

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07802

研究課題名（和文）ドラベ症候群ラットのてんかん責任脳領域の探索と細胞移植治療の実現化を目指す研究

研究課題名（英文）Research on regional brain activity for future development of cell-based therapy in Dravet syndrome

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：乳児期に発症する難治てんかんと重度の認知行動障害を呈するドラベ症候群は、脳の神経ネットワークにおける抑制機能が減弱し発症することが知られている。本研究では、将来的に細胞移植治療研究への発展を目指し、発達期疾患脳の病態責任領域を解剖学的に同定することを目標に実施した。マンガン造影磁気共鳴画像という技術を用い、疾患モデルラット脳の神経活動を経齢的に解析した。その結果、ヒト患者での発症ピーク齢に相当する3週齢ラットで、神経活動が脳の広範な領域で一時的に亢進していることを明らかにした。さらに、その活動亢進に関わる細胞分子病態を検索し、抑制ネットワークの成熟遅延によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにドラベ症候群の主な原因や病態機序に関する報告はあるが、成長とともにダイナミックに変化する臨床症状に対応する細胞分子ネットワーク病態の詳細は明らかとなっていなかった。本研究で疾患脳の大脳活動性変化をin vivoで、経齢的に、全脳レベルで、解剖学的に、明らかにできたことはこれまでにない成果である。さらに、マンガン造影磁気共鳴画像法のてんかん研究における可能性を示したことも重要である。これらは今後の病態理解、ならびに年齢や症状に応じたより適切な治療開発を目指す研究において役立ち、将来的には本症をもつ人々の福音となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Dravet syndrome is an infantile-onset developmental and epileptic encephalopathy. Impaired inhibition in the brain neuronal networks has been reported to be the main mechanism of this syndrome. The aim of this research is to elucidate developmental alteration in the regional brain activities of a rat model for Dravet syndrome, initially intending to elucidate target brain regions for future development of cell transplantation therapy. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging technique was employed to quantitatively evaluate the activities in rats at various developmental stages. As a result, a significant increase in the basal activities occurred during the third postnatal week in the widespread brain areas. The transient hyperactivity could be relieved by administration of bumetanide, an NKCC1 inhibitor, indicating that a delay in inhibitory network maturation may be involved in this phenomenon.

研究分野：てんかん学

キーワード：発達性てんかん性脳症 SCN1A モデルラット 磁気共鳴画像 てんかん発作 脳神経活動 ガンマアミノ酪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ドラベ症候群 (Dravet syndrome, DS) は乳児期に発症する発達性てんかん性脳症の一つである。重度かつ薬剤抵抗性のてんかん発作が生涯持続し、認知行動発達の顕著な障害を呈し、神経学的予後、生命予後ともに不良な疾患である。大半の患者は電位依存性ナトリウムチャンネル 1 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ことが知られている。

(2) *Scn1a* 改変マウスなどの研究から、アミノ酸 (GABA) 作動性抑制性神経細胞における Nav1.1 のハプロ不全により大脳の神経ネットワークにおいて抑制機能が減弱することが主病態と考えられている。一方、年齢とともにダイナミックに変化する各臨床現象の背景病態に関する理解は不十分であり、予後を改善しうる有効な治療法は確立されていない。

(3) 我々はこれまで、DS 患者由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作成し、分化誘導した 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ヒト患者にも該当することが示唆された。さらに、ゲノム編集技術を用い新たに *Scn1a* ノックアウトラットを作成し、DS の中核症状の一つである温熱誘発発作を呈することを確認している。

(4) そこで、自身の細胞由来の iPS 細胞を作成し、*SCN1A* 異常を修正後、誘導 GABA 前駆細胞を脳へ移植する治療法が将来的に応用できないかを検討することを想起した。しかし、細胞移植治療を実施するためには脳のどこに移植するかが大きな問題となるが、全神経細胞が *SCN1A* 異常をもつ DS においてそのような脳領域は明らかではない。

(5) 脳の病的な機能変化を解剖学的に明らかにするため、マンガン造影磁気共鳴画像法 (Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging, MEMRI) の技術を用いて、*Scn1a* ノックアウトラットの脳活動の異常を検出する方法を提案した。MEMRI は陽性造影剤としての性質を持つマンガンイオンを利用して、生体内の神経活動を T1 高信号として可視化する撮像手法である。これまで種々の中枢神経疾患研究で用いられてきたが、MEMRI は DS の *in vivo* での脳神経活動変化を示す脳領域を明らかにできる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) MEMRI を用いラット脳神経活動の定量解析法を確立する。

(2) *Scn1a* ノックアウトラット発達期の脳神経活動を各発達段階で定量的に解析し、病態に強く関与する発達段階や脳領域を同定する。

3. 研究の方法

T1 mapping を用い、MEMRI における神経活動を T1 緩和時間 (T1 値) として定量化する方法を確立した。2~5 週齢の *Scn1a* ノックアウトラットを対象に MEMRI T1 mapping を撮像し、ヘテロ型と野生型における各脳領域の T1 値を発達段階ごとに比較した。

