

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15530

研究課題名(和文)mTOR経路の異常により起こる巨脳症の診断法および治療法開発

研究課題名(英文)Genetic and biochemical analyses of mTOR related megalencephaly

研究代表者

齋藤 伸治(Saitoh, Shinji)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00281824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：巨脳症患者28例を集積し、27例に15遺伝子を搭載した遺伝子パネルを用いてIon PGMによる次世代シーケンス解析を行った。1例は直接全エクソーム解析を行った。その結果、13例に原因となる遺伝子変異を同定した(PTEN 6例、AKT3 3例、PIK3R2 3例、PIK3CA 1例)。1例はモザイクであり脳組織でのみ変異が同定された。変異陽性例のうち7例に株化リンパ芽球を用いてリン酸化S6蛋白のウエスタンブロットを行い、7例全例でリン酸化S6蛋白の発現増加を認めた。変異陰性例8例中1例に発現増加を認めた。私たちの開発した診断法は遺伝性巨脳症の診断に有用である。

研究成果の概要(英文)：Next generation sequencing based targeted panel analysis was performed on 28 patients with megalencephaly. We detected a pathogenic mutation in 13 of 27 patients (48.1%) including one patient with a mosaic mutation which was only detected in the affected brain tissue. Western blot analysis using lymphoblastoid cell lines established from peripheral leukocytes with phospho-S6 antibody was performed in 7 mutation-positive patients, and significantly increased phospho-S6 representing abnormal activation of mTOR pathway was found in all 7 patients. Increased phospho-S6 was also detected in 1 of 8 mutation-negative patients. Collectively, our combination of genetic and biochemical analyses is useful for diagnosis of genetic megalencephaly syndromes.

研究分野：小児科

キーワード：巨脳症 mTOR 次世代シーケンシング

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性巨脳症は進行性の頭囲拡大、発達遅滞、てんかんに各種合併症を伴う先天性疾患である(図1)。臨床的にはいくつかの亜型が知られている。てんかんは難治性になりやすく、時にてんかん重積から死に至ることがある。根本的な治療法はなく、対症療法にとどまる。2012年にこれらの疾患は細胞増殖の重要な経路であるmTOR系に属する遺伝子の機能獲得型変異が原因であることが明らかにされた(Riviere et al., Nat Genet 2012)。これらの機能獲得型変異が体細胞突然変異で起こると、片側巨脳症や皮質形成障害の原因となることが明らかになり、mTOR系機能異常は脳形成異常の重要な一群として認識されるようになった。mTORには阻害剤があり、既に抗がん薬として一般的に使用されている。mTOR阻害剤はさらに結節性硬化症において使用されており、合併する腫瘍性病変のみならず、てんかんに対する治療効果が注目されている。そして、結節性硬化症に見られる精神症状に対しても有効性が期待されている。遺伝性巨脳症患者においてもmTOR阻害剤を用いることで、症状を改善することが理論的には考えられる。診断面では、これらの疾患は症状が重なり合っているために、遺伝子解析には多数の遺伝子を解析することが必要である。また、脳組織でのmTOR系機能解析は行われていたが、血液を用いた簡便な機能解析は報告されていない。

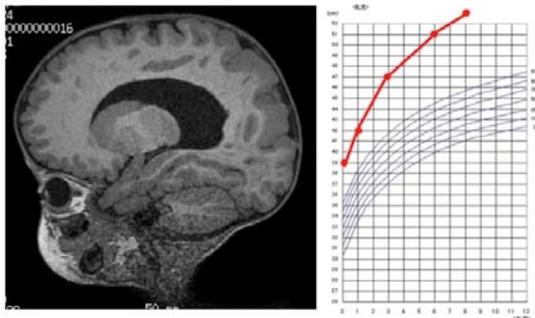


図1. 遺伝性巨脳症のMRI所見と頭囲の経過。本児で頭囲は+6SDにおよび著しい進行性巨脳症が示されている。本研究においてAKT3に突然変異が同定された。

## 2. 研究の目的

私たちはmTOR系に属する15遺伝子を搭載した遺伝子解析パネルを作成し遺伝性巨脳症患者に原因変異を同定することが可能となった。さらに、患者から樹立したリンパ芽球から蛋白を抽出し、mTOR系の機能を反映するリン酸化S6蛋白をウェスタンブロットで測定したところ、変異陽性例では全例で明確な機能亢進を同定した。これらの解析の組み合わせで、mTOR系機能亢進による遺伝性巨脳症の

