

— 研究助成報告 —

てんかん脳におけるグリア細胞機能の発達プロファイリング： 手術摘出標本を用いたグリア細胞と興奮性アミノ酸 トランスポーター発現レベルの観察

Developmental profile of glial cell function in the epileptic brain: an immunohistochemical study focusing on cortical gliosis and excitatory amino acid transporter expressions in pediatric/adult patients with refractory epilepsy.

小野 智 憲^{1,2)}, 本田 涼 子^{1,3)}, 渡 邊 嘉 章^{1,3)}, 戸 田 啓 介⁴⁾,
馬 場 啓 至⁵⁾

要旨：てんかんの病態である神経細胞の過剰興奮には、グリア細胞による制御機構も関与している。本研究では、アストロサイトの機能成熟における年齢特異性の有無と、infantile spasms/Lennox-Gastaut症候群（IS/LGS）などの年齢依存性てんかん性脳症の病態との関連について、小児/成人のてんかん手術摘出標本を用いて組織学的に検証した。焦点性てんかんでは大脳皮質のグリオシスが顕著であるのに対し、幼児期発症のIS/LGS例ではそれは欠如/減弱していた。アストロサイト機能である興奮性アミノ酸トランスポーターの発現レベルは、疾患タイプや発症年齢との関連はなかった。大脳皮質グリオシスの欠如/抑制が、幼児期発症のIS/LGS症例における特徴的な組織所見であり、それらが他のてんかんとは異なる病態である可能性が示唆された。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2019 ; 30 : 65-72

Key Words : Infantile spasms, Lennox-Gastaut syndrome, gliosis, age-specificity, epilepsy surgery

序論

てんかんにおける大脳皮質神経細胞の過剰興奮の機序として、神経細胞自身の自律的な興奮-抑制調和の破綻に加え、グリア細胞による神経制御機構も注目されている。中でもアストロサイトは、シナプス間隙に放出された過剰な興奮性アミノ酸のクリアランスや細胞外のカリウムイオンの緩衝機構などの役割を多く有している¹⁾。前者は、アストロサイトに発現した興奮性アミノ酸トランスポーター（excitatory amino acid transporter,

EAAT）を介してアストロサイト内へ取り込まれ代謝される¹⁾。したがって、アストロサイトの機能異常、例えばEAATの発現/機能低下は神経細胞を易興奮環境へとシフトさせる。

EAATには、5つのサブタイプが同定されており、大脳皮質においてはEAAT2がアストロサイトに多く発現している²⁾。実際に、てんかん外科手術標本を用いた研究では、限局性皮質形成異常（focal cortical dysplasia, FCD）の程度が顕著であるほど、組織におけるEAAT2の発現低下がみられた^{3,4)}。

¹⁾ 国立病院機構長崎医療センター てんかんセンター
[〒856-8562 長崎県大村市久原2-1001-1]

²⁾ 同 脳神経外科

³⁾ 同 小児科

⁴⁾ 国立病院機構長崎川棚医療センター 脳神経外科

⁵⁾ 医療法人祥仁会 西諫早病院

一方で、てんかん脳病理で最も頻繁に認められる所見の一つはグリオース（反応性アストロサイトの増生）である⁵⁾。動物モデル、例えば、Pilocarpine誘発てんかん重積モデルラットにおいては、海馬で著明なグリオースが見られ⁶⁾、これは神経細胞脱落と相関がみられた⁷⁾。ヒトのてんかん外科病理でも、大脳皮質には顕著なグリオースが見られ⁵⁾、こちらもFCDの程度との相関していた⁸⁾。逆に、MRI-negative症例でも64-85%, mild malformation of cortical development (mMCD) の症例でも100%, 皮質のグリオースが見られるとの報告もあり^{9, 10)}、てんかん外科病理において最も普遍的な所見と言える。

FCDにおいて、グリオースが見られ、かつEAAT2発現が低下していると状況は、EAAT2機能の欠如/低下した異常なアストロサイトが増生していると考えれば、てんかん原生の仮説としては単純である。しかしながら、EAAT2発現レベルを観察した研究は限定的で、グリオースほど普遍的な所見とは言いがたい。さらに、これまでのグリオースに関する外科病理研究の対象は、ほとんどが成人、もしくは高年齢小児の焦点性てんかんである。低年齢小児で、しかもinfantile spasms、またはLennox-Gastaut症候群 (infantile spasms/Lennox-Gastaut syndrome, IS/LGS) のような年齢依存性てんかん性脳症はほぼ含まれていない。本研究では、てんかん切除手術を実施しIS/LGS症例と焦点性てんかん症例の手術標本の免疫組織染色を用いて、グリオースやEAAT2発現の程度を両者で比較した。

