

—— 研究助成報告 ——

## 大脳皮質異形成を伴う難治性てんかんの オミックス解析による治療戦略

伊 藤 雅 之

**要旨：**大脳皮質異形成（FCD）は小児期の難治性てんかんの原因の一つである。病理学的には神経細胞の配列や形体の異常などがある。本研究では、23例のFCD IIaとFCD IIbを対象（FCD IIa：13例、FCD IIb：10例）に、同一切除標本から病理学的に明らかな病巣部と正常観察された組織とのオミックス解析を行った。

ゲノム解析の結果、6例に病因性が疑われる遺伝子異常をみつけた。体細胞変異の変異率は採取部位による変化があった。トランスクリプトーム解析では、有意なグルーブ化ができなかった。プロテオーム解析では、病巣部で2倍以上の発現差があったものが21、正常部で発現差があったものが16であった。これらの多くはPI3K-AKT-MTORシグナル系に関与するタンパクであった。FCD IIa及びIIbの遺伝学的発生母地としてPI3K-AKT-MTOR系が重要である。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2022；33：49-52

**Key Words：**難治性てんかん、FCD IIa、FCD IIb、オミックス解析、PI3K-AKT-MTOR

### 【序論】

大脳皮質異形成（FCD）は大脳皮質の一部あるいは複数葉にわたる形成異常であり、病理学的には神経細胞の配列や形体の異常などがみられ、小児期の難治性てんかんの原因になる。この遺伝学的背景として、PI3K-AKT-MTORシグナル系の遺伝子を主とした体細胞変異ないし胚細胞変異が報告されている<sup>1)</sup>。また、培養細胞あるいはマウス脳を用いた研究から、これらの遺伝子異常は細胞の大きさや移動に障害を与えていることが示されている。これらの知見はFCDの発生病理の根拠となるが、てんかん原性を説明できない。治療への応用を探るには、これら遺伝子異常がもたらす分子機構の解明が必要である。

近年、てんかんのオミックス解析の重要性が報告されているものの、多層性の解析は比較的新しい研究分野である<sup>2,3)</sup>。しかし、その研究

の歴史は浅く、てんかん原性の分子病態や治療に直結する報告は少ない。また、治療を目的とした外科切除標本は病巣部を含むだけでなく、病理学的に明らかな異常がない組織を含むことがある。そこで本研究では、FCDの特徴的な病理像を呈し、遺伝子異常が報告されているFCD IIaとFCD IIbを対象に、同一切除標本から病理学的に明らかな病巣部と正常観察された組織とのオミックス解析を行う。これらの解析結果から、遺伝的背景を限定して分子動態を把握することが期待できる。

### 【方法】

（対象）FCDと臨床診断され、外科的治療目的で病巣切除された患者脳組織で研究参加の同意を得た23例であった。

（研究内容）切除組織を約5mm厚のスライスにし、交互に病理固定と凍結保存とに分けて処理した。病理固定後、標本を作成し病理学的診

Tab. 1 本研究でみつけた遺伝子異常

| Case | Diagnosis | Gene | Exon   | Amino acid change | Frequency (positive/read) |
|------|-----------|------|--------|-------------------|---------------------------|
| 1    | FCD IIa   | MTOR | 30     | missense          | 15.63% (5/32)             |
| 2    | FCD IIa   | MTOR | 8      | missense          | 41.93% (26/62)            |
| 3    | FCD IIa   | AKT2 | Intron | frameshift        | 56.76% (21/37)            |
| 4    | FCD IIb   | TSC2 | Intron | frameshift        | 53.51% (122/228)          |
| 5    | FCD IIb   | TSC1 | 20     | missense          | 56.67% (17/30)            |
| 6    | FCD IIa   | TSC2 | 34     | missense          | 29.41% (15/51)            |

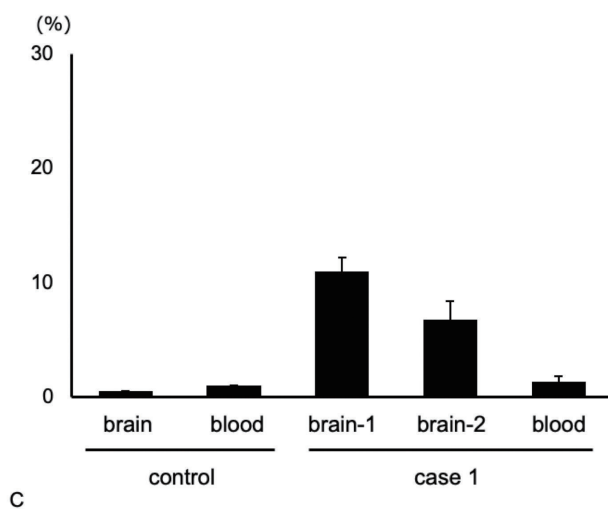
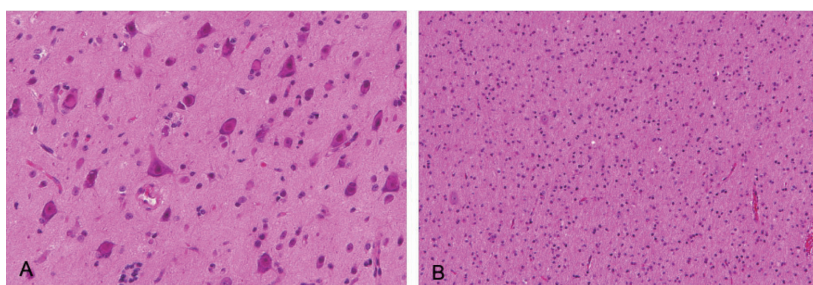
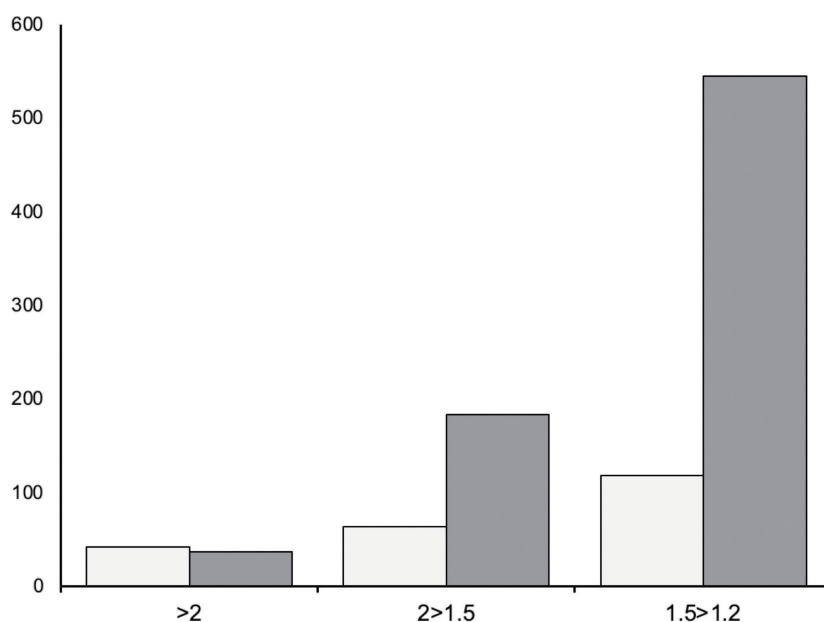


Fig. 1 FCD IIaの病理組織像と組織による遺伝子異常の頻度

(A) 病巣部ではdysmorphic neuronが多数みられる。(B) 正常部ではdysmorphic neuronはみられない。(C) MTOR遺伝子の異常アレルの頻度は、正常例 (control) では約1%で、患者血液検体でも約1%であるが、病巣部では約12%で、正常部では約6%である。

断を行い、FCD IIaあるいはFCD IIbに分けた。  
研究対象の病理診断はこのいずれかである。

病理学的に病変の最も強い領域 (病巣部) と  
最も弱い領域 (正常部) を識別し、各々に相当



**Fig. 2** FCD IIaとFCD IIbの病巣部と正常部のタンパク発現解析

2倍以上の発現差をもって有意な差がみられたタンパクは、病巣部 (□) と正常部 (■) でそれぞれ21個と16個であった。

する凍結組織を取出し、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析用にドライアイス上で小切片に分けた。ゲノム解析は、既報告の遺伝子を含みPI3K-AKT-MTORシグナル系を中心とした24遺伝子についてターゲットシーケンス解析 (Ion PGM, Illumina, San Diego, CA) を行い、遺伝子変異の割合を調べるためにPyroMarkシステム (Qiagen, Hilden, Germany) によるpyrosequencing解析を行った。さらに、トランスクリプトーム解析 (Genome Analyzer IIX, Illumina), プロテオーム解析 (液体クロマトグラフィー・質量分析 (LC-MS/MS)) を行った。

これらのデータを個別あるいは病型ごとに病巣部と正常部とを比較し、有意差のある分子あるいは化合物を抽出した。統計解析を行い、病巣に特異的に生じる変化を抽出した。

## 【結果】

対象は病理診断の結果、FCD IIaが13例、FCD IIbが10例であった。

ゲノム解析の結果、6例に病因性が疑われる

遺伝子異常を発見した (Tab. 1)。このうち、Case 1の病理組織はdysmorphic neuronを多数認める病巣部とみられない正常部に分ることができた (Fig. 1)。これらの組織と同一患者血液からのゲノム解析より、MTOR遺伝子の体細胞変異を同定した。この変異の頻度は、病巣部では約12%であったが、正常部では約6%であった (Fig. 1C)。

トランスクリプトーム解析では、発現プロファイルを作成しクラスターリング解析などを行ったが、有意なグループ化ができなかった。

プロテオーム解析では、同定できた全タンパクは1,768個であった。このうち、病巣部で2倍以上の発現差があったものが21、正常部で発現差があったものが16であった (Fig. 2)。これらの多くはPI3K-AKT-MTORシグナル系に關与するタンパクであった。さらに、FCD IIaとFCD IIb間の発現差がある分子を抽出した (Tab. 2)。FCD IIaで低下しFCD IIbで上昇していた2つのタンパクが見つかった。また、FCD IIaとFCD IIbのいずれにも上昇していたタンパクは3個であり、上昇傾向があったのが5

Tab. 2 FCD IIaとFCD IIbのタンパク発現解析

| IID | FCD IIa | FCD IIb | ontology               |
|-----|---------|---------|------------------------|
| A   | 0.65    | 2.63    | PI3K-AKT-MTOR pathways |
| B   | 0.41    | 2.46    |                        |
| C   | 1.37    | 1.28    |                        |
| D   | 1.31    | 1.05    |                        |
| E   | 1.56    | 1.82    | ion channels           |
| F   | 1.45    | 1.67    |                        |
| G   | 1.44    | 1.2     |                        |
| H   | 1.42    | 1.57    |                        |
| I   | 1.47    | 1.13    |                        |
| J   | 1.33    | 1.06    |                        |
| K   | 0.54    | 0.76    |                        |
| L   | 0.61    | 0.55    |                        |

個であった。一方、いずれも低下していたのが2個みつかった。

### 【考察】

大脳皮質の形成過程に起こる遺伝学的異常はいくつかのプロセスが知られている<sup>4)</sup>。また、FCDの原因遺伝子が報告されているが、その多くはPI3K-AKT-MTORシグナル系に関与する遺伝子である<sup>4, 5)</sup>。PI3K-AKT-MTORシグナル系の情報伝達はさまざまな生物機能に影響する。近年、WNTシグナル系との関与も知られ、発生に大きく関与していることが考えられている<sup>5)</sup>。

Case 1の結果から、病理学的に明らかな異常がみられない組織においても遺伝子異常を有する細胞があることがわかった。また、正常検体でみられた1%程度の頻度は測定限界によると考えられる。他5例の遺伝子異常について、解析を進める。さらに、17例についてはarray CGHや全ゲノムシーケンス解析 (WGS) な

どを行って、病因遺伝子を探る必要がある。

トランスクリプトーム解析により、FCD IIa/IIb間あるいは病巣部と正常部間の発現プロファイルに有意な差がなかったのは、組織の異質性や個人差が強く近似性が高いためであると考えられた。すなわち、組織の特異性や抗けいれん剤などの薬物による化学的な均一化が背景にあるものと想定される。これは、プロテオーム解析の結果にも反映されていると考えられる。また、プロテオーム解析でみつかったタンパクは、いずれもPI3K-AKT-MTORシグナル伝達系に関与する。これらの結果から、FCD IIa及びIIbの遺伝学的発生母地としてPI3K-AKT-MTORシグナル系が重要である。

### 【文献】

- 1) Hanai S, Sukigara S, Dai H, Owa T, Horike S, Otsuki T, et al. Pathological active mTOR mutation in brain malformation with intractable epilepsy leads to cell-autonomous migration delay. *Am J Pathol* 2017; **187**: 1177-1185.
- 2) Josephson CB, Wiebe S. Precision Medicine : Academic dreaming or clinical reality? *Epilepsia* 2021; **62**(Suppl. 2) : S78-S89.
- 3) Bruxel EM, Bruno DCF, do Canto AM, Geraldine JC, Godoi AB, Martin M, et al. Multi-omics in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis : Clues into the underlying mechanisms leading to disease. *Seizure*. 2021; **90** : 34-50.
- 4) Castello MA, Gleeson JG. Insight into developmental mechanisms of global and focal migration disorders of cortical development. *Curr Opin Neurobiol* 2021; **66** : 77-84.
- 5) Bennett MF, Hildebrand MS, Kayumi S, Corbett MA, Gupta S, Ye Z, et al. Evidence for a Dual-Pathway, 2-Hit Genetic Model for Focal Cortical Dysplasia and Epilepsy. *Neurol Genet* 2022; **8** (1) : e652.