

令和元年5月24日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15532

研究課題名（和文）iPS細胞由来の神経移植で難治性てんかんを治療する

研究課題名（英文）To treat refractory epilepsy with transplantation of neuros derived from iPS cells.

研究代表者

廣瀬 伸一（Hirose, Shinichi）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：60248515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：難治性てんかんのモデルとしてノンセンス変異二種類を有するドラベ症候群のモデルマウスを作出した。我々がすでに作出したマウスでは、ヒトと同様のけいれんを来し、早期突然死も観察された。一方、移植用のiPS細胞として、遺伝子編集技術を使って、アイソジェニックな人工“健常”および、人工“ドラベ症候群”iPS細胞の作出に成功した。現在これらの材料を使用して、神経細胞をモデル動物の脳内にそれぞれ移植して、両者の症状の推移と神経科学的变化を比較観察し、iPS細胞由来の神経細胞移植の治療効果を判定中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドラベ症候群初めとする乳幼児のてんかん性脳症は、発症前診断が可能となって来たが、いまのところはなすすべもなく、乳児期に発症してしまうと難治性てんかんは必発で、精神発達遅滞は避けられない、今回の予備実験により、難治性てんかんの治療に新しい選択肢が生まれ、iPS細胞そのものの臨床医学応用の可能性が広がる。やがては、多数の患者・家族が救われる道につながると確信する。

研究成果の概要（英文）：As model animals representing refractory epilepsy, we have succeeded to genetically engineered mice bearing two different types of non-sense mutations of the Scn1a gene. Mutations of its human ortholog gene, SCN1A, cause Dravet syndrome, one of refractory epilepsies. Our genetically engineered mice exhibited severe seizures and premature death, both of which are seen in patients with Dravet syndrome. To obtain disease and healthy iPS cells based on the same genetic background, we have also genetically generated “Artificial Drave syndrome” iPS cells and “Artificial healthy” iPS cells with a gene editing technology. With these subjects, transplantation of neurons derived from the iPS cells generated is now being conducted to see effects on the phenotypes of the genetically engineered mice.

研究分野：神経内科

キーワード：てんかん 遺伝子改変動物 iPS細胞 細胞移植 分子病態

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、国民の約2%近くが罹患する頻度が高い神経疾患であり、多くは小児期に発症する。しかしながら、その分子生物学的本態は多くは不明で、根本的な治療法の開発や創薬が行えず、難治性のでんかん患者は精神遅滞などの合併症を来す。ドラベ症候群（乳児重症ミオクロニーてんかん）は精神遅滞を来す難治性てんかんの代表例で、申請者らは100種以上のナトリウムチャンネルの遺伝子異常を発見してきた。並行して、ドラベ症候群の遺伝子異常を有する遺伝子改変動物の作出に新しい方法で成功し、マウスはドラベ症候群に類似した症状を起こすことを見いだした。ごく最近遺伝子編集技術を使って、世界初の Dravet 症候群のノックアウトラットの作出にも成功した。一方、ドラベ症候群患者の iPS 細胞を神経細胞に分化誘導して病態研究を行い、その神経生理学的病態を世界に先駆け解明した。ごく最近、この「患者 iPS 細胞」を遺伝子編集技術で「人工正常 iPS 細胞」に、また正常 iPS 細胞に変異を導入した「人工患者 iPS 細胞」にすることに成功した。以上から、いままで作成した遺伝子改変のドラベ症候群モデル動物を、iPS 細胞から分化誘導した神経細胞で治療する、挑戦的かつ萌芽的な研究を思い立った。

2. 研究の目的

全体構想：申請者が続けてきたてんかんの分子病態研究のなかで作出した、精神遅滞を伴う難治性てんかん（ドラベ症候群）の遺伝子改変モデル動物を用いて、蛍光マーカー付きの「マウス正常 iPS 細胞」と、ごく最近遺伝子編集技術で変異導入に成功した「人工疾病 iPS 細胞」から樹立した神経細胞をモデル動物の脳内にそれぞれ移植して、両者の症状の推移と神経科学的变化を比較観察し、iPS 細胞由来の神経細胞移植の治療効果を判定する。

