

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07825

研究課題名(和文) 小児のてんかん原性の形成・進展に関与する脳内ネットワークの解明

研究課題名(英文) Brain networks involved in the formation and development of epileptogenesis in children

研究代表者

佐久間 悟 (Sakuma, Satoru)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80570605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織染色でOligodendroglia like cell(OLC)にOlig2は、白質に最も強く発現した。Olig2よりさらに未分化なstageマーカーでOLCは免疫反応を認めず。Filamin Aは肥厚したastrocyte、dysmorphic neuron及び、balloon cellの細胞質に発現、 α -B-crystallinは、bizarre glial cells、balloon cells、OLCの細胞質に発現する症例を認めた。炎症などの強いストレス下で α -B-crystallinは、OLCを介しててんかん原性の進展に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかん性放電が伝播し、てんかん原性領域が進展していく経路となるてんかんネットワーク機構を検討した。これまで、その関係性は小児薬剤抵抗性てんかんでは未解明であった。今回、炎症などの強いストレス下で発現することが示唆されたことで、難治例では早期にてんかん外科手術を検討することが予後向上につながると思われた。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemistry showed that Olig2 was most strongly expressed in the white matter of Oligodendroglia like cells (OLCs); no immunoreactivity was observed in OLCs with a more undifferentiated stage marker than Olig2; Filamin A was expressed in the cytoplasm of thickened astrocytes, dysmorphic neurons and balloon cells; α -B-crystallin was expressed in the cytoplasm of bizarre glial cells, balloon cells and OLCs. Filamin A is expressed in the cytoplasm of thickened astrocytes, dysmorphic neurons, and balloon cells, and α -B-crystallin is expressed in the cytoplasm of bizarre glial cells, balloon cells, and OLCs. It was suggested that α -B-crystallin may have some effect on the development of epileptogenicity through OLCs under severe stress such as inflammation.

研究分野：小児神経学、てんかん学

キーワード：Epilepsy Neuropathology

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんは脳ニューロンの過剰な放電から由来するてんかん発作を反復する慢性疾患である。ニューロン間だけではなく、グリア細胞との関与がますます重要になっている。反応性アストロサイトやアストロサイトの内包物が薬剤抵抗性の難治てんかん患者の脳組織にしばしば認められる。成人難治てんかんの脳組織に、幼弱なオリゴデンドログリアである Oligodendroglia-like cells (OLC) を認めた報告がある。難治てんかんの外科手術は切除範囲が大きくなることが多い。小児の難治てんかんは成人と比較しより広範囲切除が必要となり、しばしば多脳葉切除に及ぶことが多い。その原因として、てんかん発作は病的な興奮性が持続されるための異常な神経ネットワークが存在することが想定されてきた¹。我々は、小児難治てんかん患者において、OLCは、健常脳と比較して、てんかん患者の脳白質と皮髄境界領域に著明に増加することを、初めて定量化し明らかにした²。また、小児のてんかん性スパズムは、その他の部分発作と比較してOLC密度が増加することを明らかにした³。OLCは、てんかん原性が形成され、進展していく過程に関与していることが推察されるが、その役割は未解明である。OLCの役割を明らかにし、てんかんの脳内ネットワークを解明することは、小児難治てんかん患者の発達予後改善に向けたてんかん外科手術向上のために社会的な意義がある課題である。

2. 研究の目的

難治な脳皮質てんかんは、発作起始部からてんかん性放電が広く伝播し、持続することで、てんかん原性領域が進展していく。本研究では、ミエリンを生成するオリゴデンドログリアに注目し、異常なオリゴデンドログリアが、てんかん原性領域が形成され、進展する脳内ネットワークを解明することを目的とする。手術切除病変組織を、ニューロン、アストログリア、オリゴデンドログリアとそれらの前駆細胞のマーカーとなる抗体を用いて、免疫組織学解析を行う。また、手術前後の頭皮、頭蓋内脳波におけるてんかん性放電の局在、発生頻度を解析する。得られた各々の細胞の免疫組織学的な局在と神経生理学的な機能の局在の相関性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

2剤以上の抗てんかん薬に抵抗性のある難治てんかんに罹患し、硬膜外電極を留置し、皮質切除術を行った0歳から19歳までの小児・若年者を対象とした。てんかん外科手術により切除した脳組織を10%ホルマリンに浸透し、パラフィン包埋して作製したブロックをクリオスタットで5µmに薄切し連続切片を作製した。LFB-HE染色と抗NeuN, GFAP, Olig2, NG2, O4, MBP, Filamin A, alpha B crystallin抗体を用いて免疫組織染色を行った。また、硬膜下電極におけるてんかん性放電から得られた焦点の中心と考えられた部位と周辺部位との切除病理組織所見を比較した。

