

## 特集2 ヒト検体・データを活用した基礎臨床連携

## 2. 手術脳検体を用いた一細胞核トランスクリプトーム解析によるmTORオパチーてんかんの細胞分子病態の探索

田部 直央\*, 星野 幹雄\*, 宮下 聰\*

**抄録**：てんかんは、世界人口の約1%が罹患する神経疾患であり、その詳細な細胞・分子メカニズムは未解明の部分が多い。約30%のてんかん患者は、抗てんかん薬の多剤併用でも発作を抑えられない難治性てんかんを呈し、特に小児では脳の発達に深刻な影響を及ぼす。小児難治性てんかんの約40%は大脳皮質異形成(MCD)に起因すると考えられており、特に、PI3K/AKT/mTOR経路にかかわる細胞変異が報告されている一連のMCD小分類群はmTORオパチーと総称されている。筆者らは、mTORオパチーの手術脳検体を用いたbulk RNA-seq, snRNA-seq, プロテオミクス解析により、神経細胞だけでなく、アストロサイトやミクログリアの遺伝子発現変化がてんかん原性に関与する可能性を見出した。今後、空間情報を保持したままトランスクリプトーム情報の取得を可能にする新技術(空間トランスクリプトーム)を適用していくことで、mTORオパチーのさらなる病態にアプローチできると考えられる。

日本生物学的精神医学会誌 36 (4) : 145-148, 2025

**Key words** : epilepsy, drug resistant epilepsy, mTORopathy, multi-omics analysis, spatial transcriptome

## 1. 難治性てんかんとmTORオパチー

てんかんは、世界人口100人あたり1人が罹患するともいわれる神経疾患である<sup>13)</sup>。てんかん脳内の神経細胞活動が過興奮に傾いて起こるという病態生理のみが知られているが、てんかん発症の詳細な細胞・分子メカニズムは未解明の部分が多い。通常、てんかんに対して採られる第一の治療戦略は薬物療法であり、国内外で認証を受けた抗てんかん薬の数は20種類を超える。しかし、薬物療法は大抵の場合で対症療法的であることに加え、てんかん患者の約30%は多剤併用状況下においても発作を抑制できない難治性てんかん(薬剤抵抗性てんかん)を呈するという現状がある<sup>24)</sup>。難治性てんかんは認知機能の低下や早期死亡のリスクを伴うことが報告されているが<sup>11, 25)</sup>、とりわけ小児においては、発達途中的脳に不可逆的な障害をもたらし患者のその後の人生に多大な影響を与える危険があることから、難治

性てんかんの病態解明と治療法開発は重要な課題である。

大脳皮質形成異常(malformations of cortical development: MCD)は、大脳皮質の構造異常を特徴とする疾患分類であり、小児難治性てんかんの約40%がMCDに起因することが知られている<sup>7)</sup>。1996年にMCDという概念が初めて提唱されて以降<sup>2)</sup>、イメージング技術などの発展とともに、多様な病理学的特徴に基づいたMCDの小分類化が進められてきた。そして、2007年までに、結節性硬化症(tuberous sclerosis complex: TSC)や限局性皮質異形成タイプIIb(forcal cortical dysplasia: FCD IIb)、片側巨脳症(hemimegalencephaly: HME)を代表とする一部のMCD小分類の病変部位でタンパクレベルでのthe mechanistic target of rapamycin(mTOR)経路の過剰亢進がみられることが報告され<sup>1, 3, 18, 19)</sup>、これらの小分類はmTORオパチーと総称されるようになった<sup>4)</sup>。さらに、その後の大規模

Single nucleus transcriptome analysis of surgical specimens to uncover cellular and molecular mechanisms of epileptogenesis in mTORopathy

\*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(〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1) Nao KN Tabe, Mikio Hoshino, Satoshi Miyashita : Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

【宮下 聰 E-mail : s.miyashita@ncnp.go.jp】

なMCD手術検体コホートの整備と次世代シーケンス技術の発展により、mTORオパチーでは、TSC2やMTOR, AKT3といったmTOR経路に関連する遺伝子の変異を頻繁に有することが明らかにされた<sup>12, 15, 17, 20, 21)</sup>。特筆すべきは、報告されている変異は生殖細胞系列変異に限らず、低い変異アレル頻度を有する体細胞変異も含まれるという点である<sup>16)</sup>。これはすなわち、皮質中の一部の細胞での体細胞遺伝子変異が難治性てんかんを引き起こす可能性を示唆するものである。そこで、昨今は、これらの遺伝子変異がmTORオパチーにおけるてんかん発症にどのように寄与しているのかを明らかにすることを目標として、多様な生物学的手法を用いた研究が展開されている。しかしながら、現在に至るまで、小分類間で特徴の類似した細胞種（例：TSCにおけるgiant cellとFCD IIbにおけるballoon cell）が難治性てんかんの発症にかかわる分子メカニズムはもとより、それらの細胞種の起源さえも未解明な状況にある。したがって今後、それらを1つひとつ解明していくことで、てんかん発症における細胞・分子メカニズムの解明という大きな目標を達成し、mTORオパチーひいてはMCD、そして難治性てんかん全般に有効な新規治療法の開発へと繋ぐことが期待されている。Ribierreらによって発表された最近の論文では、FCDII患者の手術脳を用いて、異形成神経細胞の数と異常な電気活動の頻度に相関関係がみられること、また、同細胞では細胞老化マーカーが上昇すること、そして、FCD IIモデルマウスに老化細胞阻害薬を投与することでてんかん発作の頻度減少が観察されることが報告された<sup>22)</sup>。このことは、mTORオパチーで共通してみられる異形成神経細胞がてんかんの原因であり治療標的となる可能性を示唆している。脳組織には多種多様な細胞が含まれているが、次なるマイリストーンとしての異形成神経細胞の遺伝的背景や起源の探索のためには、これらの細胞をとらえた網羅的な遺伝子発現解析が重要な鍵となる。

## 2. オミクス解析による てんかん原性機構へのアプローチ

2000年代以降の次世代シーケンス技術の革新的な発展により、ゲノム(genome)、トランск립トーム(transcriptome)、プロテオーム(proteome)、メタボローム(metabolome)などの生体情報を網羅的に解析することが可能なオミクス解析は飛躍的な普及を果たした。近年では、単一細胞RNAシーケン

ス(single cell RNA sequence)やエピゲノム状態を調べるATAC-seqなどの1細胞レベルでの網羅的な解析や、さらには、空間情報を保持したままトランスクリプトーム情報が取得可能な空間トランスクリプトーム解析技術(spatial transcriptome)が登場するなど、新規解析技術の開発が加速している。その結果、これまででは病態が不明であったさまざまな疾患の細胞・分子病態が数多く解明されつつある。てんかんについてもこれまでに大規模なゲノム解析<sup>9, 10)</sup>や摘出された手術脳組織を用いたRNA-seq解析<sup>5)</sup>がなされ、てんかん発症にかかわるリスク遺伝子やてんかん原性にかかわる分子メカニズムの一端が明らかとなった。筆者らのグループもgangliogliomaなどのてんかんと関連の深い低悪性度の腫瘍性病変群(low-grade epilepsy-associated tumor: LEAT)のトランスクリプトーム解析を行い、てんかん発症に関与しうる分子やシグナル経路を同定した<sup>8)</sup>。一方でmTORオパチーを含むMCDに関しては、大規模なゲノム解析とその後のマウスモデルを用いた検証などはすでに行われているが<sup>12, 15, 17, 20, 21)</sup>、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析などの網羅的な遺伝子発現解析はほとんどなされていない。これまでに筆者らのグループでは、国立精神・神経医療研究センターで取得された手術脳検体を用いたbulk RNA-seq, snRNA-seq, プロテオミクス解析を実施し、てんかん原性にかかわると考えられてきた神経細胞に発現する遺伝子だけではなく、アストロサイトなどのグリア細胞に特異的な多くの遺伝子の発現が変動することを見出した(現在投稿準備中)。グリア細胞における同様の遺伝子発現の変化はGalvãoらによても報告されており<sup>6)</sup>、また、近年のマウスモデルを用いた研究でも、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞がてんかん原性にかかわっていることが示唆されている<sup>14, 23)</sup>。今後、ヒトオミクス解析でみられた遺伝子の発現変化をマウスモデルなどを用いて解析していくことで、てんかん原性にかかわる細胞・分子メカニズムに関して新しい知見が得られることが期待される。