目的：現在根治治療のない Dravet 症候群を、正常 iPS 細胞から誘導された神経細胞の直接脳移植で治療することを目指す。

3. 研究の方法

ヒトと同じ遺伝子異常、症状を有する遺伝子改変動物に、iPS 細胞から分化誘導させた神経細胞を脳内に移植して効果を判定する。最近申請者が作出した、ドラベ症候群の遺伝子異常を有し、ヒトと同じ症状を呈する、遺伝子改変動物（キックインマウス、ノックアウトラット）に対し、蛍光マーカー付きの「正常 iPS 細胞」と、ごく最近遺伝子編集技術で変異導入に成功した「人工疾病 iPS 細胞」から樹立した神経細胞をモデル動物の脳内にそれぞれ移植して、その効果を以下の方法で比較判定する。ビデオ同時記録装置を用いて、症候と脳波の解析を行い、個体レベルでの効果を判定する。スライスパッチクランプ法を用いて、イオンチャンネル電気生理学上での効果を判定する。遺伝子改変動物の変異 iPS 細胞を遺伝子編集にて人工正常 iPS 細胞として上記を行う。

4. 研究成果

遺伝子変異を有する遺伝子改変動物に iPS 細胞由来の神経細胞を移植し、難治性のでんかんの治療が可能か検証するために、現在精神遅滞を伴う難治性てんかん（ドラベ症候群）のノックインマウスの二系統（ナンセンス変異二種）を CRISPR/Cas9 遺伝子編集法を使って作成に成功した。ドラベ症候群は中枢神経電位依存性ナトリウムチャンネルの $\alpha 1$ サブユニットをコードする遺伝子 SCN1A の変異による、てんかん性脳症である。SCN1A の変異は現在までに1200程度報告されており、60%がナンセンス変異を始めとする truncating 変異と呼ばれ、 $\alpha 1$ サブユニットの分子途絶を引き起こす。その他の多くはミスセンス変異であり、アミノ酸置換を引き起こす。最近の我々の研究により、ナンセンス変異によるドラベ症候群はミスセンス変異によるものに比べ、精神遅滞が早期に重度に起こることが明らかにされた。このため、

今回のドラベ症候群のモデルマウスの作出にノンセンス変異二種類を選んだ。我々がすでに作出した、SCN1Aを含む染色体微小欠失を持つマウスでは、ヒトと同様のけいれんを来とし、早期突然死も観察されている。

一方、アイソジェニックな人工“健常”iPS細胞および、人工“ドラベ症候群”細胞を作出することを見据え、ヒトドラベ症候群およびiPS細胞にTALEN遺伝子編集法を使い、対照健常者由来のiPS細胞にSCN1Aの変異を導入、またドラベ症候群由来の患者iPS細胞のSCN1Aの変異の修復が終了し、論文として発表した。

現在これらの材料を使用して、神経細胞をモデル動物の脳内にそれぞれ移植して、両者の症状の推移と神経科学的变化を比較観察し、iPS細胞由来の神経細胞移植の治療効果を判定中である。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 21 件）

