

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18435

研究課題名（和文）患者腫瘍移植モデルを用いたmTOR経路とてんかん性異常の関連の解明

研究課題名（英文）The association between the mTOR pathway activation and epileptic activities in the patient-derived xenograft glioma models

研究代表者

池谷 直樹（IKEGAYA, Naoki）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30644611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：グリオーマに起因するてんかんにおいて、独自に保有するグリオーマ細胞株、およびモデルマウス作成技術を用いて、細胞・動物レベルで電気生理学的、生化学的検討を行い、病態解明、治療法の開発に取り組んだ。IDH変異型グリオーマPDXモデル作成方法を確立し、急性冠状脳スライスにおけるLocal field potentialを計測し、てんかん性異常放電の検出を行なった。さらに、パッチクランプ法によるシナプス後電位の計測を行い、受容体レベルでの評価を行なった。これらの手法を、グリオーマPDXモデルの治療群・非治療群とsham手術群において適応し、群間差を検討可能とするデータを集積した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマは高率にてんかんを合併する。特にIDHという遺伝子に変異を有する(mIDH)グリオーマはてんかんの発症率が極めて高い。一方で、このようにてんかんの3割は既存の薬で制御が難しく、病態理解に基づいた新たな治療法の開発が期待されている。本研究はmIDHグリオーマ細胞株およびmIDHグリオーマモデルを独自に保有する研究者らが、分子、細胞、動物レベルでmIDHグリオーマに関連するてんかんの病態を解明するために行なった。また、同病態を標的とするIDH阻害剤の効果を検証した。研究の成果は、グリオーマに関連するてんかんの制御率向上と、患者さん・関係する方のQOL向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the pathophysiology and biochemistry of glioma-associated epilepsy at the molecular, cellular and animal tissue levels. For this purpose, we used glioma cell lines and mouse PDX models that were originally developed by our team. Furthermore, anti-epileptic effect of IDH inhibitor was tested in the IDH-mutant glioma PDX model. First, we established a method to create the IDH-mutant glioma PDX model, measured local field potential in acute coronal mouse brain slices, and detected epileptic discharges. We then measured postsynaptic potentials by the patch-clamp method which enabled to evaluate them at the receptor level. These methods were applied to the treated, untreated (vehicle) glioma PDX model group, and sham operation group. Data were collected to allow statistical analysis of differences between the groups.

研究分野：脳神経外科

キーワード：てんかん グリオーマ IDH PDXモデル IDH阻害剤 Local field potential パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

グリオーマに起因するてんかん (glioma-associated epilepsy: GAE)の病態解明に基づいた制御は、患者の QOL 向上や予定外入院の減少につながる重要な課題である。グリオーマにおいて特定の分子生物学的・遺伝学的特徴、例えば mTOR 経路の活性化や IDH1 変異が、難治てんかんの病因成り得ることが明らかとなっていることから、これらの背景に基づいた病態解明が期待されていた。一方で、研究開始当初にはこの遺伝子変異等を有するグリオーマ細胞株およびモデル作成が困難であったことが、病態解明促進の妨げとなっていた。我々はこれまでの研究活動によりこれらの遺伝子変異を有する細胞株の樹立、およびモデルマウス作成技術の確立を行なった。そのため、これらの独創的な研究素材を用いて、GAE の病態解明に取り組むことが現実的課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では特定の遺伝子プロファイルが GAE に関与していると仮説を立てた。この遺伝子変異を有する細胞株、およびモデルマウスを用いて、細胞・動物レベルで電気生理学的、生化学的検討を行うことで、GAE の病態解明、治療法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) patient-derived glioma xenograft (グリオーマ PDX) モデル作成方法の確立、mTOR 経路活性化状態、IDH 変異等遺伝子プロファイルの確認、およびてんかん性異常放電の検討
- (2) mTOR/IDH1 阻害剤 投与による IED 抑制効果の検証
- (3) パッチクランプ法によるシナプス後電位の計測
- (4) mTOR 活性化状態の違い、IDH1 変異の有無による興奮/抑制性受容体 antagonist に対する感受性の検討
- (5) mTOR 活性化の違い、IDH1 変異の有無が興奮性/抑制性受容体、トランスポーター発現に及ぼす影響の検討

4. 研究成果

まず、てんかん性異常放電の検出を行うために Local field potential (LFP) を計測するための電気生理実験台の整備から取り掛かった。良好な記録を得るためにノイズ除去作業を行い、最終的にてんかん性異常放電よりも十分に低い電位 (50uV 以下) までの低減を達成した (図 1)。

