

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18448

研究課題名(和文) 低悪性度てんかん原性腫瘍周囲の正常神経細胞におけるてんかん発症機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of epileptogenesis in normal neuron around low-grade epilepsy-associated neuroepithelial tumors

研究代表者

飯島 圭哉 (Iijima, Keiya)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・病院・医員

研究者番号：10751878

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)：1998年以降に国立精神・神経医療研究センター病院において低悪性度てんかん原性腫瘍と診断された手術検体が93検体あり、この内68症例から分子生物学的解析の同意を得た。2例は組織不足により除外され、66症例において遺伝子解析を行い得た。この結果、51症例の原因となる遺伝子異常を同定した。遺伝子型は32症例がBRAF V600E mutant、10例がFGFR1 mutant、9例はその他の変異であった。この内、12症例について、液体クロマトグラフィ法を用いて腫瘍部分と周囲の正常脳組織のGABA、Glycin、グルタミン酸の濃度を定量した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、貴重な脳神経外科手術検体を用い、低悪性度てんかん原性腫瘍およびその周囲の正常組織において、主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸、抑制性神経伝達物質であるGABAおよびglycinの濃度を測定することに成功した。この知見は低悪性度てんかん原性腫瘍の周囲におけるてんかん現象の発生機構の解明につながり、新規抗てんかん治療の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：From 1998 to 2021, ninety-three pathological samples were diagnosed as low-grade epilepsy-associated tumors. We got consent for research participation in 68 patients. Two samples were excluded from analysis due to insufficient specimen amount. We identified genotype in 51 patients (32 BRAF V600E mutant, 10 FGFR1 mutant and 9 the other genotypes). In 12 patients, we could quantify the concentration of GABA, glycin and glutamate in both tumor and surrounding normal tissue.

研究分野：てんかん原性腫瘍

キーワード：てんかん 脳腫瘍 GABA 神経伝達物質 LEAT

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の多くは高齢成人に発生するグリオブラストーマ等の悪性脳腫瘍である。一方で我々が着目している「てんかん関連低悪性度神経上皮性腫瘍群 (LEAT)」は、脳腫瘍全体の 2-5%と稀な腫瘍で、主に小児の側頭葉に好発するものである。LEAT は近年提唱されている新しい概念であり、古典的には「神経節膠腫 (Ganglioglioma)」、「胚芽異形成性神経上皮腫瘍 (Dysembryoplastic neuroepithelial tumor)」、「神経膠腫」などに分類されてきた。これらの腫瘍群は分子生物学的に解析すると、いくつかの特徴により古典的分類と異なるサブグループに分類されることが分かってきた (Blumcke 2016 Nature Reviews)。しかしながら、多くの LEAT に関する研究は、「てんかん発作を抑えるための創薬」という視点はなく、腫瘍の分子分類のみに研究者の関心が集まっていた。

LEAT によるてんかんは、なぜか薬剤抵抗性である。LEAT 患者の多くは薬剤抵抗性の難治てんかんのために外科的切除術が必要となる。外科的切除が為されればてんかん発作は良好にコントロールされる。しかしながら、本腫瘍は基本的に低悪性度腫瘍であり、生命予後に影響を与えるものではない。従って、他の低侵襲な治療方法によりてんかん発作がコントロール可能であれば、リスクの高い小児の開頭手術を回避することができる。以上より、LEAT のてんかんを抑える低侵襲な治療方法の開発は LEAT 患者にとって極めて有益である。

申請者は脳神経外科医として実際の患者の治療に関わりながら LEAT の分子分類の研究を行っていく中で、「LEAT 患者のてんかんはなぜ摘出しなければ治らないのか?」という臨床的な疑問を持った。この疑問から「LEAT がてんかんを引き起こす分子細胞学的な機序は何か?」という学術的な問いを立てた。この「学術的な問い」の答えを追求すべく過去の論文報告を解析すると、LEAT がてんかん原性を誘導する機序はほとんど未知であることがわかった。そして、LEAT の本質である「てんかん原性を持つこと」の機序を解明するためには、腫瘍本体のみに着目するのではなく、「腫瘍周囲の非腫瘍細胞群 (神経細胞・グリア細胞・血管内皮細胞)」に着目しなければならないと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は“LEAT が周囲脳組織にてんかん原性を誘導する現象の分子基盤の解明”を目的とする。この成果は LEAT 患者のてんかんに対する低侵襲で効果的な治療方法を開発することにつながる。LEAT の研究の多くは LEAT を正しく分類するための分子マーカーを探すことに主眼が置かれているが、本研究では LEAT 患者のてんかん発作を抑制する新規治療法を探索すべく「腫瘍細胞ではなく、その周囲の非腫瘍性神経細胞」を分子生物学的に解析し、候補となる治療標的因子を同定する。

