

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462269

研究課題名(和文) 限局性皮質形成異常を標識する術中分子イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of an intraoperative molecular probe visualizing the focal cortical dysplasia

研究代表者

浜崎 禎 (Hamasaki, Tadashi)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60433033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間中に難治性新皮質てんかんに対して外科的治療を行い摘出された組織を対象として、免疫組織学的に解析した。同様な症例で、術中採取されたてんかん患者髄液中タンパクと脳実質に器質的病変のない症例から術中採取された対照髄液をimmunoblotにより比較した。術中FCD可視化分子プローブの標的タンパクは、細胞外に存在することが見込まれる分泌型タンパクTGF β 及びchromogranin Aが候補となった。将来的に、蛍光ラベル分子プローブが作成できれば、てんかん焦点同定の空間解像度が大きく向上し、新皮質てんかんに対する切除外科の成績向上に寄与できると思われる。

研究成果の概要(英文)：We performed immunohistochemical analysis on the tissue resected from the patients with neocortical epilepsy during the study period. Immunoblot was performed for the cerebrospinal fluid (CSF) obtained during epilepsy- and control surgeries. We thereby selected candidate target proteins of molecular probes that would visualize the extent of FCD during surgery. The candidate target molecules would be extracellular secreted proteins, TGF β and chromogranin A, to construct molecular probes visualizing the FCD tissue. Intraoperative fluorescent-labeled molecular probes would enhance spacial resolution to localize the epileptic focus and thereby improve surgical outcome of neocortical epilepsy.

研究分野：脳神経外科

キーワード：分子イメージング 限局性皮質形成異常 てんかん手術 術中支援システム

1. 研究開始当初の背景

病変部位に特異的なタンパク質の発現分布を描出することが出来る分子イメージング法は、疾患の早期診断や治療成績の向上に有効な手段として注目されており (Kircher and Willmann. *Radiology* 263:633-643, 2012) 海外では大規模な基礎及び臨床研究が展開されている。近年、悪性脳腫瘍の摘出術において、photo dynamic diagnosis と呼ばれる腫瘍組織の術中蛍光イメージング法が開発され (Eljamel et al. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 7:76-85, 2010) 特に悪性神経膠腫の摘出率向上に対する有用性が臨床的に広く認識されるようになった。この方法は、手術中に空間解像度の高い情報をリアルタイムに得ることが出来るという点で優れている。さらに最近、蛍光色素でラベルしたモノクローナル抗体を分子プローブとして使用したさらに特異性の高い腫瘍組織イメージング法が動物実験において開発され (Terwisscha van Scheltinga et al. *J Nucl Med* 52:1778-1785, 2011) 臨床応用が期待されている。

我が国のてんかん患者は約 100 万人と概算され、有病率の高い神経疾患である。近年、てんかん患者が関与した交通事故が社会問題として取り上げられ、一般の関心も強く、法律の改正も含めた多くの議論がなされている。毎年新たに発生する約 6 万人の新たなてんかん患者のうち約 20% は薬剤抵抗性の難治性てんかんであり、外科的治療が考慮される。側頭葉てんかんに対する前側頭葉切除術は、その有効性が randomized control trial により証明され広く認められている (Wiebe et al. *N Engl J Med* 345(5):311-8, 2001) 一方で、新皮質てんかんは多彩なてんかん原性基盤を有しており、切除外科に関するエビデンスは十分でなく、手術による発作消失率は 50% 以下に留まっている。新皮質てんかんにおけるてんかん焦点の主要な病理は、中枢神経発達異常である限局性皮質形成異常 (focal cortical dysplasia, FCD) である。現在広く行われている画像診断法や慢性硬膜下電極を用いた発作時皮質脳波記録に加えて、特異性が高く FCD の存在範囲をより高精度に同定する術中分子イメージング技術を開発することができれば、てんかん焦点同定の空間解像度が大きく向上し、新皮質てんかんに対する切除外科の成績向上に寄与できると思われる。

2. 研究の目的

免疫生化学的手法を用いて FCD に特異的に発現しており、かつ、分子プローブの標的

となり得るいくつかの候補タンパクを同定し、FCD に対する分子プローブを開発して、将来的に新皮質てんかんの手術成績向上を目指した、新たな術中分子イメージング法の開発を提案する。