診断方法を確立できたと考えている。本研究では、私たちの開発した診断法の有用性を検討することを目的にする。現時点では適当なモデル動物は存在しない。そこで、ゲノム編集の方法を用いて変異導入マウスを作成し、mTOR阻害薬の効果と有害反応を検討することを目指した。

## 3. 研究の方法

研究の方法は以下のとおりである。

### 1) ターゲット遺伝子パネル解析

本研究の対象は原因不明の頭囲拡大(+2SD以上)に加えてなんらかの神経症状(発達遅滞、てんかんなど)を示した患者とした。

15遺伝子(表1)を搭載したAmpliSeqパネル(Thermo Fisher Scientific)を用い、IonPGMシステムにて解析を行った。得られたデータはCLC Genomic Workbench 7.0 (CLC bio)にて解析を行った。変異が同定されなかった場合は全エキソーム解析を実施した。全エキソーム解析は理化学研究所との共同研究で実施した。

本研究は名古屋市立大学大学院医学系研究倫理審査委員会において承認された。また、解析にあたっては両親から書面による同意を得た。

表1. 遺伝子パネル搭載遺伝子とカバレッジ

| 遺伝子    | 染色体 | エクソン数 | アンプリコン数 | 塩基総数  | カバレッジ(%) |
|--------|-----|-------|---------|-------|----------|
| PIK3CA | 3   | 20    | 34      | 3407  | 98.3     |
| PIK3CB | 3   | 22    | 30      | 3433  | 98.7     |
| PIK3CD | 1   | 22    | 37      | 3355  | 97.6     |
| PIK3R1 | 5   | 18    | 23      | 2506  | 100      |
| PIK3R3 | 1   | 10    | 14      | 1486  | 100      |
| PIK3R2 | 19  | 15    | 19      | 2337  | 79.2     |
| PTEN   | 10  | 9     | 12      | 1302  | 97.6     |
| PDPK1  | 16  | 14    | 19      | 1811  | 95.3     |
| AKT3   | 1   | 14    | 17      | 1624  | 98.8     |
| AKT2   | 19  | 14    | 18      | 1687  | 98.9     |
| AKT1   | 14  | 13    | 22      | 1573  | 97.5     |
| RHEB   | 7   | 8     | 8       | 635   | 95.1     |
| MTOR   | 1   | 57    | 69      | 8220  | 99.7     |
| TSC2   | 6   | 42    | 61      | 6006  | 96.5     |
| TSC1   | 9   | 22    | 29      | 3834  | 100      |
| 計      |     | 300   | 412     | 43216 | 97.4     |

### 2) リン酸化S6蛋白ウエスタン解析

末梢血白血球からEBウイルスで株化リンパ芽球を樹立した。株化リンパ芽球から蛋白を抽出し、抗リン酸化S6蛋白抗体(Cell Signaling Technology)および対照としてGAPDHを用いて、ウエスタンブロットにて測定した。

### 3) モデルマウスの作成

CRISPR/Cas9によるモデルマウスの作成は名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センターにて実施した。変異ノックインマウスの作成はCRISPR/Cas9システムに組

み替えの鋳型となる一本鎖 DNA を同時に注入し、組み替え体を得ることを試みた。

#### 4. 研究成果

##### 1) ターゲット遺伝子パネル解析結果および全エクソーム解析

巨脳症患者 28 例を集積し、27 例に 15 遺伝子を搭載した遺伝子パネルを用いて Ion PGM による次世代シーケンス解析を行った。1 例は直接全エクソーム解析を行った。その結果、13 例 (46.4%) に原因となる遺伝子変異を同定した。内訳は、PTEN 6 例、AKT3 3 例、PIK3R2 3 例、PIK3CA 1 例であった。このようにターゲット解析での変異陽性率は高く、巨脳症患者の初期診断に有用と考えられる。

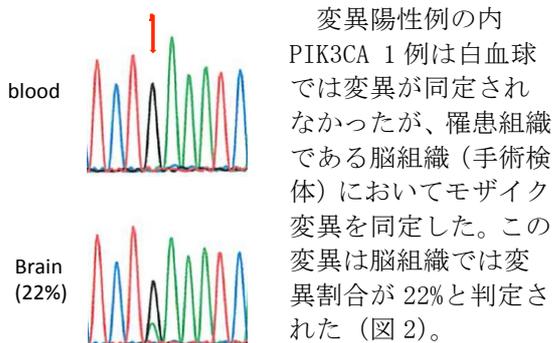


図 2. 血液と脳組織での PIK3CA 変異割合

さらに、変異陰性かつ後述のリン酸化 S6 蛋白の発現増加を認めた患者 1 例に対して、全エクソーム解析を実施した。その結果 SHOC2 に病因変異を同定した。SHOC2 はヌーナン症候群の原因遺伝子であり、Ras-MAPK 系の機能亢進を引き起こす。ヌーナン症候群は比較的大頭を示すため、一部巨脳症患者と症状がオーバーラップする。また、Ras-MAPK 系と mTOR 経路とは相互作用が知られており、mTOR 経路の亢進の原因の一つとして Ras-MAPK の機能亢進が存在することが示されたと考えている (図 3)。

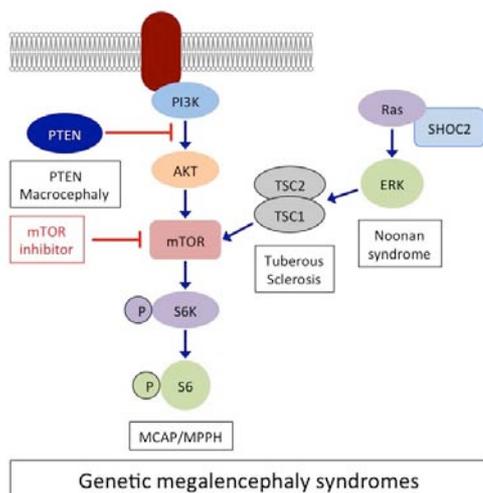


図 3. 遺伝性巨脳症に関連する経路の模式図。リン酸化 S6 (pS6) は最下流に位置するため、総ての原因を同定することに優れている。

次に、遺伝学的に診断が確定した患者の臨床症状について検討を行った。脳 MRI を比較すると、AKT3、PIK3R2 に変異を認めた例では巨脳症に加えて、皮質形成異常の合併を認めた。しかし、PTEN 変異例では皮質形成異常の合併は認めず、鑑別に有用と考えられた。PIK3CA 変異例は片側巨脳症の要素が強く、モザイク変異との結果と良く相関が見られた。図 4 に代表的な頭部 MRI を示す。

本研究において PTEN 変異が最も多く同定されたために、PTEN 変異例についての臨床症状をより詳細に検討した。その結果、PTEN 変異例では他の遺伝子に変異を有する例と比較して知的障害の程度は軽度であることが示された。さらに、突出した前額、鼻根平坦、水平な眉毛などの特徴的な顔貌が共通していることが明らかになった。頭部 MRI において皮質形成障害を認めないことと合わせて、臨床的に疑い得る疾患であることが考えられた。PTEN 変異例の顔貌特徴を図 5 に示す。

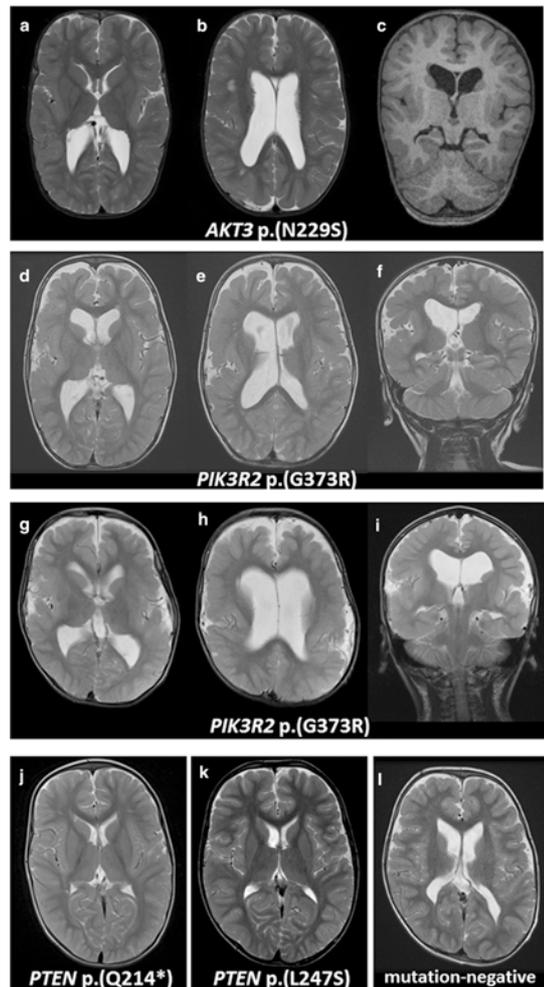


図 4. 変異陽性例での頭部 MRI

PTEN 変異例では大脳皮質の形成異常を認めないが、AKT3 と PIK3R2 変異例では広汎な多小脳回を含む皮質形成異常を認める。



図 5. PTEN 変異陽性例の顔貌特徴  
突出した前額、鼻根平坦、水平な眉毛などの特徴的な顔貌を認める。写真の掲載については代諾者の許諾を得ている。

## 2) リン酸化 S6 蛋白ウエスタン解析結果

変異陽性例のうち 7 例に株化リンパ芽球を用いてリン酸化 S6 蛋白のウエスタンブロットを行った。その結果、7 例全例で mTOR 経路の活性を示すリン酸化 S6 蛋白の発現増加を認めた。変異陰性例 8 例にもリン酸化 S6 蛋白のウエスタンブロットを行い、1 例に発現増加を認め、mTOR 経路の機能亢進を確認した(図 6)。

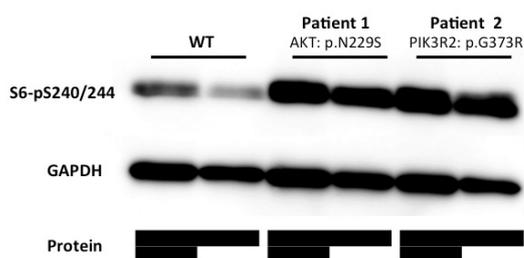


図 6. 代表的なリン酸化 S6 蛋白ウエスタンブロットの結果。変異陽性例では上段のリン酸化 S6 蛋白の発現亢進を認める。GAPDH は内部対照。下段は用いたタンパク量を示す。

本実験から、末梢血白血球由来リンパ芽球を用いたウエスタンブロット解析は機能解析として有用と考える。また、変異陰性例のなかにリン酸化 S6 亢進例が存在し、実際、その中からエキソーム解析で原因変異を同定できた。このように、mTOR 系の関与を生化学的に示すことができる意義は高いと考える。今後は、株化せずに白血球から直接解析できるかどうかを調べたい。

このように、私たちが開発した遺伝子パネ

ル解析と生化学的解析の組み合わせは、巨脳症患者の診断と病態解明に有用であることが明らかになった。mTOR 経路には阻害剤が存在するため、私たちの開発した診断法は mTOR 阻害剤の適応となる患者を抽出するために重要な役割を有すると考える。

## 3) モデルマウスの作成

モデルマウスの作成については期間内に作成には至らなかった。しかし、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術の取得のために MAGEL2 遺伝子の改変を試みた。その結果、二重鎖切断再結合による indel 変異の導入はできたが、相同組み替えによる変異導入は効率が低く実験を繰り返しても得られなかった。そのため、現在、効率を上げるための手法の改善に取り組んでいる。

## 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 4 件)

1. Negishi Y, Miya F, Hattori A, Johmura Y, Nakagawa M, Ando N, Hori I, Togawa T, Aoyama K, Ohashi K, Fukumura S, Mizuno S, Umemura A, Kishimoto Y, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Nakanishi M, Saitoh S. A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly. *BMC Med Genet* 2017;18:4. doi: 10.1186/s12881-016-0363-6.
2. Kato K, Miya F, Hori I, Ieda D, Ohashi K, Negishi Y, Hattori A, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. A novel missense mutation in the HECT domain of NEDD4L identified in a girl with periventricular nodular heterotopia, polymicrogyria and cleft palate. *J Hum Genet*. 2017;62:861-863. doi: 10.1038/jhg.2017.53.
3. Shigemizu D, Miya F, Akiyama S, Okuda S, Boroevich KA, Fujimoto A, Nakagawa H, Ozaki K, Niida S, Kanemura Y, Okamoto N, Saitoh S, Kato M, Yamasaki M, Matsunaga T, Mutai H, Kosaki K, Tsunoda T. IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment with split read analysis. *Sci Rep*.

2018;8:5608.

doi:10.1038/s41598-018-23978-z.

4. Kato K, Mizuno S, Inaba M, Fukumura S, Kurahashi N, Maruyama K, Ieda D, Ohashi K, Hori I, Negishi Y, Hattori A, Saitoh S. Distinctive facies, macrocephaly, and developmental delay are signs of a PTEN mutation in childhood. *Brain Dev.* 2018 May 8. [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.braindev.2018.04.008.

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 堀いくみ、根岸豊、宮冬樹、角田達彦、金村米博、小崎健次郎、齋藤伸治. PI3K-AKT-mTOR 経路異常による巨脳症の臨床的・分子遺伝学的・生化学的検討. 第 62 回日本人類遺伝学会学術集会（神戸）2017/11/16-18. 口頭発表、国内

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 伸治 (SAITOH, Shinji)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：00281824

(2) 研究分担者

中西 真 (NAKANISHI, Makoto)

東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：40217774