

平成30年6月6日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461552

研究課題名(和文)患者iPS細胞を用いたドラベ症候群の病態解明・細胞移植治療を目指した研究

研究課題名(英文)Research on Dravet syndrome by using patient-derived iPS cells and a rat model

研究代表者

日暮 憲道 (HIGURASHI, NORIMICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40568820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、未だ治療法のない小児難治てんかんの一つ、ドラベ症候群について、患者から作成したiPS細胞や疾患ラットを利用し、病態解明と細胞移植治療(脳へ正常神経細胞を移植し治す)の実現を目的としている。今回、将来的に移植に必要なGABA作働性神経細胞(神経の興奮を抑える細胞)をiPS細胞から効率的に作成する方法の確立、患者iPS細胞を治療に用いるため原因となる遺伝子異常を正常に治したiPS細胞の作成、今後移植実験を開始するため、マンガン造影MRIという方法を用い、疾患ラット脳のでんかん病態を解剖学的に評価した。今後さらにMRIによる検討を進め、新たな側面からの病態解明と早期の移植実験開始を目指す。

研究成果の概要(英文)：Dravet syndrome (DS) is an infantile-onset intractable epilepsy, mainly caused by mutation in SCN1A gene. This research aims to elucidate novel pathomechanisms on DS and to achieve a transplantation therapy of GABAergic inhibitory precursors in the future. In the present study, 1) we developed a method to efficiently induce GABAergic neurons from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). 2) We established mutation-repaired iPSCs from a patient-derived iPSCs by using a TALEN-based genome-editing technology. 3) Finally, to identify brain regions that is involved in the epilepsy pathogenesis in DS, we employed a manganese-enhanced magnetic resonance imaging technique, which may detect regions with increased neuronal activity. We identified several enhanced regions including hippocampus, thalamus, and some neocortical areas. Although further evaluations are necessary, this method will elucidate anatomical basis for epileptogenesis and target regions for cell therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：てんかん 病態 細胞治療 iPS細胞 モデルラット MRI 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

- (1) ドラベ症候群 (DS) は乳児期発症難治てんかんの一つで、重度のてんかん発作、知的行動障害を呈し、神経学的予後、生命予後ともに不良である。未だ満足できる治療法はない。主に神経細胞活動に関わる電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha$ サブユニット (Nav1.1) をコードする *SCN1A* 遺伝子の異常に起因する。
- (2) *Scn1a* 改変 DS モデルマウスなどの研究から、Nav1.1 タンパク量の不足によるハプロ不全により、脳神経活動の抑制・制御を担う $\gamma$ アミノ酪酸 (GABA) 作動性抑制性介在神経細胞 (以下、GABA 細胞) の働きが低下し、結果的に大脳興奮性が高まりてんかんを発症すると考えられている。DS マウスは高熱負荷で発作が出現する熱過敏性を持つ。
- (3) 我々はこれまで、DS 患者皮膚より人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作成し、分化した GABA 細胞の機能低下を実証した (Mol Brain 2013;6:19)。DS マウスで確認された病態が患者にも該当することが明らかとなった。また、*Scn1a* を破壊した DS ラットを作成し、DS 症状を呈することを確認している。
- (4) 内側側頭葉てんかんモデルマウスにおいて、発作焦点の海馬への GABA 前駆細胞移植が、症状改善に有効であると報告された (Nat Neurosci 2013;16:692-7.)。てんかん焦点への GABA 細胞補充が局所の抑制能を高め、てんかん治療に応用できる可能性が示唆された。
- (5) GABA 細胞機能低下に起因する DS に対し、GABA 細胞移植は理論的には根本機序に対する治療である。①患者由来 iPS 細胞を作成、②責任遺伝子異常を体外で修正、③修正 iPS 細胞から GABA 前駆細胞を誘導、④患者脳内のてんかん関連領域へ移植、という細胞治療が将来的に可能か検証す

るため研究を開始した。

- (6) マンガン造影磁気共鳴画 (MEMRI) は、マンガンの造影剤としての特性 (T1 時間短縮) と、神経細胞興奮時に細胞内に流入する特性を利用し、高活動神経細胞を MRI で検出することを可能とする方法で、てんかん病態研究に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

- (1) 移植リソースとするため、ヒト iPS 細胞から GABA 細胞への効率的分化方法を確立する
- (2) 樹立済患者 iPS 細胞より、遺伝子変異修正株を作成する
- (3) DS ラットのてんかん病態に関わる脳領域を MEMRI で探索し、細胞治療のための移植部位を検討する

3. 研究の方法

- (1) GABA 細胞分化方法の検討: フィーダーフリー培養で維持した iPS 細胞に、二重 SMAD シグナル阻害法を応用し神経前駆細胞へ誘導、浮遊培養で Neurosphere を形成、さらに接着長期培養で成熟神経細胞を作成した。腹側化誘導のため Sonic Hedgehog (SHH) や種々のシグナル分子の添加量を含め、種々条件検討を行った。
- (2) 変異修正患者 iPS 細胞の作成: *SCN1A* ナンセンス変異 (c.4933C>T) を TALEN (転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ) を利用したゲノム修飾技術、相同組換えにより正常配列へ修正した。
- (3) MEMRI 実験  
①撮像条件検討  
(a) 撮像時の状態: 正常オスラットを用い、マンガン腹腔内投与 24 時間後、生存ラットを吸入麻酔下で撮像 (in vivo)、撮像位置調整が容易で長時間の撮像が可能な摘出脳 (灌流固定・安楽死後に摘出) を直接撮像 (ex vivo) とで結果を比較した。

(b)マンガン負荷条件：ヒトで乳幼児期～青年期に該当する2～8週齢の正常オスラットで、マンガン投与量（塩化マンガンとして33、66、99 mg/kgを腹腔内投与）、投与後撮像までの時間（12、24時間）を比較した。

## ②DSラットでの検討

DSラットはF344ラット *Scn1a* をTALENで破壊し作成した。ホモ型 (*Scn1a*<sup>-</sup>/*Scn1a*<sup>-</sup>) は2週齢で衰弱死するため、研究には野生型 (*Scn1a*<sup>+</sup>/*Scn1a*<sup>+</sup>) とヘテロ型 (*Scn1a*<sup>-</sup>/*Scn1a*<sup>+</sup>) を用い、以下の2状況で比較した。データ解析は、T1強調画像よりT1 mapを作成後、大脳皮質・海馬・視床などに関心領域 (ROI) を手動で設定し、T1値を比較した。

(A)通常飼育（マンガン投与後、通常飼育）

(B)温熱負荷（マンガン投与後、保育器内高温環境で飼育）：MEMRIは、重度のてんかん発作を起こすと、脳浮腫や神経細胞脱落によりマンガン増強効果が得られない。熱誘発発作に関わる脳領域を探索するため、マンガン投与後、保育器内で発作誘発閾値以下の温熱負荷を行い撮像した。

## 4. 研究成果

### (1)GABA細胞分化方法に関する条件検討

健康人由来 iPS 細胞 201B7 を用いて検討した。以前我々が行った方法では、神経分化培養開始までに2～3か月を要した。今回の方法で1か月以内で可能となった。より高効率にGABA細胞へ分化させるため、種々のシグナル分子の添加量や添加時期、分化前のNeurosphereサイズ・継代数、分化時細胞密度、ラットアストロサイトとの共培養など、複数の条件検討を行ったが、GABA細胞分化効率に顕著な差は認めず、いずれも80%強の割合で誘導可能となった(図1)。

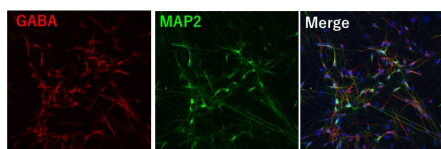


図1 201B7神経分化培養21日目での免疫染色  
MAP2陽性細胞の約80%でGABA陽性細胞を認める。

### (2) 変異修正患者 iPS 細胞の樹立

慶應義塾大学・福岡大学と共同で行い、前項の方法により1ライン樹立を完了した。核型正常、三胚葉分化能・神経分化能を確認した<sup>2)</sup>。201B7より患者変異導入ライン樹立も試みたが、樹立細胞に核型異常が認められた。

### (3) MEMRI

①(a) in vivo、ex vivoの比較では、前者でマンガン増強効果、画像コントラストが優れていた。ex vivoにおける増強効果低下は、灌流固定時のマンガン流出に起因すると推測された。(b)塩化マンガン投与量は量依存的に増強効果は高まったが、99 mg/kgでは腸重積や過剰腹水など、合併症出現頻度が増加したため、66 mg/kgが適切と判断した。投与から撮像までの時間は、増強効果が安定する24時間後で行うこととした。

②(A)野生型と比較し、ヘテロ型で大脳皮質・海馬のT1低値が低かった(図2A)(増強効果が高い⇨神経活動が高い)。さらにヘテロ型で経週齢変化を観察したところ、大脳皮質、海馬CA1、CA2、DGではT1値が上昇したが、CA3では低値が持続し、興奮性亢進の持続が推測された(図2B)。