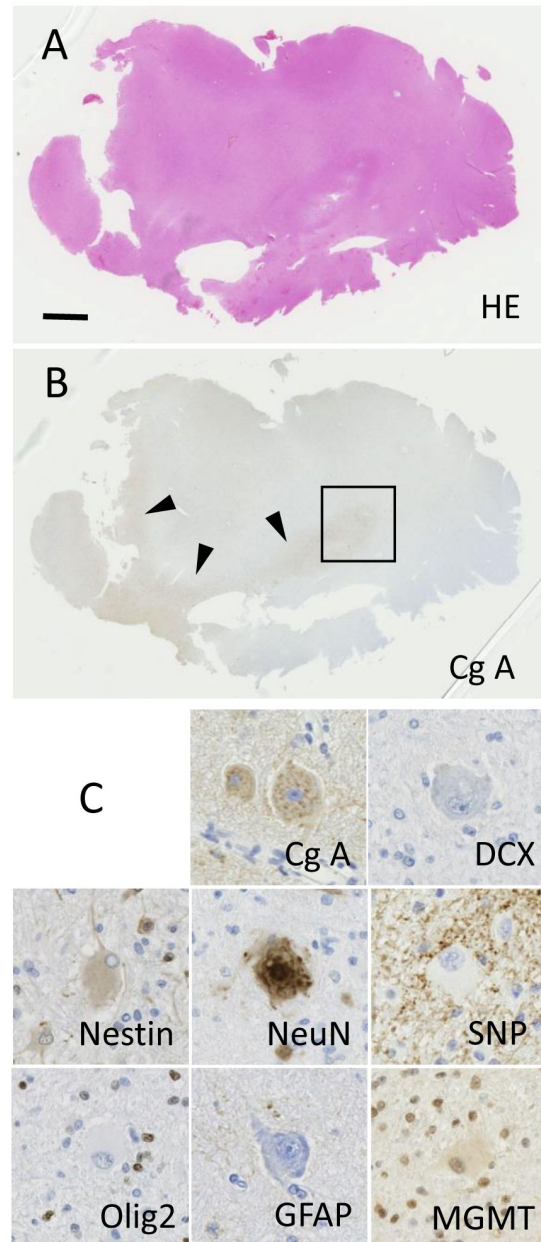


図 1. FCD type IIIb 免疫組織学的解析 (A-D) 摘出組織の hematoxylin eosin 染色 (A)、Klüver-Barrera 染色 (B)、NeuN 免疫染色 (C)、Olig2 免疫染色 (D) の弱拡大。上が脳表側。四角で示された領域に特異な細胞集塊がある。矢頭は、層構造に乱れのある大脳皮質領域を示す。Scale bar, 2 mm. (E) 特異な細胞集塊の強拡大。同細胞は、GFAP、S-100、Olig2、NF、Nestin などが陽性であり、ganglioglioma と病理診断された。

3. 研究の方法

(1) 摘出組織の免疫組織学的検討

研究期間中に難治性てんかんに対して手術を行った症例から摘出したてんかん焦点の病理組織を対象とした。また、神経膠芽腫の摘出術時に同時に切除された正常大脳皮質を対照群とした。

摘出直後に手術室で 15%ホルマリンに浸漬して固定し、パラフィン包埋のあと、3 μ m に薄切し、組織切片とした。

神経細胞のマーカーとして、neurofilament (NF)、nestin、NeuN、doublecortin (DCX)、synaptophysin (SNP)、TuJ1、グリア細胞のマーカーとして、GFAP、S-100、Olig2、また、腫瘍細胞その他をラベルする目的で、p53、IDH-1、MGMT、BRAF、CD34、Ki-67、Chromogranin A (CgA)、TGF- β 1、Smad4 それぞれに対する抗体を用いて免疫染色を行った。

免疫染色が終了したスライドは、NanoZoomer-XR バーチャルスライドスキャナ（浜松ホトニクス）を用いてデジタル化し、FCD 組織と対照の正常大脳皮質組織におけるそれぞれの発現レベルと定性的に比較解析した。

(2) てんかん患者髄液タンパクの解析

研究期間中に難治性てんかんに対して手術を行った症例から、術中採取された髄液を凍結保存した。対照群は、同一期間に開頭手術を行った、未破裂脳動脈瘤や顔面けいれんなどの脳実質に器質的病変のない症例から術中採取された髄液とした。

各髄液を spin vacuum 法により dry-up し、65 μ l の 1XSDS buffer に溶解、各 21 μ l を電気泳動し、immunoblot した。

(3) 倫理審査について

本研究は、関連する研究計画書が熊本大学大学院生命科学研究部等人を対象とする医学系研究臨床研究・医療技術部門倫理委員会により承認（先進第 1677 号及び 1612 号）され、実施された。

4. 研究成果

(1) 摘出組織の免疫組織学的検討

研究期間中に当施設において施行されたてんかん外科手術 27 例中 4 例が FCD と病理診断された。ILAE 分類 type IIIb の組織では、層構造の乱れた皮質組織の中に核腫大と核形不整のある細胞の集簇が多中心性に存在しており、この細胞群は S100、NF、nestin、Olig2、CD34 陽性、GFAP 陰性～弱陽性、であった（**図 1**）。さらに、この細胞

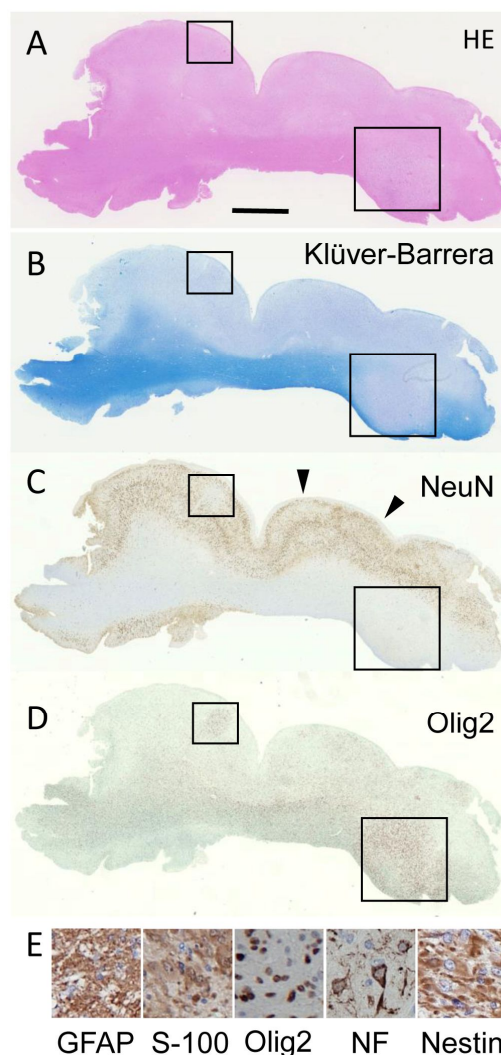


図 2. FCD type IIa 免疫組織学的解析

(A) 摘出組織の hematoxylin eosin 染色弱拡。Scale bar, 2 mm。(B) Chromogranin A (CgA) 免疫染色弱拡。(C) Dysmorphic neuron と思われる形態の細胞集塊 (B の四角内) は、CgA、nestin、NeuN、synaptophysin (SNP)、陽性、MGMT 弱陽性、doublecortin (DCX)、Olig2、GFAP は陰性であった。

群からサンプリングして行った DNA シークエンスでは BRAF-V600E の変異が検出され、多中心性の細胞集簇は ganglioglioma と病理診断された。FCD type IIa の組織では、この組織に特異的に出現する dysmorphic neuron を免疫組織学的に調べた（**図 2**）。Dysmorphic neuron は FCD 組織内で皮質と白質の境界付近に集塊を形成しており、nestin、SNP、NeuN、および CgA が陽性であった。このうち CgA は分泌型タンパクであり、FCD 可視化抗体の標的の候補となる。

また、難治性てんかんに対する外科手術の多数を占める側頭葉てんかんで切除された海馬組織でもてんかん焦点病理の組織学

的検討を行った。中枢神経発達期において神経細胞の増殖と分化に重要な役割を果たす分泌型タンパク Activin A が海馬歯状回の顆粒細胞層に発現していることが明らかとなった（未発表データ）。

(2) てんかん患者髄液タンパクの解析

Transforming growth factor (TGF) は、個体発生、免疫、組織再構築、癌化など、生体内での幅広い働きが知られているサイトカインである。セリン/スレオニンキナーゼ型受容体及び細胞内 Smad シグナルを介して、細胞分化、遊走、接着のプロセスに関与することが知られており、また最近、てんかん動物モデルにおいて、TGF シグナル阻害薬にてんかん原性形成に対する抑制効果がある可能性が示された（Ivens et al. Brain 130:535-547, 2007）。

