



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1562号
学位記番号	第1117号
氏名	根岸 豊
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	<p>A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly (PI3K-AKT-mTOR 経路の異常により起こる巨脳症の遺伝学的、生化学的診断法)</p> <p>BMC Medical Genetics 2017; 18(1): 4</p>
論文審査担当者	<p>主査： 間瀬 光人 副査： 松川 則之, 齋藤 伸治</p>

論文内容の要旨

【目的】

遺伝性巨脳症は進行性の頭囲拡大、発達遅滞に各種合併症を伴う先天性疾患であり、臨床的にはいくつかの亜型が知られている。2012年、これらの疾患のうち megalencephaly-capillary malformation syndrome (MCAP)や megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome (MPPH) が、細胞増殖の重要な経路である PI3K-AKT-mTOR 経路(mTOR 系)に属する遺伝子の機能獲得型変異が原因であることが明らかにされた。また、mTOR 系を抑制する *PTEN* の機能喪失型変異は自閉症を伴う巨脳症の原因となることが知られている。mTOR には阻害剤があり、これまで根本的な治療法がなかった巨脳症の治療法となることが理論的には考えられる。しかし、これらの疾患は症状が重なり合っているために、遺伝子解析には多数の遺伝子を解析することが必要である。また臨床像についても不明な点が多い。本研究の目的は遺伝学的解析と生化学的解析を用いた分子診断法を確立し、その臨床像を明らかにすることである。

【対象と方法】

研究対象は 2SD 以上の頭囲拡大を認め、てんかん、発達遅滞などの神経症状を呈する遺伝性巨脳症患者 13 名とその家族である。1 名の患者に対して、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq 2000)を用いて全エクソーム解析を行った。また、残りの 12 名の患者に対しては、mTOR 系に属する 15 遺伝子を搭載した AmpliSeq パネル (Thermo Fisher Scientific)を作成し、次世代シーケンサー (Ion PGM システム)にてターゲット遺伝子解析を行った。疾患原因とコールされた変異についてはサンガー法にて本人、両親の確認を行った。さらに、患者の末梢血白血球から EB ウイルスで樹立したリンパ芽球様細胞(LCL)より蛋白を抽出し、mTOR 系の機能を反映するリン酸化 S6 蛋白(pS6)をウェスタンブロットにて測定した。

【結果】

全エクソーム解析によって 1 名の患者に *AKT3* の病的変異をヘテロ接合性に同定した。残りの 12 名の患者に対しては Ion PGM システムを用いたターゲット遺伝子解析を行った。この解析によって 5 名の患者に病的変異(*PIK3R2* ; 2 名、*PTEN* ; 3 名)をヘテロ接合性に同定した。変異陽性例 6 名のうち両親の検体が得られた 5 名すべては *de novo* 変異であった。pS6 のウェスタンブロット解析では、変異陽性例のうち LCL が樹立できた 5 名全例で明確な発現亢進を同定し、さらに変異陰性例 7 名のうち 3 名で発現亢進を見出した。臨床像の解析では全例で著明な頭囲拡大を認めたが、出生時の頭囲は必ずしも大きくはなかった。MCAP や MPPH の主要症状と考えられている多合趾症や毛細血管奇形は *AKT3*、*PIK3R2* 変異例でも認めなかった。頭部 MRI では、*AKT3*、*PIK3R2* 変異例では全例で脳室拡大、シルビウス裂周囲多小脳回、白質病変を認めたが、*PTEN* 変異例では異常を認めなかった。変異陰性だがウェスタンブロットにて pS6 の発現亢進を認めた 3 名の臨床像、頭部 MRI 所見は様々であった。また、変異陰性で pS6 発現亢進も認めなかった患者と、これら 3 名の間でも臨床像、頭部 MRI 所見の相関を認めなかった。

【考察】

本研究では、遺伝子解析と LCL を用いた機能解析を組み合わせた方法で mTOR 系機能亢進による巨脳症の診断方法を確立した。遺伝子解析、生化学的解析ともに検体として血液のみを使用しており、診断の侵襲性は極めて低い。この診断法を用いて 13 名の遺伝性巨脳症患者のうち 9

名で mTOR 系の機能亢進を同定した。この結果は遺伝性巨脳症の多くは mTOR 系の機能亢進が原因であることを示している。本研究で *AKT3* や *PIK3R2* 変異が同定された患者では、これまで MCAP や MPPH の主症状とされていた毛細血管奇形や多合趾症を認めず、mTOR 系機能異常による巨脳症の臨床的多様性が示された。変異陰性だが pS6 の発現亢進を認めた症例はターゲット解析のパネルに搭載した 15 遺伝子以外の遺伝子異常や、モザイクの可能性があり、この診断法にも限界がある。更なる診断には全エクソーム解析や **ultra-deep sequencing** が必要である。近年、mTOR 阻害剤は結節性硬化症の治療薬としても使用されている。動物実験では結節性硬化症による腫瘍の縮小のみでなく、てんかんや社会性も改善させることが報告されている。mTOR 系機能異常による遺伝性巨脳症は現時点で根本的な治療法がなく、てんかん重積による死亡例も報告されているが、mTOR 阻害剤が有効な治療法となり得る。本研究にて確立した診断法は治療法を提案するものであり、臨床的価値が高いと思われる。

