

シングルセル解析による結節性硬化症の発症機序に関わる遺伝的異質性の解明

伊藤雅之

国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第二部

【研究の背景】

結節性硬化症 (TSC) はてんかんや知的障害、精神症状など中枢神経系を中核とした多彩な症状を様々な程度に呈する疾患である。1935 年に常染色体優性遺伝が知られ、原因遺伝子 *TSC1* (Hamartin) と *TSC2* (Tuberin) が発見された。*TSC1* と *TSC2* の発見により分子遺伝学的研究が進み、*TSC1* と *TSC2* は共に癌抑制遺伝子であり、相互作用によって機能していることがわかった。癌発生機序の一つとして Knudson が two-hit 理論を提唱し、多くの癌抑制遺伝子に適応されることが分かってきた。常染色体優性遺伝であるが、原因遺伝子 *TSC1* あるいは *TSC2* の遺伝子異常が体細胞モザイクであり、加えて遺伝的異質性 (loss of heterogeneity; LOH) により発症することが提唱されている¹⁾。*TSC1* と *TSC2* は共に two-hit 理論に従って機能する癌抑制遺伝子であり、患者臓器では常染色体優性であるが、細胞単位では常染色体劣性となるため多様な臨床像となると考えられている。TSC の脳病変は主として大脳皮質結節 (TB) であるが、その病巣の程度と範囲は広範に及ぶため、単一のモデルでは発症病態の理解が不十分であった。

我々は、難治性てんかんを呈する脳形成異常の病巣から、*TSC1*、*TSC2* が関与する MTOR シグナル伝達系の遺伝子異常を発見し、発症病態を解明し²⁾、MTOR 分子の発現が発達障害の発症に関与することを報告した³⁾。同じ難治性てんかんを呈する脳形成異常を呈する TSC の病巣はてんかん原性そのものであるが、正常神経細胞と異型神経細胞、バルーン細胞、変性グリア細胞と多様な細胞から成っている。これを一括にした発現解析は、真の発症病態の姿を歪めてしまう。病巣より単一の細胞を取出し、遺伝子解析や発現解析が可能となった現在の技術革新により、これらの問題解決が可能となった。

【目 的】

本研究では、結節性硬化症 (TSC) のシングルセル解析による癌抑制遺伝子の LOH とその発症病態を解明する。TSC の病態を細胞レベルで解析し、新しい治療法開発のための TSC の発症機序と LOH の関連性を分子遺伝学的に解明する。

【方 法】

対象は、本研究への参加説明と文書による同意を得た 3 例の TSC 患者で、治療目的で外科手術を受け、TSC と臨床病理学的に診断された脳組織である。本研究は、関連法規を遵守し、当施設の倫理問題等検討委員会において承認を受けたのちに行った。

(1) DNA 抽出: 外科的に摘出された脳組織を 5mm 幅スライスに作成し、病理診断用標本と凍結組織を交互に分け、標本作成と保管を行う^{4,5)}。病理診断ののち、マイクロダイセクションにより各症例の TB の異型神経細胞とバルーン細胞をそれぞれ 100 個ずつ取り出した。細胞の抽出後、DNA 抽出と増幅を行った。

(2) TSC の原因遺伝子解析: 次世代シーケンサーにてターゲットシーケンスを行った。この遺伝子変異の検証には、サンガー法で行なった。

(3) TSC の原因遺伝子と LOH の解析: 上記②の遺伝子異常について、各病巣細胞の two-hit の遺伝子変異アレルの発現率を調べた。

【結 果】

施設レポジトリから、3 例の TSC 患者の治療的外科手術により取り出された脳組織を用いた。いずれも、*TSC2* 遺伝子異常があることを確認した。

マイクロダイセクションにより、病理組織から異型神経細胞とバルーン細胞を取り出した。この工程で、レーザーによる細胞のダメージを最小限にする方法を工夫した。細胞種ごとに細胞を集め、プロトコールに従って DNA 抽出を行なった。現在、ターゲットシーケンシングにて、対立遺伝子の *TSC2* 遺伝子変異解析を行なっている。

【考 察】

TSC2 遺伝子の異常アレルを血液由来 DNA で確認した。*TSC2* は染色体 16p13.3 にあり、41 個のエクソンで 1807 アミノ酸からなる分子である¹⁾。*TSC1/TSC2* 複合体は Rheb の GAP として作用し、Rheb-GTP 型を脱リン酸化して Rheb-GDP 型にする。正常細胞では、PI3K-AKT シグナル経路を介して *TSC2* がリン酸化されると *TSC1* が遊離され、*TSC1/TSC2* 複合体の GAP 機能が喪失し、MTOR が活性亢進し、その下流にある S6K や 4EBP1 のリン酸化を促し、タンパク合成亢進や細胞増殖などを引き起こすことにより、細胞の成長、増殖や維持の調節に関わっている。*TSC1* あるいは *TSC2* 遺伝子の LOH により *TSC1/TSC2* 複合体の機能喪失が生じると GAP として機能しなくなり、結果として MTOR 活性が促進され、その下流のタンパク合成が促進され、異形成や腫瘍形成、血管新生などが生じる。TSC 患者の約 85% に *TSC2* 遺伝子異常があるとされている。一方、*TSC1* 遺伝子変異は孤発例の 10~15% に認められるのに対し、*TSC2* 遺伝子変異は孤発例の 60~70% に認められることから、*TSC2* 遺伝子は高頻度に変異が入ることが予測される¹⁾。

胎児脳の神経細胞移動期に、germline 変異として *TSC2* 遺伝子異常を持つ細胞に two-hit が生じることで、異型神経細胞やバルーン細胞が生じるものと考えられる。ヒト FCD および HME のてんかん病巣から *MTOR* 遺伝子異常がみつきり、これが MTOR 活性亢進をもたらす、神経細胞移動障害と形態学的異常を引き起こしていることが報告されている²⁾。同じ病的細胞を持つ TSC においても、MTOR 活性亢進が発生病態の起点であり、two-hit の起こる時期により、病巣の大きさと重症度が依存しているものと考えられる。これには、two-hit を起こした遺伝子変異の変異率を解析する必要がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

TSC は、古くから臨床病理学的特徴のある大脳皮質結節を形成することが知られている。これを構成する異常細胞は、局在性大脳皮質形成異常 (FCD) や片側性巨脳症 (HME) にもみられ、FCD や HME の *MTOR* 遺伝子の体細胞変異が下流分子のリン酸化亢進をもたらす、特有の細胞と移動障害をきたすことを明らかにした²⁾。これら疾患は臨床及び病理学的類縁性のみならず、PI3K-AKT-TSC1/2-mTOR 細胞内シグナル系の遺伝子異常により引き起こされるといふ共通の分子病態を有し、一連の疾患スペクトラムと考えることで、新しい疾患概念を提唱することができる。

LOH は 1970 年代より悪性腫瘍の発症機序の一つとして研究が進められたが、細胞増殖を伴わない過誤腫の発症病態への関与は不明である。本研究をさらに進展させることで、TSC の LOH の生物学的意義を明らかにするだけでなく、広く FCD と HME を含めた分子機構の解明と新たな治療法開発の基盤になることが期待できる。

【参考・引用文献】

1. Curatolo P, et al. Tuberous sclerosis. Lancet 372(9639):657-668,2008.
2. Hanai S, et al. Pathological active mTOR mutation in brain malformation with intractable epilepsy leads to cell-autonomous migration delay. Am J Pathol 187(5):1177-1185,2017.
3. Tsujimura K, et al. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. Cell Reports 12:1887-1901,2015.
4. Sukigara S, et al. Expression of Astrocyte-related Receptors in Cortical Dysplasia with Intractable Epilepsy. J Neuropathol Exp Neurol 73:798-806,2014.

5. Sakakibara T, et al. Delayed maturation of neurons of focal cortical dysplasia IIA and IIB: consideration from specific neocortical-layer marker expression. J Neuropathol Exp Neurol 71:741-749,2012.