(1) MEMRI T1 mapping を用いた神経活動の定量法の確立

解析ラットの対象週齢は髄鞘化が盛んな時期であることから、発達による髄鞘量の個体差が T1 値に影響を与える可能性があった。また、NMR 周波数信号の感度不足による撮像アーチファクトを解決する必要があった。以上より、精度の高い MEMRI T1 mapping 技術を確立するため、2~5 週齢の正常ラットを対象に次の項目について検討を行った。

髄鞘量の補正

ミエリン MRI マップを同時計測し、各ラットの髄鞘量を算出した。算出した髄鞘量を MEMRI における神経活動量の補正項として加えることで、発達における髄鞘量の差をキャンセルし、神経活動のみを抽出した。

位相マップによる周波数の補正

位相マップの同時計測により、周波数信号の段階で磁場の歪みによる位相補正を行い、信号精度を向上させた。

(2) *Scn1a* ノックアウトラットにおける神経活動の評価

(1) で確立した方法にしたがって、2~5 週齢の *Scn1a* ノックアウトラットを対象に MEMRI T1 mapping を施行し、大脳および小脳の各関心領域における T1 値を発達段階ごとにヘテロ型と野生型とで比較した。ラットにおける発達段階は、既報告にしたがって次のように定義した：日齢 15-18 (新生児期), 日齢 19-22 (乳児期), 日齢 23-26 (離乳期), 日齢 27-30 (幼児期), P31-34 (児童期), and P35-38 (前思春期)

4. 研究成果

(1) 周波数と髄鞘量の補正により、MEMRI T1mappingの解析精度が向上した

Gibbs アーチファクト除去により分解能が改善し、T1 値の測定誤差が減少した。特に脳表面に近い皮質領域における T1 値は、補正の前後で約 10~15 パーセント変化した。また、髄鞘量補正により、神経活動の変化をより正確に捉えることが可能となった。

(2) 乳児期のヘテロ型では、野生型と比較して広範な脳領域の神経活動が上昇していた

MEMRI T1mapping を用いてヘテロ型と野生型の神経活動を発達段階ごとに比較したところ、3 週齢のヘテロ型では野生型と比較して広範な脳領域の T1 値が低下、すなわち神経活動が上昇していた。さらに、この神経活動上昇は乳児期を過ぎると野生型と同じレベルまで回復し、5 週齢になると海馬や基底核など一部の領域に局限して、再度活動亢進が出現することが明らかとなった(図1)。さらに、2 週齢のヘテロ型に GABA 作用の脱分極 - 過分極スイッチを促進する Bumetanide(NKCC1 阻害薬)を連日投与したところ、3 週齢でみられた広範な脳領域の神経活動上昇が改善し(図2)、温熱誘発発作の発作閾値の有意な上昇が認められた(図3)。ラットの3 週齢は、ヒトでの DS 発症のピークとなる月齢に相当することから、発症前後で強い脳活動の上昇が生じていることが本研究で明らかとなった。また、その背景に GABA 作用の脱分極 - 過分極スイッチの遅れが関与していることが示された。

本研究は当初、移植治療の標的脳領域を検討する目的を含んでおり、移植細胞のリソース含め検討を行っていたが、研究結果からは発症早期にそのような領域の特定は困難であった。一方、経齢的な大脳の機能的ネットワーク病態の一端を明らかにすることができ、MEMRI のさらなる病態解明や治療研究への有用性が示唆された。

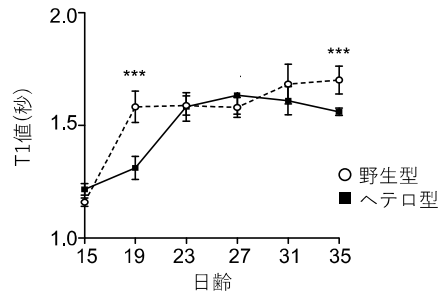


図1. 海馬におけるMEMRI T1緩和時間の比較
日齢19~22および日齢35~38における
T1緩和時間が有意に短縮している
(Tukey's multiple-comparison test; *** $P < 0.001$)

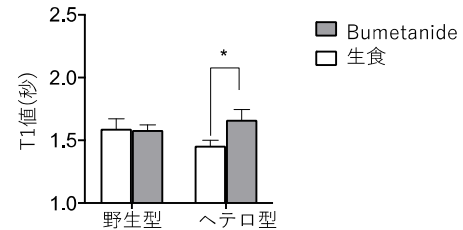


図2. Bumetanide投与後の海馬におけるT1値の比較
3週齢のヘテロ型では、Bumetanide投与群で
T1値が有意に上昇している
(Scheffe multiple-comparison test; * $P < 0.05$)

