

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月16日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300134

研究課題名（和文） てんかん病巣における神経活動の伝播特性：外科病理標本の解析

研究課題名（英文） Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations in surgical specimens taken from patients with intractable epilepsy

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

研究成果の概要（和文）：

難治てんかん原性病巣の病態形成機序を知る目的から、外科的切除脳組織を用いた病態病理学的解析を行った。すなわち、2次性の新皮質てんかん焦点を対象に急性脳スライスを用い、焦点組織内におけるネットワーク異常について、フラビン蛍光イメージング法を用いた解析を進めた。対照群には、てんかん歴のない脳腫瘍患者において摘出された正常脳皮質を用いた。摘出された脳組織は直ちに手術室にて氷冷人工脳脊髄液に入れられ、bubbling 視ながら実験室へ輸送した。実験室でスライス標本作製し、Incubate を行った。電気刺激により惹起した興奮動態をフラビン蛍光イメージング法で画像化して解析した。1次病変はDNT, angioma, Glioma, Glioblastoma, Pilocytic astrocytoma, Gliosis, Glial scar 各一例であった。その結果、てんかん原性大脳皮質には特徴的な“てんかん様興奮伝播”が全例で認められた。この興奮伝播は2つの構成成分からなること、それぞれは異なる神経回路から生じていることを明らかにした。この特徴的な変化は1次病変に関わらず一定であった。これら生理学的に異常を示した部位においては、組織学的には、神経細胞の肥大と樹状突起の異常な結節様変化が生じていることを見出した。樹状突起のspineの喪失や細胞体の肥大化については過去にも多くの報告がある。その細胞形態の劇的な変化から、樹状突起への投射線維が細胞体へ直接投射しているとのモデルが提唱されている。このモデルは、今回の研究結果、即ち高度に同期した神経活動が細胞形態異常を示す広い範囲に認められたこととよく合致する。即ち、2次性の新皮質てんかん病巣においては、特異的な“Epileptic Neuron”が存在するのではなく、むしろ神経回路網の改変によりてんかん原性を獲得したものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Seizure activities often originate from a localized region of the cerebral cortex and spread across large areas of the brain. The properties of these spreading abnormal discharges may account for clinical phenotypes in epilepsy patients, although the manner of their propagation and the underlying mechanisms are not well understood. In the present study we performed flavoprotein fluorescence imaging of cortical brain slices surgically resected from patients with partial epilepsy caused by various symptomatic lesions. Elicited neural activities in the epileptogenic tissue spread horizontally over the cortex momentarily, but those in control tissue taken from patients with brain tumors who had no history of epilepsy demonstrated only localized responses. Characteristically, the epileptiform propagation comprised early and late phases. When the stimulus intensity was changed gradually, the early phase showed an all-or-none behavior, whereas the late phase showed a gradual increase in the response. Moreover, the two phases were propagated through different cortical layers, suggesting that they are derived from distinct neural circuits. Morphological investigation revealed the presence of hypertrophic neurons and loss of dendritic spines, which

might participate in the aberrant activities observed by flavoprotein fluorescence imaging. These findings indicate that synchronized activities of the early phase may play a key role in spreading abnormal discharges in human cortical epilepsies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学神経病理学

キーワード：脳発達障害、てんかん

#### 1. 研究開始当初の背景

##### (1) てんかん病態研究における“神経病理”のアドバンテージとウィークポイント.

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。本研究申請者らは、自験例約400例を通じ、てんかん焦点にみられる皮質形成異常の多様性の実態を知ると共に、細胞内情報伝達経路関連蛋白の発現解析や海馬歯状回における神経細胞新生に関する研究を行ってきた。このように神経病理フィールドは、ヒトのてんかん病態に直接アプローチできる点が、何と云っても最大の利点であろう。

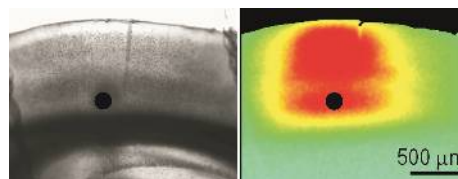
一方で、通常の病理標本では解析しにくい点、苦手なことがある。時間依存的変化をみることで、さまざまな各論はあるにせよ、てんかん発作とは要するに、神経興奮の時間空間的異常伝播であろう。つまり、てんかんの症候論からみて、時間のファクターを解析することは病態生理を知る上で極めて重要なことと考えられる。ではどうするか。

##### (2) 発想の進展：時間のファクターを取り入れる、空間的ファクターも同時に.

ヒト生鮮脳スライスを用いた生理学的解析、これが自然に想起される方法論であろう。現に、カリフォルニアの研究グループ(Mathern GWら)は、パッチクランプ法により、異型神経細胞にみられる脱分極性異常発火など幾つもの知見を既に報告している(Epilepsia

