

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640027

研究課題名(和文)皮質異形成の病態機序：体細胞変異仮説の検証

研究課題名(英文) Pathogenesis of focal cortical dysplasia: possible mechanistic implication of somatic mutations

研究代表者

柿田 明美 (Kakita, Akiyoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80281012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん外科病理診断の経験から、限局性皮質異形成(FCD)は細胞内情報伝達系における体細胞変異が原因であるとの仮説を立てこれを検証した。難治てんかん原性脳組織がFCD type IIbの特徴を示す患者の凍結脳組織と血液を対象に、全エクソーム解析を行い、脳病巣特異的にMTOR遺伝子に超低頻度の体細胞変異を見出した。生化学的発現解析では、MTOR産生蛋白の下流に位置する蛋白の発現が亢進していた。In vitro系による発現解析でも、変異を強制発現させた場合には、同情報伝達系の機能が亢進していた。このように、MTORの体細胞変異が、FCD type IIbの病因であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We explore the possible involvement of somatic mutations in focal cortical dysplasia (FCD) Type IIb. We performed whole exome sequencing using brain and blood samples from nine of the FCD Type IIb subjects. Somatic MTOR mutations were identified. The effect of MTOR mutations on mTOR kinase signaling was evaluated. We identified four lesion-specific somatic MTOR mutations in six of 13 (46%) individuals with FCD Type IIb showing mutant allele rates of 1.11 - 9.31%. Functional analyses showed that phosphorylation of ribosomal protein S6 in FCD Type IIb brain tissues with MTOR mutations was clearly elevated compared with control samples. Transfection of any of the four MTOR mutants into HEK293T cells led to elevated phosphorylation of 4EBP, the direct target of mTOR kinase. We found low-prevalence somatic mutations in MTOR in FCD Type IIb, indicating that activating somatic mutations in MTOR cause FCD Type IIb.

研究分野：神経病理学

キーワード：てんかん 脳神経疾患 皮質異形成 体細胞変異 外科病理

1. 研究開始当初の背景

(1) てんかんは古くて新しい学問領域である。近年、この罹患率の高い症候群に対し文字通りメスが入られるようになったことから、その診療・研究の両面で神経病理学が関与する状況は一変した。すなわち、局在性難治てんかん患者に対する外科的切除脳を組織診断する機会が増え、このことは同時に、こうした標本リソースを用いたさまざまな研究を展開し得ることともなった。本研究申請者は、これまでのてんかん外科病理診断の経験から「臨床病理学的に distinct な entity を形成しているのではないか」、こうした可能性を思考させる症例の存在が気になっていた。限局性皮質異形成(FCD: focal cortical dysplasia) type II は、片側巨脳症や結節性硬化症とも組織学的特徴が類似しているものの、病巣の広がりや遺伝学的背景あるいは脳以外の症状の存在から、これらとは別の病態と捉えられてきた。

(2) 本研究を開始する時点で、片側巨脳症は AKT3 情報伝達系における体細胞変異が原因で生じるとの報告がなされた。そのことから、FCD は AKT3 情報伝達系のいずれかの分子における体細胞変異が原因ではないか、と考えた。

2. 研究の目的

FCD type II は、皮質神経細胞の配列異常に加え、dysmorphic neuron や balloon cell といった特徴的な形態異常を示す細胞が観察されるヒト難治性てんかん原性病巣の代表的な病態である。その組織学的特徴は、片側巨脳症や結節性硬化症のそれとも共通する。最近、片側巨脳症の原因として AKT3 情報伝達系における体細胞変異が報告されたことから、FCD においても同情報伝達系のいずれかの分子における体細胞変異が原因であるとの仮説を検証し、その分子病態を明らかにすることを目的とした。

