

てんかん・発達障害の手術脳検体を用いた単一細胞トランスクリプトームによる病態解明

宮下 聡

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 病態生化学研究部 分子機能研究室

【研究の背景】

片側巨脳症は、先天的な発生・発達異常に伴う脳の形成異常によって、脳の片側が通常よりも巨大化する先天性の脳奇形である。片側巨脳症の患者は、難治性のてんかん、不全片麻痺、精神・運動発達障害などの症状を呈するが、その重篤な症状にも関わらず、疾患の病態に関わる分子・細胞メカニズムがほとんどわかっていない[Goel et al., 2024]。これは、片側巨脳症が超希少疾患であり症例数が少ないことや、有効なモデル動物が存在していないことが原因である。そのため、現状では、片側巨脳症の諸症状に対する治療法は確立しておらず、より有効な治療法の開発が急務である。すなわち、病態解明・治療の観点から、片側巨脳症の発症に関わる分子メカニズムの解明が今まさに必要とされている。さらに、片側巨脳症は、精神・運動発達障害を呈するため、発症の分子メカニズムの解明によって、脳の発達や機能についての新たな知見の創出につながり、この研究が、将来的には神経発達障害の予防や治療法の開発につながることも期待される。総じて、片側巨脳症の発症メカニズムに関する研究は、この疾患の治療法の改善や患者の予後・QOLを向上させ、片側巨脳症の克服につながる極めて重要な研究である。

【目 的】

上記の通り片側巨脳症は、脳の片側が通常よりも巨大化する先天性の脳奇形であり、難治性のてんかん、不全片麻痺、精神・運動発達障害などの重篤な症状を示すが、疾患の病態に関わる分子・細胞メカニズムはほとんど不明である。本研究では、片側巨脳症の手術脳検体を用いて単一細胞遺伝子発現解析を行うことで、脳内に存在する個々の細胞の遺伝子発現を調べ上げ、片側巨脳症の分子細胞病態を明らかにする。

【方 法】

本研究では、(1)単一細胞核 RNA シーケンシング (snRNA-seq) 解析の遂行による片側巨脳症の各細胞の遺伝子発現変化の解明、(2)我々が同定した患者型の遺伝変異を再現したモデルマウスの作出を実施した。

(1) snRNA-seq の実施と解析

snRNA-seq を実施可能な片側巨脳症サンプルとコントロールとして海馬硬化症の手術時に得られる健常組織サンプル検体から核抽出を行い、10X 社 chromium を用いてシングルセルライブラリーを作成する。作成されたライブラリーは NovaSeq6000 によりシーケンシングを行った。取得したデータは統計解析ソフト R とそのパッケージである Seurat により解析を行なった。

(2) モデルマウスの作出

本研究では、Cre 依存的に PI3K シグナルを恒常的に活性化させる PIK3CA-E545K を発現する Rosa-PIK3CA-E545K マウスとアデノ随伴ウイルス (AAV) による胎生期大脳半球への Cre 遺伝子導入により、世界初の片側巨脳症モデルマウスの作出を試みた。

【結 果】

(1) snRNA-seq の実施と解析

我々は、片側巨脳症およびコントロール検体から取得した大脳皮質を用いて snRNA-seq を実施した。脳検体は国立精神・神経医療研究センターバイオバンクから取得した。大脳皮質に存在する興奮性神経細胞・抑制性神経細胞・アストロサイトなどの細胞種を同定した。さらに、コントロールと片側巨脳症由来の興奮性神経細胞における発現変動遺伝子を解析することによって、てんかん原生に関与する可能性がある遺伝子を複数同定することができた。

(2) モデルマウスの作出

大脳半球のみに遺伝子を導入させるために、本研究では Cre を発現させる AAV を用いたモデルマウスの作出を試みた。まず、大脳皮質の半球のみにウイルスを導入するための最適なウイルス量を検討した。胎生期のマウスに 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 の濃度で AAV-GFP を導入し、導入した半球における発現領域、反対側における発現量を調べた。その結果、反対側への漏れが少ない最適なウイルス量を決定することができた。現在、Rosa-PIK3CA-E545K マウス胎児において AAV-Cre を導入し、片側巨脳症モデルマウスの作出を目指している。

【考 察】

本研究では、(1) ヒト検体を用いた snRNA-seq と (2) 新規モデルマウスの作出が順調に進行した。特に、(1) の snRNA-seq 解析では複数のてんかん原生遺伝子を同定することができた。(2) の新規モデルマウス開発は現在進行中ではあるが、今後片側巨脳症の病態を再現するマウスモデルを実現できる可能性が高い。我々が開発したモデルにおいては、片側巨脳症の特徴である異形成細胞の存在はまだ確認できておらず、今後さらなる解析が必要となる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

片側巨脳症のような超希少疾患は、そもそもの症例数が少ないこと、さらには、各国で外科的処置の様式や臨床検体の取り扱いが異なることから、我々のように、質の高い臨床情報をもつ新鮮な手術脳検体を用いた研究が行うことができるグループは極めて限られている。そのため、本研究で取得した snRNA-seq データとその解析結果は、大変新規性が高く医学的な意義を持つ。さらに新しく同定した候補分子を標的とし、モデルマウスにおいてその発現とてんかん発作の影響を調べることで、新しい治療標的候補を探索する。それにより、未だ治療法のない片側巨脳症の新しい治療法開発に貢献する。

【参考・引用文献】

•Goel K, Ghadiyaram A, Krishnakumar A, Morden FTC, Higashihara TJ, Harris WB, Shlobin NA, Wang A, Karunungan K, Dubey A, Phillips HW, Weil AG, Fallah A. Hemimegalencephaly: A Systematic Comparison of Functional and Anatomic Hemispherectomy for Drug-Resistant Epilepsy. *Neurosurgery*. 2024 Apr 1;94(4):666-678. doi: 10.1227/neu.0000000000002759. Epub 2023 Nov 17. PMID: 37975663.