4. 研究成果

調査期間中に検討した症例15例。脳腫瘍と診断された症例は除外した。検討した症例は、手術時年齢4歳～19歳の5例（男性1例：女性4例）。発作型は、焦点起始発作5例（焦点意識減損発作1例、焦点起始両側強直間代発作4例）、病理診断は、focal cortical dysplasia (FCD) Type b 2例、hippocampal sclerosis (HS) 3例。病理組織所見

は、Olig2は全例でOligodendroglia-like cell (OLC)の核に発現した。FilaminAは、bizarre glial cells, balloon cells, dysmorphic neuron, reactive astrocyteの細胞質に発現した。-B-crystallinは、bizarre glial cells, balloon cells, OLCの細胞質に発現した。Olig2陽性であるOLCは真円、やや楕円とする形状をもつ細胞、染色強度にばらつきを認めた。代表的な病理像をFig.1、Fig.2に示す。Oligodendrocyte lineageで、Olig2より未分化なstageでのマーカーとしてNG2抗体、O4抗体を用いたが、本研究では免疫反応を認めなかった。てんかん焦点病変組織でOLCが異常に増加していることは以前から報告されている。Oligodendrocyte lineageにおいてより幼弱なstageであるNG2、O4では免疫応答は認めなかった。その一因として今回用いた標本がホルマリン固定のパラフィン包埋であり、抗原賦活化処理が不十分であった可能性は否定できない。抗原賦活化の別の処理方法を模索するか、固定や賦活化処理による標的タンパク質の変性を受けないため抗原性が維持されやすい凍結標本を用いることを今後検討する。てんかん外科手術病変において、大脳皮質のアストロサイトにエオジン好性の内包物を細胞質に認めることがありhyaline protoplasmic astrocytopathyとして報告されている^{4, 5}。FilaminAは、アクチン結合蛋白であり、脳室帯から皮質への細胞遊走の制御に関与しているが、hyaline protoplasmic astrocytopathyはFilaminA抗体に対して陽性である。てんかん原性の獲得にfilaminまたはfilamin結合蛋白がreactive astrocyteとbizarre glial cells, balloon cells, dysmorphic neuronを介して関与している可能性が示唆された。本研究中に、新型コロナウイルスのパンデミックが起こった。共同研究機関との連携も当初の想定通りに進まず、予定症例数を大幅に下回った。より多くの症例を検討し焦点の中心と周辺部位の脳波所見とのより詳細な検討が今後の課題である。

