

機関番号： 82609  
 研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2008～2010  
 課題番号： 20591238  
 研究課題名 (和文) 急性・慢性の小児神経疾患における難治性てんかん形成機序の解明

研究課題名 (英文) Epileptogenesis of refractory epilepsy in acute and chronic child-onset neurological disorders

研究代表者 林 雅晴 (HAYASHI MASAHARU)  
 財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員  
 研究者番号：00280777

研究成果の概要 (和文)：

小児の難治性てんかんの病態を明らかにすることを目的に、生体資料と剖検脳を用いた解析を進めた。けいれん重積型脳症での軸索障害、脳梁膨大部病変を呈する脳症での酸化ストレスの関与を見出した。さらに周産期障害、West/Lennox-Gastaut 症候群既往例、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症における脚橋被蓋核アセチルコリン神経病変と、ムコ多糖症、脳形成異常での大脳皮質 GABA 系介在神経細胞減少を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

In order to clarify the pathogenesis of child-onset intractable epilepsy, we performed ELISA analysis in the cerebrospinal fluid (CSF), and immunohistochemical study in the autopsy brains. We identified the involvements of axonal damage and oxidative stress in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and clinically mild encephalopathy with a reversible splenial lesion, respectively. We found the lesion of acetylcholine neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus in cases of perinatal disorders, sequels of West syndromes, and dentatorubropallidolusian atrophy. We also discovered the impairment of the cortical GABAergic interneurons in cases of mucopolysaccharidosis and diffuse cortical dysplasia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：難治てんかん、髄液マーカー、ELISA、剖検脳、免疫組織化学染色、脳炎・脳症、酸化ストレス、アセチルコリン神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性てんかんである West 症候群 (WS) /Lennox-Gastaut 症候群 (LGS) や進行性ミオクローヌステんかん (PME) では発達障害

が後遺症としてみられることが多く、生命予後も不良である。平成 11 年度から科学研究費基盤研究 (C) (2) を用いて WS/LGS と PME を神経病理学的に研究し、その病態に興奮

性・抑制性神経のバランス異常、酸化ストレスが関与していることを明らかにしてきた。なお本研究グループの剖検脳での免疫組織化学的解析は国内外での研究をリードしているとともに、国際的にも評価されている。

(2) 二相性経過を呈し拡散強調像の異常と予後不良を特徴とするけいれん重積型脳症 (AESD)、脳梁膨大部に可逆性病変を呈する脳症 (MERS) など新たな急性脳症の亜型が、近年、日本で提唱されている。しかし、それらの病態における脳損傷メカニズムの詳細は明らかになっていない。

(3) 本研究グループは病理組織での解析と並行させながら、難治性てんかんけいれん重積、重症心身障害の患者の尿・血清・髄液において、酸化ストレスマーカーの測定を進めてきた。

## 2. 研究の目的

小児期発症の難治性てんかん発作の病態を明らかにし、治療法開発に役立てることを本研究の目的とする。患者生体資料と剖検脳を用いて、急性・慢性小児神経疾患での難治性けいれんの発症機序を、酸化ストレス、軸索損傷、興奮性・抑制性神経バランス、モノアミン神経機能の観点から解明する。

## 3. 研究の方法

本人・家族から提供同意が得られた急性・慢性小児神経疾患患者の髄液・尿を対象に、各種マーカーを ELISA 法で定量し、難治性てんかん発症における酸化ストレス、軸索障害、サイトカインの関与を明らかにする。脳発達障害剖検例において酸化ストレス、興奮性・抑制性神経のバランス異常、脚橋被蓋核アセチルコリン神経病変などに関する免疫組織化学的解析を進め、難治性てんかん既往の有無との関係を追究する。急性期・慢性期病態の比較を行い難治性けいれん形成の発症機序を解明する。

## 4. 研究成果

(1) 2008 年度： けいれん・知的障害の合併がみられるムコ多糖症の剖検脳において、ムコ多糖を蓄積した神経細胞で DNA 酸化ストレスが生じ、大脳皮質 GABA 系抑制性介在神経細胞が減少しけいれん・知的障害につながることを見出した。一方、難治性てんかんの脳幹機能異常と大脳皮質のてんかん焦点との相互作用を追究するため、大脳基底核と密な線維連絡を有し筋緊張・レム睡眠の形成・維持に関与する脚橋被蓋核 (PPN) の脳発達障