2007;48:S79-S85, Cepeda C et al.). こうした個々の細胞が示す電気生理学的個性の情報には確かに重要である。一方で、本研究代表者は以前から、てんかん病巣における場としての興奮の広がり方、つまり時間とともに空間的伝播特性を知ることは出来ないだろうか、と考えていた。もっとも、しばらくは具体性のない希望みたいなもの、であった。

フラビン蛍光イメージング。本研究代表者は、てんかん研究におけるこの方法論の有用性をはじめはよく理解していなかった。新潟大学脳研究所システム脳生理学の渋谷克栄教授が世界に先駆けて開発したこの方法は、ミトコンドリア内の自家蛍光変化を画像化するものであり、神経活動によく相関することが示されていた(図)。空間解像度が抜群にいい。ただし、マウスでの話である。本研究分担者北浦は、渋谷ラボでこの方法による研究を進め学位を得た(Eur J Neurosci 2004;19:356-364, Kitaura H et al.), 新進気鋭の研究者である。彼が研究代表者らのラボにジョイントした時から、2年超の時間をかけて、2人で本研究課題の現実的実行性を育ててきた。そしていよいよ、状況が整った。ポイントは2つ。これまで全く報告のない、ヒト脳の蛍光イメージングができるよう実験システムをチューンアップしたことと、幸いにも、多くの関係者の協力が得られ、チームとして動き出したことである。



## 2. 研究の目的

てんかんは多様な病態を包含する heterogenous なシンドロームであり、発生異常や腫瘍、炎症など多くの病態がその焦点形成に関与している。これら広範なスペクトラムを有するてんかん原性病巣において、脳形成異常を基盤とした焦点組織と後天的に獲得したそれが、同一機序によるものか否かは明らかではない。そこで、両病態の急性脳スライスを用い、焦点組織内におけるネットワーク異常について、フラビン蛍光イメージング法を用いた解析を進めた。本研究は、てんかん外科摘出脳組織における興奮伝播特性を神経生理学的に明らかにすることを目的とする。あわせて、その現象と関連する神経回路網やシナプスの異常を組織学的に探り、病態形成機序を知ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

対象は2次性の新皮質てんかん焦点とした。その1次病変はDNT, angioma, Glioma, Glioblastoma, Pilocytic astrocytoma, Gliosis, Glial scar 各一例であった。対照群には、てんかん歴のない脳腫瘍患者から摘出された正常脳皮質を用いた。摘出された脳組織は直ちに手術室にて氷冷人工脳脊髄液に入れられ、bubbling 視ながら実験室へ輸送した。実験室でスライス標本を作製し、培養を開始した。電気刺激により惹起した興奮動態を、フラビン蛍光イメージング法で画像化して解析した。本研究は新潟大学医学部倫理委員会・遺伝子倫理委員会および西新潟中央病院倫理委員会の承認を得て行った。

## 4. 研究成果

てんかん原性と考えられた大脳皮質には特徴的な「てんかん様興奮伝播」がほぼ全例において認められた。この興奮伝播は2つの構成成分よりなること、それぞれは異なる神経回路から生じている可能性が高いことを明らかにした。この特徴的な変化は1次病変に関わらずほぼ一定であった。これら生理学的に異常を示した部位においては、組織学的には、神経細胞の肥大と樹状突起の異常な結節様変化が生じていることが明らかとなった。樹状突起の spine の喪失や細胞体の肥大化については過去にも多くの報告がある。その細胞形態の劇的な変化から、樹状突起への投射線維が細胞体へ直接投射しているとのモデルが提唱されている。このモデルは、今回の研究結果、即ち高度に同期した神経活動が細胞形態異常を示す広い範囲に認められたこととよく合致する。即ち、2次性の新皮質てんかん病巣においては、特異的な“Epileptic Neuron”が存在するのではなく、むしろ神経回路網の改変によりてんかん原性を獲得したものと考えられた。

以上から、2次性の新皮質てんかん病巣におけるてんかん原性は、既存の神経細胞により異常に形成された神経回路網が原因であること、また、それは一次病変によらず共通した基盤を有することが示唆された。

