

遺伝子異常によるてんかん性脳症に関する研究

研究分担者 齋藤 伸治 名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野・教授

研究要旨

全エキソーム解析に代表される網羅的遺伝子解析技術の発展により、遺伝子異常が原因となるてんかん性脳症の存在が明らかとなった。てんかん重積を示す脳炎脳症症候群の基礎疾患として遺伝性てんかん性脳症は重要な位置を占める。原因となる遺伝子は多数あるが、機能的に分類することができる。その中で、治療法に関連する一群が注目されている。私たちはmTOR経路の機能亢進により引き起こされるてんかん性脳症に注目した。mTOR経路の機能亢進は巨脳症を示すことが多いので、巨脳症をターゲットとして遺伝子解析および生化学的解析を実施し、そのてんかんの特徴を明らかにすることで、将来のmTOR阻害剤による臨床研究の基礎データを得た。

A．研究目的

てんかん重積を示す脳炎脳症の基礎疾患として遺伝性てんかん性脳症は重要である。近年の全エキソーム解析に代表される網羅的遺伝子解析技術の発展により、遺伝子異常が原因となるてんかん性脳症の存在が明らかとなっている。てんかん性脳症の原因遺伝子は多数報告されている。私たちはその中で、mTOR経路に注目した。mTOR経路は神経細胞の増殖に必須の経路であり、結節性硬化症の病態として知られている。mTOR経路の機能亢進を示す生殖細胞性変異は遺伝性巨脳症の原因として知られている。また、体細胞突然変異は皮質形成異常の主要な原因である。このようにmTOR経路の変異はてんかんの原因として重要である。さらに、mTOR経路にはシロリムスやエベロリムスなどの阻害剤が存在し、新しい治療薬として注目されている。しかし、mTOR経路に注目した網羅的遺伝学的研究は少ない。そこで、私たちはmTOR経路に関連する15遺伝子を搭載した遺伝子パネルを構築し、巨脳症患者を対象として遺伝学的解析を実施した。さらに生化学的解析を行った。

B．研究方法

+2SD以上の頭囲拡大があり、発達の遅れもしくはてんかんがある児28名を対象とした。27名にはmTOR経路に関連する15個の遺伝子を搭載した遺伝子パネルを用いて、Ion PGMにてエクソン領

域をシーケンシングした。3例に全エキソーム解析を実施し、内1例は最初から全エキソーム解析を行った。27例は末梢白血球からゲノムDNAを抽出し、1例では手術検体として得られた脳組織からゲノムDNAを抽出した。生化学的解析としては患者由来リンパ芽球を樹立し、mTOR経路の下流に存在するリン酸化S6蛋白をウエスタンブロットにて測定し、対照であるGAPDHと比較した。（倫理面への配慮）

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科および名古屋市立大学病院倫理審査委員会で承認され、患者もしくは代諾者から書面による同意を得た。

C．研究結果

病因変異はPTEN 6例、AKT3 3例、PIK3R2 3例、PIK3CA 1例、SHOC2 1例の計14例(50%)に同定した。SHOC2はパネルに搭載されていないが、全エキソーム解析で同定された。PIK3CAの1例は片側巨脳症の児で、血液では変異は同定されず、罹患脳組織でのみ変異が同定され、モザイクであった。

病因変異が同定された児で生化学的解析が可能であった児はすべてリン酸化S6蛋白の発現が増加しており、mTOR経路の活性亢進が確認された。変異陰性の中にもリン酸化S6の亢進例が存在した。

原因遺伝子と表現型との関連は巨脳症、発達の遅れは共通して存在する。顔貌特徴での区別も難

しい。一方、MRIの所見はPTEN変異例では皮質形成異常が見られないことが特徴と考えられる。

てんかん発作は6例(21.4%)に合併していた。合併率は多くないが、てんかん発症例は難治性に経過している。特に、モザイクである片側巨脳症例は外科手術が必要となっている。また、AKT3変異例はけいれん重積後脳症のために死亡している。また、PTEN変異例6例にはてんかん合併例はいなかった。

D . 考察

mTOR経路の15遺伝子を搭載した遺伝子パネル解析は遺伝性巨脳症の診断に有用であった。臨床的には互いに重なり合っているために、区別することは困難である。そのため、遺伝子診断は正確な診断のために、有用である。

生化学的解析を加えることで、変異の意義を明らかにすることが可能になる。機能亢進型変異はミスセンス変異が多いため、多型との区別が難しい。そのため、生化学的解析との組み合わせは、正確な遺伝子診断のために有用と考えられる。本研究ではリンパ芽球様細胞を使用したために、全例での検査ができなかった。今後は白血球から直接蛋白を抽出し、簡便に検査ができるかどうか課題である。

てんかんの合併は21.4%と多くなかった。PTEN変異例はてんかんを合併した例がなく、その影響も考えられる。一方、片側巨脳症例は難治性のために、外科手術が行われていた。片側巨脳症は難治性てんかんの合併が多いが、遺伝性巨脳症では必ずしも多くない。原因遺伝子は同じであるので、変異の種類が関連している可能性がある。今後の検討課題と考えられる。少ないとはいえ、AKT3変異例はてんかん重積の後に脳症から死亡に至っていた。本例以外にもAKT3変異例のてんかん死亡例が報告されている。このように、発作回数は少なくとも、ひとたびてんかん発作が起こると重症化する可能性があり、十分な認識が必要である。

mTOR 経路には阻害剤が存在し、結節性硬化症などにすでに保険適応が認められている。AKT3 変異の死亡例などの重症例に対しては、mTOR 阻害剤が救命的な意義を有する可能性がある。さらに、片側巨脳症や限局性皮質形成障害などの mTOR 経路のモザイクで発症する疾患は極めててんかん原生が高く、mTOR 阻害剤が抗てんかん薬やてんかん重積の薬物として意義がある可能性がある。mTOR 阻害剤を適切に使用するためには、患者の遺伝学的背景が示されていることが必要である。今回の研究は、そのために基礎的データを提供することが出来たと考える。

E . 結論

遺伝性巨脳症 28 例に対して mTOR 経路をターゲ

ットとした網羅的遺伝子パネル解析を開発した。生化学的解析と組み合わせることで病態の評価に重要であり、将来の mTOR 阻害剤の適応を考える上で重要である。

F . 研究発表

1. 論文発表

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* 18:4, 2017.
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.* 62:861-863, 2017.

2. 学会発表

Negishi Y, Ieda D, Miyamoto T, Hori I, Hattori A, Nozaki Y, Komaki H, Tohyama J, Nagasaki K, Tada H, Oishi H, Saitoh S. Truncating MAGEL2 mutations produce fetal lethality in mice and may recapitulate pathogenesis of Schaaf-Yang syndrome. 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2017/10/18-21. (Orland, USA)
Nakamura Y, Togawa Y, Okuno Y, Muramatsu H, Ieda D, Hori I, Negishi Y, Hattori A, Saitoh S. A patient with compound heterozygous mutations in SZT2 represents a discernible clinical entity with developmental delay, macrocephaly and dysmorphic corpus callosum. 第59回日本小児神経学会学術集会(大阪) 2017/6/16-18.

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし