

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791081

研究課題名(和文) 小児難治性てんかんにおける脳形成異常発生病態解明のための生物化学的研究

研究課題名(英文) Biochemical study for pathological mechanism of brain malformation with intractable epilepsy in childhood

研究代表者

榊原 崇文 (SAKAKIBARA, TAKAFUMI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60570075

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)： てんかんの有病率は約1.0%、その約20%は小児期に発症する難治性てんかんである。小児難治性てんかんの原因に限局性皮質異形成(FCD)がある。FCDには、神経細胞とグリア細胞両方の特性をもつ細胞がある。本研究は、FCDの発生病態とエピジェネティクス機構(Epi機構)の関与を調べた。

FCD病巣を対象とし、5メチルシトシンと5メチルシチジンによる免疫組織学的解析とマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行ったが、Epi機構の関与について十分な解明には至らなかった。グリア分化関連蛋白が、Epi機構による神経細胞分化へ与える影響を調べるため、GFAP発現ベクター導入安定細胞株の樹立と解析を進めている。

研究成果の概要(英文)： The prevalence of epilepsy is estimated as about 1.0%, of which 20% is intractable epilepsy in childhood. Among them, focal cortical dysplasia (FCD) is one of major diseases. Especially, FCD type IIb is well known to appear specific cells in the lesion. They are thought to have the both biological characters of neuron and astrocyte. However, we have never seen the evidence since 1970s, the first described those cells. In the present study, we investigated epigenetic mechanism and abnormal differentiation of pathological cells in FCD.

We performed immunohistochemistry with the antibodies of 5-methylcytosine and 5-methylcytidine. However, there is no different expression pattern of pathological cells. Next, we tried to make inducible formation of pathological cells, using GFAP-driven SH-SY5Y (neuroblastoma cell line). We made various vectors construct and selected some working vectors. We advance to establish vector-contained cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：難治性てんかん 限局性皮質異形成 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは、有病率約1%で、その70~80%は小児期に発症する比較的頻度の高い疾患である。てんかん患者の約30%が薬剤抵抗性の難治性てんかんを示し、その約30%は外科的治療の対象となる。外科治療が行われた小児難治性てんかんの主な病理組織として限局性皮質異形成(FCD type I-III)があり、FCDの発生には遊走と分化の異常が想定されているが、その原因およびてんかん原性獲得の病態は不明である。また、FCD type IIbには、分子生物学的に神経細胞およびグリア細胞の両方の性質を持つ特徴的な細胞(balloon cells(BCs))が存在することから、その発生には胎生期の神経幹細胞の神経細胞とグリア細胞への分化異常が容易に想定される。一方、神経幹細胞の分化制御機構は、エピジェネティック機構が関与し、時間的・空間的に厳密に制御されていることが知られている。FCDに特定の遺伝子変異がないこととFCDの病巣以外は機能形態学的に異常が無いことから、その発生の分子基盤は遺伝子変異ではなくエピジェネティック機構であることが考えられた。本研究は、この点に着目し、I)FCDにおけるエピジェネティック機構の関与を定性的に明らかにすること、II)グリア関連蛋白が、培養ヒト神経芽細胞の分化誘導過程で、エピジェネティック機構による神経細胞分化へ与える影響を分子細胞学的および電気生理学的に明らかにすることである。これにより神経系細胞の分化異常を基盤とした難治性てんかんの発症病態の解明を行い、それを基盤とする治療法の開発が期待できる。

## 2. 研究の目的

小児難治性てんかんの多くは、認知行動異常、知的障害や精神症状を合併することが多く、家庭や学校を含めた社会生活をしばしば困難にしている。小児難治性てんかんの中で、先天性脳形成障害を原因とするものは少なく、限局性皮質異形成(FCD)はその中で重要な病理組織型のひとつである。FCD発生におけるエピジェネティック機構の異常、グリア関連蛋白が、エピジェネティック機構による神経細胞の分化と神経細胞の機能へ与える影響を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、当該倫理委員会の承認のもと行った。

