

—— 研究助成報告 ——

皮質下白質のグリア系細胞の神経病理学的特徴と てんかん性放電との関連性の研究

佐久間 悟¹⁾, 宇田 武弘²⁾, 小野 智憲³⁾,
本田 涼子⁴⁾, 伊東 正博⁵⁾

要旨: 本研究では, 異常なオリゴデンドログリアに着目し, 小児てんかん外科手術病変組織における脳波上の発作焦点中心領域と周辺領域における免疫組織学解析を行った。年齢4歳~16歳の4例で焦点起始発作を認めた。病理診断は, 限局性皮質形成異常 タイプ II b 2例, 海馬硬化症 2例。Olig2は全例でOligodendroglia-like cell (OLC) の核に発現した。Filamin A は, bizarre glial cells, balloon cells, dysmorphic neuron, reactive astrocyteの細胞質に発現し, α -B-crystallinは, bizarre glial cells, balloon cells, OLCの細胞質に発現した。炎症などの強いストレス下で α -B-crystallinは, OLCを介しててんかん原性の進展に何らかの影響を及ぼしてい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 2020 ; 31 : 53-60

Key Words : 小児難治てんかん, Oligodendroglia-like cell, Olig2, α -B-crystallin, immunohistochemistry

【序論】

てんかんは大脳ニューロンの過剰な放電から由来するてんかん発作を反復する慢性疾患である。ニューロン間だけではなく, グリア細胞との関与がますます重要になっている。我々は, 動物実験において, アストログリアが炎症性サイトカインやステロイドホルモン受容体を介して, てんかん発症に関与している可能性を報告してきた¹⁻³⁾。また, 抗てんかん薬に抵抗性の難治な大脳皮質てんかんは, 発作起始部からてんかん性放電が広く伝播し, 持続することにてんかん原性領域が進展していく。小児難治性てんかん患者の脳病変組織にOligodendroglia-like cell (OLC) が著明に増加していることを報告した⁴⁾。小児難治てんかん患者において, てんかん性スパズム群は, その他の部分発作群と比較してOLC密度が増加していることを報告した⁵⁾。

小児難治てんかんの皮質切除範囲は成人と比較し広範囲となり, しばしば多脳葉切除に及ぶことが多い。てんかん発作は病的な興奮性が持続されるための異常な神経ネットワーク(てんかんネットワーク)が存在することが想定されてきた⁶⁾。そのネットワークが具体的にどのような経路を示すのかは解明されていない。本研究では, ミエリンを生成するオリゴデンドログリアに注目した。異常なオリゴデンドログリアにより, てんかん原性領域が形成され, 進展する脳内ネットワークを解明することを目的とする。てんかん外科手術で切除した病変組織を, ニューロン, アストログリア, オリゴデンドログリアとそれらの前駆細胞のマーカーとなる抗体を用いて, 免疫組織学解析を行った。各々の細胞の免疫組織学的な特徴と脳波検査によるてんかん性放電との関連性を検討した。

¹⁾大阪市立大学大学院医学研究科 発達小児医学
〔大阪府大阪市〕

²⁾大阪市立大学大学院医学研究科 脳神経外科学

³⁾長崎医療センター 脳神経外科学

⁴⁾長崎医療センター 小児科

⁵⁾長崎医療センター 病理診断科

【方法】

2剤以上の抗てんかん薬に抵抗性のある難治てんかんに罹患し、硬膜外電極を留置し、皮質切除術を行った0歳から19歳までの小児・若年者を対象とした。

てんかん外科手術により切除した脳組織を10%ホルマリンに浸透し、パラフィン包埋して作製したブロックをクリオスタットで5 μ mに薄切し連続切片を作製した。LFB-HE染色と抗

NeuN, GFAP, Olig2, NG2, O4, MBP, Filamin A, alpha B crystallin抗体を用いて免疫組織染色を行った。また、硬膜下電極におけるてんかん性放電から得られた焦点の中心と考えられた部位と周辺部位との切除病理組織所見を比較した。

【結果】

検討した症例は、手術時年齢4歳～16歳の4例（男性1例：女性3例）。発作型は、焦点起始発作4例（焦点意識減損発作1例、焦点起始両側

Tab. 1

		症例1	症例2	症例3	症例4
年齢（手術時）		4歳2か月	9歳4ヶ月	15歳9か月	16歳1か月
性		女	女	女	男
発作初発年齢		3か月	8か月	6歳11か月	4歳
発作型		焦点起始両側強直間代発作	焦点起始意識減損発作	焦点起始両側強直間代発作	焦点起始両側強直間代発作
発作頻度		1-3回/日	1回/月	3-4日/週、10数回/日	数回/週
頭皮脳波所見	発作時	両側前頭部または前頭部から徐波律動（右半球優位の脳波変化）	右前頭部、側頭部にデルタ帯域の徐波 右半球広範性の徐波活動	両側前頭部から速波律動→全般性低振幅速波律動 1.5～2Hzの両側前頭部優位の棘徐波複合が持続	発作1分前、左前頭極に速波→右前頭極に反復棘波 左前頭部、側頭部に速波 右前頭部、側頭部に徐波律動→反復棘波→両側前頭部、側頭部へ反復棘波など多焦点性
	間欠期	左前頭部、中心部に多棘波時に右前頭部に多棘波 両側前頭部、中心部、側頭部に多棘波（睡眠時に高頻度）	右前頭部、側頭部に睡眠中に焦点が徐波化、高振幅徐波、鋭波	両側中心部、頭頂部高頻度の鋭波 左前頭部、中心部、頭頂部高頻度棘波 右中心部、頭頂部棘徐波複合、全般化、1.5-2Hz(前頭部優位) 睡眠時に高頻度	左前頭部、側頭部に高頻度 右前頭部、中心部、側頭部睡眠時特に高頻度
頭蓋内脳波所見	発作時	発作時：病変周囲より発作起始	発作時：側頭葉内側起始（海馬傍回→側頭葉全体）	発作時：側頭葉内側起始（海馬傍回→側頭葉全体）	発作時：多焦点性 棘波は内側側頭葉で最も頻度が高い
	間欠期	発作間欠期：病変周囲より頻回のてんかん性放電 前頭葉内側、外側、右底部にも独立したてんかん性放電認めるが頻度は少ない	発作間欠期：海馬傍回に頻雑な(多)棘波バーストあり (間欠期FDG-PET)	発作間欠期：海馬傍回に頻雑な棘波、多棘波バーストあり (間欠期FDG-PET)	発作間欠期： 左右側頭葉内側に(多)棘波 右前頭葉極に棘波
画像検査所見		(MRI) 左前頭葉底部内側の皮質直下と底部に異常信号あり (間欠期FDG-PET) 左前頭葉底部内側で低灌流(発作時ECD-SPECT) 左前頭葉底部で血流増加	(MRI) 右海馬の萎縮、異常信号あり(間欠期FDG-PET) 右側頭葉、海馬の低灌流	(MRI) 左上前頭回～前頭葉内側に皮髄境界不鮮明で皮質の肥厚(間欠期FDG-PET) MRI病変に一致して低灌流(発作時ECD-SPECT) 左前頭葉～頭頂部にかけて血流増加あり	(間欠期FDG-PET) 左側頭葉外側～内側、左前頭葉極の内側に低灌流(発作時ECD-SPECT) 発作時：左弁蓋部～側頭葉～頭頂葉にかけての血流増加 間欠期：左前頭葉底部、左側頭葉、左前頭極で血流低下
切除部位		左前頭葉皮質	右側頭葉・海馬・扁桃核	左前頭葉	左側頭葉
病理組織診断		Frontal lobe FCD Type II b with intralesional autoimmune	HS, ILAE Type 1	Frontal lobe FCD Type II b with putative autoimmune inflammatory reaction	HS, indeterminate type, and aseptic meningoencephalitis

FCD: Focal cortical dysplasia, HS: Hippocampal sclerosis

強直間代発作3例), 病理診断は, focal cortical dysplasia (FCD) Type II b 2例, hippocampal sclerosis (HS) 2例。4例の発作時及び間欠期脳波所見, 頭蓋内脳波所見, 画像所見をTab. 1に示す。

(症例1) 4歳2か月女児。発作型: 焦点起始両側強直間代発作。病理組織診断・所見: Left frontal lobe FCD Type II b with intralesional autoimmune meningocephalitis。LFB-HE染色で神経細胞の細胞密度は低く, 細胞配列や分子層以外の層構築が著しく乱れている領域を認める。個々の神経細胞は典型的な大型のdysmorphic neuronで, 背景は主として繊細なグリア線維からなっており, bizarre glial cellsやballoon cellsが混在 (Fig. 1A)。隣接した領域では神経細胞成分に乏しく, 多数のballoon cellsと少数のbizarre glial cellsを認めた (Fig. 1B)。Bizarre glial cellsは, GFAP陽性であった。

(症例2) 9歳4か月女児。発作型: 焦点起始意識減損発作。病理組織診断・所見: Right HS,

ILAE Type 1。LFB-HE染色で, 海馬はCA1に最も顕著な神経細胞脱落と繊維性グリオシスがみられ, 中等度の神経細胞脱落とグリオシスがCA4とCA3に認める。側頭葉皮質神経細胞は概ね明瞭な6層構造を認め明らかな神経細胞脱落や層構築異常は認めなかった (Fig. 2A)。

(症例3) 15歳9か月女子。発作型: 焦点起始両側強直間代発作。病理組織診断・所見: Left frontal lobe FCD Type II b with putative autoimmune inflammatory reaction。てんかん焦点の中心領域でLFB-HE染色で, 主としてdysmorphic neuronとballoon cellおよびbizarre glial cellの不規則な混在を認め, 大脳皮質神経細胞の著しい配列異常と層構築異常を認めた (Fig. 3A)。Dysmorphic neuronは白質にも数多く認めた。少し離れた領域で, 神経細胞の配列異常, 層構築異常を認めた (Fig. 3B)。Balloon cellは, GFAP陰性～弱陽性で皮質深層から白質にかけて集簇する傾向を認めた。

(症例4) 16歳1か月男子。発作型: 焦点起

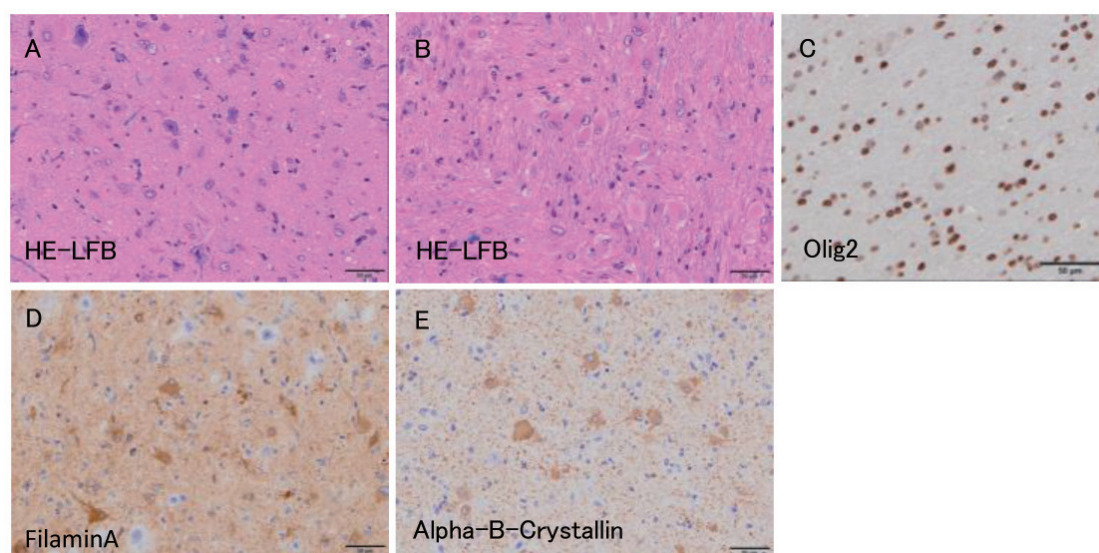


Fig. 1 症例1 免疫組織染色 (焦点中心領域)

(A, B) HE-LFB染色。(A) Dysmorphic neuronを認め, 背景は主として繊細なグリア線維からなり, bizarre glial cellsやballoon cellsが混在。(B) (A) の近接領域: 神経細胞成分に乏しく, 多数のballoon cellsと少数のbizarre glial cellsを認めた。(C) Olig2染色。Oligodendroglia-like cell (OLC)の核に白質優位に発現した。(D) FilaminA染色。焦点領域の皮質において, bizarre glial cells, balloon cellsの細胞質に発現が増加。周辺領域では皮質の少数のグリア系細胞に軽度発現。(E) Alpha-B-Crystallin染色。皮質のbizarre glial cells, balloon cellsの細胞質に発現。

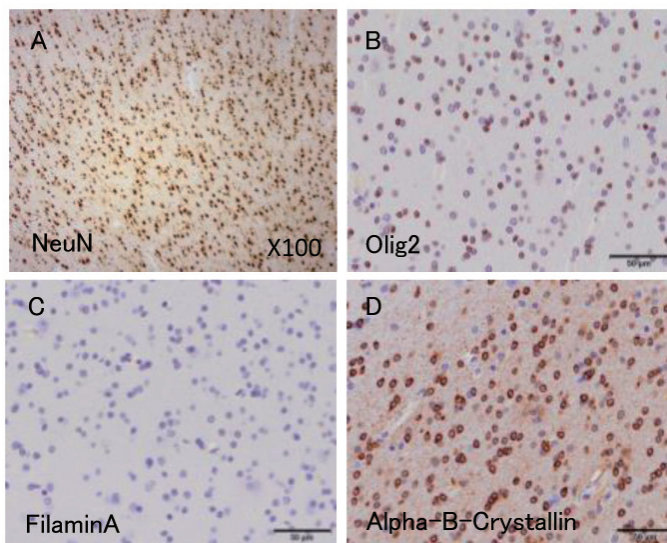


Fig. 2 症例2 免疫組織染色(焦点中心領域)

(A) NeuN染色。側頭葉皮質神経細胞は概ね明瞭な6層構造を認め明らかな神経細胞脱落や層構築異常は見られない。(B) Olig2染色。OLCの核に白質優位に発現。(C) FilaminA染色。皮質、白質いずれにも発現を認めなかった。(D) Alpha-B-Crystallin染色。OLCの細胞質に白質優位に発現した。

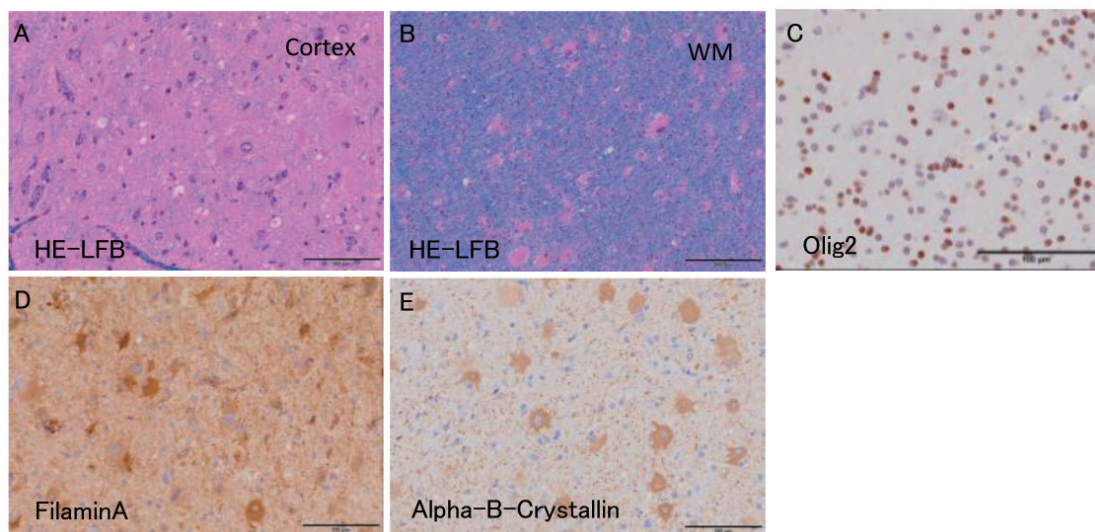


Fig. 3 症例3 免疫組織染色(焦点中心領域)

(A, B) HE-LFB染色。(A) dysmorphic neuronとballoon cellおよびbizarre glial cellの不規則な混在を認め、大脳皮質神経細胞の著しい配列異常と層構築異常を認めた。(B) Dysmorphic neuronは白質にも数多く認める。Balloon cellは、皮質深層から白質にかけて集簇。(C) Olig2染色。OLCの核に白質優位に発現した。(D) FilaminA染色。形態的に突起を持ち、肥厚したastrocyteの細胞質に弱く発現。白質においては、dysmorphic neuron及び、balloon cellの細胞質に発現。(E) Alpha-B-Crystallin染色。皮質のbizarre glial cells, balloon cellsの細胞質に発現。

始両側強直間代発作。病理組織診断・所見：Left HS, indeterminate type, and aseptic meningoencephalus。てんかん焦点中心から比較的近傍において、大脳皮質神経細胞の配列は概ね明瞭な6層構造を認めた (Fig. 4A)。脳回頂部の皮質では繊細な突起を有するastrocyteがびまん性に増生し、脳溝に面する皮質では斑状に分布 (Fig. 4B)。一部皮質及び白質で、神経細胞脱落とミクログリア増生およびリンパ球浸潤を認めた。

今回検討した抗体を用いた免疫組織染色では、全症例でOLCの核にOlig2は発現し増加を認め、白質>皮質であった (Fig. 1C, 2B, 3C,

4C)。発現の弱い細胞と強い細胞が混在し、焦点中心領域と周辺領域とに著明な差異は確認できなかった。また形態的に概ね円形であったが、一部に歪んだ形態を持つ細胞を認めた。Filamin Aは、症例1の焦点領域の皮質において、bizarre glial cells, balloon cellsの細胞質に発現が増加 (Fig. 1D)、周辺領域では皮質の少数のグリア系細胞に軽度発現した。症例2においてFilamin Aは皮質、白質いずれにも発現を認めなかった (Fig. 2C)。症例3の焦点中心領域、及び周辺領域の皮質、及び、症例4における焦点中心領域の皮質において、Filamin Aは形態的に突起を持ち、肥厚したastrocyte

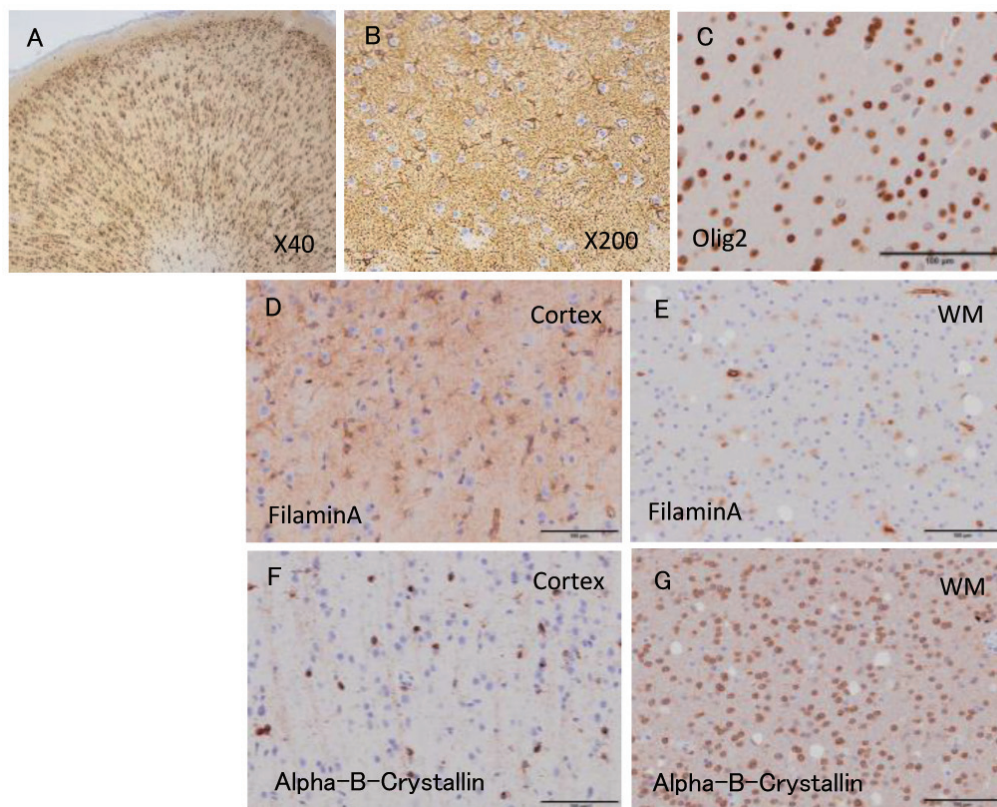


Fig. 4 症例4 免疫組織染色 (焦点中心領域)

(A) NeuN染色。大脳皮質神経細胞の配列は概ね明瞭な6層構造を認めた。(B) GFAP染色。脳回頂部の皮質では繊細な突起を有するastrocyteがびまん性に増生。脳溝に面する皮質では斑状に分布。(C) Olig2染色。OLCの核に白質優位に発現。(D, E) FilaminA染色。皮質 (D) において、形態的に突起を持ち、肥厚したastrocyteの細胞質に弱く発現。白質 (E) においては、dysmorphic neuron及び、balloon cellの細胞質に発現。(F, G) Alpha-B-Crystallin染色。OLCの細胞質に白質優位に発現。

WM: White matter

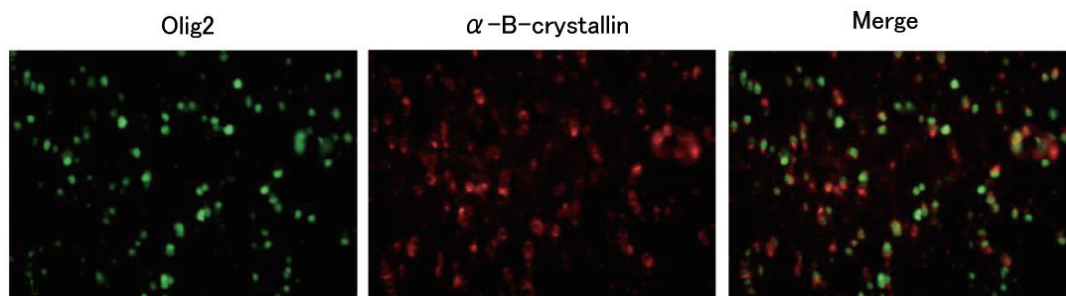


Fig. 5 蛍光二重染色 (Olig2抗体+ α -B-crystallin) (症例4)
一部のOlig2陽性細胞は α -B-crystallinに対して免疫反応を示した

の細胞質に弱く発現した。白質においては, dysmorphic neuron及び, balloon cellの細胞質に発現した (Fig. 3D, 4D, 4E)。症例4の周辺領域においては集簇したOLCの細胞質に軽度発現し, 白質>皮質であった。 α -B-crystallinは, 症例1及び3において, 焦点中心領域の皮質のbizarre glial cells, balloon cellsの細胞質に発現し (Fig. 1E, 3E), 症例1の周辺領域, 及び症例2, 4でOLCの細胞質に白質>皮質に発現した (Fig. 2D, 4F, 4G)。また, α -B-crystallinは, Olig2陽性細胞と形態的に類似した細胞において免疫反応を示した (Fig. 5)。なお, NG2抗体及びO4抗体に対してOLC, astrocyte, dysmorphic neuronとballoon cellはいずれも免疫応答を認めなかった。

【考察】

本研究で, 病理組織診断で, FCD type II b 2例, HS 2例の脳皮質切除を行った病変での脳波所見におけるてんかん焦点中心領域と周辺領域の病理組織を免疫組織化学的な手法を用いて検索した。

その結果, Olig2は全例でOLCの核に発現した。FilaminAは, bizarre glial cells, balloon cells, dysmorphic neuron, reactive astrocyteの細胞質に発現した。 α -B-crystallinは, bizarre glial cells, balloon cells, OLCの細胞質に発現した。

Olig2陽性であるOLCは真円, やや楕円とする形状をもつ細胞, 染色強度にばらつきを認めた。Oligodendrocyte lineageで, Olig2より未分化なstageでのマーカーとしてNG2抗体, O4

抗体を用いたが, 本研究では免疫反応を認めなかった。てんかん焦点病変組織でOLCが異常に増加していることは以前から報告されている。Oligodendrocyte lineageにおいてより幼弱なstageであるNG2, O4では免疫応答は認めなかった。その一因として今回用いた標本がホルマリン固定のパラフィン包埋であり, 抗原賦活化処理が不十分であった可能性は否定できない。抗原賦活化の別の処理方法を模索するか, 固定や賦活化処理による標的タンパク質の変性を受けないため抗原性が維持されやすい凍結標本を用いることを今後検討する。

てんかん外科手術病変において, 大脳皮質のアストロサイトにエオジン好性の内包物を細胞質に認めることがありhyaline protoplasmic astrocytopathyとして報告されている^{7, 8)}。FilaminAは, アクチン結合蛋白であり, 脳室帯から皮質への細胞遊走の制御に関与しているが, hyaline protoplasmic astrocytopathyはFilaminA抗体に対して陽性である。てんかん原性の獲得にfilaminまたはfilamin結合蛋白がreactive astrocyteとbizarre glial cells, balloon cells, dysmorphic neuronを介して関与している可能性が本研究で示唆された。

炎症性マーカーの一つであるヒートショックプロテインは, 小児のてんかん外科手術切除組織で強く発現することが報告されており低分子量ヒートショックプロテインである α -B-crystallinは硬膜下電極留置後に炎症性リンパ球の認めないてんかん症例の13%に広く分布していた⁹⁾。

本研究で α -B-crystallinは、Olig2陽性細胞と形態的に類似した細胞において免疫反応を示した。以上から、Olig2に免疫反応を示すOLCは、炎症などの強いストレス下で α -B-crystallinが何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

てんかん性スパズムを認める小児難治てんかん例に対する発作コントロールには、広範囲な皮質切除が必要ことが多い。今後症例数を増やすとともにてんかん性スパズム症例に対しても α -B-crystallin抗体を検討していきたい。

【文献】

- 1) Tokuhara D, Sakuma S, Hattori H, Matsuoka O, Yamano T, Kainic acid dose affects delayed cell death mechanism after status epilepticus. *Brain Dev.* 2007; **29**, 2-8.
- 2) Tokuhara D, Sakuma S, Hattori H, Matsuoka O, Yamano T, Sakuma, Expression of estrogen receptor alpha and beta in reactive astrocytes at the male rat hippocampus after status epilepticus. *Neuropathology* 2009; **29**, 55-62.
- 3) Sakuma S, Tokuhara D, Otsubo H, Yamano T, Shintaku H, Dynamic Change in Cells Expressing IL-1beta in Rat Hippocampus after Status Epilepticus. *Jpn Clin Med.* 2014; **5**, 25-32.
- 4) Sakuma S, Halliday W. C, Nomura R, Ochi A, Otsubo H, Increased population of oligodendroglia-like cells in pediatric intractable epilepsy. *Neurosci Lett.* 2014; **566**, 188-193.
- 5) Sakuma S, Halliday W. C, Nomura R, Baba S, Sato Y, Okanari K, Increased subcortical oligodendroglia-like cells in pharmacoresistant focal epilepsy in children correlate with extensive epileptogenic zones. *Epilepsia* 2016; **57**, 2031-2038.
- 6) Spencer, S. Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment *Epilepsia* 2002; **43**, 219-227.
- 7) Hazrati L. N, Kleinschmidt-DeMasters B. K, Handler M. H, Smith M. L, Ochi A, Otsubo H, et al. Astrocytic inclusions in epilepsy: expanding the spectrum of flaminopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008; **67**, 669-676.
- 8) Visanji N. P, Wong J. C, Wang S. X, Cappel B, Kleinschmidt-Demasters B. K, Handler M. H et al. A proteomic analysis of pediatric seizure cases associated with astrocytic inclusions. *Epilepsia* 2012; **53**, e50-54.
- 9) Sarnat H. B, Flores-Sarnat L, Alpha-B-crystallin as a tissue marker of epileptic foci in paediatric resections. *Can J Neurol Sci.* 2009; **36**, 566-574.