1. Yoshitomi S, Takahashi Y, Imai K, Koshimizu E, Miyatake S, Nakashima M, Saito H, Matsumoto N, Kato M, Fujita T, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Different types of suppression-burst patterns in patients with epilepsy of infancy with migrating focal seizures (EIMFS). 査読有 *Seizure*. 2019;65:118-23. DOI:10.1016/j.seizure.2019.01.009
2. Tanaka Y, Sone T, Higurashi N, Sakuma T, Suzuki S, Ishikawa M, Yamamoto T, Mitsui J, Tsuji H, Okano H, Hirose S. Generation of D1-1 TALEN isogenic control cell line from Dravet syndrome patient iPSCs using TALEN-mediated editing of the SCN1A gene. 査読有 *Stem Cell Res*. 2018;28:100-4. DOI:10.1016/j.scr.2018.01.036
3. Tanaka Y, Higurashi N, Shirasu N, Yasunaga S, Moreira KM, Okano H, Hirose S. Establishment of a human induced stem cell line (FU002-A) from Dravet syndrome patient carrying heterozygous R1525X mutation in SCN1A gene. 査読有 *Stem Cell Res*. 2018;31:11-5. DOI:10.1016/j.scr.2018.06.008
4. Okumura A, Maruyama K, Shibata M, Kurahashi H, Ishii A, Numoto S, Hirose S, Kawai T, Iso M, Kataoka S, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S. A patient with a GNAO1 mutation with decreased spontaneous movements, hypotonia, and dystonic features. 査読有 *Brain Dev*. 2018;40(10):926-30. DOI: 10.1016/j.braindev.2018.06.005
5. Nakayama T, Ishii A, Yoshida T, Nasu H, Shimojima K, Yamamoto T, Kure S, Hirose S. Somatic mosaic deletions involving SCN1A cause Dravet syndrome. 査読有 *Am J Med Genet A*. 2018;176(3):657-62. DOI: 10.1002/ajmg.a.38596
6. Ito T, Narugami M, Egawa K, Yamamoto H, Asahina N, Kohsaka S, Ishii A, Hirose S, Shiraishi H. Long-term follow up of an adult with alternating hemiplegia of childhood and a p.Gly755Ser mutation in the ATP1A3 gene. 査読有 *Brain Dev*. 2018;40(3):226-8. DOI: 10.1016/j.braindev.2017.11.007
7. Hayashida T, Saito Y, Ishii A, Yamada H, Itakura A, Minato T, Fukuyama T, Maegaki Y, Hirose S. CACNA1A-related early-onset encephalopathy with myoclonic epilepsy: A case report. 査読有 *Brain Dev*. 2018;40(2):130-3. DOI: 10.1016/j.braindev.2017.08.006
8. Hayashida T, Saito Y, Ishii A, Hirose S, Hiraiwa R, Maegaki Y, Ohno K. Further characterization of CAPOS/CAOS syndrome with the Glu818Lys mutation in the ATP1A3 gene: A case report. 査読有 *Brain Dev*. 2018;40(7):576-81. DOI:10.1016/j.braindev.2018.03.004
9. Bailey JN, de Nijs L, Bai D, Suzuki T, Miyamoto H, Tanaka M, Patterson C, Lin YC, Medina MT, Alonso ME, Serratosa JM, Duron RM, Nguyen VH, Wight JE, Martinez-Juarez IE, Ochoa A, Jara-Prado A, Guilhoto L, Molina Y, Yacubian EM, Lopez-Ruiz M, Inoue Y, Kaneko S, Hirose S, Osawa M, Oguni H, Fujimoto S, Grisar TM, Stern JM, Yamakawa K, Lakaye B, Delgado-Escueta AV. Variant Intestinal-Cell Kinase in Juvenile Myoclonic Epilepsy. 査読有 *N Engl J Med*. 2018;378(11):1018-28. DOI:10.1056/NEJMoa1700175
10. Uchida T, Lossin C, Ihara Y, Deshimaru M, Yanagawa Y, Koyama S, Hirose S. Abnormal gamma-aminobutyric acid neurotransmission in a Kcnc2 model of early onset epilepsy. 査読有 *Epilepsia*. 2017;58(8):1430-9. DOI: 10.1111/epi.13807

11. Takaori T, Kumakura A, Ishii A, Hirose S, Hata D. Two mild cases of Dravet syndrome with truncating mutation of SCN1A. 査読有 Brain Dev. 2017;39(1):72-4.
DOI: 10.1016/j.braindev.2016.07.006
12. Saito T, Ishii A, Sugai K, Sasaki M, Hirose S. A de novo missense mutation in SLC12A5 found in a compound heterozygote patient with epilepsy of infancy with migrating focal seizures. 査読有 Clin Genet. 2017;92(6):654-8.
DOI: 10.1111/cge.13049
13. Numata T, Tsumoto K, Yamada K, Kurokawa T, Hirose S, Nomura H, Kawano M, Kurachi Y, Inoue R, Mori Y. Integrative Approach with Electrophysiological and Theoretical Methods Reveals a New Role of S4 Positively Charged Residues in PKD2L1 Channel Voltage-Sensing. 査読有 Sci Rep. 2017;7(1):9760.
DOI: 10.1038/s41598-017-10357-3
14. Ishii A, Watkins JC, Chen D, Hirose S, Hammer MF. Clinical implications of SCN1A missense and truncation variants in a large Japanese cohort with Dravet syndrome. 査読有 Epilepsia. 2017;58(2):282-90.
DOI: 10.1111/epi.13639
15. Ishii A, Kang JQ, Schornak CC, Hernandez CC, Shen W, Watkins JC, Macdonald RL, Hirose S. A de novo missense mutation of GABRB2 causes early myoclonic encephalopathy. 査読有 J Med Genet. 2017;54(3):202-11.
DOI: 10.1136/jmedgenet-2016-104083
16. Hanaya R, Niantiaro FH, Kashida Y, Hosoyama H, Maruyama S, Otsubo T, Tanaka K, Ishii A, Hirose S, Arita K. Vagus nerve stimulation for genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) accompanying seizures with impaired consciousness. 査読有 Epilepsy Behav Case Rep. 2017;7:16-9.
DOI: 10.1016/j.ebcr.2016.11.001
17. Hammer MF, Ishii A, Johnstone L, Tchourbanov A, Lau B, Sprissler R, Hallmark B, Zhang M, Zhou J, Watkins J, Hirose S. Rare variants of small effect size in neuronal excitability genes influence clinical outcome in Japanese cases of SCN1A truncation-positive Dravet syndrome. 査読有 PLoS ONE. 2017;12(7):e0180485.
DOI: 10.1371/journal.pone.0180485
18. Shi XY, Tomonoh Y, Wang WZ, Ishii A, Higurashi N, Kurahashi H, Kaneko S, Hirose S, Epilepsy Genetic Study Group J. Efficacy of antiepileptic drugs for the treatment of Dravet syndrome with different genotypes. 査読有 Brain Dev. 2016;38(1):40-6.
DOI: 10.1016/j.braindev.2015.06.008
19. Meisler MH, Helman G, Hammer MF, Fureman BE, Gaillard WD, Goldin AL, Hirose S, Ishii A, Kroner BL, Lossin C, Mefford HC, Parent JM, Patel M, Schreiber J, Stewart R, Whittemore V, Wilcox K, Wagnon JL, Pearl PL, Vanderver A, Scheffer IE. SCN8A encephalopathy: Research progress and prospects. 査読有 Epilepsia. 2016;57(7):1027-35.
DOI: 10.1111/epi.13422
20. Ju J, Hirose S, Shi XY, Ishii A, Hu LY, Zou LP. Treatment with Oral ATP decreases alternating hemiplegia of childhood with de novo ATP1A3 Mutation. 査読有 Orphanet J Rare Dis. 2016;11(1):55.
DOI: 10.1186/s13023-016-0438-7
21. Ihara Y, Tomonoh Y, Deshimaru M, Zhang B, Uchida T, Ishii A, Hirose S. Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations. 査読有 PLoS ONE. 2016;11(2):e0150095.
DOI: 10.1371/journal.pone.0150095

〔学会発表〕（計 26 件）

1. Hirose S, Pathogenesis and genetic substrate, 19th International symposium on severe infantile epilepsies: old and new treatments, 2018
2. Hirose S, Application of Genetics to Epilepsy after Gene-Hunting, Anzcns 7th Annual Scientific Meeting, 2018
3. Hirose S, Genes in Focal Epilepsy, ANZCNS 7th Annual Scientific Meeting, 2018
4. Hirose S, Disease Modeling of Refractory Epilepsy using iPSC s, The 40th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry The 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2018
5. Hirose S, Precision medicine though stem cells, 12th Asian and Oceanian Epilepsy Congress, 2018
6. Hirose S, Challenges and Opportunities in Pediatric Neurological Disease in Low Income Countries like Nepal, XIXth Nepalese Congress of Paediatrics, NEPCON 2018 & 37th Anniversary NEPAS, 2018
7. Hirose S, Genetic background of developmental and epileptic encephalopathies, KEC2018 23rd, 2018

