

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07784

研究課題名（和文）ドラベ症候群の脳オルガノイド病態モデルを活用した発達性てんかん性脳症の病態解析

研究課題名（英文）Dravet

研究代表者

田中 泰圭（Tanaka, Yasuyoshi）

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：50714466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ドラベ症候群患者由来のiPS細胞から脳オルガノイドを作製した。脳オルガノイド内で観察された神経ロゼットは、大部分の細胞が脳前脳マーカーFOXG1およびMGEマーカーNkx2.1を発現していた。

12週間培養したMGE脳オルガノイドからRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンス解析により遺伝子発現解析を行った。健康者由来およびドラベ症候群由来のMGE脳オルガノイドにおける遺伝子発現をRNA-seqを用いて比較したところ、いくつかの遺伝子で発現の変化が見られた。現在、これらの遺伝子発現変化がドラベ症候群の病態形成に関与するかどうかを解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドラベ症候群（DS）における発達性てんかん性脳症（DEE）の発症は、群発する難治のてんかん発作により惹起されると考えられている。この群発するてんかん発作に伴った神経毒性や神経変性の関与が疑われているが、DEEにおける重篤な認知機能障害などを含む発達遅滞の発症機構については、未だ不明な点が多い。すなわち、DEEの発症機序を解明すれば、難治性疾患であるDSの根治を目指した革新的な治療研究に繋がること期待され、苦悩する患者や家族にとって大きな福音となる。

研究成果の概要（英文）：We generated brain organoids from iPS cells derived from a patient with Dravet syndrome. Almost cells within neural rosettes were characterized by expression of the expressing the telencephalic marker FOXG1 and the subpallial medial ganglionic eminence (MGE) marker Nkx2.1.

RNA was extracted from MGE brain organoids cultured for 12 weeks, and gene expression analysis was performed using RNA sequencing with next-generation sequencers. Comparing the gene expression in MGE brain organoids derived from healthy individuals and those with DS using RNA-seq, we found changes in the expression of several genes. We are currently analyzing whether these gene expression changes are involved in the pathogenesis of Dravet syndrome.

研究分野：小児科学

キーワード：発達性てんかん性脳症 Dravet症候群 疾患特異的iPS細胞 脳オルガノイド SCN1A Nav1.1 神経変性 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

ドラベ症候群 (DS) は、原因となる遺伝子異常が明確となった数少ない乳児期発症難治性てんかんの一つであり、発作重積等により約 3 割の患者が若年死亡する (Genton et al., 2011、Sakaguchi et al., 2011)。DS 患者では、主に電位依存性 Na⁺チャネル (Na_v1.1) のサブユニットをコードする *SCN1A* 遺伝子の異常が同定される (Depienne et al., 2009、Zuberi et al., 2011 他)。*SCN1A* 遺伝子の変異同定による遺伝子診断は可能だが、詳細な分子病態は未だ不明な点が多く、既存抗てんかん薬が無効で効果的な治療法が未確立である。平成 27 年には本邦の「難病の患者に対する医療等に関する法律」のもと、厚生労働省の指定難病の対象疾患に含まれたことから、早期の病態解明と新たな根治薬および治療法の開発が急務であり、患者ご家族およびてんかん研究の悲願である。

DS モデルマウスを用いた先行研究より (Ogiwara et al., 2007、Han et al., 2012、Cheah et al., 2012 他) 発達期の前脳 GABA 性介在性神経細胞における Na_v1.1 のハプロ不全が報告された。これにより中枢神経における抑制性 GABA 作動性神経細胞の機能不全により脳神経の過剰興奮が誘起され、重篤なてんかん発作を発病すると考えられている。一方で、DS の発達性てんかん性脳症 (DEE) や、それに伴った認知機能の低下などの発症機序について分子生物学的原因については未だ不明な点が多く残されている。患者脳における神経変性や神経毒性が病因だと考えられているが、DEE の発症との相関性を示した研究報告はない。

モデル動物とヒト脳における神経細胞基盤の違いは周知の通りであり、必ずしも患者の複雑な表現系が推定される病態を反映しているとは言い難い。しかしながら、DS の病態・治療研究には患者脳組織を利用することはできず、患者脳組織を模倣したヒト擬似脳組織の *ex vivo* 疾患モデルを活用する手立てが切望される。これらの問題を解決し、DEE の病態研究を実施できない限りは、DS の根治への道は閉ざされたままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、疾患特異的 iPS 細胞より作製した脳オルガノイドを活用して、DS 患者における DEE の発症機序の解明である。DS 患者の DEE 発症には、群発するてんかん発作に伴った興奮毒性による神経細胞死の誘発が考えられている。これまで不明であった DEE の発症機序に対して、新しい観点から治療標的の提示を目指す。治療標的を科学的に定義付けすることで、革新的な治療法や創薬研究の発展に寄与する。

3. 研究の方法

1. 患者由来および患者由来人工健常 iPS 細胞

健常者由来 iPS 細胞 (201B7; 健常コントロール)、DS 患者由来 iPS 細胞 (D1; *SCN1A* 遺伝子に nonsense 変異を有する DS モデル)⁵⁾、DS 患者由来人工健常 iPS 細胞 (D1T; D1 細胞株の遺伝子変異を修復した isogenic な人工健常コントロール)⁶⁾。