論文審査の結果の要旨

【目的】 遺伝性巨脳症は進行性の頭囲拡大、発達遅滞に各種合併症を伴う先天性疾患であり、臨床的にはいくつかの亜型が知られている。近年、これらの疾患の一因として、細胞増殖の重要な経路である PI3K-AKT-mTOR 経路(mTOR 系)に属する遺伝子変異が原因であることが明らかにされた。これらの疾患は症状が重なり合っているために、遺伝子解析には多数の遺伝子を解析することが必要である。また臨床像についても不明な点が多い。本研究の目的は遺伝学的解析と生化学的解析を用いた分子診断法を確立し、その臨床像を明らかにすることである。【対象と方法】 研究対象は 2SD 以上の頭囲拡大を認め、てんかん、発達遅滞などの神経症状を呈する遺伝性巨脳症患者 13 名である。1 名の患者に対して、全エクソーム解析を行った。また、残りの 12 名の患者に対しては、mTOR 系に属する 15 遺伝子を搭載したパネルを作成し、ターゲット遺伝子解析を行った。さらに、患者の末梢血白血球から樹立したリンパ芽球様細胞(LCL)より蛋白を抽出し、mTOR 系の機能を反映するリン酸化 S6 蛋白(pS6)をウエスタンブロットにて測定した。【結果】 全エクソーム解析によって 1 名の患者に *AKT3* の病的変異を同定した。また、ターゲット遺伝子解析によって 5 名の患者に病的変異(*PIK3R2* ; 2 名、*PTEN* ; 3 名)を同定した。pS6 のウエスタンブロット解析では、変異陽性例のうち LCL が樹立できた 5 名全例で明確な発現亢進を同定し、さらに変異陰性例 7 名のうち 3 名で発現亢進を見出した。臨床像の解析では全例で著明な頭囲拡大を認めたが、出生時の頭囲は必ずしも大きくはなかった。これまでに合併頻度が高いと考えられていた多合趾症や毛細血管奇形は *AKT3*、*PIK3R2* 変異例でも認めなかった。頭部 MRI では、*AKT3*、*PIK3R2* 変異例では全例で脳室拡大、シルビウス裂周囲多小脳回、白質病変を認めたが、*PTEN* 変異例では異常を認めなかった。【考察】 本研究では、遺伝子解析と LCL を用いた機能解析を組み合わせた方法で mTOR 系機能亢進による巨脳症の診断方法を確立した。この診断法を用いて 13 名の遺伝性巨脳症患者のうち 9 名で mTOR 系の機能亢進を同定した。変異陰性だが pS6 の発現亢進を認めた症例はターゲット解析のパネルに搭載した 15 遺伝子以外の遺伝子異常や、モザイクの可能性があり、この診断法にも限界がある。更なる診断には全エクソーム解析や ultra-deep sequencing が必要である。近年、mTOR 阻害剤は結節性硬化症の治療薬としても使用されている。mTOR 系機能異常による遺伝性巨脳症は現時点で根本的な治療法がないが、mTOR 阻害剤が有効な治療法となり得る。本研究にて確立した診断法は治療法を提案するものであり、臨床的価値が高いと思われる。

【審査の内容】 約 20 分間のプレゼンテーションの後に、主査の間瀬からは、本巨脳症ではどの種類の細胞が増殖しているか、画像にて脳室拡大を呈する理由、遺伝学的解析と生化学的解析を組み合わせる意義、mTOR 阻害剤の副作用についてなど 5 項目の質問を行った。また第一副査の松川教授からは、全エクソーム解析、ターゲット解析、ウエスタンブロットなどの方法論、検出された変異の解釈方法、今後どのように臨床へ展開していくかなど、研究の方法論、結果の解釈、臨床への還元などに関する 15 項目の質問がなされた。第二副査の齋藤教授からは専門領域に関連して、大頭症の診断の進め方、脳形成異常の分類など、2 項目の質問がなされた。いずれに対しても概ね満足のいく回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、mTOR 系異常により起こる巨脳症の遺伝学的、生化学的診断法を示したはじめての研究であり、意義の高い研究である。以上をもって本論文の著者には、博士(医学)の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 間瀬 光人 副査 松川 則之 齋藤 伸治