I)FCDにおけるエピジェネティック機構の関与についての定性的検討

対象は、FCD type I, FCD type IIb, 結節性硬化症(TSC)と臨床および病理学的に診断され、治療目的に摘出された患者脳組織。各パラフィン切片を用いて、Mastoeni Dら(Neurobiol Aging 2010)が、アルツハイマ

ー病におけるエピジェネティック機構の関与を定性的に明らかにした手法を参考にして、5メチルシトシン抗体と5メチルシチジン抗体を用いた免疫組織学的検討を行った。また、FCD type IIbのBCs発生に関与する特異的なエピジェネティック機構関連遺伝子を同定するため、FCD type IIbの凍結組織のうち、BCsを含む領域(BCs(+))とBCsを含まない領域(BCs(-))を用いて、マイクロアレイ(Affymetrix)によるエピジェネティック機構関連遺伝子発現量の解析を行った。

II)グリア関連蛋白が、培養ヒト神経芽細胞の分化誘導過程で、エピジェネティック機構による神経細胞分化へ与える影響を検討するため、培養ヒト神経芽細胞へ第3世代テトラサイクリン発現誘導システムを用いたGFAP発現ベクターの作成と導入を行い、安定細胞株の樹立を行う。

培養ヒト神経芽細胞として、SH-SY5Y(neuroblastoma cell line)を、第3世代テトラサイクリン発現誘導システムとして、Tet-On<sup>®</sup> 3G Inducible Expression System(CLONTECH)を、そしてGFAPのHuman cDNA cloneは文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研BRCから提供されたGNP Human cDNA Entry Cloneを用いた。導入された各ベクターの機能評価については、ルシフェラーゼアッセイ法、蛍光標識蛋白の発光およびウエスタンブロッティングにより標的蛋白質発現解析で確認した。

## 4. 研究成果

I)FCD type IIbにおける5メチルシトシンおよび5メチルシチジン陽性率は、FCD type IおよびTSCと比較して、有意な低下を認めなかった。次に、FCD type IIbの凍結組織について、各症例におけるBCs(+))領域とBCs(-))領域におけるエピジェネティック機構関連遺伝子発現量の比較を行った。各症例におけるBCs(+))およびBCs(-))領域間におけるエピジェネティック機構関連遺伝子発現量に有意差を認めなかった。また、BCs(+))領域の平均とBCs(-))領域の平均を領域間でエピジェネティック機構関連遺伝子発現量の比較を行ったが、遺伝子発現量に有意差を認めなかった。このことは、FCD type IIbを構成する組織での遺伝子発現には、BCs(+))領域とBCs(-))領域間での違いがなく、また、FCD type IIb症例間での違いも乏しい可能性がある。また、このことは、FCDで正常に見える組織でもその未分化性などがあることを示したHanaiら(Seizure 2010)の結果を裏付けるものではないかと推察する。本研究では、FCDにおけるエピジェネティック機構の関与について十分な解明には至らなかった。

II)第3世代テトラサイクリン(Dox)によるGFAP発現誘導システムをもつSH-SY5Y安定細胞株の樹立のため、まずSH-SY5Y with

pCMV-Tet3G 細胞株の作成を行った。ルシフェラーゼアッセイにより SH-SY5Y with pCMV-Tet3G 細胞株の樹立を確認した。次に、RIKEN\_Clone から Dox 誘導 GFAP 発現ベクターを作成した。作成したベクターを SH-SY5Y with pCMV-Tet3G 細胞株へ導入を行った。導入した細胞における蛍光標識蛋白の発光と GFAP 発現をウエスタンブロッティングで確認した。次に、安定細胞株樹立のため、SH-SY5Y with pCMV-Tet3G 細胞株へ Dox 誘導 GFAP 発現ベクターと選択マーカー遺伝子の共導入を行った。培養液の種類、FBS 濃度、トランスフェクション試薬の種類・濃度・作用時間および導入ベクターの濃度の調整を行った。本研究では、SH-SY5Y with pCMV-Tet3G 細胞株と Dox 誘導 GFAP 発現ベクターの一過性導入を確立できたが、安定細胞株の樹立には至っていない。本研究で得られた SH-SY5Y with pCMV-Tet3G 細胞株と Dox 誘導 GFAP 発現ベクターの一過性導入の確立により、分化誘導前の SH-SY5Y において、GFAP がエピジェネティック機構による神経細胞分化へ与える影響を明らかにすることが期待できる。また、Dox 誘導 GFAP 発現ベクターの再編成を行い、Dox による GFAP 発現誘導システムをもつ SH-SY5Y 安定細胞株樹立を引き続き進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

Fukasawa T, Kubota T, Negoro T, Maruyama S, Honda R, Saito Y, Itoh M, Kakita A, Sugai K, Otsuki T, Kato M, Natsume J, Watanabe K. Two siblings with cortical dysplasia: Clinico-electroencephalographic features. *Pediatr Int.*, 査読あり, 57, 2015, 472-475. DOI:10.1111/ped.12509

Sukigara S, Dai H, Nabatame S, Otsuki T, Hanai S, Honda R, Saito T, Nakagawa E, Kaido T, Sato N, Kaneko Y, Takahashi A, Sugai K, Saito Y, Sasaki M, Goto Y, Koizumi S, Itoh M. Expression of astrocyte-related receptors in cortical dysplasia with intractable epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 査読あり, 73, 2014, 798-806. DOI:10.1097/NEN.0000000000000099.

Otsuki T, Honda R, Takahashi A, Kaido T, Kaneko Y, Nakai T, Saito Y, Itoh M, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M. Surgical management of cortical dysplasia in infancy and early childhood. *Brain Dev.*, 査読あり, 35, 2013, 802-809. DOI:10.1016/j.baraindev.2013.04.008

Leventer RJ, Jansen FE, Mandelstam SA, Ho A, Mohamed I, Sarnat HB, Kato M, Fukasawa T, Saito H, Matsumoto N, Itoh M, Kalnins RM, Chow CW, Harvey AS, Jackson GD, Crino PB, Berkovic SF, Scheffer IE. Is focal cortical dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. *Epilepsia*, 査読あり, 55(3), 2014, e22-e26. DOI: 10.1111/epi.12533.

Munakata M, Watanabe M, Otsuki T, Itoh M, Uematsu M, Saito Y, Honda R, Kure S. Increased Ki-67 immunoreactivity in the white matter in hemimegalencephaly. *Neurosci Lett.*, 査読あり, 548, 2013, 244-248. DOI:10.1016/j.neulet.2013.05.033.

Inoue T, Kawawaki H, Kuki I, Nabatame S, Tomonoh Y, Sukigara S, Horino A, Nukui M, Okazaki S, Tomiwa K, Kimura-Ohba S, Inoue T, Hirose S, Shiomi M, Itoh M. A case of severe progressive early-onset epileptic encephalopathy: unique GABAergic interneuron distribution and imagings. *J Neurol Sci.*, 査読あり, 327(1-2), 2013, 65-72. DOI:10.1016/j.jns.2013.01.038.

[学会発表](計 3件)

伊藤雅之. てんかんの分子病態学: てんかん原性の病理と分子生物学. 第169回東北小児神経学研究会. 2015年3月14日. 仙台.

伊藤雅之. てんかんはどうして起こるのか? ~てんかんの病理から考える~. 第23回(ELPS)-2014 春季 仙台てんかん医学市民講座. 2014年6月7日. 仙台.

伊藤雅之, 鋤柄小百合. 小児難治性てんかんの脳皮質形成異常の原因遺伝子と発生病態の解明のための分子生物学的研究. 第25回てんかん治療研究会. 2014年3月7日. 大阪.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

神原 崇文 (SAKAKIBARA TAKAFUMI)  
奈良県立医科大学・小児科・助教  
研究者番号：60570075

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

伊藤 雅之 (ITO MASAYUKI)  
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研  
究センター・神経研究所疾病研究第二部・室  
長

研究者番号：50243407