害剖検脳における変化を世界で初めて解析した。正常対照でのアセチルコリン神経とカテコールアミン神経の加齢性変化を明らかにするとともに (図 1)、周産期障害でのアセチルコリン神経の選択的障害を見出した。さらにけいれんを合併する神経線維腫症の剖検脳において、扁桃体、線条体、視床に非腫瘍性アストロサイト集簇が出現することを見出し、てんかん原性に関連する可能性を指摘した。

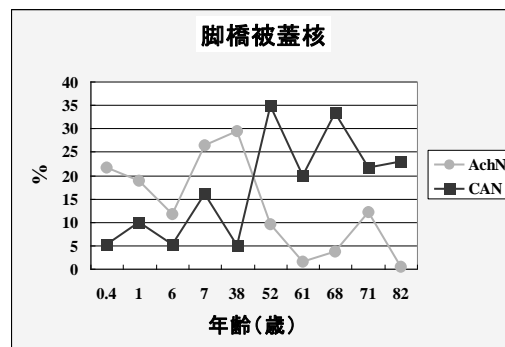


図 1 脚橋被蓋核 (PPN) でのアセチルコリン神経 (AchN) とカテコールアミン神経 (CAN) の比率の変化

(2) 2009 年度： 急性脳炎・脳症患者髄液において、DNA・脂質の酸化ストレスマーカー、軸索損傷マーカーの総タウ蛋白を ELISA により定量した。二相性の臨床経過を呈するけいれん重積型脳症 (AESD) で髄液総タウ蛋白値が第 3 病日以降に上昇することを明らかにし、AESD 病態での軸索障害の関与を推定した。PPN のアセチルコリン神経病変を WS+LGS 既往剖検例、WS のみ既往剖検例で免疫組織化学に検討した。両既往群の 3 分の 2 において PPN アセチルコリン神経が選択的に障害されていることを見出し、WS・LGS 病態への PPN の関与を推定した。さらに難治の低血糖発作を繰り返した脳発達障害例において島回皮質形成異常部での GABA 系抑制性神経病変 (図 2) の関与を明らかにした。

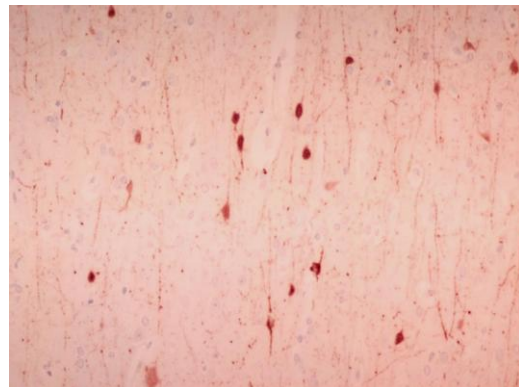


図 2 島回皮質の形成異常部位での Calretinin 染色

(3) 2010 年度： 脳梁膨大部に可逆性病変を呈する脳症 (MERS) において、髄液中の DNA と脂質に対する酸化ストレスマーカーである 8-OHdG と HEL が高値を示した。さらに脳梁膨大部以外の大脳白質に病変を合併した患者では IL-6・IL-10 値も上昇していた。一方、軸索障害マーカーであるタウ蛋白に異常を認めなかった。以上から MERS 病態での酸化ストレス、白質病変拡大でのサイトカインの関与が明らかになった (表 1)。加えて PME の病因として重要な歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症剖検例の PPN において、WS 既往例と同様なアセチルコリン神経減少を見出した。PPN アセチルコリン病変が WS のみならず PME の発症にも関与する可能性が示唆された。