体細胞変異は生殖細胞以外の細胞が分裂時に生じる DNA 変異である。近年の遺伝子解析技術により、癌や先天性疾患における単一遺伝子の体細胞変異が相次いで報告されている。しかしながら、体細胞変異率は著しく低いことから、通常の疾患原因遺伝子解析技術では同定が出来ない場合も多い。本研究では、全エクソーム解析を行い、原因遺伝子を同定し、次いで、その産生蛋白の発現を検証し、in vitro 系で同情報伝達系が活性化しているかどうかを検証した。

3. 研究の方法

本遺伝子解析研究について、患者本人あるいは保護者に文章を基に説明を行い、書面での同意が得られた患者を対象とした。難治てんかん原性病巣として、外科的摘出術が施行された脳組織を病理学的に解析し、FCD type I (n = 6)あるいは type II (type

IIa, n = 5; type IIb, n = 13)と診断した 24 名の患者の脳組織を用いた。同患者から採取した血液あるいは唾液を対照組織とした。各組織から DNA を抽出し FCD type IIb (n = 9)に対して全エクソーム解析を施行した。脳組織と対照組織から得られた DNA 配列情報は、体細胞変異検索ソフトを用いて比較し、脳病変組織に特異的な遺伝子変異の検索を行った。更に残る 15 例については、エクソームで同定された候補遺伝子の変異検索を行った。

Western blotting と免疫組織化学は抽出された FCD type IIb を示す脳組織を用いた。対照として組織学的に異常所見を指摘出来ないてんかん患者の脳組織(MCD: mild malformation of cortical development)の脳組織を用いた。

HEK293 細胞に患者脳に認められた MTOR の変異を発現するベクターを transfection し、情報伝達系の蛋白発現を in vitro の実験系で解析した。

4. 研究成果

FCD type IIb (n = 6)で MTOR の一塩基置換変異を同定した。脳組織における変異は 1-9%と低頻度であった。しかしながら、血液あるいは唾液においては 0.1%未満と超低頻度であったことから、真の変異であると判断した。FCD type I および type IIa の組織には同変異は認められなかった。

Western blotting では、MTOR 変異の認められた脳組織におけるリン酸化 S6 蛋白の発現が有意に亢進していた。免疫組織化学では、抗リン酸化 S6 蛋白抗体により、FCD type IIb 組織における dysmorphic neuron や balloon cell が強く標識された。このことは、MTOR 変異により細胞内情報伝達系が活性化していることを示している。

MTOR 変異蛋白を発現した培養細胞においては、mTOR キナーゼの直接の作用蛋白であるリン酸化 4EBP 蛋白が有意に発現亢進していた。

このように MTOR の活性化型体細胞変異により FCD type IIb が生じることが明らかとなった。

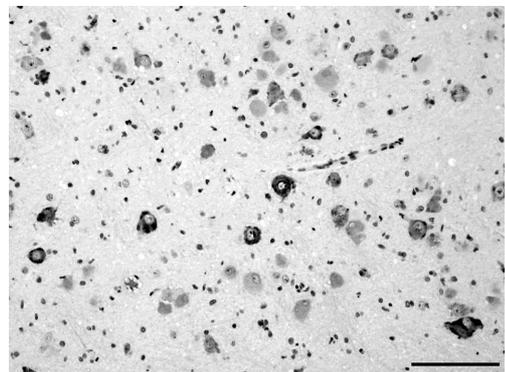


図 抗リン酸化 S6 抗体で免疫染色を行った FCD type IIb 脳組織。大型で異型性を示す細胞が強く標識されている。

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 12 件)

Nakashima M, Saito H, Tohyama J, Kato M, Shiina M, Takei N, Kitaura H, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N. Somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia. *Ann Neurol*, in press. 査読有.

Kimura T, Kitaura H, Masuda H, Kameyama S, Saito Y, Otsuki T, Nakazawa A, Morota N, Yamamoto T, Iida K, Takahashi H, Kakita A. Characteristic p57/Kip2 immunoreactivity of balloon cells in focal cortical dysplasia. *Neuropathology*, in press. doi: 10.1111/neup.12199. 査読有.

Fukasawa T, Kubota T, Negoro T, Maruyama S, Honda R, Saito Y, Ito M, Kakita A, Sugai K, Otsuki T, Natsume J, Watanabe K. Two siblings with cortical dysplasias: focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly: clinicocephalographic features. *Pediatr Int*, in press. 査読有.

柿田明美. ヒトてんかん病巣におけるグリア細胞の病理組織学的所見. *臨床神経* 2014; 54 (12): 1136-1138. doi: 10.5692/clinicalneuro.54.1136. 査読有.

柿田明美. 小児てんかん原性病巣の外科病理. *脳発達* 2014; 46 (6): 413-417. 査読無.

柿田明美. てんかん外科病理: 最新の国際分類について. *最新医学* 70 (6), 2015, 印刷中. 査読無.

北浦弘樹、柿田明美. 結節性硬化症. *Epilepsy* 2014; 8 (2): 74-76. 査読無.

Takahashi H, Kakita A, Tomikawa M, Okamoto K, Kameyama S. Oligodendroglioma (WHO grade I) in a young epilepsy patient: a specific entity lying within the spectrum of dysembryoplastic neuroepithelial tumor? *Neuropathology* 2013; 33 (6): 637-644. doi: 10.1111/neup.12026. 査読有.

Kagawa K, Iida K, Kakita A, Katagiri M, Nishimoto T, Hashizume A, Kiura Y, Hanaya R, Sugiyama K, Arihiro K, Arita K, Kurisu K. Electroencephalographic-histopathologic correlations implying epileptogenicity of dysembryoplastic neuroepithelial tumor (DNT). *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2013;53:676-687. doi: 10.2176/nmc.0a2012-0420. 査読有.

Kakita A. Surgical pathologic features of

cerebral cortical lesions taken from 600 patients with intractable epilepsy. *Brain Dev* 2013;35:793-801. doi: 10.1016/j.braindev.2013.03.008. 査読有.

Kitaura H, Kakita A. Optical imaging of human epileptogenic tissues *in vitro*. *Neuropathology* 2013; 33 (4): 469-474. doi: 10.1111/neup.12017. 査読有.

Miyahara H, Natsumeda M, Shiga A, Aoki H, Toyoshima Y, Zheng Y, Takeuchi R, Murakami H, Masuda H, Kameyama S, Izumi T, Fujii Y, Takahashi H, Kakita A. Suppressed expression of autophagosomal protein LC3 in cortical tubers of tuberous sclerosis complex. *Brain Pathol* 2013; 23: 254-262. doi: 10.1111/j.1750-3639.2012.00634.x. 査読有.

〔学会発表〕(計 15 件)

Kitaura H, Shirozu H, Shimizu H, Sonoda M, Murakami H, Masuda H, Takahashi H, Kameyama S, Kakita A. Different mechanism of epileptogenesis in subiculum and dentate gyrus in mesial temporal lobe epilepsy: an *in vitro* optical imaging study of resected human hippocampus. Society for Neuroscience, 2014 年 11 月 15 日. Washington DC (USA).

柿田明美. てんかん焦点の病理. 第 48 回日本てんかん学会. 2014 年 10 月 2 日. 京王プラザホテル (東京都).

園田真樹、北浦弘樹、伊藤陽祐、白水洋史、増田浩、柿田明美、亀山茂樹. 視床下部過誤腫の生検組織スライス標本を用いた生理学的・薬理学的研究. 第 48 回日本てんかん学会. 2014 年 10 月 2 日. 京王プラザホテル (東京都).

伊藤陽祐、増田浩、白水洋史、村上博淳、園田真樹、亀山茂樹、北浦弘樹、高橋均、柿田明美. 内側側頭葉てんかん患者の海馬萎縮: VBM による MRI 解析と病理所見との比較研究. 第 48 回日本てんかん学会. 2014 年 10 月 2 日. 京王プラザホテル (東京都).

跡部真人, 須貝研司, 石山昭彦, 齋藤貴志, 斎藤義朗, 小牧宏文, 中川栄二, 佐々木征行, 高橋章夫, 大槻泰介, 伊藤雅之, 柿田明美. 限局性皮質形成異常によるてんかん患者の発作頻度の特徴について. 第 56 回日本小児神経学会. 2014 年 5 月 29 日. アクティシティ浜松 (浜松市).

柿田明美. ヒトてんかん病巣におけるグリア細胞の病理組織学的所見. 第 55 回日本神経学会. 2014 年 5 月 24 日. 福岡国際会議場 (福岡市).

北浦弘樹、園田真樹、清水宏、白水洋史、伊藤陽祐、増田浩、高橋均、亀山茂樹、柿田明美. 視床下部過誤腫にお

けるてんかん原性の in vitro 脳スライス標本を用いた検討.第 55 回日本神経病理学会.2014 年 6 月 6 日.学術総合センター(東京都).

古川 絢子、柿田明美、千葉陽一、樋口善博、高橋均、亀山茂樹、島田厚良.内側側頭葉てんかん患者の海馬硬化組織特異的な酸化損傷タンパクの同定.第 55 回日本神経病理学会.2014 年 6 月 6 日.学術総合センター(東京都).塩谷彩子、大槻泰介、佐々木征行、佐藤典子、柿田明美、齊藤祐子.内側側頭葉てんかんにおける臨床病理学的研究.第 55 回日本神経病理学会.2014 年 6 月 6 日.学術総合センター(東京都).

清水宏、花岡仁一、金村米博、山崎麻美、田澤立之、高橋均、柿田明美.L1CAM 遺伝子変異を伴う伴性劣性遺伝性水頭症の胎児例.第 55 回日本神経病理学会.2014 年 6 月 6 日.学術総合センター(東京都).

柿田明美. てんかんの病理. 第 37 回日本てんかん外科学会(招待講演).2014 年 2 月 7 日.大阪国際会議場(大阪市).

柿田明美. 難治てんかん原性病巣の病態病理:外科標本の解析. 奈良てんかん懇話会(招待講演).2013 年 9 月 13 日.奈良県立医科大学厳檀会館(橿原市).

柿田明美. てんかんの病理. 西新潟中央病院てんかんセンター 夏季セミナー(招待講演).2013 年 7 月 27 日.西新潟中央病院講堂(新潟市).

柿田明美. てんかん外科病理学の実践. ビジュアルにみる. 第 9 回日本てんかん学会近畿地方会(招待講演).2013 年 7 月 6 日.ピアザ淡海(津市).

柿田明美. 小児てんかん原性病巣の外科病理 ビジュアルに示す. 第 55 回日本小児神経学会総会学術研究会(招待講演).2013 年 5 月 30 日.iichiko 総合文化センター(大分市).

[図書](計 3 件)

柿田明美. 医学書院, てんかんの病理学. In: 臨床てんかん学(編集:兼本浩祐,丸 栄一,池田昭夫,川合謙介),印刷中.

柿田明美. 診断と治療社, 限局性皮質異形成, 病理診断マニュアル. In: 稀少難治てんかん診療マニュアル(編集:大槻泰介,須貝研司,小国弘量,井上有史,永井利三郎)2013, pp. 65-67, 114-116.

柿田明美. 診断と治療社, てんかん原性の病理. In: てんかん専門医ガイドブック. てんかんにかかわる医師の

ための基礎知識 (編集:日本てんかん学会)2013, pp. 27-30.

[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:
出願年月日:
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

柿田 明美(KAKITA, Akiyoshi)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 80281012

(2) 研究分担者

武井 延之(TAKEI, Nobuyuki)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 70221372