

—— 研究助成報告 ——

皮質形成異常症におけるてんかん原性の機能的・形態学的解析

Morphological and functional analysis of the human epileptogenic tissues in vitro

北 浦 弘 樹¹⁾, 園 田 真 樹²⁾, 白 水 洋 史²⁾, 清 水 宏¹⁾, 伊 藤 陽 祐²⁾,
増 田 浩²⁾, 高 橋 均¹⁾, 亀 山 茂 樹²⁾, 柿 田 明 美¹⁾

要旨: 皮質形成異常症 (FCD) と視床下部過誤種 (HH) は共に胎生期に生ずる発生異常のひとつであり, その病変内にてんかん原性が存在することが重要な臨床的特徴の一つである。そのため本研究では, 両者の摘出組織より急性脳スライス標本を作成して機能的・形態学的に調べることで, その共通点や相違点を検討した。FCD, HH ともに切除された組織片自体から高頻度でてんかん様自発発火が認められた。HHではJSTXの投与によりてんかん様自発発火がほぼ消失したのに対して, FCDでは変化がみられなかった。また, HHではADAR2の核内における免疫染色性の低下が認められた。さらに, GluA2サブユニットQ/R部位のRNA編集率もHHにおいて有意に低下していた。以上の結果から, HHではQ/R変異をきたしたGluA2サブユニットを含むCa²⁺透過型AMPA受容体が発現していることを示唆している。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2017; 28: 41-46

Key Words: 視床下部過誤種, Field potential recordings, AMPA型グルタミン酸受容体, ジョロウグモ毒素, RNA編集

[序論]

皮質形成異常症 (FCD) は大脳皮質に生じる発生異常のひとつであり, 病理学的に異常な形態を示す細胞 (Dysmorphic neuron/ Balloon cell) の出現様式などによって, いくつかのサブタイプに分類されている¹⁾。特に最も激しい表現型を示すFCD IIbにおいてはその病変内にてんかん原性が高確率に存在することが重要な臨床的特徴の一つである。病変自体にてんかん原性が存在する他の発生異常症としては, 視床下部に発生する視床下部過誤種 (HH) がよく知られている^{2,4)}。両者は共に幼少期より難治

性てんかんを生じるが, 手術により比較的良好な予後をとることが知られている^{5,6)}。筆者らはこれまでに手術により摘出された脳組織から急性脳スライス標本を作製し, 生体外でそのてんかん様神経活動の解析を進めてきた^{7,8)}。そのため本研究では, 両者の摘出標本を機能的・形態学的に詳細に調べることで, その中に存在するてんかん原性について共通点や相違点を明らかにすることを目標とした。

[方法]

国立病院機構西新潟中央病院および新潟大学医学部倫理委員会による認可のもと, 対象患者

¹⁾新潟大学脳研究所病理学分野

[951-8585 新潟県新潟市中央区旭町通1-757]

²⁾国立病院機構西新潟中央病院機能脳神経外科

[950-2085 新潟県新潟市西区真砂1-14-1]

Hiroki Kitaura¹⁾, Masaki Sonoda²⁾, Hiroshi Shirozu²⁾, Hiroshi Shimizu¹⁾, Yosuke Ito²⁾, Hiroshi Masuda²⁾, Hitoshi Takahashi¹⁾, Shigeki Kameyama²⁾, Akiyoshi Kakita¹⁾

¹⁾Department of Pathology, Brain Research Institute, Niigata University

²⁾Department of Neurosurgery, Nishi-Niigata Chuo National Hospital

からは文書によるインフォームドコンセントを得て研究を行った。

FCD IIb 3例, HH 11例より記録を行った。また, 対照群としててんかんを有さない脳腫瘍患者において, 深部腫瘍へアクセスする際に最小限切除された正常様大脳皮質2例を用いた。FCD, control例においては, 切除された脳組織を手術室内にて直ちに病理診断用と研究用とに切り分け, 視床下部過誤種においては深部電極記録後, 定位温熱凝固術施行の際に針生検により採取された数個の組織 (1-2mm大) を病理診断用と研究用とに分別した。いずれも研究用の組織は直ちに氷冷人工脳脊髄液中 (ACSF) に入れられ, 95% O₂/ 5% CO₂でバブリングしながら実験室へ輸送した。実験室において摘出標本から500 mm 厚の急性脳スライス標本を作成してincubateし, ACSFを灌流させながらスライスに挿入したタングステン電極より局所電場電位 (LFP) を記録した。

記録後, 組織を20% BFで固定し, パラフィン包埋切片を作成して組織学的解析を行った。免疫組織化学に用いた一次抗体と希釈倍率は以下の通りである。GFAP (1 : 4,000, Z0334, Dako, USA), GluA2 (1 : 500, 11994-1-AP, Proteintech, USA), NeuN (1 : 200, MAB377,

Millipore, USA), ADAR2 (1 : 100, sc-73049, Santa Cruz Biotechnology, USA)。また, 免疫染色による実験では, 正常対照群として, てんかんの既往がない剖検脳の視床下部領域パラフィン包埋標本を用いた。RNA解析においては, 摘出直後に手術室内で RNA stabilization 溶液に浸漬し, -80℃で凍結保存したサンプルより既報に準じてGluA2サブユニットのRNA解析を行った⁹⁾。

[結果]

病理組織学的には, FCD IIb の症例において皮質内に神経細胞配列の高度な乱れやGliosisとともに, Dysmorphic neuronやBalloon cellの出現を認めた。一方, HHでは異型性の見られない神経細胞とグリア細胞から成り, 明らかな特徴的变化には乏しかった (Fig. 1)。FCD, HHともに生体外に isolate された環境下においても, 切除された組織片自体から高頻度のてんかん様神経活動が認められたが, このような神経活動は control tissue においては認められなかった (Fig. 2)。さらに, 種々の薬剤に対する応答を比較した結果, ジョロウグモ毒素 (JSTX) に対する反応において, 両者に明瞭な差が認められた。すなわち, HHでは10μmM

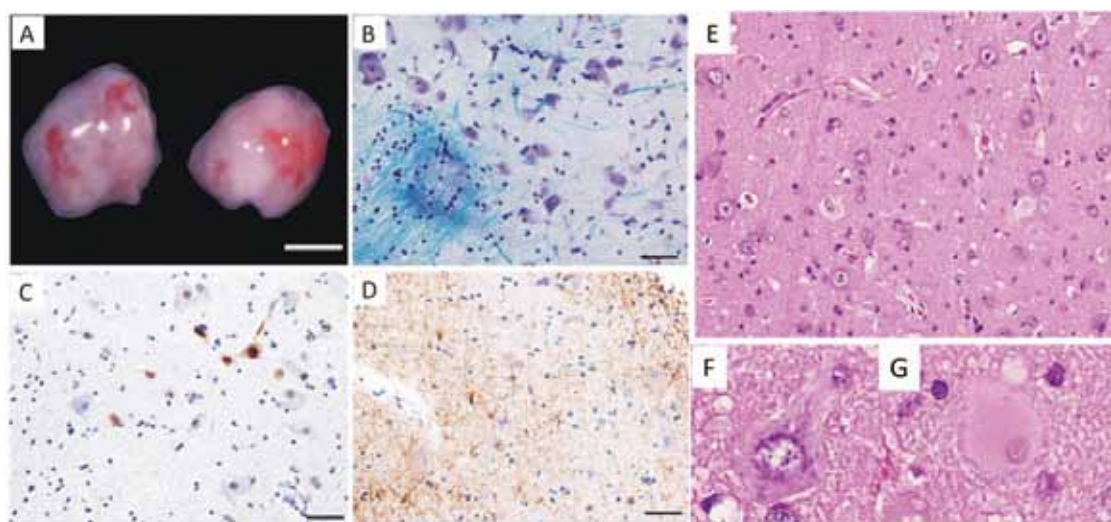


Fig. 1 Histopathological features of HH (A-D) and FCD IIb (E-G). (A). Macroscopic picture of the needle biopsied specimen. (B-D). Microscopic images stained by Klüver-Barrera (B), immunostained for NeuN and GFAP (D). Scale bars, 1 mm (A) and 50 μm (B-D).

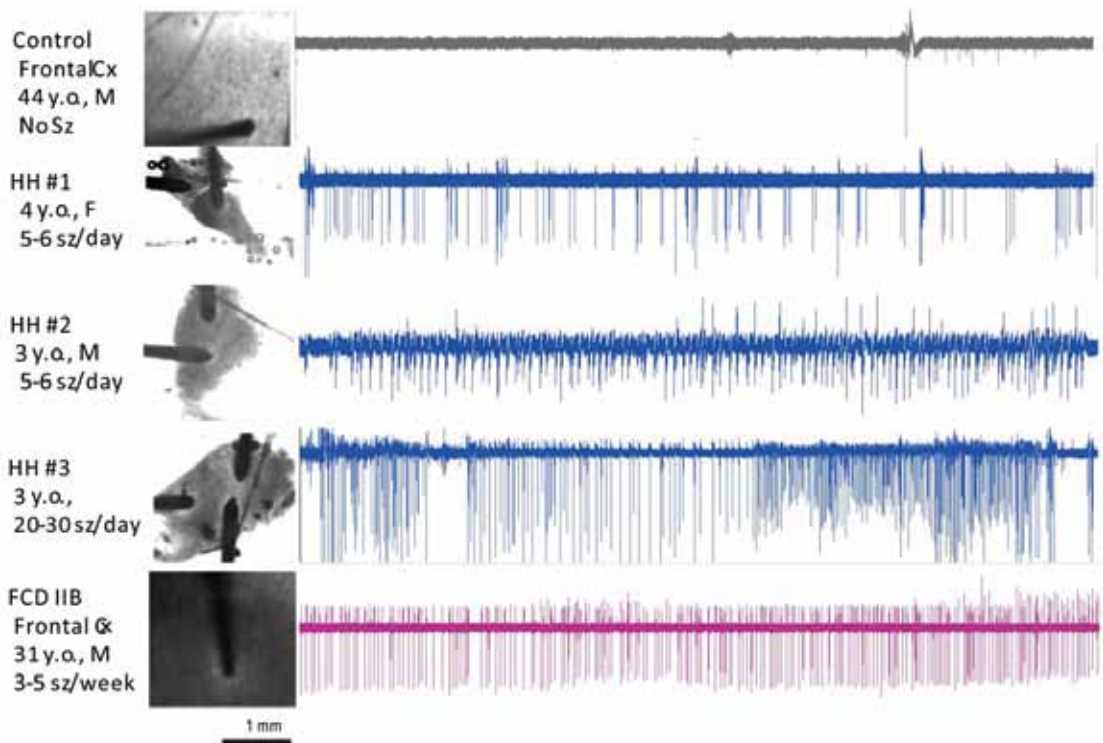


Fig. 2 LFP recordings from HH, FCD IIB and control tissue.

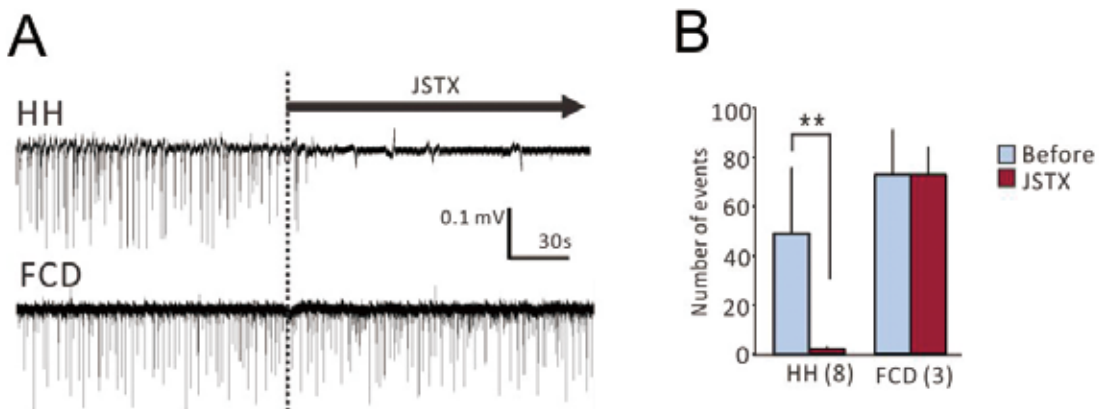


Fig. 3 Result of pharmacological experiment.

JSTX significantly suppressed the epleptiform activities in HH, but not in MTLE and FCD IIB.

** $p < 0.01$, paired t-test.

JSTXの投与によりてんかん様自発発火がほぼ消失したのに対して、FCDでは変化がみられなかった¹⁰⁾ (Fig. 3)。JSTXはAMPA型グルタミン酸受容体のGluA2サブユニットに特殊な変異(Q/R変異)をきたしている場合のみ作用することが知られており、通常哺乳類の神経細

胞においては作用することがない¹¹⁾ (Fig. 4)。このことはHHでは、AMPA受容体のQ/R変異をきたしていることを示唆しているものと思われる。そのため、このQ/R変異を制御している核内酵素であるAdenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2)^{12,13)}の分布を免疫組織染

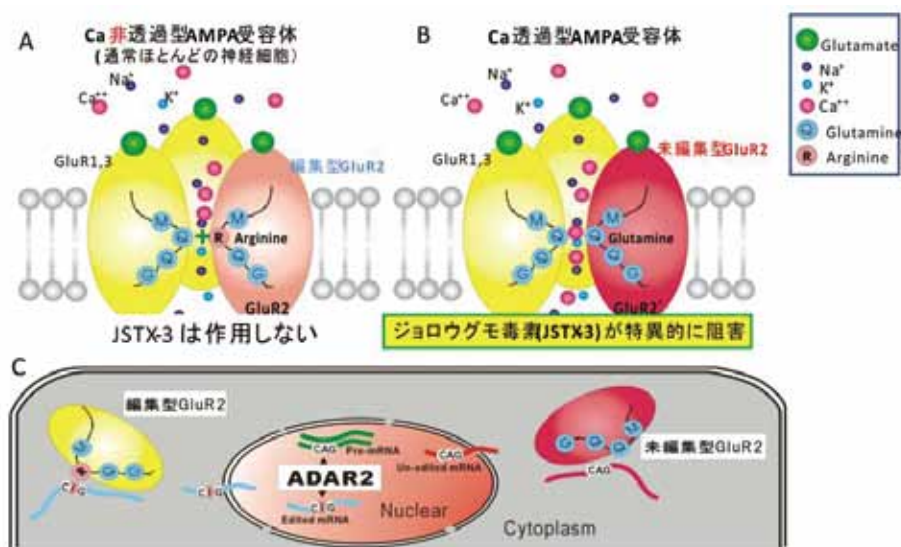


Fig. 4 Pathomechanisms involving ADAR2 and GluA2 editing.

The DNA sequence at the genomic glutamine/arginine (Q/R) site of GluA2 is CAG. The adenosine at the Q/R site of the pre-mRNA is specifically converted to inosine by ADAR2. This converts the genomic CAG codon for Q to a CIG codon in the mRNA, and CIG is read as CGG, which is the codon for R during translation. Only AMPA receptors including edited GluA2 have the property of Ca^{2+} impermeability (A). If Q-to-R conversion has failed, unedited GluA2 is expressed (C). This results in abnormal Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in neurons and JSTX binds specifically to this receptor (B).

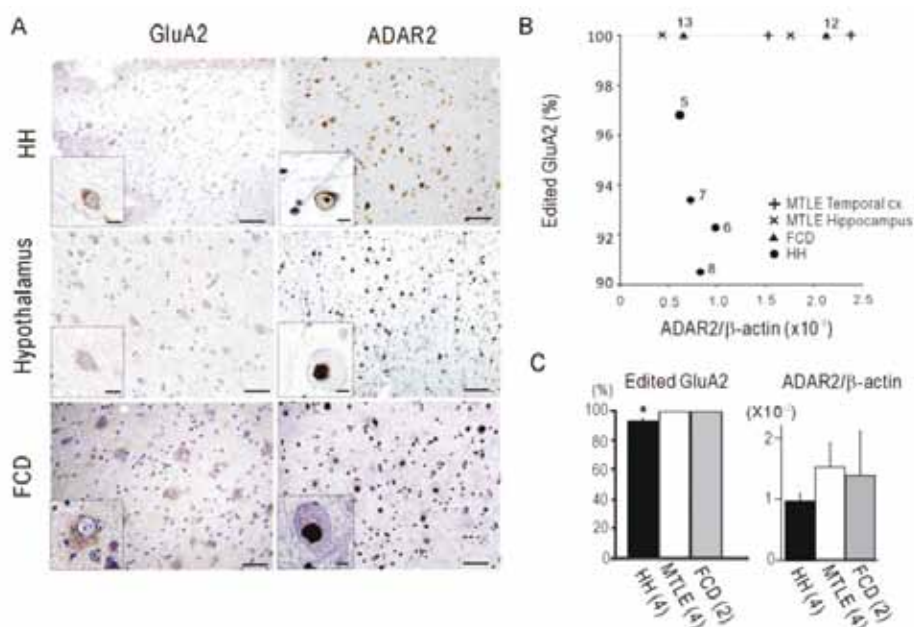


Fig. 5 Distribution and quantification analysis of ADAR2.

(A) Immunohistochemistry for the nonspecific GluA2 subunit (left column) and ADAR2 (right column). Note the dysmorphic neuron in FCD highlighted in the *inset*. Scale bars: $100\mu\text{m}$, and in the *inset* $10\mu\text{m}$. (B) Editing efficiency of the GluA2 mRNA is plotted against the normalized yield of ADAR2. Each circled number corresponds to the case number in Table 1. (C) Summary of the data (error bar indicates S.E.M., * $p < 0.05$, Mann-Whitney U test).

色により検討した結果、HHにおいてはADAR2の核内における染色性の低下が認められた(Fig. 5A)。さらに、GluA2サブユニットのRNA編集率を検討した結果、通常大脳皮質神経細胞において100%であるべきGluA2 Q/R部位のRNA編集率^{14,15)}が有意に低下していた(Fig. 5B,C)。これらの変化はFCDにおいては認められなかった。

[考察]

視床下部過誤腫は稀な先天性脳形成異常のひとつで、視床下部腹側や灰白隆起に生じる異所性灰白質であり、高頻度に薬物抵抗性のてんかん性笑い発作を発症する⁵⁾。同疾患をもつ患者では、笑い発作以外のてんかん発作を伴う頻度も約90%と高く、認知機能の低下や行動異常などのてんかん性脳障害を約半数で伴う⁶⁾。本研究において、視床下部過誤腫に内在するといわれているてんかん原性を*in vitro*においても再現したことで、また、捕捉されたてんかん様神経活動が特異的にジョロウグモ毒素で抑制されたという知見は、今後の治療展開を構築する上で大きな意味を持つ。特にHHにおいて認められたGluA2のRNA編集異常に起因するJSTXへの感受性亢進については、JSTXが正常神経細胞には作用しないことから、有効な新規抗てんかん薬の開発につながる可能性がある重要な結果であると考えられる。

