

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14608

研究課題名（和文）体細胞変異に焦点をあてたGATOR1機能障害によるてんかん発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism of epilepsy caused by somatic mutations of GATOR1 genes

研究代表者

石田 紗恵子（Ishida, Saeko）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50777927

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：GATOR1の常染色体優性機能喪失型変異は、多様なてんかん発作を引き起こす。患者脳組織で、新たにGATOR1機能喪失型の体細胞変異が同定されたことから、脳で両アリルに機能喪失型変異が発生する2-hitが発症に影響を与え、体細胞変異発生箇所に依存して多様な症状が現れると考えた。そこで、2-hitモデルマウスを作製して患者の遺伝子異常を再現したが、てんかん発作は認められなかった。一方で、大脳皮質全体でGATOR1を欠損させたマウスは、患者の表現型を再現した。このマウスの脳皮質においてRNA-seq解析を行ったところ、てんかん関連遺伝子を含む複数の遺伝子の発現変動が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、GATOR1に変異を有する患者の表現型を再現するマウスモデルを用いたRNA-seq解析により、GATOR1変異によって引き起こされる複数の遺伝子の発現変動を明らかにした。それらの遺伝子にはてんかん関連遺伝子としてこれまでに報告がある遺伝子も含まれていたことから、本解析によって検出された遺伝子群の発現の変動はてんかん発作の発症に強く関連していると期待される。今後、これらの遺伝子がてんかんの治療標的として有効かどうか、またそれらの発現調整がてんかん抑制効果を示すかどうかを検証することにより、新たな治療法の開発につなげることができる。

研究成果の概要（英文）：Autosomal dominant loss-of-function mutations in GATOR1 subunit genes cause various focal epilepsies. Since somatic loss-of-function mutations of GATOR1 subunit gene were identified in the patient's brain tissue, 2-hit -brain somatic and germline -mutational mechanism leading to loss of function in both alleles in the brain, was thought to be the pathogenesis.

In this study, we generated 2-hit model mice of GATOR1 subunit genes, but no epileptic seizure was observed. On the other hand, mice lacking GATOR1 subunit genes throughout the cerebral cortex reproduced the patient's phenotype. RNA-seq analysis in the cortex of these mice revealed changes in the expression of multiple genes, including epilepsy-related genes.

研究分野：実験動物学

キーワード：てんかん 疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

神経疾患は複雑な遺伝的構造を示す。次世代シーケンサーの登場により、これまでに多くの生殖細胞変異が神経疾患のリスクとして報告されている。しかし、これらの生殖細胞変異のみでは、てんかん発作の多様性を十分に説明できてはいない。先天的な遺伝子変異である生殖細胞変異に対して体細胞変異は後天的な変異である。発達段階において神経前駆細胞は、分裂を繰り返して神経細胞に分化する。この間に生じる DNA 損傷が正確に修復されなかった場合、体細胞変異が引き起こされる。近年、この体細胞変異がさまざまな神経疾患患者の脳から同定されており、神経疾患発症に与える影響について関心が高まっている。

神経細胞の過度な放電に由来する反復性発作を特徴とするてんかんは、人口の約 1% に生じる頻度の高い神経疾患であるが、多くの場合は根本的な治療がなく、抗てんかん薬を長期間服用する対症療法に頼らざるを得ない。にもかかわらず、全体の約 30% は抗てんかん薬が効かない難治性であり、新たな治療、予防法の開発が急務である。

成人てんかんの約 60% を占める焦点性てんかんは、特定の脳部位に限局して異常放電を発生し、その脳部位が司る機能に依存して、様々な症状を示す。我々は、複数の主要な焦点性てんかん患者のゲノム DNA において全エクソーム解析を行い、それらに共通した原因遺伝子として、DEP domain containing protein5 (DEPDC5) を世界で初めて同定した。DEPDC5 は、同じく焦点性てんかんの原因遺伝子として報告された Nitrogen permease regulator 2 および 3-like protein (NPRL2、NPRL3) とともに Gap activity toward Rags 1 (GATOR1) 複合体を形成する。GATOR1 複合体は、成長因子や細胞ストレスなどの刺激に応答して mRNA の翻訳を促進し、細胞の成長・増殖等を制御する mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex1) の抑制因子である。しかしながら、GATOR1 複合体の機能障害による mTORC1 活性化が、下流の遺伝子発現動態にどのような影響を与え、てんかん発症を引き起こしているかは明らかになっていない。

これまで同定された DEPDC5、NPRL2、NPRL3 変異のほとんどは機能喪失型変異であり常染色体優性遺伝形式を示すことから、遺伝子産物が半減するハプロ不全が病因であることが示唆された。しかし、興味深いことに、各遺伝子に同じ機能喪失型変異をもつ家族内であっても、それぞれが異なる脳部位に神経異常発火を有し、それに伴い異なる症状を示した。このことは、GATOR1 複合体変異によるてんかん発症には、各構成遺伝子の生殖細胞変異以外の要因が存在していることを示唆しているが、その要因が何であるかは未だ明らかになっていない。

我々はこれまで、患者病態を詳細に解析する目的で、DEPDC5 に生殖細胞変異を持つ患者の脳サンプルにおいてシーケンス解析を行い、新たに DEPDC5 の機能喪失型体細胞変異を発見した。また、Depdc5 ヘテロ型ノックアウト (KO) ラットを作製し、表現型解析を行ったところ、痙攣誘発剤に対する感受性の上昇は認められたものの、自発性のてんかん発作を示さないことを明らかにした。

以上の結果から、GATOR1 複合体変異によるてんかん発症には、同一遺伝子に生殖細胞変異と体細胞変異が発生することにより二本のアリルの両方が障害をうける 2-hit モデルが、発症の重要な要因となっており、体細胞変異の発生脳部位に依存して多様な症状のてんかんが引き起こされるのではないかという仮説を立てた。NPRL2、NPRL3 においても、現時点で未発表であるが、同様に、体細胞変異の発生がてんかん発症を引き起こしている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、cre-loxP システムと、子宮内の胎児に DNA を導入する *in utero* electroporation (IUE) 法を組み合わせ、片側アリル欠損マウスの脳内に、体細胞変異を導入することにより、2-hit モデルマウスを作製する。また、2-hit 変異がマウスの脳形成・脳機能に与える影響を明らかにし、2-hit 変異を有する細胞における GATOR1 複合体機能障害が下流遺伝子の発現に与える影響を RNA-seq 解析により明らかにすることにより、てんかんが引き起こされる分子メカニズムを解明することを目的とした。



3. 研究方法

患者から同定された DEPDC5 の体細胞変異は機能喪失型変異であった。そこで、同一遺伝子において片側アリルが欠損しており、対側アリルの特定のエクソン両側には loxP 配列を有している lox/-マウスを用いて、その大脳半球に、pcx-Cre-GFP ベクターを IUE 法で導入することにより体細胞変異を有する患者の遺伝子異常の再現を試みた。これにより 2-hit 変異を有する細胞は GFP+細胞として標識される。

GATOR1 複合体に生殖細胞変異および体細胞変異を有する患者から、てんかん発作とともに、神経異常興奮を示す異型巨大錐体細胞の出現や大脳層構造の乱れを特徴とする限局性皮質形成異常 (FCD) が報告されていることから、このような FCD 病変を、体細胞変異が 2-hit モデルマウスに引き起こすかを調べた。また、2-hit モデルマウスが自発性のてんかん発作を示すかを 24 時間 video recording により調べた。

4. 研究成果

(1) 2-hit モデルマウスの作製と表現型解析

初めに、GATOR1 複合体を形成する *Depdc5* に注目し、*Depdc5* lox/-マウスに Cre-EGFP を *in utero* electroporation (IUE) で発現させた後、脳を固定し、GFP+細胞の大きさを、*Depdc5* lox/+に Cre-EGFP を発現させたマウスと比較することで評価した。また、大脳層構造を、層特異的マーカーで評価した。結果、Cre 導入マウスにおいて明らかな FCD 様の特徴は認められなかった。そこで、Cre 導入効率を上げる目的で、*Depdc5* lox/-マウスに、FLEX-TdTomato 配列を導入し、IUE で Cre のみを発現させた 2-hit モデルマウスを新たに作製した。しかし、FCD 様病変は認められず、長期に渡る 24hr video recording を行ったが、てんかん発作は認められなかった。

(2) GATOR1 複合体の下流遺伝子発現解析

2-hit モデルが FCD およびてんかんの表現型を示さなかった一方で、我々はてんかん発作を引き起こす神経異常興奮の好発部位である大脳皮質全体において GATOR1 複合体を構成する遺伝子 (*Depdc5*, *Nprl2*, *Nprl3*) を欠損させたマウス (*Depdc5*-cKO, *Nprl2*-cKO, *Nprl3*-cKO) を作製し、それぞれの変異マウスが FCD 病変と自発性てんかん発作を示すことを明らかにした。そこで、当初の予定を変更し、2-hit モデルマウスではなく、これらの cKO マウスを利用し、GATOR1 複合体機能障害が下流遺伝子の発現に与える影響を RNA-seq 解析により明らかにすることにした。

各 cKO マウスは生後 2 週齢より自発性のてんかん発作を示すため、その発作直前の時期にあ

たる生後 12 日齢の脳皮質から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。その結果 3 cKO マウス系統で共通して発現が変化している遺伝子群が明らかになった。これらの遺伝子群の機能が、どのような代謝系や制御系に関係しているかを KEGG pathway 解析で検討した結果、最も多い 14 遺伝子がてんかん発作発症に強い関連がある neuroactive ligand-receptor interaction pathway に分類された。この中には、既にてんかん関連遺伝子として報告されている遺伝子も含まれていた。今後、これらの遺伝子が新たな治療標的として有効かを検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 de Calbiac Hortense, Dabacan Adriana, Marsan Elise, Tostivint Hervé, Devienne Gabrielle, Ishida Saeko, Leguern Eric, Baulac Stéphanie, Muresan Raul C., Kabashi Edor, Ciura Sorana	4. 巻 5
2. 論文標題 Depdc5 knockdown causes mTOR-dependent motor hyperactivity in zebrafish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 510 ~ 523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishida Saeko	4. 巻 152
2. 論文標題 DEPDC5, a new key to understand various epilepsies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 281 ~ 285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.152.281	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田 紗恵子、中島 陽二、相田 知海、宇佐美 貴子、和田 悠作、渡辺 雅彦、田中 光一
2. 発表標題 DEPDC5機能障害による神経・精神疾患発症機序の解明
3. 学会等名 第66回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------