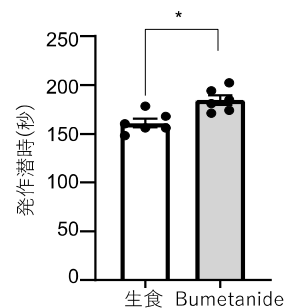


図3. ヘテロ型の温熱誘発発作の比較
Bumetanide投与群では、生食投与群と比較して
温熱負荷開始から発作出現までの発作潜時が
有意に延長している (Mann-Whitney U test; * $P < 0.05$)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fisher RS, Cross H, D'Souza C, French JA, Haut S, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Peltola J, Moshe SL, Perucca E, Lagae L, Roulet-Perez E, Schulze-Bonhage A, Scheffer IE, Somerville E, Sperling MR, Wiebe S, Yacubian EM, Zuberi S	4. 巻 60
2. 論文標題 2017 International League Against Epilepsy classifications of seizures and epilepsy are steps in the right direction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epilepsia	6. 最初と最後の頁 1040-1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/epi.15052.	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 該当する

1. 著者名 Fisher RS, Cross H, D'Souza C, French JA, Haut S, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Peltola J, Moshe SL, Perucca E, Lagae L, Roulet-Perez E, Schulze-Bonhage A, Scheffer IE, Somerville E, Sperling MR, Wiebe S, Yacubian EM, Zuberi S.	4. 巻 60
2. 論文標題 Classification as autonomic versus sensory seizures.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epilepsia	6. 最初と最後の頁 2003-2005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/epi.16308.	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 該当する

1. 著者名 Kubota J, Higurashi N, Hirano D, Isono H, Numata H, Suzuki T, Kakegawa D, Ito A, Yoshihashi M, Ito T, Hamano SI.	4. 巻 411
2. 論文標題 Predictors of recurrent febrile seizures during the same febrile illness in children with febrile seizures.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 116682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.116682.	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 Tanaka Y, Sone T, Higurashi N, Sakuma T, Suzuki S, Ishikawa M, Yamamoto T, Mitsui J, Tsuji H, Okano H, Hirose S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Generation of D1-1 TALEN isogenic control cell line from Dravet syndrome patient iPSCs using TALEN-mediated editing of the SCN1A gene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Res	6. 最初と最後の頁 100-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2018.01.036	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 Tanaka Y, Higurashi N, Shirasu N, Yasunaga S, Moreira KM, Okano H, Hirose S	4. 巻 31
2. 論文標題 Establishment of a human induced stem cell line (FUi002-A) from Dravet syndrome patient carrying heterozygous R1525X mutation in SCN1A gene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Res	6. 最初と最後の頁 11-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2018.06.008	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 Yokoi T, Enomoto Y, Naruto T, Kurosawa K, Higurashi N	4. 巻 5
2. 論文標題 Tatton-Brown-Rahman syndrome with a novel DNMT3A mutation presented severe intellectual disability and autism spectrum disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hum Genome Var	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-020-0102-6.	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 Kimura Y, Tanaka Y, Shirasu N, Yasunaga S, Higurashi N, Hirose S	4. 巻 47
2. 論文標題 Establishment of human induced pluripotent stem cells derived from skin cells of a patient with Dravet syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Res	6. 最初と最後の頁 101857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101857.	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 Kubota J, Higurashi N, Hirano D, Okabe S, Yamauchi K, Kimura R, Numata N, Suzuki T, Kakegawa D, Ito A, Hamano S	4. 巻 S0387-7604
2. 論文標題 Body temperature predicts recurrent febrile seizures in the same febrile illness	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Dev	6. 最初と最後の頁 00057-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 日暮憲道
2. 発表標題 小児てんかん診療の現状と未来 - ゲノム医学のインパクト
3. 学会等名 第41回日本小児遺伝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日暮憲道
2. 発表標題 小児てんかん診療update 2019 遺伝子異常によるてんかん
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norimichi Higurashi
2. 発表標題 GABAergic failure in epileptogenesis Dravet syndrome and more
3. 学会等名 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日暮憲道
2. 発表標題 発作型分類2017の改訂意義と邦訳版
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日暮憲道
2. 発表標題 2017発作型分類の概要と実際
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higurashi N
2. 発表標題 Research topic for DEE (iPSCs and so on)
3. 学会等名 Korea Epilepsy Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higurashi N
2. 発表標題 Dravet syndrome-Clinical & Genetics
3. 学会等名 19th International Symposium on Severe Infantile Epilepsies（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higurashi N
2. 発表標題 Network and molecular mechanisms of generalized spike-waves in DEEs
3. 学会等名 21st Annual Meeting of Infantile Seizure Society International Symposium (ISSET)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日暮憲道
2. 発表標題 てんかん診療に役立つ「ナトリウムイオンチャネル」
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日暮憲道
2. 発表標題 PCDH19関連てんかんの病態解析
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 日暮憲道	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本医師会	5. 総ページ数 366
3. 書名 日本医師会雑誌 第148巻特別号 指定難病ペディア（PCDH19関連症候群）	

1. 著者名 日暮憲道	4. 発行年 2019年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 89
3. 書名 ペランパネルによるてんかん治療のストラテジー（児童・小児のてんかんの特徴と治療）	

1. 著者名 日暮憲道	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本プランニングセンター	5. 総ページ数 64
3. 書名 月間 難病と在宅ケア（小児てんかんの発作の種類を読み解く）	

1. 著者名 日暮憲道	4. 発行年 2020年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 468
3. 書名 てんかん専門医ハンドブック改訂第2版	

〔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
---------	---------