[文献]

1. Blumcke IM, Thom M, Aronica E, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Commission. *Epilepsia* 2011 ; **52** (1) : 158-174.
2. Kameyama S, Murakami H, Masuda H, Sugiyama I : Minimally invasive magnetic resonance imaging-guided stereotactic radiofrequency thermocoagulation for epileptogenic hypothalamic hamartomas. *Neurosurgery* 2009 ; **65** (3) : 438-449.
3. Kuzniecky R, Guthrie B, Mountz J, et al. Intrinsic epileptogenesis of hypothalamic hamartomas in gelastic epilepsy. *Ann Neurol* 1997 ; **42** : 60-67.
4. Shirozu H, Masuda H, Ito Y, et al. Stereotactic radiofrequency thermocoagulation for giant hypothalamic hamartoma. *J Neurosurg* 2016 ; **1** : 1-10.
5. 亀山茂樹 : 視床下部過誤腫に対する定位温熱凝固術. *Epilepsy* **3** (1) 2009.
6. Kameyama S, Shirozu H, Masuda H, et al. MRI-guided stereotactic radiofrequency thermocoagulation for 100 hypothalamic hamartomas. *J Neurosurgery* 2016 ; **124** : 1503-1512.
7. Kitaura H, Oishi M, Takei N, et al. Periventricular nodular heterotopia functionally couples with the overlying hippocampus. *Epilepsia* 2012 ; **53** : e127-131.
8. Kitaura H, Hiraishi T, Murakami H, et al. Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations: imaging of human brain slices. *NeuroImage* 2011 ; **58** : 50-59.
9. Kawahara Y, Sun H, Ito K, et al. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* 2006 ; **54** : 11-14.
10. Kitaura H, Sonoda M, Teramoto S, et al. Ca²⁺ permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma. *Epilepsia* 2017; *in press*.
11. Blaschke M, Keller BU, Rivosecchi R, et al. A single amino acid determines the subunit-specific spider toxin block of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate/kainate receptor channels. *PNAS* 1993 ; **90** : 6528-6532.
12. Seeburg PH. A-to-I editing: new and old sites, functions and speculations. *Neuron* 2002 ; **35** : 17-20.
13. Rueter SM, Burns CM, Coode SA, et al. Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* 1995 ; **267** : 1491-1494.
14. Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor

neurons. Nature 2004 ; **427** : 801.

15. Higuchi M, Maas S, Single FN, et al. Point mutation in an AMPA receptor gene rescues

lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. Nature 2000 ; **406** : 78-81.

Summary

Morphological and functional analysis of the human epileptogenic tissues in vitro

Hiroki Kitaura, Masaki Sonoda, Hiroshi Shirozu, Hiroshi Shimizu, Yosuke Ito,
Hiroshi Masuda, Hitoshi Takahashi, Shigeki Kameyama, Akiyoshi Kakita

Hypothalamic hamartoma (HH) is a rare developmental malformation in humans, composed of neurons and glia without apparent cytological abnormalities. Patients with HH often suffer characteristic medically refractory gelastic seizures, and intrinsic epileptogenesis within the lesions has been speculated. In needle biopsy specimens of HH tissue, field potential recordings showed spontaneous epileptic activities, which were similar to the tissues taken from the epileptic focus of focal cortical dysplasia (FCD). However, these activities were clearly abolished by application of Joro-spider toxin, a specific inhibitor of the Ca^{2+} -permeable AMPA receptor. Consistent with these physiological findings, the neuronal nuclei showed disappearance of ADAR2 immunoreactivity. Furthermore, examination of GluA2 mRNA revealed that editing efficiency at the Q/R site was apparently low. These results suggest that neurons in HH may bear Ca^{2+} -permeable AMPA receptors due to dislocation of ADAR2.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2017 ; **28** : 41-46