方法

薬剤抵抗性てんかんで焦点切除手術、もしくは半球/（多）脳葉離断手術を行った10症例を対象とした。IS/LGS群 (n = 6) と焦点性てんかん (n = 4) を比較する際に、病変有無の影響を避けるため、MRI上の明確な病変、例えばFCD、結節性硬化症、腫瘍、脳炎後変化などの症例は除外した。非特異的な所見として、軽度の脳萎縮や小さな白質の信号変化などが見られた症例は対象に含めた。また、側頭葉切除を

実施した内側側頭葉てんかん2例については、MRI異常のない外側側頭葉の組織を検討に用いることとし、対象とした (Tab 1)。

手術摘出した脳組織は、ホルマリン固定、およびパラフィン包埋し保管した。脱パラフィン切片を作成し、GFAP, NeuN, およびEAAT2といった一次抗体を用いて免疫組織染色を行った。

GFAPについては、大脳皮質におけるその発現パターンを症例ごとにグレード分類して評価した (Fig. 1)。EAAT2については、大脳皮質におけるその発現分布を記録した (Fig. 2)。

発症年齢、手術時 (標本摘出時) 年齢、疾患タイプなどの臨床データと組織学的所見との相関を検討した。疾患タイプは、焦点性てんかんとIS/LGSなどの年齢依存性てんかん性脳症の2群に分けて比較した。この際、統計学的な検討は2×2分割表を用い、Fisherの精密確率法を用いて検定した。

結果

診断に用いた脳組織は前頭葉7例、側頭葉外側3例であった。それらの病理組織診断、GFAP, およびEAAT2発現パターンをTab. 2に示す。

大脳皮質のGFAP発現パターンを疾患タイプと比較すると (Tab. 3), grade 0-1は例外なくIS/LGS (n = 6) で、grade 2-3は焦点性てんかん (n = 4) であった (p = 0.005)。てんかん発症が2歳以前の症例 (n = 7) では、海馬硬化による内側側頭葉てんかんの1例を除き、GFAP gradeは0-1で、これらもすべてIS/LGSであった (p = 0.03)。典型例の組織所見をFig. 3, および4に示す。

大脳皮質のEAAT2発現パターンは、全例でびまん性に認められ、発症年齢や疾患タイプに特異的な所見は見られなかった。ただし、一部の症例においては、神経/グリア細胞、および血管周囲にまだら状に染色の欠落が見られた (Fig. 2)。

皮質直下白質においては、全症例でGFAP発現は顕著に陽性で、EAAT2は大脳皮質と比べ発現は減弱していた。

Tab 1. 対象患者の臨床データ

No.	Clinical diagnosis	Surgery (age)	Onset (age)	MRI	Surgery	Seizure outcome	Specimens
1	IS	2y	12m	White matter lesions	TCC, FD	Free	Frontal cortex
2	IS	3y	4m	Mild hemispheric atrophy	TCC, HEM	Free	Frontal cortex
3	IS	3y	6m	Mild hemispheric atrophy	TCC, MD	Free	Frontal cortex
4	FLE	8y	5y	No abnormality	SDR, FR	Frequency reduced	Frontal cortex
5	TLE	9y	8m	Hippocampal sclerosis, no abnormality in the lateral temporal cortex	ATL	Free	Lateral temporal cortex
6	LGS (after IS)	9y	7m	Hemispheric atrophy after previous surgery	TCC, MD	Free	Frontal cortex
7	LGS (after IS)	10y	7m	No abnormality	TCC, FD	Recurrence	Frontal cortex
8	LGS	11y	2y	No abnormality	TCC, FD	Recurrence	Frontal cortex
9	TLE	22y	14y	No abnormality	SDR, TR	Free	Lateral temporal cortex
10	TLE	23y	22y	Amygdalar enlargement, no abnormality in the lateral temporal cortex	ATL	Free	Lateral temporal cortex

IS, infantile spasms; FLE, frontal lobe epilepsy; TLE, temporal lobe epilepsy; LGS, Lennox-Gastaut syndrome; TCC, total corpus callosotomy; FD, frontal disconnection; HEM, hemispherotomy; MD, multilobar disconnections; FR, frontal resection; ATL, anterior temporal lobectomy; SDR, subdural recording; TR, temporal resection

Tab 2. 臨床データと免疫染色結果 (GFAP and EAAT2)

No.	Clinical diagnosis	Surgery (age)	Onset (age)	Pathological diagnosis	Cortical GFAP expression	Cortical EAAT2 expression
1	IS	2y	12m	Mild MCD type 2	Grade 1	Diffuse
2	IS	3y	4m	Mild MCD type 2	Grade 0	Diffuse
3	IS	3y	6m	Mild MCD type 2	Grade 0	Diffuse
4	FLE	8y	5y	FCD type IA	Grade 3	Diffuse/patchy
5	TLE	9y	8m	No FCD	Grade 2	Diffuse
6	LGS (after IS)	9y	7m	Mild MCD type 2	Grade 1	Diffuse
7	LGS (after IS)	10y	7m	Polymicrogyria	Grade 1	Diffuse
8	LGS	11y	2y	No FCD	Grade 0	Diffuse/patchy
9	TLE	22y	14y	FCD type IA	Grade 3	Diffuse
10	TLE	23y	22y	No FCD	Grade 3	Diffuse

IS, infantile spasms; FLE, frontal lobe epilepsy; TLE, temporal lobe epilepsy; LGS, Lennox-Gastaut syndrome

Tab 3. 臨床データとGFAP発現グレードの関係

GFAP expression	Clinical diagnosis		Onset age of epilepsy	
	IS/LGS	Focal epilepsy	≤ 2-year-old	> 2-year-old
Grade 0-1	6	0	6	0
Grade 2-3	0	4	1	3
Statistical test*	p = 0.005		p = 0.03	

*, Fisher's exact test

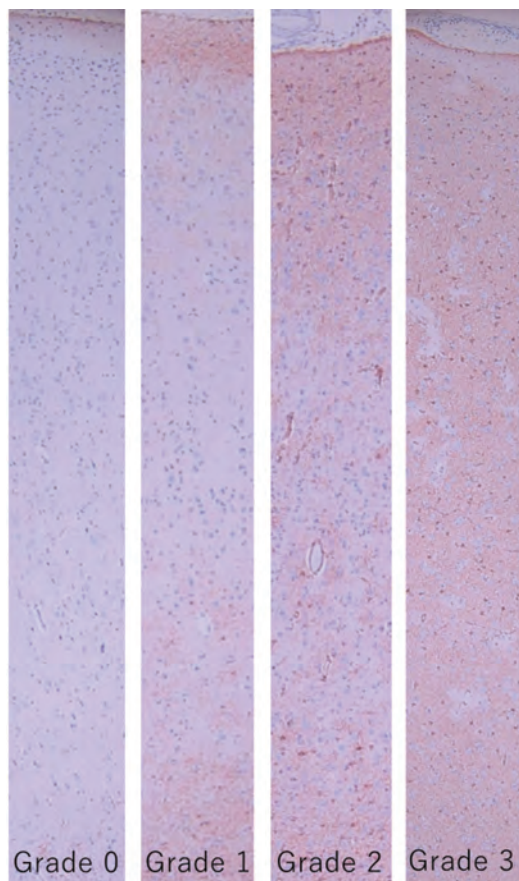


Fig. 1

大脳皮質GFAP発現グレードを以下のように定義した：grade 0, 主に分子層, および多型細胞層のみの発現している；grade 1, grade 0に加え, 外顆粒層や内錐体細胞層まで発現しているが, 外錐体細胞層にはおよんでいない；grade 2, ほぼ全層にわたって発現しているが, 外・内錐体細胞層の発現は比較的低い；grade 3, 全層にびまん性に発現している。

考察

2歳以前にてんかん発症歴がある患者の大脳皮質組織では, グリオースは欠如/抑制されていた (GFAP 発現grade 0-1)。また, これらの患者がIS/LGS症例であったことも注目すべきで, 早期に発症する年齢依存性てんかん性脳症の特徴的な組織形態なのかもしれない。実際にてんかん動物モデルにおいても, 低日齢にけいれん重積を誘発した場合, 海馬のgliosisは少

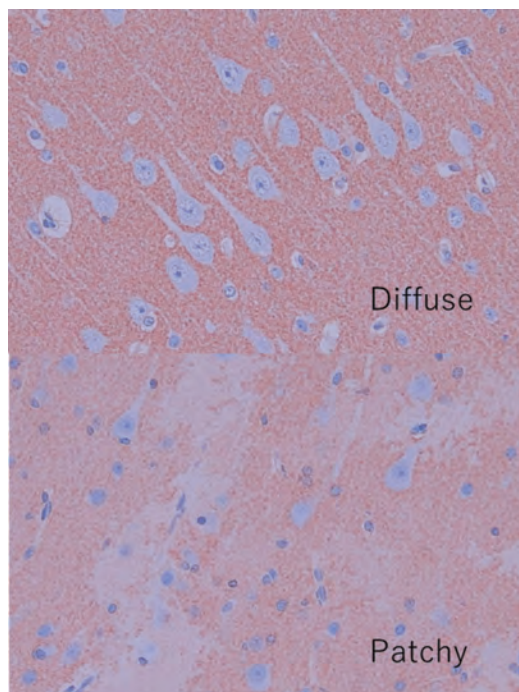


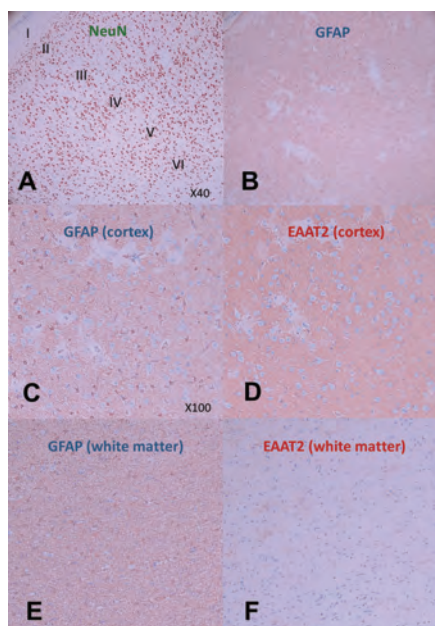
Fig. 2

大脳皮質のEAAT2発現は, 全例で神経/グリア細胞周囲にほぼびまん性に見られた (diffuse expression, 上)。一部の症例では細胞や血管周囲に発現のムラがみられた (patchy expression, 下)。

なく, その形成過程には年齢依存性があることが示唆される⁴⁾。

一方で, これらのIS/LGS症例の脳組織標本は, 半球離断術や (多) 脳葉離断術等の際に, 一部を生検した組織標本であり, 焦点性てんかんと異なり, 頭蓋内脳波記録等で発作起始を確認した部位ではない。したがって, 組織学的には正常に近い部位ではないかという疑問はある。しかし, これらの症例で切除した脳組織は, 術中脳波ではてんかん性放電が見られていた。さらに, 病理所見上も, FCD type IAやmMCDを認め, それらの生検標本が生理学的にも, 形態的にも正常組織であるとは考えにくく, 大脳皮質グリオースの欠如/抑制は, やはり年齢依存的な変化と考えるのが自然である。

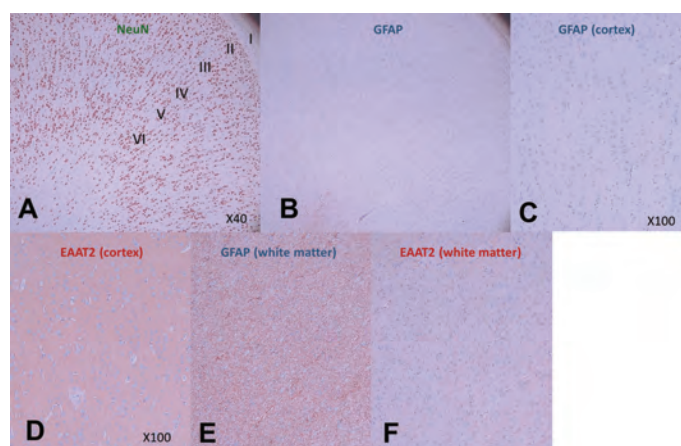
このグリオース発現の年齢特異性が, てんかんの病態に関与しているのか, あるいはてんかん性活動による副次的な反応なのかは不明で

**Fig. 3**

症例4 (8歳女児, 前頭葉てんかん)。A, 大脳皮質 NeuN染色; B-C, 大脳皮質GFAP染色; D, 大脳皮質EAAT2染色; E, 白質GFAP染色; F, 白質EAAT2染色。大脳皮質は全層にわたってGFAP強発現で (grade 3), EAAT2も、一部の細胞/血管周囲を除き、ほぼびまん性に発現が見られる (diffuse/patchy pattern)。白質では、GFAP発現はさらに強く、突起を有する反応性アストロサイトが多く存在する。EAAT2は大脳皮質ほどの、強陽性所見は呈していない。

ある。先述した、てんかん動物モデルにおける所見¹¹⁾と合わせて考えると、成熟脳では“正常”反応として見られるはずのグリオーススが、未熟脳において抑制されているのは、アストロサイト自体の未熟性も関係しているかもしれない。GFAPはアストロサイトに特有な中間径フィラメントの一つであり、げっ歯類では在胎終期からその発現を認め、出生から15日齢まで増加し、成熟脳では減少し、プラトーになるという¹²⁾。これをヒトに当てはめると、およそ幼児期にGFAPの合成は活発であることが示唆され、この時期の過剰興奮暴露によりアストロサイトの発達が阻害され、未熟な状態で残存しているのかもしれない。

本研究では、すでにFDC組織で指摘されているような、大脳皮質でのEAAT2発現低下はほとんど観察されなかった^{3, 4)}。EAAT2免疫組織染色は、大脳皮質では正常組織と同じように、ほぼ均一びまん性に染色されていた。一部の標本では、神経細胞、グリア細胞、及び血管の周囲にまだら状にEAAT2染色の欠落が見られたが、非常に限局的であった。少なくとも今回対象とした症例では、グリオーススの程度に関わらず、大脳皮質におけるEAAT2を介した興奮性アミノ酸クリアランス機構はほとんど正

**Fig. 4**

症例2 (3歳男児, infantile spasms)。A, 大脳皮質NeuN染色; B-C, 大脳皮質GFAP染色; D, 大脳皮質EAAT2染色; E, 白質GFAP染色; F, 白質EAAT2染色。大脳皮質は分子層を除いて、GFAPの発現は見られない (grade 0), EAAT2はほぼびまん性に発現が見られる (diffuse pattern)。白質では、GFAP発現は非常に強いが、EAAT2は大脳皮質ほどの、強陽性所見は呈していない。

常に保たれているのではないかと推測され、当初の仮説は証明できなかった。

IS/LGSなどの乳幼児期に発症するてんかん性脳症は、他の焦点性てんかんとは大脳発達の観点からは大きく異なる疾患群と思われる。その最大の特徴は年齢依存性で、細胞生物学的には神経細胞や受容体などの成熟過程と連動しているかもしれない。実際に、神経細胞の発生や遊走、シナプス結合や神経伝達物質受容体の成熟などは、胎児期のみならず、生後早期にも継続している¹³⁾。例えば、NMDAやAMPAといった興奮性アミノ酸の活性ピークやGABA受容体の興奮-抑制スイッチの完了時期を考えると、幼児期の神経細胞は非常に易興奮状態に維持されていることが言える¹⁴⁾。一方で、大脳皮質において、シナプス間隙での興奮性アミノ酸クリアランスに最も重要なEAAT2は、胎生期も含め未発達脳では、アストロサイトのみならず、第5層錐体細胞、遊走中の白質内ニューロンやサブプレートニューロンなどにも顕著に発現しており、過剰興奮に対するニューロンの脆弱性と関連があるとされる¹⁵⁾。本研究では、IS、もしくはISを経てLGSへ移行したすべての症例の病理診断は、mMCDであり、例外なくEAAT2は正常発現していた。このことは、何らかの機序で生じた過剰興奮が、EAAT2を介して神経細胞の遊走や機能発達に影響していた可能性も考察される。

本研究では、てんかん外科病理組織を用いて、大脳皮質におけるグリオーシスやEAAT2の発現レベルを、てんかん発症年齢や疾患タイプに着目して検討を行った。てんかん脳における反応性グリオーシスの欠如/抑制が、IS/LGSに代表される乳幼児期発症の年齢依存性てんかん性脳症において特徴的であることを報告した。それらのてんかんの病態は、他のてんかんとは異なる可能性があり、今後もさらなる研究が必要である。

謝辞

病理組織診断、および批判的レビューをいただいた、秋田県立循環器・脳脊髄センター脳神経病理学研究部、宮田元先生に感謝いたします。

文献

- 1) de Lanerolle NC, Lee T, Spencer DD. Astrocytes and Epilepsy. *Neurotherapeutics* 2010 ; **7** : 424-38.
- 2) Seal R, Amara S. Excitatory amino acid transporters : A family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999 ; **39** : 431-56.
- 3) Ulu M, Tanriverdi T, Oz B, Biceroglu H, Isler C, Eraslan B, et al. The expression of astroglial glutamate transporters in patients with focal cortical dysplasia : an immunohistochemical study. *Acta Neurochir* 2010 ; **152** : 845-53.
- 4) Rakhade SN, Loeb JA. Focal reduction of neuronal glutamate transporters in human neocortical epilepsy. *Epilepsia* 2008 ; **49** : 226-36.
- 5) Kakita A, Kameyama S, Hayashi S, Masuda H, Takahashi H. Pathologic Features of Dysplasia and Accompanying Alterations Observed in Surgical Specimens From Patients With Intractable Epilepsy. *J Child Neurol* 2005 ; **20** : 341-50.
- 6) André V, Rigoulot M, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A. Long-term Pregabalin Treatment Protects Basal Cortices and Delays the Occurrence of Spontaneous Seizures in the Lithium-Pilocarpine Model in the Rat. *Epilepsia* 2003 ; **44** : 893-903.
- 7) Jupp B, Williams J, Binns D, Hicks RJ, Cardamone L, Jones N, et al. Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recurrent seizures in a rat model of TLE. *Epilepsia* 2012 ; **53** : 1233-44.
- 8) Leach J, Miles L, Hankel D, Greiner H, Kukreja K, Holland K, et al. Magnetic resonance imaging abnormalities in the resection region correlate with histopathological type, gliosis extent, and postoperative outcome in pediatric cortical dysplasia. *J Neurosurg Pediatr* 2014 ; **14** : 68-80.
- 9) Muhlhof W, Tan Y, Mueller SG, Knowlton R. MRI-negative temporal lobe epilepsy — What do we know ? 2017 ; **58** : 727-42.
- 10) Kogias E, Altenmüller D, Klingler J, Schmeiser B, Urbach H, Doostkam S. Histopathology of 3

- Tesla MRI-negative extratemporal focal epilepsies. *J Clin Neurosci* 2019 ; **50** : 232-6.
- 11) Rizzi M, Perego C, Aliprandi M, Richichi C, Ravizza T, Colella D, et al. Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. *Neurobiol Dis* 2003 ; **14** : 494-503.
- 12) Gomes FCA, Paulin D, Moura Neto V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) : modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Brazilian J Med Biol Res* 1999 ; **32** : 619-31.
- 13) Brooks-Kayal A. Epilepsy and autism spectrum disorders : Are there common developmental mechanisms ? *Brain Dev* 2010 ; **32** : 731-8.
- 14) Rakhade SN, Jensen FE. reviews Epileptogenesis in the immature brain : emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol* 2009 ; **5** : 380-91.
- 15) DeSilva T, Borenstein N, Volpe J, Kinney H, Rosenberg P. NIH Public Access. *J Comp Neurol* 2013 ; **520** : 3912-32.

Summary

Developmental profile of glial cell function in the epileptic brain: an immunohistochemical study focusing on cortical gliosis and excitatory amino acid transporter expressions in pediatric/adult patients with refractory epilepsy.

Tomonori Ono, Ryoko Honda, Yoshiaki Watanabe, Keisuke Toda, Hiroshi Baba

Neuronal hyperexcitability is a basic pathology of epilepsy, and also controlled by glial cells. In this study, the relationship between the presence or absence of age-specificity in functional maturation of astrocytes and type of epilepsy such as infantile spasms/Lennox-Gastaut syndrome (IS/LGS) and focal epilepsy was investigated. Surgically resected cortical specimens were observed using immunohistochemistry in pediatric/adult patients with refractory epilepsy. In patients with focal epilepsy, cortical gliosis was markedly expressed, whereas it was absent/suppressed in patients with infantile-onset IS/LGS. The expression of the excitatory amino acid transporter, which is one of the astrocytic functions, was normally maintained regardless of the epilepsy type or the age of onset. In age-specific epileptic encephalopathy such as IS/LGS, lack/suppression of cortical gliosis is a characteristic histological feature, suggesting that there may be a different pathological condition than other epilepsy.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2019 ; 30 : 65-72