## 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13件)

- ① Okazaki K, Kakita A, Tanaka H, Kimura K, Minagawa M, Morita T, Takahashi H. Widespread ischemic brain lesions caused by vasculopathy associated with neurofibromatosis type 1. 査読有. *Neuropathology* 2010; 30: 627-33.
- ② 柿田明美. てんかん焦点の外科病理 1. 査読無. *Epilepsy* 2010; 4: 4-6.
- ③ Kaido T, Otsuki T, Kaneko Y, Takahashi A, Kakita A, Takahashi H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M. Anterior striatum with dysmorphic neurons associated with the epileptogenesis of focal cortical dysplasia. 査読有. *Seizure* 2010; 19: 256-9.
- ④ Fu Y-J, Morota N, Nakagawa A, Takahashi H, Kakita A. Neurocutaneous melanosis: surgical pathologic features of an apparently hamartomatous lesion in the amygdala. 査読有. *J Neurosurg Pediatrics* 2010; 6: 82-6.
- ⑤ 柿田明美. てんかん焦点の外科病理 2. 査読無. *Epilepsy* 2010; 4: 80-83.
- ⑥ Miyahara H, Ryufuku M, Fu Y-J, Kitaura H, Murakami H, Masuda H, Kameyama S, Takahashi H, Kakita A. Balloon cells in the dentate gyrus in hippocampal sclerosis associated with non-herpetic acute limbic encephalitis. 査読有. *Seizure* 2011; 20: 87-9.
- ⑦ Ryufuku M, Toyoshima Y, Kitaura H, Zheng Y, Fu Y-J, Miyahara H, Murakami H, Masuda H, Kameyama S, Takahashi H, Kakita A. Hypertrophy of end folium neurons in patients with mesial temporal lobe epilepsy. 査読有. *Neuropathology* 2011; 31 (5): 476-485.
- ⑧ Ueda M, Sugiura C, Ohno K, Kakita A, Hori A, Ohama E, Vinters HV, Miyata H. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor-2 in developing human cerebrum and epilepsy-associated malformations of

- cortical development. 査読有.  
Neuropathology 2011; 31 (6): 589-598.
- ⑨ Kitaura H, Hiraishi T, Murakami H, Masuda H, Fukuda M, Oishi M, Ryufuku M, Fu Y-J, Takahashi H, Kameyama S, Fujii Y, Shibuki K, Kakita A. Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations: imaging of human brain slices. 査読有.  
NeuroImage 2011; 58 (1): 50-59.
- ⑩ Nakayama Y, Watanabe M, Suzuki K, Usuda H, Emura I, Toyoshima Y, Takahashi H, Kawaguchi T, Kakita A. Lymphoplasmacyte-rich meningioma: a convexity mass with regional enhancement in the adjacent brain parenchyma. 査読有. Neuropathology 2012; 32 (2): 174-179.
- ⑪ Hiraishi T, Oishi M, Kitaura H, Ryufuku M, Fu Y-J, Fukuda M, Takahashi H, Fujii Y, Kakita A. Epidermoid cyst involving the medial temporal lobe: surgical pathologic features of the epileptogenic lesion. 査読有. Neuropathology 2012; 32 (2): 196-201.
- ⑫ Kaido T, Otsuki T, Kakita A, Saito Y, Sugai K, Takahashi A, Kaneko Y, Sakakibara T, Saito Y. Novel pathological abnormalities of deep brain structures including dysplastic neurons in anterior striatum associated with focal cortical dysplasia in epilepsy. 査読有. J Neurosurg Pediatrics, in press.
- ⑬ Kitaura H, Oishi M, Takei N, Fu Y-J, Hiraishi T, Fukuda M, Takahashi H, Shibuki K, Fujii Y, Kakita A. Periventricular nodular heterotopia functionally couples with the overlying hippocampus. 査読有. Epilepsia, in press.
- [学会発表] (計 28 件)
- ① 柿田明美. てんかん原性病巣における分子細胞病理 一病態形成への関与一. 東京都神経科学総合研究所 神経科学セミナー 先端研究セミナー. <Invited> 2010.01.27, 府中.
- ② 柿田明美. てんかん外科病理学の実際: 異形成と腫瘍性病変. 第 38 回埼玉脳腫瘍病理懇話会 特別講演. <Invited> 2009.11.26, 大宮.
- ③ 柿田明美. てんかん外科病理学の実際. 第 35 回静岡県神経病理懇談会 特別講演. <Invited> 2009.09.12, 浜松.
- ④ 柿田明美. てんかんの病理. 第 10 回国立西新潟中央病院てんかんセンター 夏期セミナー. <Invited> 2009.08.29, 新潟.
- ⑤ 北浦弘樹 他. ヒト脳スライス標本を用いたてんかん病態の生理学的解析: 皮質形成異常と結節性硬化症における検討. 第 50 回日本神経病理学会. 2009.06.04, 高松.
- ⑥ 平石哲也 他. ヒト脳スライス標本を用いたてんかん病態の神経生理学的解析: 脳腫瘍症例における異常ネットワーク検出の試み. 第 50 回日本神経病理学会. 2009.06.04, 高松.
- ⑦ 香川幸太 他. Dysembryoplastic neuroepithelial tumor (DNT) 2 症例における病変部周辺領域の電磁気生理学および病理学的検討. 第 33 回日本てんかん外科学会. 2010.01.21, 大阪.
- ⑧ 西本武史 他. Dual pathology 症例におけるてんかん原性局在についての検討. 第 33 回日本てんかん外科学会. 2010.01.21, 大阪.
- ⑨ Kitaura H, et al. Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations in human partial epilepsy in vitro. The 40th Annual Meeting Society for Neuroscience. 2010 Nov 13-17, San Diego.
- ⑩ Kagawa K, et al. Intracranial cephalographic and histopathological features in epilepsy patients with dysembryoplastic neuroepithelial tumor (DNT) and DNT like lesion. Asia and Oceania Society for Epilepsy. 2010 Oct 21-24, Melbourne.
- ⑪ Kaido T, et al. Epileptogenesis of deep brain structures associated with frontal lobe epilepsy in children. XIX Congress of the European Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery. 2010 Sep 22-25, Athens.
- ⑫ 田村 誠 他. 胎生期ストレスが歯状回顆粒細胞の成熟に与える影響. 第 82 回日本薬理学会. 2010. 3. 16-18, 大阪.
- ⑬ 柿田明美. てんかんの病理. 第 11 回国立西新潟中央病院てんかんセンター 夏期セミナー. <Invited> 2010.8.21, 新潟.
- ⑭ 北浦弘樹 他. 新皮質てんかん病巣における興奮伝播様式の時空間的解析: ヒト脳スライス標本を用いた光学的イメージング. 第 44 回日本てんかん学会. 2010.10.14-15, 岡山.
- ⑮ 村上博淳 他. 準傾斜磁場トポグラフィによる多脳葉間てんかんネットワーク解析. 第 44 回日本てんかん学会. 2010.10.14-15, 岡山.
- ⑯ 香川幸太 他. 胚芽異形成性神経上皮腫瘍 (DNT) とその類似病変 5 症例における頭蓋内脳波および病理所見の検討. 第 44 回日本てんかん学会. 2010.10.14-15, 岡山.
- ⑰ 西本武史 他. テント上 pilocytic astrocytoma における腫瘍局在・形態とてんかんの難治性に関する検討. 第 44 回日本てんかん学会. 2010.10.14-15, 岡山.
- ⑱ 香川幸太 他. 胚芽異形成性神経上皮腫瘍