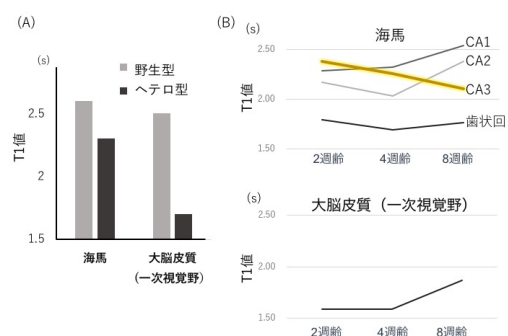


図1 海馬と大脳皮質(一次視覚野)のT1値

(A)野生型と比較しヘテロ型で低値

(B)ヘテロ型の週齢による変化

(B)温熱負荷の条件検討では15分毎に直腸温を測定し、室温時より $2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 上昇し発作を起こさない設定を調整した(器内温 $33^\circ\text{C}$ 、湿度65%)。また、ビデオ撮影し発作を起こしたラットは撮像対象外とした。結果、野生型と比べ、ヘテロ型で脳梁膨大後皮質と

視床の T1 値低下を確認した(図 3)。これらの領域は、温熱負荷なしでは差が認められなかったことから、熱誘発発作への関与が示唆された。

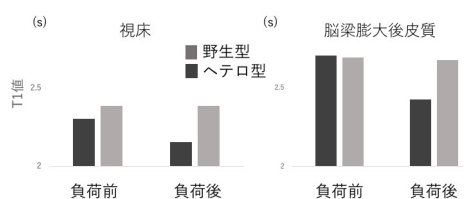


図3 温熱負荷前後のT1値の変化  
野生型では有意な変化はないが、ヘテロ型では負荷後にT1値の低下を認める。

### 本研究の意義と今後の方向性

本研究期間では、DS ラットへの移植実験まで到達しなかったが、誤った部位への移植では有効性は期待できない。詳細なてんかん病態の解剖学的解析を行なった上で、論理的に戦略を練る必要がある。今回、遺伝子変異修正 iPS 細胞の準備、GABA 前駆細胞誘導方法の条件検討を行ったことで、今後、前述の課題を解決できた段階で移植実験を開始する準備ができた。もちろん、移植実験に最初に用いるラット由来細胞(内側基底核原基)の培養方法の検討、移植後の in vivo での評価システムの準備も本研究期間で行なっている。

一方、上記 MEMRI 所見から、海馬や視床、大脳皮質の一部がてんかん病態に関与している可能性が示唆されたが、今後より具体的にてんかんネットワークを同定するため、N 数を増やし、詳細に関心領域を設定し、全脳レベルで包括的に解析していく必要がある。また、現状では撮像時の呼吸運動や装置の撮像設定に起因するアーチファクトにより、T1 値に顕著なばらつきが認められていた。これに対し、現在アーチファクト除去プログラムを作成し、撮像設定(スライスギャップ)を改良することにより、ばらつきの回避にも成功した。さらに、マンガン投与前後、温熱負荷後の3点を同一個体で撮像する実験デザインへと改良し、より正確な評価を進めている。

### 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7件)

1. Tanaka Y, Sone T, Higurashi N, et al. Generation of D1-1 TALEN isogenic control cell line from Dravet syndrome patient iPSCs using TALEN-mediated editing of the SCN1A gene. *Stem Cell Res.* 2018;28:100-4. (査読有)
2. Ikeda H, Imai K, ..., Higurashi N, et al. Characteristic phasic evolution of convulsive seizure in PCDH19-related epilepsy. *Epileptic Disord* 2016;18:26-33. (査読有)
3. Compagnucci C, Petrini S, Higurashi N, et al. Characterizing PCDH19 in human induced pluripotent stem cells (iPSCs) and iPSC-derived developing neurons: emerging role of a protein involved in controlling polarity during neurogenesis. *Oncotarget* 2015;6:26804-13. (査読有)
4. Shi XY, Tomonoh Y, Wang WZ, Ishii A, Higurashi N, et al. Epilepsy Genetic Study Group, Japan (Chairperson, SK). Efficacy of antiepileptic drugs for the treatment of Dravet syndrome with different genotypes. *Brain Dev* 2016;38:40-6. (査読有)
5. 保科めぐみ, 日暮憲道, 阿部優作, 他. 幼児期早期に診断し得たPCDH19関連てんかんの女兒例. *脳と発達.* 2015;47:305-9. (査読有)
6. Kano S\*, Yuan M\*, Cardarelli RA\*, Maegawa G\*, Higurashi N\*, et al. Clinical utility of neuronal cells directly converted from fibroblasts of patients for neuropsychiatric disorders: studies of lysosomal storage diseases and channelopathy.

Curr Mol Med 2015;15:138-45. \*equal contribution (査読有)

7. Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, et al. Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in *PCDH19* female epilepsy. *Seizure* 2015;27:1-5. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 日暮憲道 : 患者神経細胞を用いた Dravet 症候群の病態・治療研究. 第 51 回日本てんかん学会学術総会. 2017
2. 日暮憲道, 菊池健二郎 : 前頭葉てんかんが疑われた 2 例における睡眠時 Minor motor event の臨床的意義. 第 59 回日本小児神経学会総会. 2017
3. Higurashi N: Overview of iPSC research on pediatric neurological diseases. 14<sup>th</sup> Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN 2017). 2017
4. Higurashi N, Takata F, Goto A, et al. Generation of heterozygous (*Pcdh19*<sup>-/-</sup>) female rats as a model for *PCDH19*-related epilepsy. 第 50 回日本てんかん学会学術総会. 2016
5. 日暮憲道, 廣瀬伸一 : *PCDH19* 関連てんかんの最新事情. 第 58 回日本小児神経学会総会. 2016
6. Higurashi N, Hirose S: *PCDH19* Female Epilepsy. 53<sup>rd</sup> Annual Conference of Indian Academy of Pediatrics (PEDICON), 15<sup>th</sup> Asia Pacific Congress of Pediatrics (APCP), 5<sup>th</sup> Asia Pacific Congress of Pediatric Nursing (APCN). 2016
7. Higurashi N, Takahashi Y, Hirose S: Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in *PCDH19* female epilepsy. 13<sup>th</sup> Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (AOCCN 2015). 2015

8. Higurashi N: New technologies in epilepsy research. The 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research (ASPR 2015). 2015
9. Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, et al.: Inflammatory aspects of *PCDH19*-related epilepsy. 第 48 回日本てんかん学会. 2014
10. Higurashi N, Hirose S: Corticosteroids: A Powerful Treatment Option for *PCDH19*-related Epilepsy. *PCDH19* Pediatric Epilepsy Professional and Family Symposium. San Francisco (UCSF, United States). 2014
11. Higurashi N, Hirose S: Dravet syndrome research using patient-derived induced pluripotent stem cells—Present findings and future directions. Korea Epilepsy Congress (KEC 2014). 2014
12. 日暮憲道 : iPS 細胞を用いた小児神経疾患の病態解明への期待とその問題点 : てんかんの病態研究とその問題点. 第 56 回日本小児神経学会総会. 2014
13. Higurashi N, Takahashi Y, Hirose S: High prevalence of autoantibodies to N-methyl-D-aspartate receptor and the efficacy of glucocorticoids in *PCDH19*-related female-limited epilepsy. 13<sup>th</sup> International Child Neurology Congress. 2014

[図書] (計 9 件)

1. 日暮憲道 : *PCDH19* 関連症候群 : 日本てんかん学会編. 稀少てんかんの診療指標. 診断と治療社. pp94-96, 2017.
2. 日暮憲道, 廣瀬伸一 : *PCDH19* 関連症候群の診断. 新薬と臨床. 2017;66(2):61-65.
3. 日暮憲道 : てんかんの遺伝子診断 女性に発症する *PCDH19* 関連てんかん. 医学のあゆみ 253 巻 7 号 pp573-577. 2015.

4. 日暮憲道, 廣瀬伸一: *PCDH19*関連てんかん: 兼本浩祐, 丸栄一, 小国弘量, 池田昭夫, 川合謙介, 編. 臨床てんかん学. 医学書院. pp447-448. 2015.
5. 日暮憲道, 廣瀬伸一: 遺伝子異常に基づく難治てんかん—Dravet症候群, 遺伝子医学MOOK 27号 iPS細胞を用いた難病研究—臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見. メディカル ドゥ. pp43-47. 2015.
6. 日暮憲道, 廣瀬伸一: XIV てんかん症候群 その他の重要な病態 女性に発症する*PCDH19*関連てんかん. 日本臨牀別冊 神経症候群VI. 日本臨牀社 pp468-472. 2014.
7. 日暮憲道, 井原由紀子, 廣瀬伸一. 症例31. 遺伝学的診断が臨床上役立つケースは?: 池田昭夫. 症例から学ぶ 戦略的てんかん診断・治療. 南山堂. pp221-227. 2014.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日暮 憲道 (HIGURASHI Norimichi)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40568820

### (2) 研究協力者

田原 麻由 (TAHARA Mayu)  
東京慈恵会医科大学・医学部・大学院生