## 3. 精神・神経疾患とオミクス解析にかかわる 今後の展望

てんかんを含む精神・神経疾患の発症・病態進展メカニズムは、神経科学が発展した現代においても未解明の課題として残り続けている。ヒト検体を用いたbulk RNA-seq, snRNA-seq, プロテオミクスなどのオミクス解析は精神・神経疾患の病態を理解

するうえで重要な知見を与えてきたが、未だに病態の全容を解明するには十分ではない。その一因として、従来型のオミクス解析では空間情報を無視していることが挙げられる。image-based spatial transcriptome 装置である 10X Genomics 社 Xenium や Vizgen 社 Merscope は、空間情報を保持したままトランスクリプトームデータの取得を可能にする最先端の空間トランスクリプトーム装置である。そのため、こうした新しいオミクス解析手法は、今後の精神・神経疾患研究を推進していくための重要なツールとなっていくことが期待されている。

本論文に記載した筆者らの研究に関して、すべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

## 文 献

- 1) Aronica E, Boer K, Baybis M, et al (2007) Co-expression of cyclin D1 and phosphorylated ribosomal S6 proteins in hemimegalencephaly. *Acta Neuropathol*, 114 (3) : 287-293.
- 2) Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, et al (1996) A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics*, 27 (2) : 59-63.
- 3) Baybis M, Yu J, Lee A, et al (2004) mTOR cascade activation distinguishes tubers from focal cortical dysplasia. *Ann Neurol*, 56 (4) : 478-487.
- 4) Crino PB (2009) Focal brain malformations : seizures, signaling, sequencing. *Epilepsia*, 50 (suppl 9) : 3-8.
- 5) Dixit AB, Banerjee J, Srivastava A, et al (2016) RNA-seq analysis of hippocampal tissues reveals novel candidate genes for drug refractory epilepsy in patients with MTLE-HS. *Genomics*, 107 (5) : 178-188.
- 6) Galvão IC, Lemoine M, Messias LA, et al (2024) Multimodal single-cell profiling reveals neuronal vulnerability and pathological cell states in focal cortical dysplasia. *iScience*, 27 (12) : 111337.
- 7) Harvey AS, Cross JH, Shinnar S, et al (2008) Defining the spectrum of international practice in pediatric epilepsy surgery patients. *Epilepsia*, 49 (1) : 146-155.
- 8) Iijima K, Komatsu K, Miyashita S, et al (2024) Transcriptional features of low-grade neuroepithelial tumors with the BRAF V600E mutation associated with epileptogenicity. *Genes Cells*, 29 (3) : 192-206.
- 9) International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies (2018) Genome-wide mega-analysis identifies 16 loci and highlights diverse biological mechanisms in the common epilepsies. *Nat Commun*, 9 (1) : 5269.
- 10) International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies (2023) GWAS meta-analysis of over 29,000 people with epilepsy identifies 26 risk loci and subtype-specific genetic architecture. *Nat Genet*, 55 (9) : 1471-1482.
- 11) Jokeit H and Ebner A (1999) Long term effects of refractory temporal lobe epilepsy on cognitive abilities : a cross sectional study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 67 (1) : 44-50.
- 12) Jozwiak J, Jozwiak S and Skopinski P (2005) Immunohistochemical and microscopic studies on giant cells in tuberous sclerosis. *Histol Histopathol*, 20 (4) : 1321-1326.
- 13) Kanner AM and Bicchi MM (2022) Antiseizure medications for adults with epilepsy : a review. *JAMA*, 327 (13) : 1269-1281.
- 14) Kong S, Chen TX, Jia XL, et al (2023) Cell-specific NFIA upregulation promotes epileptogenesis by TRPV4-mediated astrocyte reactivity. *J Neuroinflammation*, 20 (1) : 247.
- 15) Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, et al (2012) De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet*, 44 (8) : 941-945.
- 16) Leventer RJ, Scerri T, Marsh AP, et al (2015) Hemispheric cortical dysplasia secondary to a mosaic somatic mutation in MTOR. *Neurology*, 84 (20) : 2029-2032.
- 17) Lim JS, Kim WI, Kang HC, et al (2015) Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med*, 21 (4) : 395-400.
- 18) Ljungberg MC, Bhattacharjee MB, Lu Y, et al (2006) Activation of mammalian target of rapamycin in cytomegalic neurons of human cortical dysplasia. *Ann Neurol*, 60 (4) : 420-429.
- 19) Miyata H, Chiang AC and Vinters HV (2004) Insulin signaling pathways in cortical dysplasia and TSC-tubers : tissue microarray analysis. *Ann Neurol*, 56 (4) : 510-519.
- 20) Nakashima M, Saito H, Takei N, et al (2015) Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol*, 78 (3) : 375-386.
- 21) Poduri A, Evrony GD, Cai X, et al (2012) Somatic

- activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron*, 74 (1) : 41-48.
- 22) Ribierre T, Bacq A, Donneger F, et al (2024) Targeting pathological cells with senolytic drugs reduces seizures in neurodevelopmental mTOR-related epilepsy. *Nat Neurosci*, 27 : 1125-1136.
- 23) Sano F, Shigetomi E, Shinozaki Y, et al (2021) Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepti-  
cus. *JCI Insight*, 6 (9) : e135391.
- 24) Stafstrom CE and Carmant L (2015) Seizures and epilepsy : an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5 (6) : a022426.
- 25) Trinka E, Bauer G, Oberaigner W, et al (2013) Cause-specific mortality among patients with epilepsy : results from a 30-year cohort study. *Epilepsia*, 54 (3) : 495-501.

## ■ ABSTRACT

### Single nucleus transcriptome analysis of surgical specimens to uncover cellular and molecular mechanisms of epileptogenesis in mTORopathy

Nao KN Tabe, Mikio Hoshino, Satoshi Miyashita

*Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry*

Epilepsy is a neurological disorder that affects approximately 1% of the global population, with its underlying cellular and molecular mechanisms remaining incompletely understood. Notably, around 30% of epilepsy patients experience drug-resistant epilepsy (DRE), in which seizures persist despite the use of antiseizure medication. DRE is particularly critical in pediatric patients as it can lead to cognitive and behavioral development. Among pediatric DRE cases, nearly 40% are associated with malformations of cortical development (MCD). Recent genomic and pathohistological studies of MCD specimens have identified a subgroup of MCD that carries somatic mutations in genes related to the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway that potentially trigger the upregulation of mTOR signaling, which is now referred to as mTORopathies.

To investigate the molecular pathophysiology of mTORopathies, we performed bulk RNA sequencing (bulk RNA-seq), single-nucleus RNA sequencing (snRNA-seq), and proteomic analyses on resected brain tissues from mTORopathy patients. Our findings indicate that, in addition to neuronal dysfunction, transcriptional alterations in astrocytes and microglia contribute to epileptogenesis in mTORopathies.

Furthermore, the application of spatial transcriptomics, such as 10x Genomics Xenium, may provide deeper insights into the spatial organization of gene expression in epileptogenic lesions. Such approaches could enhance our understanding of the molecular pathology of mTORopathies and contribute to the development of targeted therapeutic strategies for DRE.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 36 (4) : 145-148, 2025)