

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670481

研究課題名(和文)難治性てんかんに遺伝子修復で挑む

研究課題名(英文)Challenges to refractory epilepsies with gene editing.

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：単一遺伝子異常によるてんかんであれば、理論的にはその遺伝子を修復することにより根治することができるはずである。我々はドラベ症候群の患者より樹立したiPS細胞から神経を分化させることに世界に先駆け成功した。さらにこの細胞を用いて、SCN1Aの異常をTALENと呼ばれる遺伝子修復技術により、正常化することに成功した。これに対応する形で、正常対照者より樹立iPS細胞にドラベ症候群の患者のSCN1Aの異常を同じ方法で導入することに成功した。現在遺伝子異常が修復されたiPS細胞より神経細胞を誘導分化させ、病態が回復し、健常者iPS細胞からより樹立した神経細胞の神経活動と同じであるか等を評価中である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular pathomechanisms of Dravet syndrome, we use induced pluripotent cells (iPSCs) from a Dravet syndrome patient. These cells demonstrate the dysfunction of their inhibitory neurons. We use TALEN gene editing techniques to repair abnormalities in the SCN1A gene of the patient's iPSCs and, in doing so, see the potential of repaired cells for Dravet syndrome treatment, the iPSC abnormality is corrected with no effect on other parts of the genome. In addition, the SCN1A mutation is introduced iPSCs from a healthy individual. These repaired and mutated iPSCs allow the pathomechanisms of Dravet syndrome to be studied from an isogenic perspective, and with the gene editing system should provide new therapeutic measures for epilepsies such as Dravet syndrome.

研究分野：小児科

キーワード：てんかん ドラベ症候群 遺伝子 遺伝子修復 TALEN

1. 研究開始当初の背景

乳児期発症のドラベ症候群は難治性で、予後不良である。遺伝子学的研究で、申請者らの報告も含め、約 70% で電位依存性 Na チャネル (Na_v1.1) の 1 サブユニットをコードする SCN1A 遺伝子に変異が同定されている。Na_v1.1 は主に抑制系介在ニューロンに発現し GABA 放出を司っている。残念なことに、GABA 作動薬を含め殆どの抗てんかん薬に抵抗性である。近年、ES 細胞や幹細胞を用いた再生医療は進み、神経疾患では 2005 年にパーキンソン病モデルのサルで ES 細胞をドーパミン神経細胞に分化させた後に移植することで神経症状の改善が報告された。これに先駆けて、アデノ随伴ベクターを用いて、線条体への芳香族アミノ酸脱炭酸酵素遺伝子導入による臨床研究が米国で 2004 年に開始されている。しかしながら、てんかんにおいては罹患 1% と多い疾患ながら一向に根本的治療法の構築がなされていない。

申請者らは、ドラベ症候群の脳神経病解明のためドラベ症候群患者由来 iPS 細胞を作成し、抑制系介在ニューロンに分化させることに成功している。また、常染色体優性夜間前頭葉てんかんの変異を導入したラット独自の Cre-Lox 法 (キックイン法) で良性家族性新生児てんかんの変異を導入したマウスを作成し解析を行っている。

2. 研究の目的

本研究は小児難治性てんかんであるドラベ症候群を初めとする遺伝子異常を、iPS 細胞や TALEN などの最新技術を使って修復し治療する試みで、てんかんの根治治療の開発を目的とする。

3. 研究の方法

以下の 2 つの手法での治療法を樹立する基盤を構築する。

(1) 変異を持つ iPS 細胞を TALEN 技術で正常遺伝子配列に修復し、正常神経ネットワー

ク再構築を行う。

その後、改変型アデノ随伴ウイルス 2 型を用いた経静脈的に脳神経細胞を標的とした遺伝子配列修復による遺伝子治療法の開発をめざす。

4. 研究成果

ドラベ症候群の患者より樹立した iPS 細胞から神経を分化させた。その細胞の電気活動を詳細に調べることで、異常があるナトリウムチャネルは主に、抑制神経に発現していること。ナトリウムチャネルの異常により、この抑制神経の活動電位が低下して、相対的な神経興奮、すなわち激しいてんかん発作を来すことを明らかにすることができた。

さらにこの細胞を用いて、SCN1A の異常を TALEN と呼ばれる遺伝子修復技術により、正常化することに成功した。これに対応する形で、正常対照者より樹立 iPS 細胞にドラベ症候群の患者の SCN1A の異常を同じ方法で導入することに成功した。また次世代シーケンサーを用いて、他の部分の遺伝子に偶発的に変異が入っていないかを確認した。さらに、遺伝子異常が修復された iPS 細胞より神経細胞を誘導分化させ、病態が回復しているか、健常者 iPS 細胞からより樹立した神経細胞の神経活動と同じであるか等を評価中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 24 件)

1. 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. PLoS One. 査読有 2016;11(2):e0150095.

DOI:10.1371/journal.pone.0150095

2. 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. *Brain & Dev* 査読有 2016;38(1):40-6. DOI:10.1016/j.braindev.2015.06.008
3. Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, Sugawara Y, Sakuma H, Tomonoh Y, Inoue T, Hoshina M, Satomi R, Ohfu M, Itomi K, Takano K, Kirino T, Hirose S. Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy. *Seizure*. 査読有 2015;27:1-5. DOI:10.1016/j.seizure.2015.02.006
 4. Kano S, Yuan M, Cardarelli RA, Maegawa G, Higurashi N, Gaval-Cruz M, Wilson AM, Tristan C, Kondo MA, Chen Y, Koga M, Obie C, Ishizuka K, Seshadri S, Srivastava R, Kato TA, Horiuchi Y, Sedlak TW, Lee Y, Rapoport JL, Hirose S, Okano H, Valle D, O'Donnell P, Sawa A, Kai M. Clinical utility of neuronal cells directly converted from fibroblasts of patients for neuropsychiatric disorders: studies of lysosomal storage diseases and channelopathy. *Current molecular medicine*. 査読有 2015;15(2):138-45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732146>
 5. Shi XY, Yang XF, Tomonoh Y, Hu LY, Ju J, Hirose S, Zou LP. Development of a mouse model of infantile spasms induced by N-methyl-D-aspartate. *Epilepsy research*. 査読有 2015;118:29-33. DOI:<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.eplepsyres.2015.09.014>
 6. Xiu-Yu Shi , Xiao-Fan Yang, Yuko Tomonoh, Lin-Yan , Hu Jun Ju, Hirose S, Li-Ping Zou. Development of a mouse model of infantile spasms induced by N-methyl-D-aspartate. *Epilepsy Research ELSEVIER*. 査読有 2015 118: 29-33. DOI:<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.eplepsyres.2015.09.014>
 7. Yamamoto T, Shimojima K, Sangu N, Komoike Y, Ishii A, Abe S, Yamashita S, Imai K, Kubota T, Fukasawa T, Okanishi T, Enoki H, Tanabe T, Saito A, Furukawa T, Shimizu T, Milligan CJ, Petrou S, Heron SE, Dibbens LM, Hirose S, Okumura A. Single Nucleotide Variations in CLCN6 Identified in Patients with Benign Partial Epilepsies in Infancy and/or Febrile Seizures. *PLoS One*. 査読有 2015;10(3):e0118946. DOI:10.1371/journal.pone.0118946
 8. Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawawaki H, Kubota M, Yamagata T, Miyamoto A, Yamanaka G, Amemiya K, Kikuchi K, Kamei A, Akasaka M, Anzai Y, Mizuguchi M. Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline. *Brain & development*. 査読有 2015;37(5):463-70. DOI:10.1016/j.braindev.2014.07.010
 9. Fukasawa T, Kubota T, Negoro T, Saitoh M, Mizuguchi M, Ihara Y, Ishii A, Hirose S. A case of recurrent encephalopathy with SCN2A missense mutation. *Brain & development*. 査読有 2015;37(6):631-4. DOI:10.1016/j.braindev.2014.10.001
 10. Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Morisada N, Iijima K, Takada S, Araki A, Tanabe Y, Arai H, Yamashita S, Ohashi T, Oda Y,

- Ichiseki H, Hirabayashi S, Yasuhara A, Kawawaki H, Kimura S, Shimono M, Narumiya S, Suzuki M, Yoshida T, Oyazato Y, Tsuneishi S, Ozasa S, Yokochi K, Dejima S, Akiyama T, Kishi N, Kira R, Ikeda T, Oguni H, Zhang B, Tsuji S, Hirose S. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology*. 査読有 2014;82(6):482-90. DOI:10.1212/WNL.000000000000102
11. Tomonoh Y, Deshimaru M, Araki K, Miyazaki Y, Arasaki T, Tanaka Y, Kitamura H, Mori F, Wakabayashi K, Yamashita S, Saito R, Itoh M, Uchida T, Yamada J, Migita K, Ueno S, Kitaura H, Kakita A, Lossin C, Takano Y, Hirose S. The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy. *PLoS One*. 査読有 2014;9(2):e88549. DOI:10.1371/journal.pone.0088549
12. Inoue S, Ishii A, Shirotani G, Tsutsumi M, Ohta E, Nakamura M, Mori T, Inoue T, Nishimura G, Ogawa A, Hirose S. Case of Desbuquois dysplasia type 1: potentially lethal skeletal dysplasia. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 査読有 2014;56(4):e26-9. DOI:10.1111/ped.12383
13. Inoue T, Ihara Y, Tomonoh Y, Nakamura N, Ninomiya S, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Zhang B, Hirose S. Early onset and focal spike discharges as indicators of poor prognosis for myoclonic-astatic epilepsy. *Brain & development*. 査読有 2014;36(7):613-9. DOI:10.1016/j.braindev.2013.08.009
14. Ishii A, Kanaumi T, Sohda M, Misumi Y, Zhang B, Kakinuma N, Haga Y, Watanabe K, Takeda S, Okada M, Ueno S, Kaneko S, Takashima S, Hirose S. Association of nonsense mutation in GABRG2 with abnormal trafficking of GABAA receptors in severe epilepsy. *Epilepsy research*. 査読有 2014;108(3):420-32. DOI:10.1016/j.epilepsyres.2013.12.005
15. Koyama S, Mori M, Kanamaru S, Sazawa T, Miyazaki A, Terai H, Hirose S. Obesity attenuates D2 autoreceptor-mediated inhibition of putative ventral tegmental area dopaminergic neurons. *Physiol Rep*. 査読有 2014;2(5):e12004 DOI:10.14814/phy2.12004
16. Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S. Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 査読有 2014;29(1):153-4 DOI:10.1002/mds.25659
17. Fukasawa T, Kubota T, Negoro T, Saitoh M, Mizuguchi M, Ihara Y, Ishii A, Hirose S. A case of recurrent encephalopathy with SCN2A missense mutation. *Brain & development*. 査読有 2014;pii: S0387-7604(14)00248-4. DOI:10.1016/j.braindev.2014.10.001
18. Higurashi N, Nakamura M, Sugai M, Ohfu M, Sakauchi M, Sugawara Y, Nakamura K, Kato M, Usui D, Mogami Y, Fujiwara Y, Ito T, Ikeda H, Imai K, Takahashi Y, Nukui M, Inoue T, Okazaki S, Kirino T, Tomonoh Y, Inoue T, Takano K, Shimakawa S, Hirose S. PCDH19-related female-limited epilepsy: further details regarding early clinical features and therapeutic efficacy. *Epilepsy Res*. 査読有

- 2013;106(1-2):191-9
DOI:10.1016/j.eplepsyres.2013.04.005
19. Higurashi N, Okano H, Hirose S. The effect of SCN1A mutations on patient-derived GABAergic neurons: what are the implications for future Dravet syndrome therapeutics? *Future Neurol.* 査読有 2013;8(5):487-9
 20. Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain.* 査読有 2013;6:19. DOI:10.1186/1756-6606-6-19
 21. Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, Kauffman M, Tan NC, Lowenstein DH, Sisodiya SM, Ottman R, Berkovic SF, SCN1A testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia.* 査読有 2013;54(5):946-52. DOI:10.1111/epi.12168
 22. Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S, Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S, Sasaki M, Hirose S. Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *Plos one.* 査読有 2013;8(2):e56120. DOI:10.1371/journal.pone.0056120
 23. Ishii A, Yasumoto S, Ihara Y, Inoue T, Fujita T, Nakamura N, Ohfu M, Yamashita Y, Takatsuka H, Taga T, Miyata R, Ito M, Tsuchiya H, Matsuoka T, Kitao T, Murakami K, Lee WT, Kaneko S, Hirose S. Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choreoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain & development.* 査読有 2013;35(6):524-30. DOI:10.1016/j.braindev.2012.09.006
 24. Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Lossin C, Z. BT, Hirose S. Novel HCN2 Mutation Contributes to Febrile Seizures by Shifting the Channel's Kinetics in a Temperature-Dependent Manner. *PLoS one.* 査読有 2013;8(12).doi:10.1371/journal.pone.0080376
- 〔学会発表〕(計5件)
1. Hirose S. Channelopathy in Early- life Seizures. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology 2015/5/14 Taipei, Taiwan
 2. Higurashi N, Takahashi Y, Hirose S. Immediate Suppression of Seizure Clusters by Corticosteroids in PCDH19 Female Epilepsy. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology 2015/5/14-17 Taipei, Taiwan
 3. Tanaka Y, Sone T, Uchida T, Higurashi N, Ishikawa M, Okano H, Hirose S. Genome Editing of SCN1A in iPSC Cells to Study the Pathomechanisms of Dravet Syndrome. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology 2015/5/14-17 Taipei, Taiwan
 4. Hirose S. Molecular basis of benign familial infantile epilepsy and related syndromes. モントリオールてんかん学会 30th International Epilepsy Congress2013 2013.6.23-27 Montreal, Canada

5. Hirose S, Ihara Y, Ishii A. Frequency of Mutations of KCNQ2 and KCNQ3 in Benign Neonatal Epilepsy in Japan. *てんかん学会 Korean Epilepsy Congress2013* 2013.6.13-6.15 韓国ソウル
〔図書〕(計9件)
1. 石井敦士、廣瀬伸一 てんかん外来 神経内科外来シリ-ズ4 てんかんでの遺伝子異常 20~27 8ページ MEDICAL VIEW 2016
 2. 倉橋宏和、廣瀬伸一 臨床てんかん学 第5章てんかんの遺伝学 良性ローランドてんかん 113-114 2ページ 医学書院 2015
 3. 石井敦士、廣瀬伸一 臨床てんかん学 第5章てんかんの遺伝学 小児欠伸てんかん 111-112 2ページ 医学書院 2015
 4. 石井敦士、廣瀬伸一 臨床てんかん学 第5章てんかんの遺伝学 若年ミオクロニーてんかんを含めた突発性全般てんかん 108-110 3ページ 2015 医学書院
 5. 倉橋宏和、廣瀬伸一 臨床てんかん学 第5章てんかんの遺伝学 一般的な年齢非依存性焦点性てんかん 106-108 3ページ 2015 医学書院
 6. 廣瀬伸一 今日の治療指針 私はこうして治療している 熱性けいれん febrile seizures 1452-1453 2ページ 2015 医学書院
 7. Hirose S. Mutant GABAA receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. *Genetics of Epilepsy Progress in brain research*. 55-85. 31ページ 2014
 8. 廣瀬伸一 小児科研修ノート第2版 診断と治療社 96-98 3ページ 2014
 9. 廣瀬伸一 遺伝学的診断マニュアル 希少難治てんかん 診療マニュアル

109-113 5ページ 2013 診断と治療社

10.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)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

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
高野 行夫 (TAKAN0, Yukio)
福岡大学薬学部教授 2014年3月末退職
研究者番号：50113246

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI, Shyutaro)
福岡大学薬学部准教授
研究者番号：5043145

斎藤 亮 (SAITO, Ryo)
福岡大学薬学部講師 2014年3月末退職
研究者番号：80122696