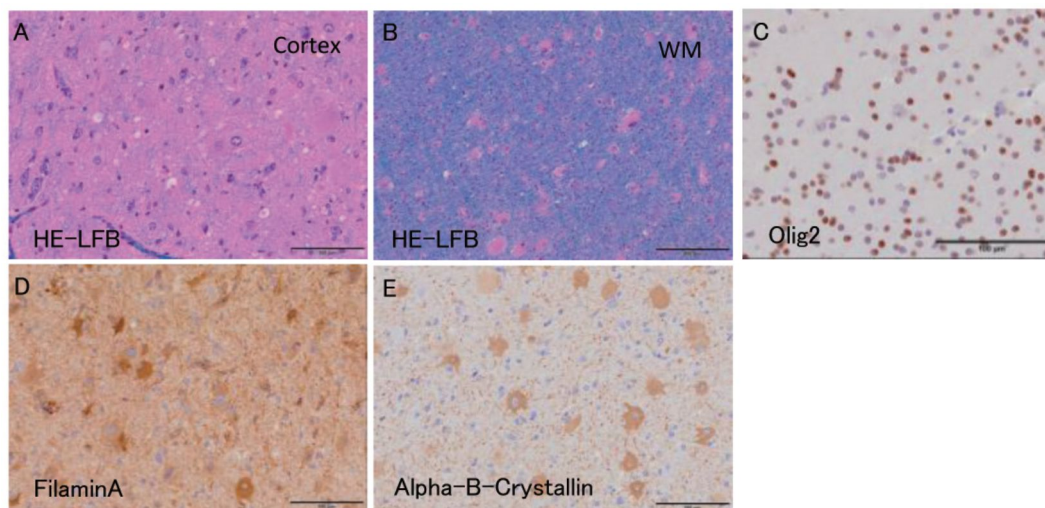


Fig.1 免疫組織染色（焦点中心領域）（A, B）HE-LFB染色。（A）dysmorphic neuronとballoon cellおよびbizarre glial cellの不規則な混在を認め、大脳皮質神経細胞の著しい配列異常と層構築異常を認めた。（B）Dysmorphic neuronは白質にも数多く認める。Balloon cellは、皮質深層から白質にかけて集簇。（C）Olig2染色。OLCの核に白質優位に発現した。（D）FilaminA染色。形態的に突起を持ち、肥厚したastrocyteの細胞質に弱く発現。白質においては、dysmorphic neuron及び、balloon cellの細胞質に発現。（E）Alpha-B-Crystallin染色。皮質のbizarreglial cells, balloon cellsの細胞質に発現。

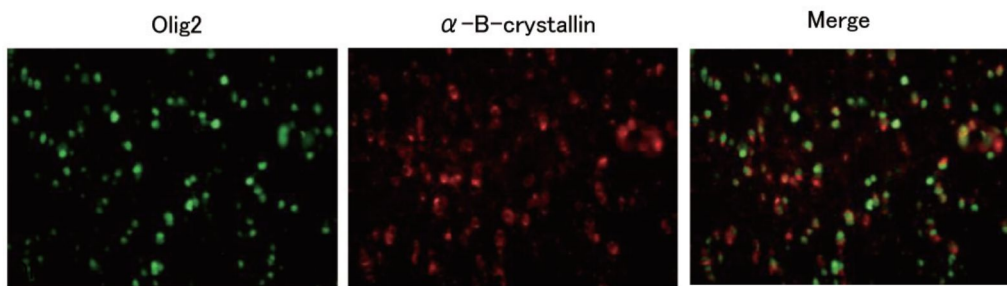


Fig.2 蛍光二重染色 (Olig2抗体 + α -B-crystallin) 一部のOlig2陽性細胞は α -B-crystallin に対して免疫反応を示した

1. Spencer SS. Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia* 2002;43:219-227.
2. Sakuma S, Halliday WC, Nomura R, Otsubo H. Increased population of oligodendroglia-like cells in pediatric intractable epilepsy. *Neuroscience letters*, 566; 188-193. 2014.
3. Sakuma S, Halliday WC, Nomura R, Baba S, Sato Y, Okanari K, Nakajima M, Widjaja E, Boelman C, Ochi A, Snead OC 3rd, Rutka JT, Drake JM, Miller S, Otsubo H. Increased subcortical oligodendroglia-like cells in pharmaco-resistant focal epilepsy in children correlate with extensive epileptogenic zones. *Epilepsia*, 57; 2031-38. 2016.
4. Hazrati L. N, Kleinschmidt-DeMasters B. K, Handler M. H, Smith M. L, Ochi A, Otsubo H, et al. Astrocytic inclusions in epilepsy: expanding the spectrum of filaminopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008; 67, 669-676.
5. Visanji N. P, Wong J. C, Wang S. X, Cappel B, Kleinschmidt-Demasters B. K, Handler M. H et al. A proteomic analysis of pediatric seizure cases associated with astrocytic inclusions. *Epilepsia* 2012; 53, e50-54.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐久間悟, 宇田武弘, 小野智憲, 本田涼子, 伊東正博	4. 巻 31
2. 論文標題 皮質下白質のグリア系細胞の神経病理学的特徴と てんかん性放電との相関性の研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 てんかん治療研究振興財団 研究年報	6. 最初と最後の頁 53 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐久間 悟
2. 発表標題 小児薬剤抵抗性てんかんにおける皮質下白質のグリア系細胞の神経病理学研究
3. 学会等名 小児脳機能研究会
4. 発表年 2020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	宇田 武弘 (Uda Takehiro) (70382116)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	
研究分担者	本田 涼子 (Honda Ryoko) (70457555)	独立行政法人国立病院機構 (長崎医療センター臨床研究センター)・小児科・医師 (87301)	
研究分担者	小野 智憲 (Ono Tomonori) (10393456)	独立行政法人国立病院機構 (長崎医療センター臨床研究センター)・脳神経外科・脳神経外科医長 (87301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大澤 政彦 (Osawa Masahiko) (80213685)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	
研究分担者	伊東 正博 (Ito Masahiro) (30184691)	独立行政法人国立病院機構（長崎医療センター臨床研究センター）・臨床検査科・病理医 (87301)	

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