### 3. 研究の方法

#### [試料の選定と処理]

1998 年から 2020 年までに国立精神・神経医療研究センター病院において手術を受けた症例の内、93 症例の検体が低悪性度てんかん原性腫瘍と診断された。この内 68 症例から研究参加の同意を得た。2 例は検体量不足により解析対象から外した。66 例の遺伝子解析を行った。

LEAT の手術では、腫瘍が海馬に同在・あるいは接している症例では海馬を含めて摘出する。このような症例は、腫瘍組織、腫瘍から離れた組織を比較することができるため研究価値が高い。正常組織を含めて摘出された 12 標本の解析を行った。、における標的物質の発現量の違いを評価・検討した。

当施設では手術後の検体は薄く切断され、それら試料を順に凍結固定とホルマリン固定を交互に行う。凍結固定標本は同意の下に「NCNP バイオバンク」システムに登録されており、これを利用した。

#### [神経伝達物質の解析 および mTOR 経路関連物質の解析]

液体クロマトグラフィ法を用いて、主要な神経伝達物質 (グルタミン酸、GABA、グリシン、セロトニン等) 質量分析を行い、てんかん原性に寄与している神経伝達物質の濃度比を計測した。

#### [遺伝子解析]

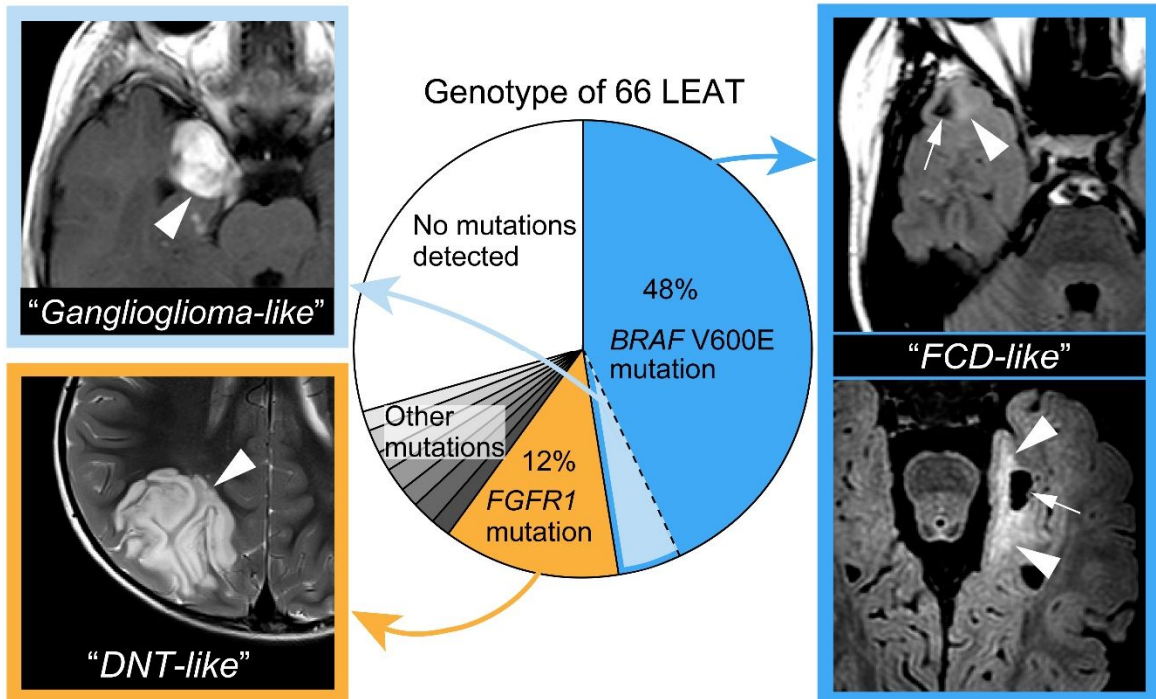
Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法および次世代シーケンサー (NGS) を用いて遺伝子変異を特定した。MLPA 法では KIAA1549-BRAF, FGFR1-TACC1 の fusion、BRAF V600E と IDH の 4 つの hot spot の突然変異、BRAF、CDKN2A/B、FGFR1、MYB、MYBL1 遺伝子の copy number aberration を解析した。NGS では IDH1/2、BRAF、FGFR1、TP53、SLC44A1、PRKCA、KIAA1549 の遺伝子のエクソン領域の約 90%

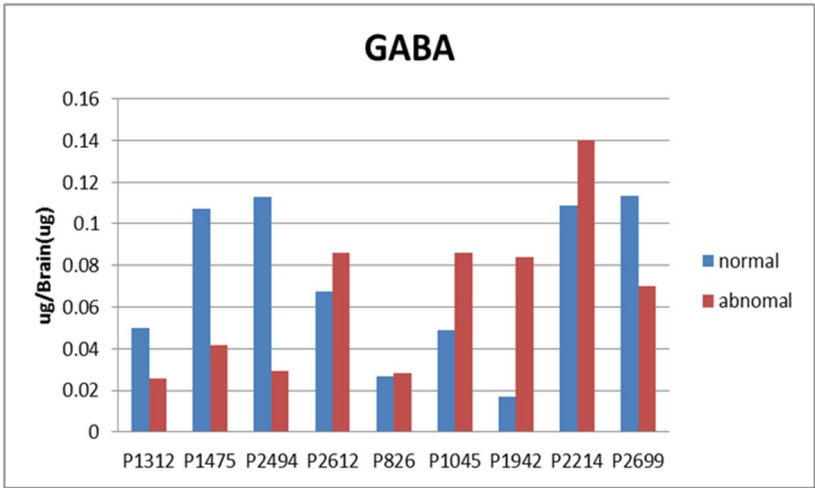
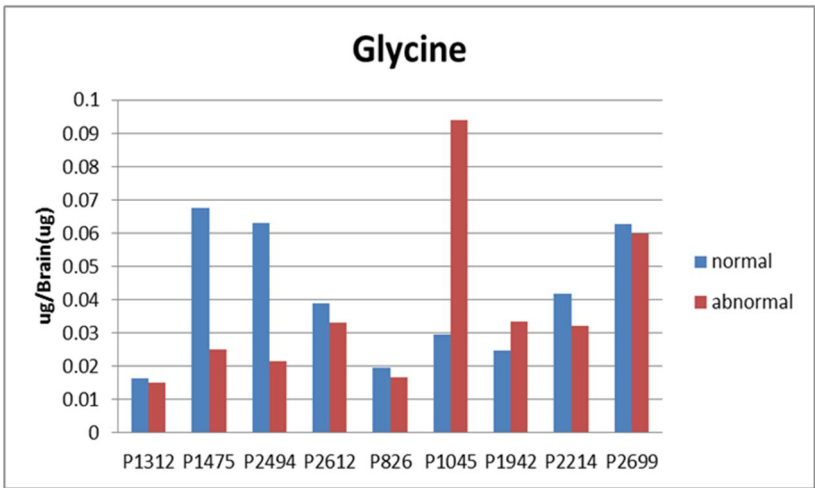
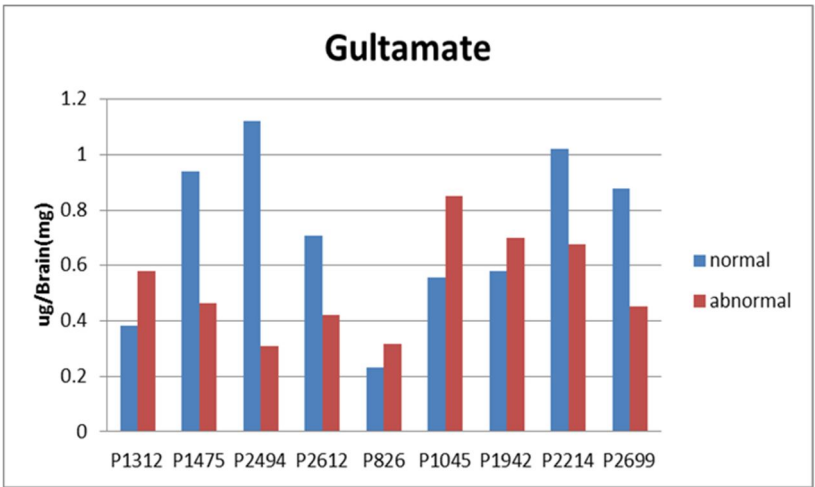
をカバーするオリジナルパネルを使用した。MLPA および NGS で変異が特定されたものはサンガー法で確認した。

#### 4. 研究成果

51 症例の原因となる遺伝子異常を同定した。遺伝子型は 32 症例が BRAF V600E mutant、10 例が FGFR1 mutant、9 例はその他の変異であった (図 1)。この内、12 症例について、液体クロマトグラフィ法を用いて腫瘍部分と周囲の正常脳組織の GABA、Glycin、グルタミン酸の濃度を定量した (図 2)。

図 1





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 飯島圭哉 後藤雄一 佐藤典子 斎藤祐子 渋谷誠 宮田元 鈴木博義 種井善一 岩崎真樹
2. 発表標題 てんかんを主症状とする低悪性度神経上皮性腫瘍の病理と分子遺伝学的特徴
3. 学会等名 日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiya Iijima, Noriko Sato, Yu-ichi Goto, Hajime Miyata, Hiroyoshi Suzuki, Masaki Iwasaki
2. 発表標題 The specific neuroimaging patterns of BRAF V600E mutant and FGFR1 mutant low grade epilepsy-associated neuroepithelial tumor
3. 学会等名 米国てんかん学会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 飯島圭哉 岩崎真樹	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 3
3. 書名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト	

〔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
---------	---------