裕子, 石山昭彦, 齋藤貴志, 小牧宏文, 中川栄二, 佐藤典子, 柿田明美, 齋藤祐子, 大槻泰介, 岩崎真樹, 佐々木征行. MRI 病変の指摘がないが機能画像等により焦点切除術を行った小児てんかん患者の臨床的特徴. 第 60 回 小児神経学会. 2018 年.
老谷嘉樹, 木村有喜男, 須貝研司, 齋藤祐子, 池谷直樹, 岩崎 真樹, 竹下絵里, 本橋裕子, 石山昭彦, 齋藤貴志, 小牧宏文, 中川栄二, 柿田明美, 佐藤典子, 佐々木征行. 限局性皮質異形成で T1 強調高信号を呈した症例の検討. 第 60 回 小児神経学会. 2018 年.
Kato M, Mutoh H, Akita T, Shibata T, Wakamoto H, Ikeda H, Kitaura H, Aoto K, Nakashima M, Wang T, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Kakita A, Miyake K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitu H. Biallelic variants in *CNPY3* cause West syndrome with hippocampal malrotation and characteristic fast waves. 13th European Congress on Epileptology. 2018 年. 国際学会.
Tainaka K, Saito R, Kakita A. Development of 3D neuropathology

based on tissue clearing technique. International Congress of Neuropathology 2018. 国際学会. Furukawa A, Kakita A, Chiba Y, Kameyama S, Shimada A. Comprehensive analysis of protein expression profiles in sclerotic hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. International Congress of Neuropathology 2018. 国際学会.

Kitaura H, Shiroku H, Masuda H, Fukuda M, Fujii Y, Kakita A. Epileptogenesis of the subiculum associated with hippocampal sclerosis in patients with MTLE. International Congress of Neuropathology 2018. 国際学会.

北浦弘樹、白水洋史、福多真史、増田浩、高橋均、柿田明美. 海馬硬化症における海馬支脚のてんかん原性. 第58回日本神経病理学会. 2017年.

Miyake N, Chihara T, Miura M, Shizumizu H, Kakita A, Matsumoto N. TBCD mutations cause autosomal recessive inherited early childhood-onset neurodegenerative encephalopathy. European Society of Human Genetics. 国際学会.

Maehara T, Ina M, Hashimoto S, Kakita A, Ikeda A. Multi-institutional study of epilepsy and glia in patients with medication-resistant focal epilepsy. The 10th Epilepsy Colloquium. 国際学会.

北浦弘樹、福多真史、藤井幸彦、柿田明美. グリア細胞のてんかん原性：病態病理学的解析. シンポジウム：グリアとてんかん：基礎と臨床のアップデート・インフォメーション. 第51回日本てんかん学会. 招待講演. 2017年. 前原健寿、橋本聡華、清水一秀、稲次基希、池田昭夫、柿田明美、井上有史、渡辺裕貴、白水洋史、福田敦夫、小泉修一、岡田元宏、大野行弘. 基礎と臨床の包括的研究の重要性. シンポジウム：グリアとてんかん：基礎と臨床のアップデート・インフォメーション. 第51回日本てんかん学会. 招待講演. 2017年.

小林環、北浦弘樹、村井智彦、中谷光良、菊池隆幸、人見健文、井内盛遠、松本理器、國枝武治、宮本享、白水洋史、井上有史、前原健寿、池田昭夫、柿田明美. 発作時 DC 電位とその病理組織学的検討. 第51回日本てんかん学会. 2017年.

Miyake N, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Matsumoto N. Clinical features and the pathomechanism of early childhood-onset neurodegenerative

encephalopathy arising from biallelic TBCD mutations. American Society of Human Genetics. 2017年. 国際学会. Shirozu H, Hashizume A, Masuda H, Kakita A, Otsubo H, Kameyama S. Spike onset zone detected by gradient magnetic-field topography (GMFT) reflects the epileptogenic zone in neocortical focal cortical dysplasia. American Epilepsy Society Annual Meeting. 2017年. 国際学会.

柿田明美. 第3回東海生理懇談会 / 名古屋. てんかん原性脳病巣の病態病理. 招待講演. 2018年.

柿田明美. 第59回京滋奈良てんかん懇話会 / 京都. てんかん原性脳病巣の病態病理：臨床に役立つ知見. 招待講演. 2018年.

柿田明美. 熊本神経病理研究会 / 熊本. てんかん原性脳病巣の病態病理：臨床に役立つ知見. 招待講演. 2017年.

柿田明美. Epilepsy forum in Nagaoka. てんかん原性脳病巣の病態病理：臨床に役立つ知見. 招待講演. 2017年.

Kakita A, Kitaura H. Alterations of glial cells in epileptogenic regions of the brain: a pathophysiological study. 第60回日本神経化学会 / 仙台. 招待講演. 2017年.

Kakita A. Histopathologic features indicating possible pathomechanisms underlying neurological disorders of infants and children. Asian Oceanian Congress of Child Neurology. 国際学会. 招待講演. 2017年.

〔図書〕(計2件)

柿田明美. Focal cortical dysplasia (FCD). てんかん学用語事典. 日本てんかん学会(編集). pp. 59-60. total 165 pages. 診断と治療社. 2017年.

柿田明美. 稀少てんかんの診療指針. 日本てんかん学会(編集). pp. 28-31. total 259 pages. 診断と治療社. 2017年.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし.

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿田 明美 (KAKITA, Akiyoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80281012

(2)研究分担者

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

清水 宏 (SHIMIZU, Hiroshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：40608767

(3)連携研究者

なし()

研究者番号：

(4)研究協力者

なし()