Patient	8-OHdG (ng/ml)	HEL (nmol/l)	Tau (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
<i>Cutoff</i>	<b>0.097</b>	<b>6.08</b>	<b>688</b>	<b>9.3</b>	<b>2.5</b>
1	<b>0.06</b>	<b>4.158</b>	<b>396</b>	<b>2.4</b>	<b>0.39</b>
	<b>0.06</b>	<b>3.355</b>	<b>637</b>	<b>0.76</b>	<b>0.03</b>
2	<b>0.173*</b>	<b>2.6</b>	<b>422</b>	<b>9.41*</b>	<b>6.11*</b>
3	<b>0.174*</b>	<b>4.99</b>	<b>489</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>
4	<b>0.374*</b>	<b>n/a</b>	<b>48</b>	<b>13.96*</b>	<b>7.15*</b>
5	<b>0.328*</b>	<b>1.72</b>	<b>320</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>
6	<b>0.041</b>	<b>7.37*</b>	<b>281</b>	<b>15.56*</b>	<b>2.79*</b>

表 1 MERS 患者での髄液マーカーの変化

#### 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 8 件)

- ① Sekigawa M, Okumura A, Nijima S, Hayashi M, Tanaka K, Shimizu T, Autoimmune focal encephalitis shows marked hypermetabolism on positron emission tomography, J Pediatrics, 査読有, Vol. 156, 2010, 158-160
- ② Tanuma N, Hayashi M, et al (7 名中 7 番目), The axonal damage marker tau protein in the cerebrospinal fluid is increased in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion, Brain Dev, 査読有, Vol. 32, 2010, 435-439
- ③ Hayashi M, Hachiya Y, Arai N, An autopsy report of case showing repetitive hypoglycemia and unique cortical dysplasia, Brain Dev, 査読有, Vol. 32, 2009, 289-292
- ④ Katayama Y, Maeda K, Iizuka T, Hayashi M, et al (8 名中 4 番目), Accumulation of oxidative stress around the stroke-like lesions of MELAS patients, Mitochondrion, 査読有, Vol. 9, 2009,

306-313

- ⑤ Hayashi M, Oxidative stress in developmental brain disorders, Neuropathology, 査読有, Vol. 29, 2009, 1-8
- ⑥ Yokota O, Tsuchiya K, Hayashi M, et al (8 名中 3 番目), Glial clusters and perineuronal glial satellitosis in the basal ganglia of neurofibromatosis type 1, Acta Neuropathol, 査読有, Vol. 116, 2008, 57-66
- ⑦ Anzai Y, Hayashi M, Ohya T, Yokota S, The pedunculo-pontine nucleus in developmental disorders of the basal ganglia, Neuropathology, 査読有, Vol. 28, 2008, 258-263
- ⑧ Hamano K, Hayashi M, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S, Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue, Acta Neuropathol, 査読有, Vol. 115, 2008, 547-559

[学会発表] (計 6 件)

- ① 林雅晴、宮田理英、田沼直之、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症での脚橋被蓋核病変、第 44 回日本てんかん学会、2010 年 10 月 15 日、岡山
- ② 林雅晴、教育講演 てんかん病理のトピックス、Metropolitan Child Epilepsy Meeting, 2010 年 7 月 10 日、東京
- ③ 林雅晴、モーニングセミナー 難治性てんかんの神経病理、第 36 回日本小児臨床薬理学会、2009 年 11 月 21 日、高松
- ④ Hayashi M, Miyata R, Tanuma N, Increase of oxidative stress markers in the urine in patients with xeroderma pigmentosum, The 10th Asia Oceanian Congress of Child Neurology, 2009 年 6 月 11 日、韓国・大邱
- ⑤ 林雅晴、宮田理英、田沼直之、West 症候群剖検例での酸化ストレスに関する免疫組織化学的解析、第 111 回日本小児科学会学術集会、2008 年 4 月 25 日、東京
- ⑥ Tanuma N, Miyata R, Hayashi M, et al, Oxidative stress biomarkers in febrile seizures, The 11<sup>th</sup> Annual Meeting of the Infantile Seizure Society, 2008 年 4 月 10 日、大津

[図書] (計 3 件)

- ① Hayashi M, Tanuma N, Miyata R, Nova Science Publishers, Handbook of free radicals: formation, types and effects, 2010, 642

- ② 林雅晴、診断と治療社、小児神経学の進歩 第38集、2009、136
- ③ 柳下章、林雅晴、医学書院、症例から学ぶ神経疾患の画像と病理、2008、218

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 雅晴 (HAYASHI MASAHARU)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員  
研究者番号：00280777

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし