

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461312

研究課題名(和文) 局所皮質異形成におけるミオクロニー発作の誘導とその分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) A study of the correlation between myoclonic seizure and molecular mechanism induced by focal cortical dysplasia.

研究代表者

高瀬 敬一郎 (Takase, Kei-ichiro)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00467903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：胎生18日目(E18)に子宮壁外から胎児頭蓋に冷却プローブで傷害を加えた局所皮質異形成モデルを、左前頭葉に1箇所、左前頭葉に2箇所、両側前頭葉に1箇所ずつ、それぞれ7匹ずつ作成した。異形成を有するモデルに対し、出生後1日(P1)から7日(P7)まで頭皮上左右前頭部に刺激電極を用いて2電極間に短径波双極定電流を与えた。ミオクロニー発作と考えられる発作を生じた個体を確認したところ、P1では両側前頭葉の傷害モデルに有意に出現率が高い結果となったが、P2以降は各群とも出現率が増加し、最終的には差がない結果となった。両側皮質異形成モデルに初期のみミオクロニー発作の閾値が高い傾向となった。

研究成果の概要(英文)：On embryonic day (E) 18, a frozen probe was placed on the frontal scalp of a Sprague-Dawley rat embryo through the uterus wall to produce multiple (one or two) freeze lesions on each hemisphere. FCD rat models were divided to group A (one lesion on the left), group B (two lesions on the left) and group C (one lesion on the each frontal areas). All rats were performed EEG monitoring with electrical stimulation onto the scalp electrodes from postnatal day (P) 1 to P7. The number of animals of group C showing myoclonic seizure was significantly more than the other groups on P1, however there was no significance between all groups through the stimulations. Immunoreactivities for N-methyl-D-aspartate receptors and glutamate transporters in FCD lesions were significantly enhanced compared to controls.

研究分野：てんかん

キーワード：てんかん 実験てんかん ミオクロニー発作 皮質異形成

### 1. 研究開始当初の背景

てんかんは種々の病因による大脳神経細胞の過剰な発射(てんかん性放電)に由来する反復性の発作を主徴とする疾患である。7割は投薬で経過が良好であるが、残り3割は薬物療法・手術療法を駆使しても発作がコントロールできない難治てんかんである。特に小児の難治てんかんのうち乳児重症ミオクロニーてんかん、レノックス・ガストー症候群等でみられるミオクロニー発作は難治性であり、満足のいく治療効果が得られていないのが現状である (Arzimanoglou A, 2009)。小児てんかんは特に少子化の我が国では治療法の確立が急がれる分野である。

てんかんの原因としては様々なものがあり、皮質異形成はてんかん焦点切除術で取り出した組織に認められることが多く、てんかんを引き起こす原因として近年重要視されるようになった (Porter BE, 2003; Fauser S, 2004)。しかし皮質異形成そのものにてんかん原性があるか否かは明らかになっていない (Palmini A, 1995; Fauser S, 2006)。小児の症候性全般てんかんに皮質異形成が合併することがあり、原因の一つとして注目されているが (Arzimanoglou A, 2009)、皮質異形成と症候性全般てんかんの関連性は未だ不明のままである。

このような局在する皮質異形成のてんかん原性を解明するために、私たちはこれまでに、ラット胎児胎生 18 日齢の大脳に寒冷傷害を加えることで、世界で初めてヒトの皮質異形成に極めて近似する局所大脳皮質異形成の作成に成功している (Takase K, 2008; 日本てんかん学会 WADA 賞受賞; 図 1)。このモデルラットでは、特に電気刺激等を必要とせず、自発性海馬てんかん発作を獲得することを明らかにした (Kamada T, 2013; 世界神経学会ポスター賞受賞)。このモデルでは、皮質異形成組織には脳の正常な層構造が見られず、神経細胞の極性が完全に乱れており、ヒトの皮質異形成に合致する所見であり、自発性海馬てんかん発作が生じた。ラットでは生後 2 週間までは GABAA 受容体は興奮性に働くとしており、てんかん発射を生じやすい。興奮しやすい海馬細胞と同様の状態が幼少期には存在する可能性がある。以上の学術的背景から、私たちは症候性全般てんかん、特に難治性ミオクロニー発作に皮質異形成が寄与するとの仮説を立てた。

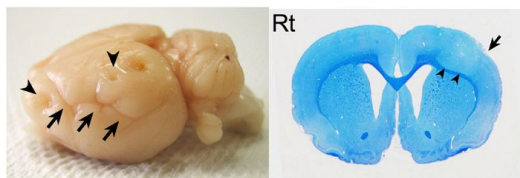


図 1

### 2. 研究の目的

上記仮説を証明するために、本研究ではキンドリング刺激を行う群と行わない群に分け、皮質異形成モデルラットの短期ビデオモ

ニターによりてんかん性スパズムを証明し、皮質異形成のミオクロニー発作誘発性を明らかにする。さらに、皮質の神経細胞のレセプター蛋白異常を明らかにする。これらにより皮質異形成が主要な症候性全般てんかんの原因たり得ることを立証する。

### 3. 研究の方法

胎生 18 日目 (E18)、母ラットから子宮を有茎のまま取り出し子宮壁外から胎児頭蓋に冷却プローブで傷害を加え、再び母ラットの腹腔内に戻した上で出産させ、局所皮質異形成モデルを作製した (図 2)。



図 2

左前頭部に 1 箇所 (group A)、左前頭葉に 2 箇所 (group B)、両側前頭葉に 1 箇所ずつ (group C)、sham ラットモデル (group D)、正常コントロール (group E)、それぞれ 7 匹ずつ作成した (図 3)。それぞれのラットに対し、出生後 1 日 (P1) から 7 日 (P7) まで頭皮上左右前頭部に刺激電極を設置し、2 電極間に 50Hz、持続 5 秒 (計 250 回) の短径波双極定電流を与え刺激した (図 4)。

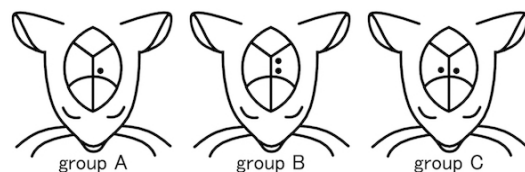


図 3



図 4

記録はそれぞれ刺激直後から 1 時間にかけてビデオ上全身性ミオクロニー発作を生じた個体をカウントした。P7 のモニタリング終了後全てのラットを灌流固定した。

次に group A-E 各群のラットの組織切片に対し、HE, KB, NeuN 染色にて形態を判断した

上で、新皮質・海馬の組織に対し免疫染色を行った。抗体はそれぞれ NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B、GAD65/67、GLAST、GLT-1 を行い、NMDA 受容体、GABA ニューロン、グルタミン酸トランスポーターの変化を観察すると共に、画像処理ソフトを用いた Semi-quantitative densitometric analysis を用いて定量し、各群間で比較検討した。また神経細胞/軸索・アストロサイト間の細胞間情報伝達に関わるコネクシン群蛋白 (Cx) である Cx 36 (GABA-ergic neuron), Cx 43 (Astrocyte) に関しても、それぞれ染色し比較検討した。

#### 4. 研究成果

P1 には group A の 43%、group B の 43%、group C の 57% にミオクロニー発作を認め、group D の sham モデル、group E の正常コントロール群と有意差が疑われたが、P7 まで観察を続けたところ、最終的に全ての群で発作出現率が 100% となり、有意差はなかった (図 5)。

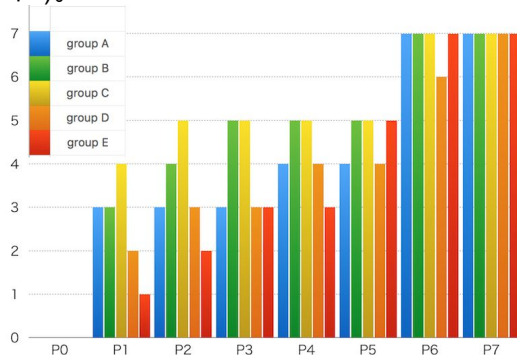


図 5

これらの発作は全て同一で、まず長時間続く無動状態から、その後強く体幹全体を瞬間的に振るわせるミオクロニー発作に進展した。

Group A-C の組織を HE、KB、NeuN 染色で形態を調べたところ、異形成部位にあたる大脳皮質は軽度肥厚しており、異形成部位の皮質は著明な層構造異常を伴っていた。層構造は破綻しており、極性を失った様々な大きさの神経細胞群を同部位に認めた。異常部位の内側と外側はともに正常な皮質構造を呈していた。NeuN 染色では、異形性に当たる部位はほぼ神経細胞の異常な集簇であった (図 6)。Group D, E には組織学的異常を認めなかった。

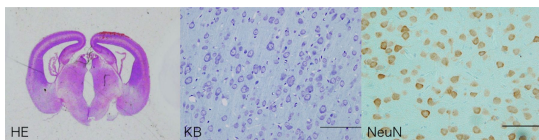


図 6

A-C 群、D-E 群の組織に対し、NMDA 受容体、GABA ニューロン、グルタミン酸トランスポーターの変化を Semi-quantitative densitometric analysis を用いて定量したところ、GAD64/67 に差はなかったが、それ以外の NMDA 受容体とグルタミン酸トランスポーターの染色性は著明に上昇しており、グルタミン酸を介した神経興奮活動の上昇が示唆

された。(図 7)。

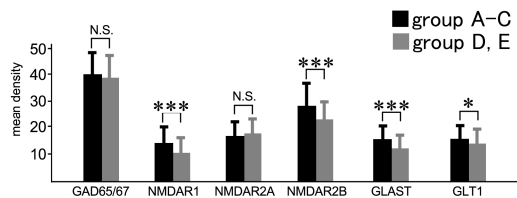


図 7

コネクシン蛋白については、Cx 36 (GABA-ergic neuron), Cx 43 (Astrocyte) の染色において、皮質異形成と正常コントロール間で比較検討したが、両者で濃度の明らかな有意差を認めなかった (図 8)。

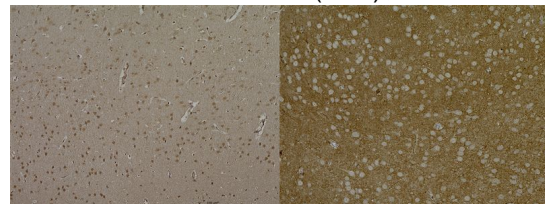


図 8 : 左が Cx36、右が Cx43

以上の結果から、幼若ラットでのミオクロニー発作出現に関して、皮質異形成の関与は明らかではないことが示唆された。我々は以前の報告で、皮質異形成のある成体ラットにおいては、皮質及び海馬の過興奮が生じ、側頭葉てんかんを生じることを証明している (Takase K, 2008, Kamada T, 2013)。本研究に置いても皮質の組織においては、NMDA 受容体、グルタミン酸トランスポーターの過活動は認められたが、それはミオクロニー発作に関与するというよりは、成熟後のてんかん原性を励起する段階的な変化と考えられると結論付けられた。

#### 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 10 件)

Takase K, Matsumoto S, Nishi H, Nakahara I. A case of superior sagittal sinus intracranial dural sagittal sinus intracranial dural arteriovenous fistula mimicking corticobasal syndrome. *Journal of the Neurological Sciences*. 376: 91-92, 2017

Nakamura Y, Takase K, Matsushita T, Yoshimura S, Yamasaki R, Murai H, Kikuchi K, Kira J. Recurrent Hemorrhagic Venous Infarctions Caused by Thrombosis of a Pontine Developmental Venous Anomaly and Protein S Mutation. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 25:e216-e217, 2016

Tanaka K, Yamada T, Torii T, Matsumoto S, Yoshimura T, Takase K, Wakata Y, Nakashima N, Kira JI, Murai H. Predictive Factors for Excellent or Extremely Poor Functional Outcome in Initial Atrial Fibrillation-Related

Cardioembolic Stroke. Eur Neurol. 76:105-111. 2016  
Tanaka K, Yamada T, Torii T, Matsumoto S, Yoshimura T, Takase K, Wakata Y, Nakashima N, Kira J, Murai H. Predictive Factors for Excellent or Extremely Poor Functional Outcome in Initial Atrial Fibrillation-Related Cardioembolic Stroke. Eur Neurol 76:105-111. 2016  
Tanaka K, Yamada T, Torii T, Yoshimura T, Takase K, Togao O, Wakata Y, Hiwatashi A, Nakashima N, Kira J, and Murai H. Pure dysarthria and dysarthria-facial paresis syndrome due to internal capsule and/or corona radiata infarction. BMC Neurol. 15: 184. 2015  
Shimmura M, Maeda N, Kanetou S, Takashima N, Takase K. A case of Isaacs' syndrome causing various central nervous symptoms successfully treated with high-dose intravenous methylprednisolone therapy. Rinsho Shinkeigaku. 55:37-40. 2015  
Kamada T, Sun W, Takase K, Shigeto H, Suzuki SO, Ohyagi Y, Kira J. Spontaneous seizures in a rat model of multiple prenatal freeze lesioning. Epilepsy Res. 105:280-91. 2013  
Takase K, Kamada T, Shimmura M, Uehara T, Shigeto H, Suzuki SO, Murai H, Kira J. Prenatal lesioning cortical dysplasia rat model with spontaneous temporal lobe seizures. Journal of the Neurological Sciences. 15: Supplement 1, Page e11. 2013  
Yutsudo N, Kamada T, Kajitani K, Nomaru H, Katogi A, Ohnishi YH, Ohnishi YN, Takase K, Sakumi K, Shigeto H, Nakabeppu Y. fosB-null mice display impaired adult hippocampal neurogenesis and spontaneous epilepsy with depressive behavior. Neuropsychopharmacology. 38:895-906. 2013  
Takase K, Murai H, Tasaki R, Miyahara S, Kaneto S, Shibata M, Takashima N. Initial MRI Findings Predict Progressive Lacunar Infarction in the Territory of the Lenticulostriate Artery. Eur Neurol 65:355-360. 2011  
〔学会発表〕(計6件)  
高瀬敬一郎ら. 虚血性脳卒中に関連した症候性てんかんの考察 第42回日本脳卒中学会総会 2017年3月16日-19日. 大阪市大阪国際会議場.  
Kei-ichiro Takase. A study of symptomatic epilepsy related to ischemic stroke. 第50回日本てんかん

学会学術集会. 2016年10月7日-9日. 静岡市グランシップ.  
Kei-ichiro Takase. A study of symptomatic epilepsy related to ischemic stroke. The 12th European Congress of Epileptology. Sep 11 to 15, 2016. Prague, Czech Republic  
Kei-ichiro Takase. A study of symptomatic epilepsy related to ischemic stroke. 第57回日本神経学会学術大会. 2016年5月18日-21日. 神戸市神戸コンベンションセンター  
高瀬敬一郎ら. 脳梗塞における地域連携パスの問題点. 連携パスは不要か? 第18回日本医療マネジメント学会学術総会. 2016年4月22日-23日. 福岡市福岡サンパレス  
kei-ichiro Takase. A study of early and late epileptic seizure related to ischemic stroke. 第41回日本脳卒中学会総会. 2016年4月14日-16日. 札幌市ロイトン札幌  
(講演)(計2件)  
高瀬敬一郎. 脳梗塞二次予防のポイント. 筑豊地区 Network Meeting. 2016年11月25日. 飯塚市コスモスコモン  
高瀬敬一郎. 脳梗塞はこうやって治療する. ふれあい市民講座. 2016年5月14日. 飯塚市コスモスコモン  
〔図書〕(計0件)  
〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)  
〔その他〕  
ホームページ等  
<https://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/6>. 研究組織  
(1)研究代表者  
高瀬 敬一郎 (TAKASE KEI-ICHIRO)  
飯塚病院 神経内科部長, 九州大学 大学院 医学研究院 臨床準教授  
研究者番号: 00467903  
(2)研究分担者  
重藤 寛史 (SHIGETO HIROSHI)  
福岡山王病院 てんかん・すいみんセンター長, 国際医療福祉大学教授  
研究者番号: 50335965  
鎌田 崇嗣 (KAMADA TAKASHI)  
久留米大学医学部 神経内科 助教  
研究者番号: 70614460