

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670486

研究課題名(和文)小児難治性てんかんの原因究明のための遺伝子解析技術を駆使した多角的研究

研究課題名(英文)Multiple approaches of molecular and genetic analyses for pathophysiology of intractable epilepsy in childhood

研究代表者

伊藤 雅之(Masayuki, Itoh)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本邦のてんかんの有病率は約1.0%で、その70%は小児期に罹患する頻度の高い疾患である。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ない。

本研究で対象とする大脳皮質形成異常(FCD)と片側巨脳症(HME)は大脳皮質の一部に形成異常がみられる疾患で、当施設で管理している病理標本と凍結組織、同一患者血液からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いてゲノムレベルでの原因遺伝子解析を行った。その結果、28症例を解析し、HME 1例に病巣部の遺伝子異常を約15%の割合で病変部の体細胞変異を、FCD 4例で胚細胞のヘテロ接合体異常を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is known that prevalence of epilepsy is estimated about 1.0 % of peoples, and among them childhood patients occupy about 70%. The pathologies of childhood intractable epilepsy are quite a few brain malformations; those majorities are focal cortical dysplasia (FCD) and hemimegalencephaly (HME). In the present study, we revealed genetic and molecular pathomechanism of FCD and HME.

After obtained an informed consent and permitted by the committee of the institute for the study, we performed genetic analysis of 28 patients with FCD or HME by the next generation sequencer. Then, we confirmed the genetic variants by the Sanger sequencer and the currently variant ratio by the pyrosequencing method. As the results, we discovered one somatic mutation patient and four germline mutation patients. Moreover, we revealed that the genetic mutations lead to form dysmorphic cells and cell migration disruption by in vivo and in vitro studies.

研究分野：発達病態学

キーワード：てんかん 大脳皮質形成異常 次世代シーケンサー 体細胞変異

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんの有病率は約1%で、その約70%は小児期に罹患する比較的頻度の高い疾患である。小児難治性てんかんのうち、脳形成障害を伴うものは少なくない。近年、これらのてんかん病巣の切除や離断などにより良好な経過を取る症例が増えている。一方、こうした疾患の病因・病態の解明は免疫組織学的解析や電気生理学的解析にとどまり、疾患体系の分類学から広がりを見ない。我々は、てんかんを有する滑脳症の GABA 作動性介在神経細胞の移動障害 (*Acta Neuropathol* 2008) および II 型滑脳症の原因遺伝子 FUKUTIN のヒト脳組織内の発現分布 (*Brain Dev* 2004, *J Neuropathol Exp Neurol* 2003) を明らかにし、分子・細胞病態を解明してきた。また、難治性てんかんを有する大脳皮質形成異常 (FCD) の神経細胞の K-C1 イオンポンプの異常を解明し (*Epilepsia* 2007)、分化異常を明らかにした (*J Neuropathol Exp Neurol* 2012, *Brain Res* 2012, *J Neurol Sci* 2012)。これまで病因へのアプローチに手を拱いていたが、新たな技術を多角的に応用し原因遺伝子を究明する。

FCD 及び片側巨脳症 (HME) は大脳皮質の一部だけに形成異常がみられる疾患で、他の部分は正常なことから、神経幹細胞の分裂する際に何らかの遺伝子異常が単一細胞に入り、その異常が分裂を繰り返した場所だけに生じたもの (体細胞変異) と考えられる。一方、近年の遺伝子解析技術はゲノムレベルでの網羅的解析を可能にした。全ゲノムを対象に数的異常を高精度に解析する CGH (Comparative genomic hybridization) アレイ技術と次世代シーケンサーによるエキソーム解析、脳組織から神経細胞の核だけ取り出す cell sorting 技術を組み合わせる。また、当施設はてんかん外科手術を有する国内有数の施設であり、臨床データのみならず病理標本や凍結組織を管理している。こうした研究環境を基盤に、新しい遺伝子解析技術を多角的に応用することで、FCD 及び HME の原因遺伝子を探求する。

## 2. 研究の目的

本邦のてんかん有病率は約1%で、精神・神経疾患のうち患者数の多い疾患の一つである。その約70%は小児期に発症し、治療抵抗性を示すものが少なくない。このような小児難治性てんかんでは行動異常や知的障害を合併することが多く、家庭生活や学校生活を困難にしている。その原因の多くは大脳皮質異形成などの先天性脳形成障害を伴うものであるが、病巣切除や離断などにより良好な経過を取る症例が増えてきている。一方、小児てんかんの大部分は原因遺伝子が未同定である。本研究では、多方面の既存研究技術を駆使し、今までにない新しい視点から小児難治性てんかんの原因を解明する。

我々の施設は国内有数のてんかん手術例

を有し、その多くは先天性脳形成障害を伴う症例である。こうした小児難治性てんかんの原因を外科的切除組織に求めることが出来るが、その病因・病態の解明は組織学的解析や電気生理学的解析による疾患体系の分類学にとどまり、未だ原因遺伝子の同定に至っていない。本研究では、十分な臨床情報を有する多数例の試料を用いて、小児難治性てんかんの代表的疾患である FCD と HME を対象に、我々が独自に開発した新たな技術により、効率的なてんかんの原因遺伝子の探求を行なう。

## 3. 研究の方法

本研究への参加の了解を得た小児難治性てんかん患者で外科手術を受け、臨床および病理学的に FCD 及び HME と診断された脳組織および血液 DNA を対象とする。この FCD 及び HME 病巣の神経細胞 DNA 抽出と同一患者血液の DNA 抽出を行い、高精度 CGH アレイの反応と解析を行なう。本研究では、純粋に病巣の神経細胞だけを検討する。この行程が重要である。これにより、各症例で共通にみられるゲノム変化を探し出し、脳病巣由来神経細胞 DNA と血液由来 DNA の両方でサンガー法による実際のゲノムの異常を検証する。さらに、パイロシーケンサーによる遺伝子異常を有するアレルの比率を明らかにした。また、発現確認のため免疫組織化学およびウエスタンブロット法を行なう。これらの結果、得られた FCD 及び HME の原因遺伝子候補の機能障害を培養神経細胞で検証することで、FCD 及び HME の原因遺伝子を特定する。

本研究の対象: 対象は、本研究への参加の了解を得た難治性てんかん患者で外科手術を受け、FCD 及び HME と臨床および病理学的に診断された脳組織および血液 DNA の揃っている 28 症例とした。

FCD 及び HME の病巣神経細胞 DNA および同一患者血液由来 DNA の抽出と CGH アレイ解析、エキソーム解析

① FCD 及び HME 病巣の神経細胞 DNA 抽出: FCD の凍結組織をホモジナイズし、濃度勾配超遠心により細胞核の成分だけを取り出した。この溶液にあらかじめ Alexa488 で標識した神経細胞核抗体である NeuN 抗体 (Sigma) を一晚反応させる。フィルターなどで洗浄後、Cell sorter (BD 社 FAC-Scan Aria II) で Alexa488 陽性細胞だけを回収した。② 同一患者血液の DNA 抽出: 同一患者から得た約 1ml の血液を Qiagen Blood DNA kit を用いて DNA 抽出を行なった。③ 検体 DNA の処理と CGH アレイの反応と解析: ①②で得た各 1 $\mu$ g の DNA を Cy3、Cy5 で標識し、Agilent CGH アレイ (SurePrint G3 human CGH マイクロアレイ 1M) にハイブリダイズ反応を 40 時間行なった。洗浄後、Agilent C scanner と control software でデータを収集し、Agilent Genomic Workbench で解析した。④同様に得られた DNA で次世代シーケンサーによるエキソーム

解析を行った。

#### 遺伝子解析と検証

①得られた結果より、脳病変特異的な遺伝子異常と脳病変と血液に共通の遺伝子異常を分けて調べた。異常が見つかった遺伝子について、サンガー法による確認とパイロシークエンスによる遺伝子異常の割合を調べた。②さらに、その異常遺伝子の発現について、免疫組織化学およびウエスタンブロット法にて検証した。

#### モデル細胞と動物による検証

同定した原因遺伝子の患者データベースにおける頻度や臨床像の特徴などを検証する。①発現ベクターの作製と培養細胞へのトランスフェクション：候補となる原因遺伝子が gain-of-function かどうかを調べるため、異常遺伝子の発現ベクターを作成し、HeLa 細胞にとランスフェクションし、形態及び発現解析を行った。②さらに、E14.5 マウス胎仔脳室内へトランスフェクションし、P0 で観察し、細胞移動障害を調べた。③これらの結果から、原因遺伝子を同定し、患者臨床から臨床像の特徴などを解析した。

本研究は、ヒトを対象とする臨床研究に関する倫理指針などに則り、本施設に既設されている倫理委員会の承諾を得て行われた。また、遺伝子改変に関する実験において、既設の組換え DNA 安全委員会の承認を得ている。研究へのインフォームドコンセントの取得に際しては、プライバシーの保護や安全の確保を含め被験者の人権を最大限に尊重する。また、臨床情報を含む個人情報当センター内 Translational Research Center が管理する。

#### 4. 研究成果

対象とした 28 症例の遺伝子解析から、10 例にミスセンス変異と 1 塩基欠失があった。この 10 例のサンガー法では 2 例に遺伝子変異が確認できた。サンガー法による変異アレル率は約 10~50%であった。さらに、これらの症例の血液由来 DNA の遺伝子変異解析の結果、HME の 1 例で脳組織特異的な変異が確認でき、4 例に脳組織と血液由来 DNA 共通の遺伝子異常が見つかった。前者について、パイロシークエンスを行った結果、約 10-15%の割合で、脳病変部に遺伝子異常があることが分かった。

さらに、病因性を明らかにするために特定し得た遺伝子変異について、病理組織標本のウエスタンブロット法による発現解析の結果、gain-of-function であることを明らかにした。

作製した遺伝子異常の発現ベクターを HeLa 細胞へとランスフェクションした結果、細胞の大型化と形態学的異形成がみられた。また、遺伝子異常発現ベクターを作成し、マウス胎仔脳室内エレクトロポレーションによる解析の結果、神経細胞の大型化と移動障害が生じることを明らかにした。

これらの結果から、今回発見した体細胞変異は gain-of-function による神経細胞の形態形成と移動障害を引き起こすところを明らかにした。このことが、小児期に生じる難治性てんかんの発症病態となっていることと考えられる。これらの成果は、新しい治療法開発の基盤となることが期待される。現在、作成中である CRISP/Cas9 による遺伝子改変マウスを用いた解析により、さらにその展開が加速されるものと考えられる。

#### 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)

- (1) Fukasawa T, Kubota T, Maruyama S, Saito Y, Itoh M, Kakita A, Sugai K, Otsuki T, Kato M, Natsume J. Two siblings with cortical dysplasias: clinico-electroencephalographic features. *Pediatr Int* 2015;57(3):472-475. doi: 10.1111/ped.12509. (査読有り)
- (2) 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* 73:798-806, 2014. doi: 10.1097/NEN.000000000000099. (査読有り)
- (3) 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* 2013;35:802-809. doi: 10.1016/j.braindev.2013.04.008. (査読有り)
- (4) Jansen F, Simone Mandelstam S, Ho AW, Mohamed I, Sarnat H, Kato M, Fukasawa T, Saitsu H, Matsumoto N, Itoh M, Kalnins R, Chow C, Harvey S, Jackson G, Peter C, Berkovic S, Scheffer I, Leventer R. Is Focal Cortical Dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. *Epilepsia* 2014;55(3):e22-e26. doi: 10.1111/epi.12533. (査読有り)
- (5) 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* 2013;548:244-8. doi: 10.1016/j.neulet.2013.05.033. (査読有り)
- (6) Inoue T, Kawawaki H, Kuki I, Nabatame S, Tomonoh Y, Sukigara S, Horino A, Nukui M, Okazaki S, Tomiwa K, Kimura-Ohta 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* 2013;327:65-72. doi: 10.1016/j.jns.2013.01.038. (査読有り)

[学会発表] (計9件)

- (1) 伊藤雅之. 形成障害. 第11回神経病理コアカリキュラム教育セミナー. 第56回日本神経病理学会総会学術研究会. 九州大学百年講堂, 福岡. 平成27年6月3日.
- (2) 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. 仙台. 平成27年3月14日.
- (3) Itoh M. Comparative Neuropathology of Lissencephaly with ARX Mutation: Consideration of Neocortical Interneuron Distribution. Symposium 3. The 5th Congress of the European Academy of Paediatric Societies. Barcelona, Spain, 19, October, 2014.
- (4) 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. 仙台. 2014年6月7日.
- (5) 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. 大阪. 2014年3月7日.
- (6) Itoh M. The way of interneuron distribution in human neocortex: Lesson from various lissencephalies. 9th FENS Forum of Neuroscience. Milan, Italy. 5-9, July, 2014.
- (7) Sukigara S, Otsuki T, Nabatame S, Honda R, Takahashi A, Kaido T, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Saito Y, Goto Y, Koizumi S, Itoh M. Astrocytic P2Y receptors contribution to epileptogenesis. The 30th International Epilepsy Congress. Montreal, Canada, 23-27, June 2013.
- (8) Itoh M, Okazaki S, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. Interneuron pathology associated with ARX mutation. The 30th International Epilepsy Congress. Montreal, Canada, 23-27, June 2013
- (9) Itoh M. Disrupted migration of GABAergic interneurons lead to the epileptogenesis: Interneuron pathology associated with ARX mutation. The 21st World Congress of Neurology. Vienna, Austria, 21-26, September, 2013.

[図書] (計0件)

なし。

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)  
なし。

○取得状況 (計0件)  
なし。

[その他]

ホームページ等  
<http://www.ncnp.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。