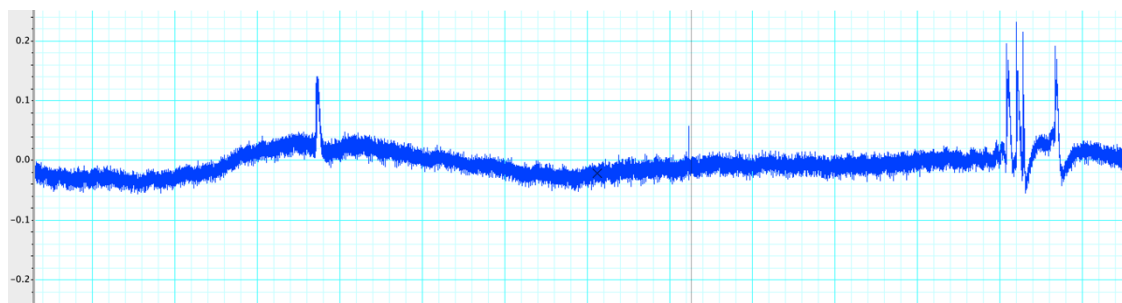


図 1 グリオーマ PDX モデルの LFP: 基線 (ノイズ) を十分に上回る異常放電を認める

同時にモデルマウス作成として、まず mTOR 経路の活性化状態の異なるモデルマウスの作成に取り掛かった。これについては腫瘍植え込みと生着は可能であったものの、mTOR 活性化状態の制御が困難であった。そのため、もう一方の独自の細胞株を用いた IDH 変異グリオーマモデルの作成に注力することとした。

4-5 週齢 SCID beige マウスに 1×10^5 の IDH 変異型グリオーマ細胞を移植した。体重減少と活気低下を指標として腫瘍形成と判断し、イソフルラン麻酔下に脳を摘出しビブラトームを用いて $400 \mu\text{m}$ の冠状急性脳スライスを作成した。GAE におけるてんかん性異常放電は腫瘍周囲皮質から生じることが示されており、同部で LFP の記録を行った。さらに脳スライスにおけるてんかん性異常放電を受容体レベルで評価するためにパッチクランプ法によるシナプス後電位の測定技術を取得し、記録を行なった。現在、sham operation 群、PDX マウス-IDH1 阻害剤投与群、PDX マウス-IDH 阻害剤非投与群それぞれにおいて、LFP およびパッチクランプ法によるデータ集積を継続しており、近く群間の差異について統計学的な解析を加えて評価を行う予定である。

参考文献(1-5)

1. Mortazavi A, Fayed I, Bachani M, Dowdy T, Jahanipour J, Khan A, et al. IDH Mutated Gliomas Promote Epileptogenesis through D-2-Hydroxyglutarate Dependent mTOR Hyperactivation. *Neuro-oncology*. 2022.
2. Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B, Okun JG, Hörster F, Mayatepek E, et al. NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in d-2-hydroxyglutaric aciduria. *The European journal of neuroscience*. 2002;16(1):21-8.
3. Gill BJA, Wu X, Khan FA, Sosunov AA, Liou JY, Dovas A, et al. Ex vivo multi-electrode analysis reveals spatiotemporal dynamics of ictal behavior at the infiltrated margin of glioma. *Neurobiology of disease*. 2020;134:104676.
4. Venkatesh HS, Morishita W, Geraghty AC, Silverbush D, Gillespie SM, Arzt M, et al. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature*. 2019;573(7775):539-45.
5. Chen H, Judkins J, Thomas C, Wu M, Khoury L, Benjamin CG, et al. Mutant IDH1 and seizures in patients with glioma. *Neurology*. 2017;88(19):1805-13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 M.Kamogawa, N. Ikegaya, Y. Miyake, T. Hayashi, H. Murata, K. Tateishi and T. Yamamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Verbal and memory deficits caused by aphasic status epilepticus after resection of a left temporal lobe glioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgical neurology international	6. 最初と最後の頁 614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.25259/sni_1120_2021	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 -

1. 著者名 Y.Miyake, K. Fujii, T. Nakamura, N. Ikegaya, Y. Matsushita, Y. Gobayashi, H. Iwashita, N. Udaka, J. Kumagai, H. Murata, Y. Takemoto, S. Yamanaka, K. Ichimura, K. Tateishi and T. Yamamoto	4. 巻 80
2. 論文標題 IDH-Mutant Astrocytoma With Chromosome 19q13 Deletion Manifesting as an Oligodendroglioma-Like Morphology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of neuropathology and experimental neurology	6. 最初と最後の頁 247-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnen/nlaa161	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 K.Tateishi, N. Ikegaya, N. Udaka, J. Sasame, T. Hayashi, Y. Miyake, T. Okabe, R. Minamoto, H. Murata, D. Utsunomiya, S. Yamanaka and T. Yamamoto	4. 巻 8
2. 論文標題 BRAF V600E mutation mediates FDG-methionine uptake mismatch in polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta neuropathologica communications	6. 最初と最後の頁 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-020-01023-3	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池谷直樹, 鴨川美咲, 立石健祐, 佐藤充, 三宅勇平, 鈴木良介, 長尾景充, 清水信行, 末永潤, 村田英俊, 山本哲哉
2. 発表標題 側頭葉腫瘍術後の意識障害を伴わない非けいれん性てんかん重積により言語障害が後遺した一例
3. 学会等名 日本てんかん外科学会
4. 発表年 2020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
研究協力者	立石 健祐 (TATEISHI Kensuke)		
研究協力者	宮崎 智之 (MIYAZAKI Tomoyuki)		

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
---------	---------