

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893318

研究課題名(和文) Dravet症候群患者由来iPS細胞におけるGABA作動性ニューロンの解析

研究課題名(英文) Analysis of GABAergic neuron using Dravet syndrom patients iPS Cell

研究代表者

河野 洋幸 (KAWANO, HIROYUKI)

福岡大学・てんかん分子病態研究所・ポスト・ドクター

研究者番号：10736218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Dravet症候群患者由来のiPS細胞を用いて、単一ニューロン培養標本であるオートプス培養標本を作製し、GABA作動性神経におけるシナプス伝達の解析を行うことを目的に研究を行った。しかし、iPS細胞から分化誘導した単一のGABA作動性ニューロンではパッチクランプ法による電気生理学的な応答が記録できなかった。そこで、本研究では遺伝子改変マウスを用いた単一のGABA作動性ニューロンの電気生理学的解析を行い、Dravet症候群モデルマウスではGABA作動性ニューロンのシナプス伝達が脆弱していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The goal of this research is to investigate GABAergic transmission and try to detect its dysfunction using autaptic culture of iPS cells made from the patients of the severe epilepsy, Dravet syndrome. But I can not get adequate response from the autaptic synapse on iPS cells. Then, in this study I used model mice of Dravet syndrome and discover that the GABAergic synaptic transmission of DS model mice was lowered but glutamatergic synaptic transmission was not change.

研究分野：神経科学

キーワード：てんかん Dravet症候群 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Dravet 症候群は、非常に難治性のでんかん性脳症である。近年、遺伝子研究の発展に伴い、約 80% の Dravet 症候群患者が SCN1A に変異を有することが分かった。SCN1A は電位依存性ナトリウムチャネル Nav1.1 のサブユニットをコードする遺伝子であり、本遺伝子を改変した Dravet 症候群モデルマウスも既に複数作製されている。これらの研究から、GABA 作動性ニューロンにおける Nav1.1 ハプロ不全が脳の抑制系の機能不全をもたらし、発病に繋がると考えられている (Han S, et al. Nature, 2012; Cheah CS, et al. PNAS, 2012)。申請者のグループ (てんかん分子病態研究所、所長：廣瀬伸一教授) でも、SCN1A 欠失を有するマウスを作成し、Dravet 症候群と同様の全身性強直間代性けいれんを発症することを確認しており、SCN1A が Dravet 症候群のてんかん発作を誘発する原因遺伝子であると考えている。申請者のグループでは、SCN1A 変異が発見された Dravet 症候群患者由来の iPS 細胞を作成し、GABA 作動性ニューロンに分化させることに成功しており、世界に先駆けて、GABA 作動性ニューロンにおける電気生理学的な機能低下を同定した (Higurashi, et al. Molecular Brain, 2013) が、詳細な分子メカニズムは不明である。

## 2. 研究の目的

### 【全体構想】

Dravet 症候群患者由来の iPS 細胞を用いて、細胞レベルでの GABA 作動性神経の機能異常を解析し、本疾患の分子病態を明らかにすることで、疾患病態研究ならびに新規治療法開発を進展させるための基礎を構築することを目的としている。

### 【具体的な目的】

(1) SCN1A 異常が発見された複数の患者由来の iPS 細胞を樹立する。  
(2) TALEN 法を用いて遺伝子変異を修復した患者由来 iPS 細胞を同時に確立する。  
(3) (1)、(2) で確立した iPS 細胞を GABA 作動性ニューロンに分化させ、修復 iPS 細胞を正常対照群として、Dravet 症候群の分子病態を invitro 実験で解析し、疾患病態研究および新規治療法開発の基盤を構築する。

ニューロンの機能を解明するためには、ニューロンの特性とネットワーク構造の特性とともに、ネットワークの要となるシナプスの解析が必要不可欠である。すなわち、シナプスの病態変化を理解することは、脳における病態変化を知るための、第一歩となる。これらを踏まえて、本研究では、シナプス機能の詳細な解析に適した培養標本であるオータプス培養標本 (自己にシナプスを投射するニューロン培養モデル) を作成し、Dravet 症候群患者由来 iPS 細胞から

分化させた GABA 作動性ニューロンのシナプス機能を解析することで、Dravet 症候群患者における分子病態の解明に繋がることを研究の目的としている。また、TALEN (Transcription Activator-like Effector Nuclease) 技術を用いて、iPS 細胞の SCN1A 変異の修復にも成功しているため、患者 iPS 細胞とほぼ同等のゲノムバックグラウンドを有する対照正常 iPS 細胞を得ることが可能である。

## 3. 研究の方法

(1) 患者 iPS 細胞から分化させた神経細胞樹立。山中らの確立した方法、つまり Sox2、Oct3/4、Klf4、c-Myc の 4 種の初期化遺伝子を、レトロウィルスを用いて線維芽細胞に導入し、患者由来 iPS 細胞を樹立する。(現在、SCN1A 遺伝子の変異を持つ患者の iPS 細胞は樹立済である。)

### (2) GABA 作動性ニューロンへの分化誘導

岡野らの確立したマウス ES 細胞における分化誘導方法 (Okada, et al., 2008) を一部改変し、神経細胞への分化誘導を行う。樹立した iPS 細胞から、浮遊培養により胚葉体を介し神経細胞の塊である神経球を形成する。これを接着培養により神経細胞へ分化誘導する。すでに Dravet 症候群患者の iPS 細胞で成功している。コントロール実験には 201B7 などの確立された iPS 細胞ライン、さらに、TALEN 法を用いた修復 iPS 細胞を用いて行う。目的の神経細胞の発現が乏しい場合は、誘導因子の添加などにより目的細胞の誘導を試みる。また、電気生理学的解析は顕微鏡観察下で行うため、GAD67-GFP をレポーターとし、目的の GABA 作動性ニューロンを確認できるよう設計する。

(3) iPS 細胞を用いたオータプス培養標本の作製。自己にシナプスを投射するオータプス培養標本を作成する。本標本は、異種の細胞でも共培養できるので、生後 0 日齢の ICR マウスから大脳皮質を摘出し、マウスのアストロサイトを培養し、フィーダー細胞として用いる。培養 2 週間後に、アストロサイトを小さな島状 (Microisland) にパターン培養し、iPS 細胞から形成した神経球と共培養させ、GABA 作動性ニューロンへと分化誘導する。ニューロンは区分化された領域内で自己にシナプスを形成しながら成長するので、他ニューロンからのシナプス入力がかくなく、単一ニューロンに由来するシナプス動態を詳細に解析できる利点がある。なお、安定したパターン形成を得るために、一辺が 300 $\mu$ m の正方形領域を多数配列して区分培養できる「コーティングスタンプ」を開発したので、それを利用する。

(4) Dravet 症候群患者由来 iPS 細胞を用いたオータプス培養標本の分子メカニズムの解析。

Dravet 症候群患者由来 iPS 細胞から分化した GABA 作動性ニューロンにおけるシナプス伝達の変化をパッチクランプ法で解析する。Dravet 症候群患者由来 iPS 細胞と、修復 iPS 細胞、また対照群として 201B7 細胞から分化させた GABA 作動性ニューロンを用いたオータプス培養標本を準備し、Dravet 症候群における GABA 作動性ニューロンのシナプス伝達機能異常を、蛍光条件下でパッチクランプ法を用いて解析する。具体的には、パッチしたニューロンに高頻度電気刺激を与え、シナプス小胞開口放出の動態変化を調べる。また、単一ニューロン当たりのシナプス小胞数は、0.5M Sucrose 溶液を 10 秒間投与した時の強制開口放出反応から算出する(高浸透圧刺激法)。

Dravet 症候群患者由来 iPS 細胞から分化した GABA 作動性ニューロンにおけるシナプス形成及びシナプス密度に対する影響をイメージング法で解析する

オータプス培養標本は電気生理学的なシナプス解析に適しているだけでなく、形態学的解析にも適している。その利点を活用し、ニューロンを MAP2 抗体、GABA 作動性シナプスを VGAT (Vesicular inhibitory amino acid transporter) 抗体で免疫染色し、コンフォーカル顕微鏡を用いて蛍光観察する。ニューロン形態は、MAP2 抗体で染色されたニューロンの細胞体を中心に同心円を等間隔で描き、それぞれの同心円と交差する樹状突起を計測して評価する (Sholl analysis 法)。本法により、ニューロンの樹状突起の分布状態を数値化できる。これらの方法により、Dravet 症候群におけるシナプス形成の変異を解析する。

これらの解析で、GABA 作動性ニューロンに異常が見られなかった場合は、GABA 作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロンにおけるサブタイプ(パルブミン陽性、カルレチニン陽性、ソマトスタチン陽性)毎に解析を行い、適切な治療ターゲットの選定を行う。

#### 4. 研究成果

Dravet 症候群患者由来の iPS 細胞を用いて、単一ニューロン培養標本であるオータプス培養標本を作製し、GABA 作動性神経におけるシナプス伝達の解析を行うことを目的に研究を行った。しかし、iPS 細胞から分化誘導した単一の GABA 作動性ニューロンではパッチクランプ法による電気生理学的な応答が記録できなかった。

そこで、本研究では遺伝子改変マウスを用いた単一の GABA 作動性ニューロンの電気生理学的解析を行った。実験方法は生後 0-1 日齢の遺伝子改変マウスから顕微鏡下で線条体を単離し、予め準備しておいた島状アストロサイトと共培養する。培養 14-16 日にパッチクランプ法を用いた電気

生理学的解析を行った。線条体から単離したニューロンは 90%以上が GABA 作動性ニューロンであるが、GABAA 受容体アンタゴニストである bicuculline を投与することで GABA 作動性ニューロンを特定することができる。オータプスニューロンを用いたホールセル・パッチクランプ法では、記録電極を用いて刺激も行き、返ってきた自己の応答を記録している。オータプスニューロンは自己からのシナプス入力しか存在しないため、シナプス応答が GABAergic であれば、つまり Bicuculline でシナプス応答が阻害されれば、記録しているニューロンは GABA 作動性ニューロンであるといえる。

Dravet 症候群モデルマウスを用いた解析では、GABA 作動性ニューロンのシナプス伝達が脆弱していることが分かった。記録された IPSC (Inhibitory postsynaptic current) の amplitude、mIPSC frequency が有意に減少しており、シナプス前終末におけるシナプス伝達が低下していることが示唆された。さらに、海馬から単離した興奮性神経のオータプスニューロンを作成し同様に解析を行ったところ、有意な差は見られなかった。

これらの結果から、Dravet 症候群では興奮性神経と抑制性神経のバランスの破たんが起きていることが示唆された。今後の検討課題として、ニューロンの発達や、ネットワーク形成、シナプス形成に差が見られるかを解析する。さらに、患者由来の iPS 細胞を用いて、ヒトの Dravet 症候群に特化した解析を行う。

本研究室では 2014 年 4 月にモデルマウスを作製したため、バッククロスが完了したのが 2015 年 10 月となり、十分な結果が得られなかった。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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 河野 洋幸 (KAWANO, Hiroyuki)

福岡大学・てんかん分子病態研究所・ポストドクター

研究者番号：10736218

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：