2. 終脳領域の脳オルガノイド (MGEOs) の作製

他の研究グループの誘導方法を改変し、ヒト iPS 細胞から目的の終脳領域の脳オルガノイド (MGEOs) へ分化誘導した⁷⁾。定量的 RT-PCR お呼び免疫染色法により、これら 3 株の iPS 細胞より作製した MGEOs の終脳領域特異的なマーカー遺伝子の発現を解析した。同様に、MGEOs に含まれる神経細胞種の同定ならびに Nav1.1 の発現も解析した。

3. 終脳領域の脳オルガノイド (MGEOs) の RNA-seq 解析

作製した MGEOs から RNA を抽出し、網羅的な RNA-Seq を実施した。健常者と比較し DS 患者において発現変化していた遺伝子群を Gene Ontology 解析等で同定した。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞より MGEOs の作製

本研究では 3 ラインのヒト iPS 細胞 (健常者由来 iPS 細胞: 健常コントロール、DS 患者由来 iPS 細胞: DS 病態モデル、患者由来人工健常 iPS 細胞: *SCN1A* 遺伝子異常を修復した DS 病態モデルと isogenic な健常コントロール) を用いて、MGE 領域に由来する脳オルガノイドを作製した。作製した脳オルガノイドでは、MGE 領域マーカーである FOXG1 および NKX2.1 の発現が陽性な神経幹細胞が観察され、MGE 領域に属する脳オルガノイド (MGEOs) であることが確認できた。

(2) MGEOs に含まれる神経細胞種の同定

12 週間培養した MGEOs において、BII-tubulin 陽性な神経細胞と GFAP 陽性なアストロサイトの発現が観察された。加えて、神経細胞においては、VGLUT1 陽性なグルタミン酸作動性

の興奮性神経細胞および VGAT 陽性な GABA 作動性の抑制性神経細胞が発現していた。

抑制性神経細胞のサブタイプの同定を試みた結果、てんかんの病態に重要な Parvalbumin(PV) 陽性な抑制性神経細胞が含まれていることが分かった。また、この PV 陽性な神経細胞では Nav1.1 の発現も認められ、作製した MGEOs が DS の病態モデルとして活用できることが示唆された。

(3) MGEOs の活動電位測定

作製した MGEOs の活動電位測定を行った結果、自発的な神経の活動電位を記録することができた。現在、健常者由来 MGEOs と DS 由来 MGEOs で神経ネットワークの発火パターンの際について解析中である。

(4) MGEOs の RNA-seq 解析

RNA-seq を用いて健常者由来と DS 由来の MGEOs における遺伝子発現を比較したところ、数種類の遺伝子で発現が変化していることが分かった。現在、これらの遺伝子発現変化が DS の病態形成に関与するか解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 田中泰圭	4. 巻 16
2. 論文標題 人工多能性幹細胞 (iPSC) を利用した病態解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Epilepsy	6. 最初と最後の頁 111 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchino Kouya, Tanaka Yasuyoshi, Ikezawa Wakana, Deshimaru Masanobu, Kubota Kaori, Watanabe Takuya, Katsurabayashi Shutaro, Iwasaki Katsunori, Hirose Shinichi	4. 巻 643
2. 論文標題 Astrocyte Ca ²⁺ signaling is facilitated in Scn1a+/- mouse model of Dravet syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 169 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.12.084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchino Kouya, Tanaka Yasuyoshi, Kawaguchi Sayaka, Kubota Kaori, Watanabe Takuya, Katsurabayashi Shutaro, Hirose Shinichi, Iwasaki Katsunori	4. 巻 25
2. 論文標題 Establishment of autaptic culture with human-induced pluripotent stem cell-derived astrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104762 ~ 104762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kouya Uchino, Yasuyoshi Tanaka, Sayaka Kawaguchi, Kaori Kubota, Takuya Watanabe, Shutaro Katsurabayashi, Shinichi Hirose & Katsunori Iwasaki.
2. 発表標題 The establishment of a novel autaptic culture system equipped with human-induced pluripotent stem cell-derived astrocytes.
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内野 紘也, 田中泰圭, 川口 紗果, 渡辺拓也, 窪田香織, 桂林秀太郎, 廣瀬伸一, 岩崎克典.
2. 発表標題 神経変性疾患の病態解明に資するiPS細胞由来アストロサイトによる最小神経回路の構築.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内野 紘也, 田中泰圭, 川口 紗果, 渡辺拓也, 窪田香織, 桂林秀太郎, 廣瀬伸一, 岩崎克典.
2. 発表標題 ヒト iPS細胞由来アストロサイトと共培養した単一ニューロンの興奮性シナプス機能解析.
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内野 紘也, 河野洋幸, 田中泰圭, 安谷屋友菜, 朝原愛, 弟子丸正伸, 渡辺拓也, 窪田香織, 桂林秀太郎, 廣瀬伸一, 岩崎克典.
2. 発表標題 Dravet症候群モデルマウスであるScn1a ^{+/-} マウスは細胞外Ca ²⁺ 濃度が増加するとシナプス伝達の興奮性と抑制性のバランスが崩壊する.
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuyoshi TANAKA
2. 発表標題 Basic study of pathogenesis of epilepsy by means of iPS cell.
3. 学会等名 the 13th Asian & Oceanian Epilepsy Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------