

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09628

研究課題名(和文) てんかん性脳症の予後改善に向けた創薬基盤研究

研究課題名(英文) Drug discovery study improves the outcomes of epileptic encephalopathy

研究代表者

千代延 友裕 (CHIYONOBU, Tomohiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40571659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なてんかん性脳症である2疾患(大田原症候群、Dravet症候群)において患者由来iPS細胞を用いて病態の一部を解明した。STXBP1変異による大田原症候群ではsyntaxin-1の発現が低下し、局在の異常が生じることを明らかにした。また、SCN1A変異によるDravet症候群ではチロシン水酸化酵素の発現が上昇し、ドパミン合成亢進が生じていることを明らかにした。これらの細胞表現型をin vitroで改善する化合物はてんかん性脳症の発達予後を改善させる新規治療となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have partially elucidated the pathophysiology of two examples of epileptic encephalopathies, Ohtahara syndrome and Dravet syndrome, using patient-derived induced pluripotent stem (iPS) cells. Ohtahara syndrome, which is caused by mutation of the STXBP1 gene, was found to decrease levels of syntaxin-1, which in turn leads to localized abnormalities. In addition, Dravet syndrome, which is caused by mutation of the SCN1A gene, was found to increase levels of tyrosine hydroxylase, accelerating dopamine synthesis. Compounds that can improve the relevant cellular phenotypes in vitro could form the foundation of novel treatment to improve outcomes in epileptic encephalopathy.

研究分野：小児神経学

キーワード：てんかん性脳症 iPS細胞 発達遅滞

1. 研究開始当初の背景

てんかん性脳症は頻回の発作と持続性かつ高度な脳波異常で特徴づけられるてんかんの総称であり、大田原症候群、West 症候群、Dravet 症候群など複数のてんかん症候群が含まれる。多くは新生児期から幼児期にかけて発症し、治療はてんかん発作に対する対症療法となるが、発作は難治に経過するものが多く、たとえ発作が抑制されてもほとんどの症例で重度の精神運動発達遅滞をきたす。既存の治療では不十分と言わざるを得ず、発達予後を改善させる治療の開発が必要である。

近年、遺伝子解析技術の進歩により、単一遺伝子異常によるてんかん性脳症が同定されるようになった。遺伝子異常がもたらす神経細胞機能障害はてんかん性脳症の病態解明の手がかりとなり、治療標的となりうる。研究代表者は先行研究(若手研究(B)課題番号 25870617)において *STXBP1* 変異を有する大田原症候群患者から iPS 細胞を樹立し、分化誘導した神経細胞では SNARE タンパク複合体のひとつである syntaxin-1 の発現が低下し、神経突起伸長に障害があることを見出した。本研究では、このモデルを用いて *STXBP1* てんかん性脳症の病態をさらに詳細に検討することとした。また、*SCN1A* 変異を有する Dravet 症候群についても、患者由来 iPS 細胞を同様に神経分化し、神経細胞での表現型を検討することとした。これらの検討によりてんかん性脳症の予後改善に向けた治療標的を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

*STXBP1* 変異を有する大田原症候群、*SCN1A* 変異を有する Dravet 症候群において患者由来 iPS 細胞から神経細胞を分化誘導し、これらの疾患にみられる発達障害の病態を明らかにする。

3. 研究の方法

SFEBq 法 (Eiraku et al, Cell Stem Cell, 2008) を改良して神経分化を行い(図1)得られた神経細胞の分子細胞学的解析を行った。

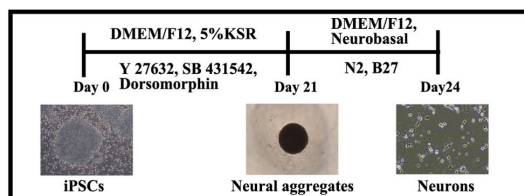


図1 分化誘導法

4. 研究成果

*STXBP1* 変異を有する大田原症候群

分化誘導した神経細胞に含まれる興奮性神経細胞(グルタミン酸作動性)抑制性神経細胞(GABA 作動性)の割合を免疫染色によ

り定量解析したところ、患者由来と対象で差は認めなかった(図2)。一方で、患者由来神経細胞では NMDA 受容体サブユニット 2A および 2B (*GRIN2A* および *GRIN2B*)、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter (*NKCC1*) の mRNA 発現上昇を認め、患者由来細胞における興奮性変化が示唆された(図3)。

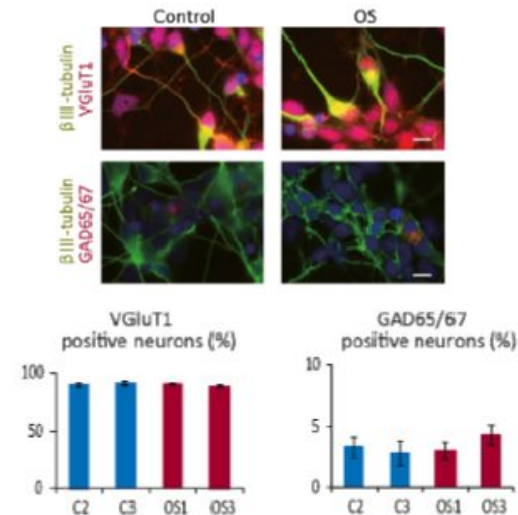


図2 分化誘導した神経細胞

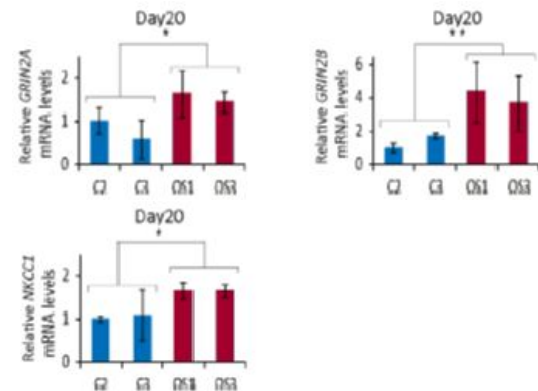


図3 患者由来細胞における興奮性変化

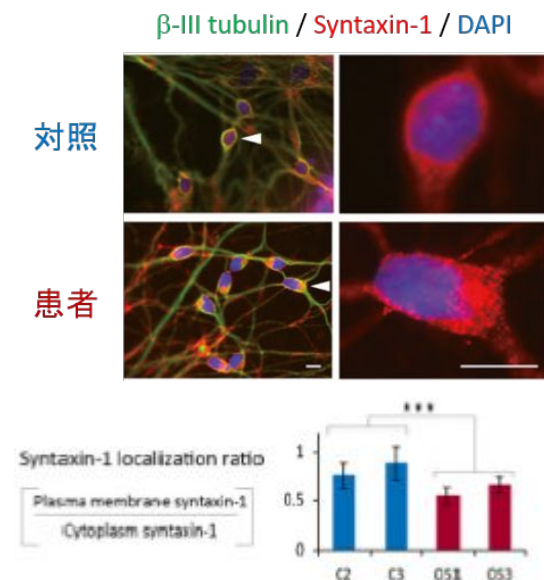


図4 Syntaxin-1 の局在変化

また、先行研究（若手研究（B）課題番号 25870617）において、患者由来細胞では syntaxin-1 の発現が低下していることを報告したが、本研究ではさらに syntaxin-1 の局在変化を免疫染色により検討した。免疫染色により得た各細胞の像を細胞膜と細胞質に分けて信号強度を定量評価したところ、患者由来細胞では syntaxin-1 は細胞膜から細胞質に局在変化がみられることが明らかとなった（図 4）。

以上の通り、本研究では STXBP1 てんかん性脳症の患者由来 iPS 細胞を用いて、新たな細胞モデルを確立し、論文報告した。STXBP1 てんかん性脳症の iPS 細胞は世界初の成果である。また本研究で明らかにした細胞レベルでの異常（syntaxin-1 の発現低下・局在変化）を改善させる化合物のスクリーニングは STXBP1 てんかん性脳症の発達予後を改善させる新規薬剤開発につながる可能性がある。

#### SCN1A 変異を有する Dravet 症候群

分化誘導した神経細胞の mRNA 発現解析により、主に前脳、間脳、中脳の神経細胞へ分化誘導されていることを確認した（図 5）。また、β-III tubulin の発現は mRNA、タンパクレベルともに変異株と正常株で差がなく、両者の分化効率に差はないと考えられた（図 6）。

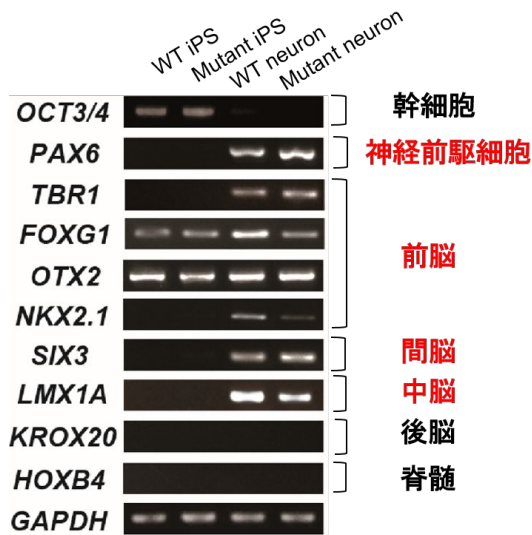


図 5 分化誘導の領域特異性

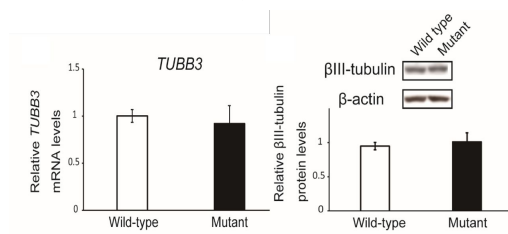


図 6 β-III tubulin の発現

続いて上記の通り分化誘導した神経細胞において、ドパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素（TH）について、mRNA、タ

ンパクレベルともに有意な上昇を認めることを見出した（図 7）。

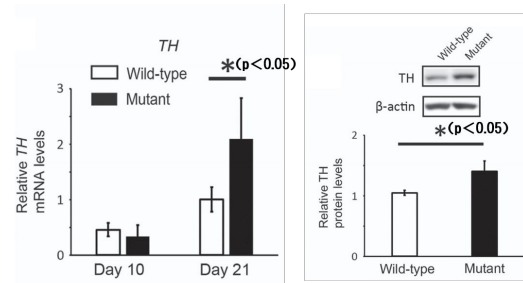


図 7 変異株における TH の上昇

さらに培養液中のドパミン濃度を ELISA 法で解析したところ、変異株で有意な上昇を認められた（図 8）。

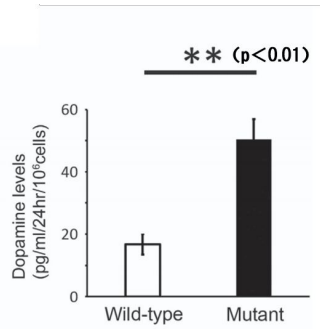


図 8 変異株培養液中のドパミン濃度上昇

以上の通り、患者由来 iPS 細胞を用いて、Dravet 症候群における発達障害の新たな病態として TH 発現上昇によるドパミン合成亢進の可能性を見出し、論文報告した。ドパミン合成系は SCN1A 変異を有するてんかん性脳症（Dravet 症候群）患者の発達予後を改善させる治療標的となる可能性がある。

#### 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 3 件)

Yoshida M, Nakashima M, Okanishi T, Kanai S, Fujimoto A, Itomi K, Morimoto M, Saito H, Kato M, Matsumoto N, Chiyonobu T. Identification of novel BCL11A variants in patients with epileptic encephalopathy: expanding the phenotypic spectrum. Clin Genet. 93(2): 368-373, 2018. DOI: 10.1111/cge.13067 査読有

Maeda H, Chiyonobu T, Yoshida M, Yamashita S, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Yamakawa K, Morimoto M, Nakahata T, Saito MK, Hosoi H. Establishment of isogenic iPSCs from an individual with SCN1A mutation mosaicism as a model for investigating

neurocognitive impairment in Dravet syndrome. *J Hum Genet.* 61(6): 565-9, 2016. DOI: 10.1038/jhg.2016.5 査読有

Yamashita S, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Morimoto M, Kato M, Saito H, Matsumoto N, Nakahata T, Saito MK, Hosoi H. Mislocalization of syntaxin-1 and impaired neurite growth observed in a human iPSC model for STXBP1-related epileptic encephalopathy. *Epilepsia.* 57(4):e81-86, 2016. DOI: 10.1111/epi.13338 査読有

[学会発表](計 8件)

Yamashita S, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Kato M, Saito H, Matsumoto N, Morimoto M. A human iPSC model of STXBP1-related epileptic encephalopathy uncovers specific neural dysfunctions. 14<sup>th</sup> Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2017 May 11-14; Fukuoka, Japan.

Chiyonobu T, Maeda H, Yoshida M, Yamashita S, Zuiki M, Nakahata T, Saito MK, Morimoto M. Establishment of isogenic iPSCs from an individual with *SCN1A* mutation mosaicism as a model for investigating neurocognitive impairment in Dravet syndrome. The 14<sup>th</sup> International Child Neurology Congress. 2016 May 1-5; Amsterdam, the Netherlands.

Yamashita S, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Zuiki M, Kato M, Saito H, Matsumoto N, Nakahata T, Saito MK, Morimoto M. Modeling the cellular phenotype of STXBP1-related epileptic encephalopathy using iPSC. 14<sup>th</sup> International Child Neurology Congress. 2016 May 3; Amsterdam, Netherlands.

Yamashita S, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Morimoto M, Kato M, Saito H, Matsumoto N, Nakahata T, Saito MK, Hosoi H. Modeling the cellular phenotype of STXBP1-related epileptic encephalopathy using iPSC. 第58回日本小児神経学会学術集会. 2016年6月3日; 東京.

前田裕史, 千代延友裕, 吉田路子, 山下

哲史, 瑞木匡, 木戸脇智志, 磯田賢一, 森本昌史. SCN1A 変異モザイク個人由来 iPSC 細胞の樹立と病態解析への応用. 第50回日本てんかん学会学術集会. 2016年10月7日; 静岡

Chiyonobu T, Kato M, Maeda H, Kidowaki S, Yamashita S, Zuiki M, Morimoto M, Nakashima M, Matsumoto N, Hosoi H. Refractory epileptic encephalopathy in a case with cardio-facio-cutaneous syndrome caused by MAP2K1 mutation. The 13<sup>th</sup> Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2015 May 14; Taipei, Taiwan.

Maeda H, Chiyonobu T, Yoshida M, Yamashita S, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Morimoto M, Nakahata T, Saito MK, Hosoi H. Isogenic iPSCs from an individual with *SCN1A* mutation mosaicism revealed aberrant dopamine levels in Dravet syndrome neurons. Society for Neuroscience 45<sup>th</sup> Annual Meeting. 2015 Oct 21; Chicago, USA.

Yamashita S, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Zuiki M, Kidowaki S, Isoda K, Morimoto M, Kato M, Saito H, Matsumoto N, Nakahata T, Saito MK, Hosoi H. Mislocalization of syntaxin-1 and impaired neurite growth observed in a human iPSC model for STXBP1-related epileptic encephalopathy. Society for Neuroscience 45<sup>th</sup> Annual Meeting. 2015 Oct 21; Chicago, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千代延 友裕 (CHIYONOBU, Tomohiro)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 40571659

(2) 研究協力者

吉田 路子 (YOSHIDA, Michiko)  
山下 哲史 (YAMASHITA, Satoshi)  
前田 裕史 (MAEDA, Hiroshi)