研究期間に、難治性てんかんに対して手術を行ったてんかん群 16 例と脳実質に器質的病変のない対照群 14 例、合計 30 例から開頭術中採取された髄液に対して TGF の immunoblot を行った。結果は図 3 に示されるように、てんかん群の髄液中で TGF の顕著な上昇が認められた。TGF の産生上昇が、てんかん原性形成に関与したものか、神経細胞の過剰な興奮により分泌された 2 次的なものか不明であるが、分泌型タンパクであることは、FCD 可視化抗体の標的の候補として有力である。

(3) 今後の研究の展開について

本研究成果を踏まえて、術中 FCD 可視化抗体の標的タンパクを、細胞外に存在することが見込まれる分泌型タンパク TGF、chromogranin A、また、摘出された海馬で発現していた Activin A とし、分子プローブの作成を行う。その後ラットにおけるカニン酸 (KA) 注入 FCD モデル (Hodozuka et al. Childs Nerv Syst 22:827-833, 2006) を用いた in vivo の検証実験を行う。

本研究で開発を計画している分子イメージング法は、術中に FCD の位置を同定するという点で、従来行われてきた神経生理学的手法と異なる新たな術中診断モダリティである。これにより、難治性新皮質てんかんに対する切除外科の成績や安全性の向上が期待できる。

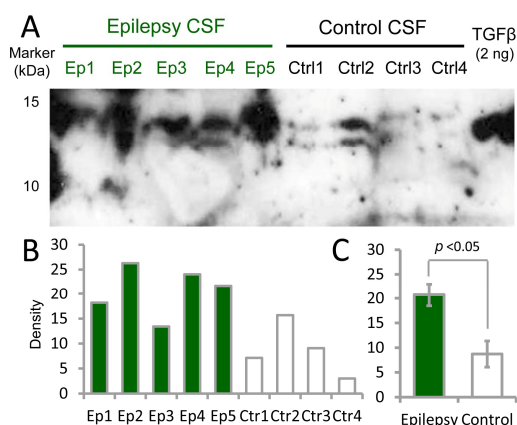


図 3. 髄液の生化学的解析 (A) 抗 TGF 抗体による Western blot。Ep1-Ep5 が難治性てんかん患者から、Ctrl1-Ctrl4 が対照群から採取した髄液の解析。(B) Image J を用いた各レーン TGF バンドの densitometry。てんかん群の density の平均は、対照群より有意に ($p = 0.012 < 0.05$) 高かった。

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]

(てんかん学に関する発表：合計 4 件)

- (1) Hamasaki T, Hirai T, Yamada K, Kuratsu J. (2015) An in vivo morphometry study on the standard transsylvian trajectory for mesial temporal lobe epilepsy surgery. Springerplus 4:406. (査読あり)
- (2) Hamasaki T, Otsubo H, Uchikawa H, Yamada K, Kuratsu J. (2014) Olfactory auras caused by a very focal isolated epileptic network in the amygdala. Epilepsy & Behavior Case Report 2:142-144. (査読あり)
- (3) Ninomiya S, Esumi S, Ohta K, Fukuda T, Ito T, Imayoshi I, Kageyama R, Ikeda T, Itohara S, Tamamaki N. (2013) Amygdala kindling induces nestin expression in the leptomeninges of the neocortex. Neurosci Res 75(2):121-9. (査読あり)
- (4) Hamasaki T, Yamada K, Kuratsu J. (2013) Seizures as a presenting symptom in neurosurgical patients: A retrospective single-institution analysis. Clin Neurol Neurosurg 115(11):2336-40. (査読あり)

〔学会発表〕

(てんかん学に関する発表：合計 13 件)

- (1) 第 24 回九州山口てんかん外科研究会
(平成 29 年 3 月 18 日：福岡市)
Subtemporal approach による脳幹部海綿状血管腫摘出術後に生じた難治性左側頭葉てんかんに対して multiple subpial transection が有効であった 1 例
熊本大学病院脳神経外科、*生理検査室、**中央放射線部
森川裕介、浜崎禎、原田美保*、森田康祐**、山田和慶
- (2) 第 40 回日本てんかん外科学会
(平成 29 年 1 月 26 - 27 日：大阪市)
脳腫瘍及び脳血管障害手術後の難治性てんかん - 焦点診断とてんかん手術の有効性に関する検討
熊本大学医学部脳神経外科
浜崎禎、山本隆広、中村英夫、牧野敬史、矢野茂敏、山田和慶
- (3) 第 50 回日本てんかん学会学術集会
(平成 28 年 10 月 7 - 9 日：静岡市)
脳神経外科手術後の難治性てんかんに対する外科治療
熊本大学医学部脳神経外科、桜十字病院*
浜崎禎、中村英夫、牧野敬史、矢野茂敏、山田和慶、倉津純一*
- (4) 第 123 回日本脳神経外科学会九州地方会
(平成 28 年 6 月 11 日：久留米市)
確定診断に DNA シークエンスが有用であった ganglioglioma の 1 例
熊本大学医学部脳神経外科、*病理診断科
**群馬大学大学院医学系研究科 病態病理学分野
舎川健史、林建佑、浜崎禎、篠島直樹、黒田順一郎、今岡幸弘、竹島裕貴、中川隆志、三上芳喜*、横尾英明**、秀拓一郎、牧野敬史、中村英夫、矢野茂敏、倉津純一
- (5) 第 39 回日本てんかん外科学会
(平成 28 年 1 月 21 - 22 日：仙台市)
非典型的な脳梁離断症状を呈した 1 症例
熊本大学医学部脳神経外科
村上あゆみ、浜崎禎、賀来泰之、山田和慶、倉津純一
- (6) 第 49 回日本てんかん学会学術集会
(平成 27 年 10 月 30 - 31 日：長崎市)
後頭葉てんかんに対する焦点切除後に視野障害が改善した 1 例
熊本大学医学部脳神経外科

浜崎禎、山本隆広、中村英夫、山田和慶、倉津純一

- (7) 第 23 回九州・山口機能外科セミナー
(平成 27 年 8 月 22 日：久山町)
後頭葉てんかんの外科治療後に視野障害の改善が得られた 1 例
熊本大学医学部脳神経外科
浜崎禎、山本隆広、中村英夫、山田和慶、倉津純一
- (8) 第 38 回日本てんかん外科学会
(平成 27 年 1 月 15 - 16 日：東京)
In vivo morphometry を用いた側脳室下角へのシルビウス裂經由到達ルートの検討
熊本大学医学部脳神経外科
浜崎禎、山田和慶、倉津純一
- (9) 第 48 回日本てんかん学会学術集会
(平成 26 年 10 月 2 - 3 日：東京)
てんかん患者脳における TGF の発現増強
熊本大学医学部脳神経外科、*熊本大学大学院生命科学研究部脳回路構造学分野
浜崎禎、江角重行*、玉巻伸章*、篠島直樹、山田和慶、倉津純一
- (10) 第 25 回石打カンファレンス
(平成 26 年 2 月 15 日：福島県塩原村)
選択的扁桃体海馬切除術の経シルビウス裂到達ルート
熊本大学医学部脳神経外科
浜崎禎、倉津純一
- (11) 第 37 回日本てんかん外科学会
(平成 26 年 2 月 6 - 7 日：大阪市)
焦点切除により症状改善したてんかん性幻臭の一例
熊本大学医学部脳神経外科、*トロント小児病院
浜崎禎、山田和慶、伊東山剛、大坪宏*、倉津純一
- (12) 第 47 回日本てんかん学会学術集会
(平成 25 年 9 月 11 - 12 日：北九州市)
Individual variations in the access route to the inferior horn of the lateral ventricle via sylvian fissure: an in vivo morphometry on 3-dimensional 3T MRI
Department of Neurosurgery,
Kumamoto University Medical School
Tadashi Hamasaki, Kazumichi Yamada, and Jun-ichi Kuratsu

- (13)第 8 回日本てんかん学会九州地方会
(平成 25 年 7 月 13 日：福岡市)
脳外科疾患におけるけいれん発作の合併
率 - 単一施設での解析 -
熊本大学医学部脳神経外科
浜崎禎、山田和慶、倉津純一

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浜崎 禎 (HAMASAKI, Tadashi)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60433033

(2)研究分担者

山田 和慶 (YAMADA, Kazumichi)
熊本大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号：00398215

玉巻 伸章 (TAMAMAKI, Nobuaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20155253

倉津 純一 (KURATSU, Jun-ichi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20145296

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし