

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791620

研究課題名(和文) 外科摘出標本を用いたてんかん原性脳皮質形成異常症の遺伝子探求

研究課題名(英文) A preliminary study of genetic analysis of surgical specimens from patients with focal cortical dysplasia.

研究代表者

齋藤 貴志 (Saito, Takashi)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・病院・医師

研究者番号：10532533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：皮質形成異常症は極難治なてんかんとしてし、発達にも大きな影響を与える。治療や予防法の開発のためにも、皮質形成異常症の原因は明らかにする必要がある。皮質形成異常が、体細胞変異により生じると仮定し、皮質形成異常組織と同一患者の遺伝子を比較することにより、原因となる染色体異常や遺伝子異常を特定できると考えられる。我々は、この仮説を検証するため、少数例で病変部-正常組織ペアのゲノムを使用し、アレイCGHとエクソーム解析を行って解析を行ったが、原因となる異常を検出することはできなかったものの、ターゲットシーケンスでは異常の検出の可能性はある。遺伝子変異の検出には、変異率が高い組織を用いる必要がある。

研究成果の概要(英文)：Cortical dysplasia is a congenital anomaly, often causing intractable epilepsy in children and greatly affecting their development. A clear understanding of the underlying cause is necessary for developing treatment and prevention strategies for cortical dysplasia. We postulated that cortical dysplasia is caused by somatic mutations in cortical neurons at a certain stage of embryonic development. Based on this hypothesis, we attempted to compare the genome of cortical dysplasia tissue and healthy tissue from the same patient. Array comparative genomic hybridization (array CGH) and whole-exome sequencing were performed using DNA from the lesion and healthy blood samples from the same patient. Array CGH and exome sequencing failed to detect causal chromosomal abnormalities or causal genes. We surmise that to detect genetic abnormalities in patients with cortical dysplasia, lesions with a high incidence of somatic mutations should be used for genetic analysis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：7304

キーワード：皮質形成異常 てんかん

1. 研究開始当初の背景

てんかん、熱性けいれんなどのけいれん性疾患は、全人口の約 1%が罹患すると言われる、中枢神経疾患で最も頻度の高い疾患である。限局性皮質形成異常症(片側巨脳症を含む、以下皮質形成異常症)は難治性てんかんの原因として多く見られ、難治てんかんとして乳児期ないし小児期に発症し、極めて難治なてんかんとして経過することが多く、発達にも大きな影響を与える。治療や予防法の開発のためにも、研究開始当時には不明であった皮質形成異常症の原因を明らかにする必要があった。

研究開始当時、皮質形成異常症に関して、放射線学的、電気生理学的な検討が多数行われ、その疾患概念が広く知られるようになってきていた。画像診断、生理学的計測技術の進歩とともに、高精細な MRI 画像や脳磁図などを用いて、診断技術も進歩してきた。これらを背景に近年、皮質形成異常症に対しては広く外科的治療で病巣が切除されるようになり、病理学的報告も増加してきていた。

皮質形成異常症の患者では、大脳半球の一部～半球全体に形成異常が認められるが、ほとんどの例では対側半球や大脳以外には異常は認められない。このことから、我々は、大脳発生初期に、一部の細胞に遺伝子異常が生じ、この細胞から生じた組織に体細胞変異によって皮質形成異常が起きる、との仮説を考えた。

この仮説を検証するため、皮質形成異常組織と同一患者の遺伝子を比較することにより、原因となる染色体異常や遺伝子異常を特定できると考えられた。まず、少数例で病変部-正常組織ペアのゲノムを使用し、アレイ CGH を行って解析を行う事を計画した。しかし、実験期間中に、この分野での研究の進展が海外の他グループから報告されたため、計画を修正していった。

2. 研究の目的

特に小児期の難治性てんかんの原因として多く見られる皮質形成異常症は、研究開始時点では原因が不明であった。遺伝的異常のほか、大脳の発生中の血管障害、難治てんかんとして乳児期ないし小児期に発症し、極めて難治なてんかんとして経過することが多く、発達にも大きな影響を与える。治療や予防法の開発のためにも、皮質形成異常症の原因は明らかにする必要がある。皮質形成異常症の患者では、大脳半球の一部～半球全体に形成異常が認められるが、ほとんどの例では対側半球や大脳以外には異常は認められない。このことは、大脳発生初期に、一部の細胞に遺伝子異常が生じ、この細胞から生じた組織に体細胞変異によって皮質形成異常が起きる、と考えられる。皮質形成異常組織と同一患者の遺伝子を比較することにより、原因となる染色体異常や遺伝子異常を特定で

きると考えられる。

3. 研究の方法

研究は、研究代表者所属施設倫理委員会にて研究承認を取得、文書により患者あるいは代諾者により同意を得たものを使用した。皮質形成異常症が体細胞変異で生じるとの仮説を設定し、病巣部での体細胞変異が、染色体の微小領域の欠失あるいは重複が生じる場合と、点変異が生じる場合を想定した。これらの想定に基づき、病巣部と正常組織(白血球)より遺伝子を抽出し、同一患者内での変化を検出することで原因遺伝子(遺伝子群)を検出するように下記のように研究を行った。

(a)ゲノムの抽出

病変部または白血球からは、QIAGEN 社製 kit を用いて、製造者のマニュアルに準じてゲノムを抽出した。病変部は切除後凍結保存されているものを使用した。十分な量のゲノムを抽出することが困難な場合、Sigma-Aldrich 社製の Whole genome amplification kit を用いて増幅を行った。検体は片側巨脳症患者を選んで行ったが、これはアレイ CGH を行う際には良好な品質のゲノム DNA を比較的多く必要とするためであった。

(b)アレイ CGH

2 例で病変部-正常組織ペアのゲノムを使用した。

アレイ CGH は、アジレント社製の sure print Whole Human Genome DNA マイクロアレイを使用し、マニュアルに従ってハイブリダイゼーションを行った。マイクロアレイスライドからは同社製スキャナで画像データを取得し、Feature Extraction ソフトウェア、Genomic Work Bench ソフトウェアで解析を行った。

(c)エクソーム解析

2 例で病変部と正常組織のエクソーム解析を行った。症例は病変の組織型が類似しており、遺伝的背景・病態が共通の基盤を持つ、と考えられる症例を選択するため、脳室から病変部まで画像上つながるように異常信号がみられる(組織上は異所性神経細胞、balloon cell が出現しており、細胞の遊送障害、機能障害を反映していると考えられる。) trans mantle sign が認められる例を選択した。

(d)病理学的組織解析

より均一な遺伝的異常を持つと考えられる組織を選択するため、腫瘍性疾患に注目した。小児期によく見られるてんかん原性腫瘍は、多くの場合低悪性度の神経膠腫(ganglioglioma、dysmorphic neuroepithelial tumor など)であり皮質形成異常症を合併することがある。これらの腫瘍は、てんかんを高率に合併する一方、神経学的異常を伴うことは稀である。これらの臨

床的、組織学的特徴から皮質形成異常症とてんかん原性低悪性度神経膠腫との発症の共通性を指摘する研究者もある (Palmini et al など)。また、組織学的に ganglioglioma、FCD では mTOR 系の亢進が報告されており、さらに、mTOR 系の異常や組織学的類似性から、てんかん原性低悪性度神経膠腫、FCD に加えて結節性硬化症も類似した病態を指摘する研究者もある。最近 12 年間当院で切除を行ったてんかん原性腫瘍の小児例 30 例を検索したところ、1 例で FCD 2b 型を合併した ganglioglioma 例が認められた。

4. 研究成果

(a)アレイ CGH

片側巨脳症 4 例の結果では、アレイ CGH で染色体上に共通の微小欠失域、微小重複域は認められなかった。実験施行中に、Rivière, et al および Lee et al より、興味深い報告がなされた。それは、細胞の増殖や細胞の肥大などに関わる PI3K-AKT3-mTOR 系の遺伝子の変異が、片側巨脳症患者で見つかった、というものであった。さらに多くの場合、体細胞変異による発症であった。体細胞変異による発症という仮説はこれらの報告により指示されたが、変異はアレイ CGH で検証できる染色体の微小な重複、欠失ではなかった。このため、これ以上のアレイ CGH 解析は一度中断し、点変異を検出できるような研究手法に変更する必要があると考えられた。このため、次のステップとしてエクソーム解析を行うこととした。

(b)エクソーム解析

遺伝子変異が認められたものは、PAK2 (GTP binding protein のターゲットの一つ)、DCHS1 (procadherin superfamily、機能不明)、SAFB2 (estrogen receptor corepressor) などの 17 の遺伝子であり、中枢神経異常症との関連が明らかなものはなかった。既報でも、遺伝子異常が認められたものは片側巨脳症の一部の患者のみであり、皮質形成異常症ではまだ認められていないこと、この原因として、片側巨脳症よりも形態的異常が軽微な皮質形成異常症では、体細胞変異した細胞の割合が低いこと、検出が困難である可能性も考えられている。本例でも、組織としては transmantle sign 陽性で皮質形成異常症としては組織の変化が強い症例ではあったが、体細胞変異率が低いことが予想された。このため、実験手法を再考し、多数の症例を解析し、解析する遺伝子もこれまでに変異の報告されている PI3K-AKT3-mTOR 系遺伝子にしぼり、多数の例を解析することにより体細胞変異率の多い例での変異検出を期待するように実験計画を変更した。

(c)病理学的検索

形態的に ganglioglioma に FCD IIb を合併した例で、免疫組織学的検討を行った。

ganglioglioma と考えられる部分に neurofilament 陽性の ganglion cell が多数認められ、肥大型の astrocyte を含む著明なグリオシスが認められた。一部に pS6 蛋白、nestin 陽性の細胞も認められた。さらに周囲には FCD IIb でみられる皮質構築の異常、異常な神経細胞の出現、pS6 陽性の balloon cell の出現が認められた。これらは mTOR 系の活性化を伴う二つの組織型であるが、その基礎に共通の病態が存在することを示唆するものと考えられた。

さらに病態を解析するために、ganglion cell、balloon cell から DNA を抽出し、免疫組織化学的に明らかとなった mTOR 系の亢進を、遺伝子レベルで検索する必要があり、現在準備を進めている。

5. 考察今後の研究の展望

研究開始当初には原因不明だった皮質形成異常症の原因遺伝子がこれまで 6 例のみではあるが、PI3K-AKT3-mTOR 系の主として体細胞変異によって引き起こされる、ということが明らかになったことで、この分野は一気に研究者の注目を集めることになった。

本研究は、当初より体細胞変異による発症を仮定し研究を行っており、そのために患者検体の収集を継続してきた。アレイ CGH、エクソーム解析で異常を検出できなかった。これは、皮質形成異常症が染色体の微小な量的変化からは生じないことや、染色体の量的異常あるいは変異が前述のように少数の細胞の体細胞変異で生じている可能性があるから、と考えられる。現在、PI3K-AKT3-mTOR 系の遺伝子にしぼったターゲットシーケンスを準備しており、多数例での検討を開始している。また、特定の細胞腫 (フローサイトメトリーで神経細胞あるいはバルーン細胞、幼弱な細胞にしぼる)、組織から単一の細胞からの DNA を抽出する、など、組織全体ではなく、より異形成の強い限られた細胞 (種) のみ解析を行う、という手法も考えられる。

この分野の研究は端緒についたばかりであり、研究領域分野としては明らかにされていないものも多く残されている。

今後は、上記のもの他、PI3K-AKT3-mTOR 系以外の神経細胞の増殖、移動に関する遺伝子に関して遺伝子解析をすすめ、これまでにない原因を追及し、疾患の病体解明、治療を目指したいと考えている。

参考文献

- Lee, J. H., Huynh, M., Silhavy, J. L., Kim, S., Dixon-Salazar, T., Heiberg, A., et al. (2012). De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nature genet*, 44(8), 941-945.
- Rivière, J. -B., Mirzaa, G. M., O'Roak, B. J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R. L., et al. (2012). De novo germline and

postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nature genet*, 44(8), 934-940.

Palmini, A., Paglioli, E., & Silva, V. D. (2013). Developmental tumors and adjacent cortical dysplasia: single or dual pathology? *Epilepsia*, 54 Suppl 9, 18-24.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

LATE-ONSET EPILEPSY IN CHILDREN AFTER ACUTE FEBRILE ENCEPHALOPATHY WITH PROLONGED CONVULSIONS

Saito T, Saito Y, Sugai K, Nakagawa E, Komaki H, Kaneko Y, Kaido T, Takahashi A, Otsuki T, Sakuma H, Sasaki M

30th international epilepsy congress, 23rd-27th, June, 2013

the Palais des congres de Montreal, Montreal, Canada,

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 貴志 (Saito, Takashi)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・病院・医師

研究者番号：1032533