8. Hirose S, Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in intractable childhood disorders, 10th Annual World Congress on Pediatrics, Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2017
9. Watanabe E, Ihara Y, tomonoh Y, Fujita T, Ideguchi H, Inoue T, Takahashi Y, Yasumoto S, Hirose S, Effects of steroid pulse therapy in refractory epilepsy with anti-glutamate receptor antibodies, 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2017
10. Fujita T, Ideguchi H, Watanabe E, Tomonoh Y, Ihara Y, Inoue T, Hirose S, Yasumoto S, ACTH induced nonconvulsive status epilepticus in an infant with West Syndrome, 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2017
11. Ideguchi H, Ihara Y, Fujita T, Inoue T, Hirose S, Efficacy of Levetiracetam monotherapy in epilepsy, 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2017
12. Ihara Y, Tomonoh Y, Fujita T, Ideguchi H, Inoue T, Takahashi Y, Yasumoto S, Hirose S, The effectiveness of steroid pulse therapy and prognosis in frontal lobe epilepsy with anti-glutamate receptor antibodies:a case report, 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2017
13. Ishii A, Hirose S, A de novo missense mutation of GABRB2 causes early myoclonic encephalopathy, 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2017
14. Hirose S. Voltage-Gated sodium Ion Channels in Epileptic Encephalopathy, 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2017
15. Hirose S, Ishii A. Status epilepticus in genetic epilepsies. CNSP-PLAE Symposium on Status Epilepticus & 9th National Epilepsy Congress, 2017
16. Yamaguchi H, Watanabe E, Ihara Y, Tomonoh Y, Fujita T, Ideguchi H, Inoue T, Takahashi Y, Yasumoto S, Hirose S, Effects of steroid pulse therapy in autoimmune childhood epilepsy with anti-glutamate receptor antibodies. CNSP-PLAE Symposium on Status Epilepticus & 9th National Epilepsy Congress, 2017
17. Hirose S. The potential of stem cells in precision medicine, 32nd International Epilepsy Congress, 2017
18. Hirose S, Genetics of epileptic encephalopathy, 4th National Conference of Society for Indian Academy of Medical Genetics(SIAMG), 2017
19. Hirose S. Epilepsy Genetics beyond “Mutation Hunting”Bridges from Laboratory to Patient Care-From the studies for epilepsy at Fukuoka University 2017 Educational Seminar of Genetic & Metabolic Diseases for Young Pediatricians, Investigators(SGMDYPI), 2017
20. Ishii A, Watkins J, Chen D, Hirose S, Hammer M F, Characteristics of SCN1A Mutation locations in a Cohort of 285 Japanese Dravet Syndrome Patients AES Annual Meeting, 2016
21. Fujita T, Ideguchi H, Watanabe E, Tomonoh Y, Ihara Y, Inoue T, Takahashi Y, Hirose S, The effect of steroid pulse therapy on a case of Dravet . The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders(ISAE2016), 2016
22. Sokoda T, Nishizawa Y, Matsui J, Nishikura N, Takano T, Takeuchi Y, Ishii A, Hirose S. A case of Dravet syndrome affected an acute encephalopathy. The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders(ISAE2016), 2016
23. Saitoh M, Hoshino A, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Mizuguchi M, Genetic predisposition to acute encephalopathy with status epilepticus. The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders(ISAE2016), 2016.
24. Hirose S, Genetic background of encephalopathy, The 18th annual meeting of infantile seizure society, International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders(ISAE2016), 2016
25. Ishii A, Watkins J C, Chen D, Hirose S, Hammer M F, Predictions of regression of intellectual disability and measuring efficacy of medication in 286 Japanese cohort of Dravet syndrome with SCN1A missense and truncation mutations, 11th Asian & Oceanian epilepsy congress, 2016.
26. Hirose S. ”How to interpret the results of a genetic test for epilepsy, What are the Limitations?” 11th Asian & Oceanian epilepsy congress, 2016

〔図書〕 (計 8 件)

1. Ishii A, Hirose S, Elsevier: USA, Acute Encephalopathy and Encephalitis in Infancy and Its Related Disorders. 2017, 8
2. 石井敦士、廣瀬伸一, 診断と治療社, 稀少てんかんの診療指標, 2017, 6
3. 日暮憲道、廣瀬伸一, 診断と治療社, 稀少てんかんの診療指標, 2017, 3
4. 石井敦士、廣瀬伸一, 診断と治療社, 稀少てんかんの診療指標, 2017, 4
5. 石井敦士、廣瀬伸一, 株式会社メディカルドゥ, 遺伝医学 MOOK 別冊 最新精神・神経遺伝

医学研究と遺伝カウンセリング, 2017, 8

6. 廣瀬伸一, 医学書院, 今日の治療指針, 2016, 2

7. 石井敦士、廣瀬伸一, MRDICALVIEW, 神経内科外来シリーズ4 てんかん外来, 2016, 8

8. 石井敦士、廣瀬伸一, 日本てんかん学会, てんかん白書 てんかん医療・研究のアクションプラン, 2016, 9

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。