(DNT)とその類似病変5症例における頭蓋内脳波および病理所見の検討. 第69回日本脳神経外科学会. 2010.10.27-29, 福岡.

- ⑲ Kakita A. Surgical pathologic features of epileptogenic lesions. The 2nd Congress of Asian Society for Neuropathology. <Invited> 2011.11.5-6, Beijing.
- ⑳ Kitaura H et al. Pathophysiological mechanisms underlying hippocampal sclerosis for mesial temporal lobe epilepsy: implications of flavoprotein fluorescence imaging on human brain slices. The 41th Annual Meeting Society for Neuroscience. 2011.11.12-16, Washington DC.
- 21 Kakita A. Surgical pathologic features of FCD and related conditions in infants. The 14th Annual Meeting of ISS International Symposium <Invited>. 2012.2.18-19, Tokyo.
- 22 Kakita A. Surgical pathologic features of epileptogenic lesions. The 42nd NIPS International Symposium <Invited>. 2012.3.6-7, Okazaki.
- 23 遠山 潤、柿田明美. 動脈管開存の既往があり、難治性てんかんを示した女性例. 第41回小児神経学セミナーCPC<Invited>. 2011.9.17-19, 大阪.
- 24 柿田明美. 脳のできかたの妙を探る. 第20回新潟脳外科病院研究会 <Invited>. 2011.11.20, 新潟.
- 25 柿田明美. 小児てんかん原性病巣の外科病理. 第60回大阪小児てんかん研究会<Invited>. 2011.11.26, 大阪.
- 26 柿田明美. 難治てんかん原性病巣の神経病理. 第39回東北てんかん懇話会<Invited>. 2012.3.17, 秋田.
- 27 古川 絢子 他. 内側側頭葉てんかん患者の海馬における酸化損傷タンパク質の解析. 第52回日本神経病理学会. 2011.6.2-4, 京都.
- 28 北浦弘樹 他. 内側側頭葉てんかんにおける海馬硬化の病態生理学的意義: ヒト脳スライス標本を用いたイメージング解析. 第52回日本神経病理学会. 2011.6.2-4, 京都.

[図書] (計2件)

- ① 遠山 潤、柿田明美. 小児神経学の進歩. (分担執筆) Clinical Pathological Conference. 診断と治療社. 2012, in press.
- ② 柿田明美. てんかんテキスト New Version. (分担執筆)てんかんの病理. 中山書店. 2012, in press.

[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

## 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

福多真史 (FUKUDA MASAFUMI)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号: 00361907

### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号: