

—— 研究褒賞受賞記念報告 ——

外科手術標本を用いたヒトてんかん原性の病態生理学的解明

北 浦 弘 樹

要旨：てんかん外科手術により切除された焦点組織内には、機能的および形態的なてんかん原性メカニズムが包含されていると考えられる。そこにみられる病理組織像は実に多彩であり、てんかん原性は単一の普遍的なメカニズムで説明するよりも病態ごとに多様なメカニズムが併存していると考えの方が自然に思える。そこで、我々は様々な病理学的背景に基づく実際のヒトてんかん焦点組織を用いて、生体外で異常神経活動を詳細に解析する試みを進めてきた。こうした試みにより様々な病態において、病理学的な形態異常に関連する異常興奮性を見出し報告することができた。本稿ではこうした研究を紹介し、今後の展望を考察する。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2025；36：11-16

Key Words：Optical imaging, Electrophysiology, Neuropathology, Brain slice, Ex vivo

【序論】

てんかん外科手術の進展により、切除された焦点組織を病理組織学的に検討する機会も増えてきた。そこにみられる病理組織像は発生異常、腫瘍、炎症など実に多彩であるため¹⁾、焦点組織におけるてんかん原性メカニズムは、単一の普遍的なメカニズムで説明するよりも病態ごとに多様なメカニズムが併存していると考えの方が自然に思える。このような焦点組織の病理学的多様性を基盤としたミクロレベルでのてんかん原性メカニズムの研究は、てんかん病態の理解と治療法開発のためには重要なことと考えられるが、これまでなかなかアプローチが容易ではなかった。こうした背景から、我々は15年ほど前より、てんかん患者より切除された実際のヒトてんかん焦点組織において、生体外で異常神経活動を詳細に解析する試みを進めてきた。

手術標本の一部から切除後直ちに脳スライス標本作製して人工脳脊髄液中でincubateすると、神経細胞の活性を半日程度維持ができる²⁾。そこで、このスライス標本上で電気生理学的・光学的イメージング解析を行うことで、病理組

織学的な形態変化と空間的に対応させた興奮動態の解析が可能となる。この技術を用いて、様々な病理像を示すてんかん焦点組織の興奮動態を解析してきた。これまでに行ってきたこうした研究を紹介し、今後の展望を考察する。

【方法】

切除された焦点組織を手術室内で氷冷人工脳脊髄液中（ACSF）に入れ、95%O₂-5%CO₂混合ガスでバブリングしながら実験室へ輸送した（約45分以内）。実験室内で500 μm厚の急性脳スライス標本作製し、ACSF中で維持した。同スライス標本をフラビン蛍光イメージング法あるいはカルシウムイメージング法により神経活動を可視化して、病理組織学的検索の結果と対比した（Fig. 1）。

【結果】

1. Low-grade epilepsy associated tumors (LEAT)

腫瘍周囲の皮質にSeizure onsetが存在するとされており³⁾、こうしたLEAT症例について腫瘍とそれに近接した大脳皮質を含む脳領域より

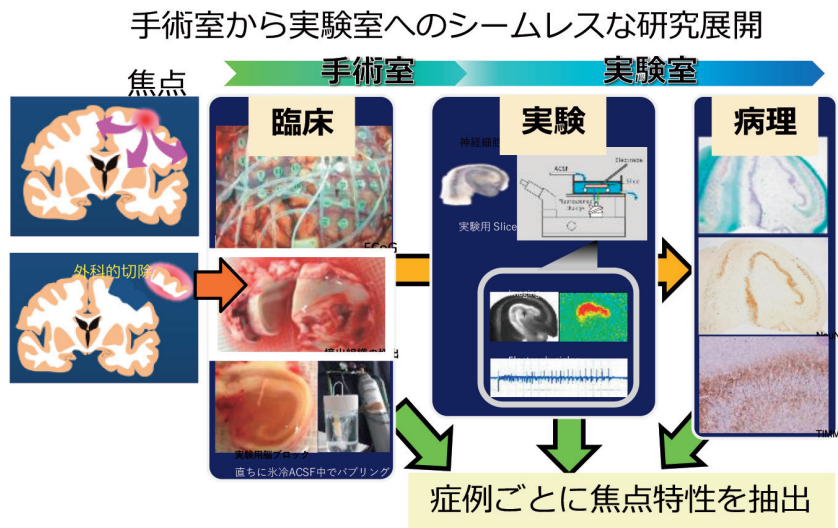


Fig. 1 手術検体を用いたてんかん原性の機能的解析

計測を行った⁴⁾。電気刺激により脳スライス内に惹起された興奮は、1脳回内においても腫瘍に近接した領域では皮質の層に沿って水平方向に強く伝播していくものの、遠い領域ではこのようなてんかん様興奮伝播はみられず、column状の興奮として捉えられた。また、てんかんの既往がない脳腫瘍患者から採取された脳組織においても同様のcolumn状の興奮がみられるのみであった。さらに、この皮質内での伝播特性の強弱は摘出前に同部位で測定された皮質脳波とも空間的によく一致していた。

水平方向に強く広がるてんかん様興奮伝播の経時変化をみてみると、速く小さな先導波とそれに続いて皮質全体に広がる大きな遅行波が確認された。スライスの部分的離断を行うことにより、異常興奮の伝播経路を検討した。白質のU線維を保存しても皮質の全層を切離すると完全に阻止されることから、皮質内回路を介していること、II/III層とV/VI層の切離では先導波と遅行波の伝播様式が異なることなどを明らかにした。

2. Periventricular nodular heterotopia (PVNH)

PVNHは大脳皮質神経細胞の遊走異常により脳室周囲に異所性灰白質結節を形成し、こうし

た異所性灰白質内にはよく分化した神経細胞とグリア細胞がみられる⁵⁾。同部位からてんかんが生じることが知られているが⁶⁾、そのてんかん原性は異所性灰白質内で完結しているのか、周囲組織とのinteractionによるものなのかは明らかでなかった。そこで、異所性灰白質とその周囲皮質を一塊として含む組織から、スライスイメージング実験を行うことにより、異所性灰白質と周囲皮質の間には、潜在的な増幅回路が存在していること、そして普段はこの回路がGABA作動性神経により抑制されているが、脱抑制により増幅回路が顕在化して異常興奮を生じることを明らかにした⁷⁾。

3. Hypothalamic Hamartoma (HH)

HHはそれ自体よりてんかん原性が存在することが臨床的に示唆されてきたが⁸⁾、その細胞メカニズムは不明であった。そこで、needle biopsyにより採取されたHH組織から*in vitro*で記録を取り、HH自体から高頻度にも自発放電が生じていること、この自発放電がヒトの脳組織では通常存在しないはずのCa²⁺透過型AMPA受容体の阻害剤であるジョウロウグモ毒(JSTX)で阻害されることなどを明らかにした⁹⁾。このような病変組織自体からの自発放電はFocal cortical dysplasia type-IIbの組織片からも同様

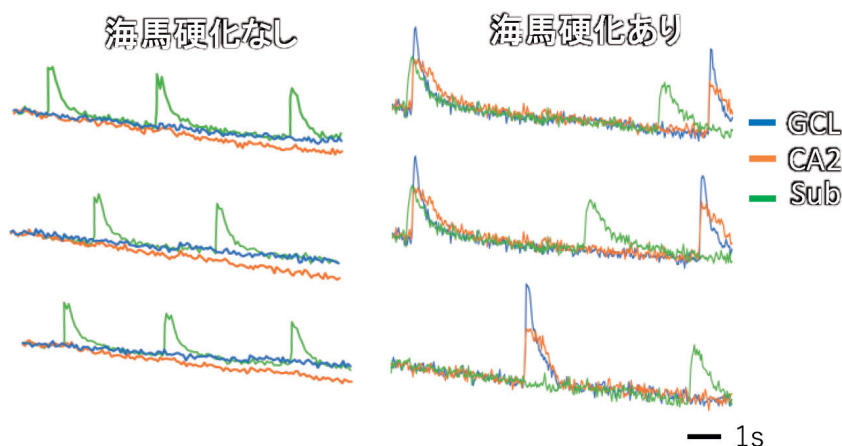


Fig. 2 切除海馬標本における自発神経活動

非海馬硬化例(左)では海馬支脚から規則的で突発的な神経活動を認めるが、海馬硬化例(右)では突発的な活動は歯状回でも見られ、それらは不規則に生じ海馬支脚の活動とは同期していない。

GCL: 顆粒細胞層, Sub: 海馬支脚

に観察されたが、JSTXによる障害は見られなかった。そのため、 Ca^{2+} 透過型AMPA受容体の発現機序を解析した結果、HHの神経細胞ではAMPA受容体のRNA編集を行うADAR2の異常によって、未編集のAMPA受容体が発現してしまうことで Ca^{2+} 透過性を有してしまうことを明らかとした。

4. Cavernous Angioma (CA)

臨床的に海綿状血管腫周囲の脳皮質からてんかんが生じることが知られている¹⁰⁾。しかしながら、ヘモジデリン沈着がどのようにてんかん原性に結び付くのかは明らかでなかった。そこで海綿状血管腫と周囲のヘモジデリンが沈着した皮質を一塊とした標本からイメージング記録を行った。ベルリンブルー染色で顕微鏡下に検索すると、鉄イオンの沈着は血管腫近傍の肉眼的なヘモジデリン沈着の範囲よりもはるかに広範囲に及んでいた。しかしながら、光学的イメージングで確認された過剰興奮領域はそれよりも局限しており、むしろGliosisがみられる領域にほぼ一致していることを明らかとした。このことは、皮質に沈着した鉄イオンによる神経細胞へのChemicalな刺激よりも、増生したグリア細胞によるBiologicalな刺激の方がてんかん原性の獲得に重要であると考えられた¹¹⁾。

5. Hippocampal Sclerosis (HS)

内側側頭葉てんかん患者の多くには、海馬内の領域選択的な神経細胞脱落とグリオシスを特徴とする海馬硬化症が認められ、病理組織学的には「萎縮像」と捉えられる¹²⁾。すなわち、神経細胞の過剰興奮性を積極的に示唆する所見に乏しい。一方で臨床的には、硬化した海馬にてんかん原性があると考えられている¹³⁾。つまり「なぜ萎縮した海馬組織がてんかん原性をもつのか？」という点において、臨床と病理に乖離が存在していた。そこで、摘出海馬標本を用いた脳スライス実験を施行し、病理組織学的な進展に合わせててんかん原性のメカニズムが変化していくことを報告した¹⁴⁾。

発作起始が海馬にあったものの、病理組織学的には明確な海馬硬化像を呈していなかった症例では、海馬支脚にまず増強した異常興奮波が発生し、それがCA1方向へ逆行性に伝播していくことを明らかとした。このことはCA1領域と海馬支脚との間に、通常存在しない逆行性の神経線維連絡が形成されて、双方向性の異常神経回路網による増強が生じていることを示している。一方で海馬硬化が著明であった症例では、海馬支脚の自発発火に加えて歯状回でも自発発火が認められ、これらは同期することなく不規則に生じていた (Fig. 2)。歯状回での自発

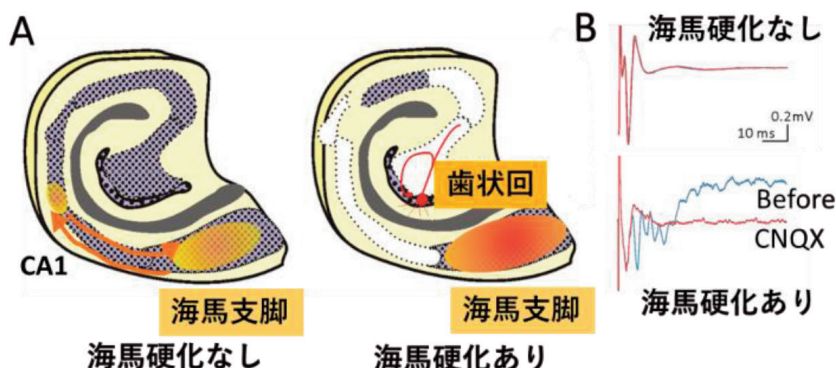


Fig. 3 内側側頭葉てんかんの海馬におけるてんかん原性

A. 非海馬硬化例では海馬支脚とCA1間の異常なinteractionがみられ、硬化例では海馬支脚の興奮性増強に加え、歯状回での苔状線維発芽がみられる。B. 苔状線維発芽例では歯状回の反回性興奮現象が観察され、興奮性シナプス伝達阻害剤で遮断される。

発火は、苔状線維の刺激により逆行性に反回性興奮を顆粒細胞に引き起こすため、苔状線維発芽による自己再投射が生じていることを示していた。これらの結果は、海馬硬化症の病理学的な進展に伴って、CA1-海馬支脚間の双方向性の異常神経回路網がもたらす過剰興奮性から、海馬支脚の興奮性増強と歯状回の苔状線維発芽による反響回路形成へ、そのてんかん原性が変遷することを示唆していると考えられた (Fig. 3)。

6. Focal cortical dysplasia (FCD) and Tuberous Sclerosis (TSC)

TSC, FCD type IIbはともに大脳皮質の発生異常に伴うてんかん性病変であり、Dysmorphic Neuron (DN) や Balloon cell (BC) といった大型の異形細胞の出現をみるなど、よく類似した病理組織像を呈する。しかしながら、臨床的にそのてんかん原性は異なっていると考えられており、FCD type IIbでは病変部自体に Seizure onsetが存在する^{15, 16)}のに対し、TSCでは結節周囲の皮質に存在すると考えられている¹⁷⁾。そこで、両組織における興奮特性をスライスイメージングにより検討した。スライス上での自発発火がみられる領域は、FCDではDN存在領域と一致していたものの¹⁶⁾、TSCではDNのいない結節周囲皮質から生じており、結節内からはほとんど記録されなかった。しかしながら、TSC

では周囲皮質から発生した興奮波が結節内に侵入すると、増幅され再度周囲皮質へ拡散されることが分かった。これらのことは、病理組織学的には類似して見えるDNやBCが、TSCとFCDでは機能的には異なった役割を担っている可能性を示唆していると考えられた。

【考察と今後の展望】

てんかんの焦点組織は病理学的に多彩な像を示し、そこに宿るてんかん原性もそれに見合った多様なメカニズムが存在していると考えられる。切除焦点組織を用いた神経活動の*in vitro*での解析は、この命題にアプローチする上で非常に有用な手段であると考えられる。一方でその限界として、焦点組織の異常神経活動と個体としての発作の間にはブラックボックスが存在するということもまた事実である。そのため、てんかん焦点組織の異常活動がどのように発作として表出するかという動物モデルなどを用いた発作原性の解析も併せて展開していくことにより、包括的なてんかん病態に理解につながるものと考えられる。

【謝辞】

これら研究は新潟大学脳研究所病理学分野および脳神経外科学分野、国立病院機構西新潟中央病院脳神経外科の先生方のご指導ご協力の下、遂行することができました。心より感謝申

し上げます。

【文献】

- 1) Wolf, H.K. & Wiestler, O.D. Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders. *Brain Pathol.* **3**, 371-380 (1993).
- 2) Kitaura H & Kakita A. Optical imaging of human epileptogenic tissues in vitro. *Neuropathology* 2013 ; **33**(4) : 469-474.
- 3) Beaumont A & Whittle IR. The pathogenesis of tumor associated epilepsy. *Acta Neurochir* 2000 ; **142** : 1-15.
- 4) Kitaura H, Hiraishi T, Murakami H, Masuda H, Fukuda M, Oishi M, et al. Spatiotemporal dynamics of epileptiform propagations: imaging of human brain slices. *Neuroimage* 2011 ; **58**(1) : 50-59.
- 5) Kakita A, Hayashi S, Moro F, Guerrini R, Ozawa T, Ono K, et al. Bilateral periventricular nodular heterotopia due to filamin 1 gene mutation: widespread glomeruloid microvascular anomaly and dysplastic cytoarchitecture in the cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 2002 ; **104** : 649-657.
- 6) Battaglia G, Chiapparini L, Franceschetti S, Freri E, Tassi L, Bassanini S, Villani F, Spreafico R, D'Incerti L, Granata T. Periventricular nodular heterotopia: classification, epileptic history, and genesis of epileptic discharges. *Epilepsia* 2006 ; **47** : 86-97.
- 7) Kitaura H, Oishi M, Takei N, Fu YJ, Hiraishi T, Fukuda M, et al. Periventricular nodular heterotopia functionally couples with the overlying hippocampus. *Epilepsia* 2012 ; **53**(7) : 127-131.
- 8) Kameyama S, Shirozu H, Masuda H, et al. MRI-guided stereotactic radiofrequency thermocoagulation for 100 hypothalamic hamartomas. *J Neurosurg* 2016 ; **124** : 1503-1512.
- 9) Kitaura H, Sonoda M, Teramoto S, Shirozu H, Shimizu H, Kimura K et al., Ca²⁺ permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma. *Epilepsia* 2017 ; **58**(4) : 59-63.
- 10) Williamson A, Patrylo PR, Lee S, Spencer DD. Physiology of human cortical neurons adjacent to cavernous malformations and tumors. *Epilepsia* 2003 ; **44** : 1413-1419.
- 11) Kitaura H, Hiraishi T, Itoh Y, Oishi M, Fujii Y, Fukuda M et al., Reactive astrocytes contribute to epileptogenesis in patients with cavernous angioma. *Epilepsy research* 2021 ; **176** : 106732-106732.
- 12) Blümcke I, Thom M, Aronica E et al : International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 2013 ; **54** : 1315-1329.
- 13) Wiebe S, Blume WT, Girvin JP et al : Effectiveness of surgery for temporal lobe epilepsy study group. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med* 2001 ; **345**(5) : 311-318.
- 14) Kitaura H, Shirozu H, Masuda H, Fukuda M, Fujii Y, Kakita A. Pathophysiological characteristics associated with epileptogenesis in human hippocampal sclerosis. *EBioMedicine* 2018 ; **29** : 38-46.
- 15) Palmini, A. et al. Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann Neurol* **37**, 476-487, (1995).
- 16) Kitaura H, Fukushima K, Fukuda M, Ito Y, Kakita A. Pharmacological evaluation of E2730, a novel selective uncompetitive GAT1 inhibitor, on epileptiform activities in resected brain tissues from human focal cortical dysplasia ex vivo. *Epilepsy research* 2024 ; **202** : 107364.
- 17) Jansen, F. E. et al. Identification of the epileptogenic tuber in patients with tuberous sclerosis: a comparison of high-resolution EEG and MEG. *Epilepsia* **47**, 108-114, (2006).

