

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07855

研究課題名（和文）STXBP1てんかん性脳症における シヌクレイン神経毒性の解明と標的治療の探索

研究課題名（英文）Search for targeted therapies for alpha-synuclein-induced neurotoxicity in STXBP1 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）・講師

研究者番号：40571659

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：STXBP1脳症における シヌクレイン神経毒性の病態を検証した。患者由来iPS細胞から得た神経細胞を用いたマイクロアレイ解析により、パーキンソン病との関連が報告されているSIAH3およびINPP5Fの発現変動が明らかとなった。また、パーキンソン病モデルショウジョウバエに認める神経変性がSTXBP1の相同遺伝子の変異体との交配により増悪することを示した。さらに、トレハロースの投与がこの神経変性を軽減させることを示した。以上よりSTXBP1脳症では シヌクレイン神経毒性により神経変性が生じてい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

発達性てんかん性脳症は多数の原因遺伝子が同定されているが、個別の病態に基づいた治療は存在せず、患者の神経予後は極めて不良である。本研究で発達性てんかん性脳症の代表的な原因遺伝子であるSTXBP1の機能不全とシヌクレイン神経毒性の関連を示したことは、発達性てんかん性脳症のプレジジョン医療実現に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We examined the pathology of α -synuclein neurotoxicity in STXBP1 encephalopathy. Microarray analysis using neurons obtained from patient-derived iPS cells revealed changes in the expression of SIAH3 and INPP5F, which have been reported to be associated with Parkinson's disease. We also showed that neurodegeneration observed in the Parkinson's disease model *Drosophila* was exacerbated by crossing with a mutant of Rop, the *Drosophila* ortholog of STXBP1. Furthermore, we showed that trehalose supplementation effectively alleviates neuronal phenotypes. These results connect STXBP1 encephalopathy with α -synucleinopathies.

研究分野：小児神経学

キーワード：STXBP1 シヌクレイン ショウジョウバエ iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発達性てんかん性脳症 (DEE) は主に乳幼児期に発症し、難治性のてんかん発作に精神運動発達遅滞・退行を伴う疾患群である。患者および家族の生活に大きな影響を与える重篤な疾患であるが、治療は抗てんかん薬を主体とする対症療法のみに限られる。DEE の原因遺伝子は多彩で、現在まで 80 を超える原因遺伝子が同定されている。網羅的遺伝子解析の普及により、現在では多くの DEE 患者で原因となる遺伝子変異の同定にまで至るが、今後はこの遺伝情報に応じた個別の疾患修飾治療 (プレジジョン医療) の実現が望まれる。*STXBP1* は DEE 患者で病的変異が同定される頻度が最も高い遺伝子の一つである。*STXBP1* (別名 Munc18-1) はシナプス小胞の開口放出において SNARE タンパク質複合体と協働するとされるが、患者で認めるヘテロの機能喪失変異 (ハプロ不全) による DEE 発症メカニズムは不明な点が多い。最近の研究により、*STXBP1* は シヌクレイン (α -Syn) の分子シャペロンとしての機能も有し、*STXBP1* を欠損した PC12 細胞では α -Syn 凝集が生じることが明らかにされた (Chai YJ, et al. *J Cell Biol* 2016)。 α -Syn 凝集による細胞毒性はパーキンソン病 (PD) をはじめとする成人発症の神経変性疾患の主病態として古くから知られており (シヌクレイノパチーと総称) *STXBP1* と α -Syn の関連はこれまで誰もが関係性を想定することのなかった成人疾患と DEE を関連づける新たな病態として注目されている (Lanoue V, et al. *Neurology* 2019)。しかし、*STXBP1* 脳症患者由来細胞や生体モデルを用いて *STXBP1* と α -Syn の関連を検証した研究はない。

2. 研究の目的

患者由来 iPS 細胞および遺伝子改変ショウジョウバエを用いて、*STXBP1* 脳症における神経変性の病態を明らかにし、標的治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

STXBP1 脳症患者由来 iPS 細胞から分化誘導したニューロンの網羅的遺伝子発現解析により神経変性の病態を検討する。

α -Syn トランスジェニックショウジョウバエを用いて、Rop (ショウジョウバエにおける *STXBP1* 相同遺伝子) の変異が神経変性に及ぼす影響を検討する。さらに神経変性に対するトレハロースの効果を検討する。

4. 研究成果

患者由来 iPS 細胞を用いた検討

STXBP1 にナンセンス変異 c.1099C>T を有する患者から樹立した iPS 細胞を用いた。対照として使用する目的で患者 iPS 細胞に CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行い、変異を修復した iPS 細胞を作製した。これら iPS 細胞に *ASCL1* および *DLX2* を Tet-On システムで一過性発現させ GABA ニューロンを選択的に分化誘導した。この GABA ニューロンに対し、微小電極アレイ (Maestro PRO, AXION Biosystems 社) を用いて、分化誘導 10 週まで経時的に自発神経活動の計測を行った。神経活動は 1 週間毎に 37 の条件下で 5 分間計測し、AxIS software (AXION Biosystems 社) で解析した。変異修復および健常父由来 GABA ニューロンは分化誘導 10 週にかけて経時的に自発スパイクが増加するのに対し、患者由来 GABA ニューロンは分化誘導 8 週以降に自発スパイクが有意に低下した (図 1)。

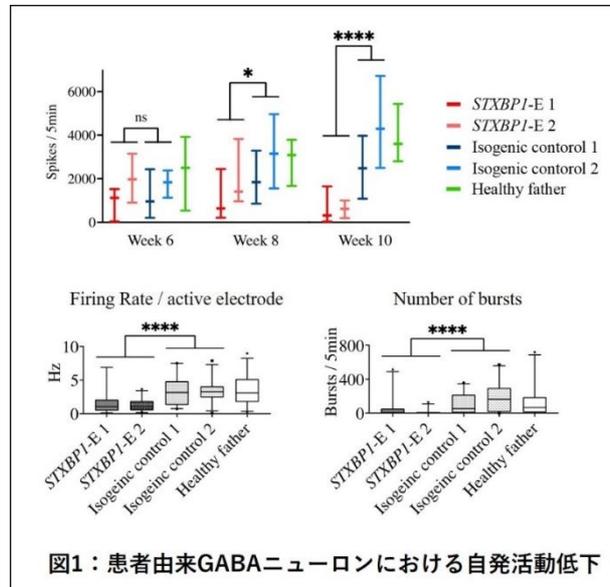


図1：患者由来GABAニューロンにおける自発活動低下

分化誘導 8 週の GABA ニューロンを用いたマイクロアレイ解析では、患者由来と変異修復の比較で *STXBPI* を含む 67 の発現変動遺伝子を認めた。その 67 遺伝子の発現プロファイルでは、変異修復ニューロンは遺伝背景を同じくする患者由来ニューロンよりもむしろ健常父由来ニューロンに近いパターンを示した。一方、患者由来と健常父由来の比較では 543 の発現変動遺伝子を認め、両者に共通する 35 の遺伝子群が *STXBPI* 脳症の病態に重要と考えられた (図 2)。このうちタンパクをコードする遺伝子は 14 個存在し、その中にはパーキンソン病との関連が報告されている *SIAH3*、*INPP5F* が含まれていた。

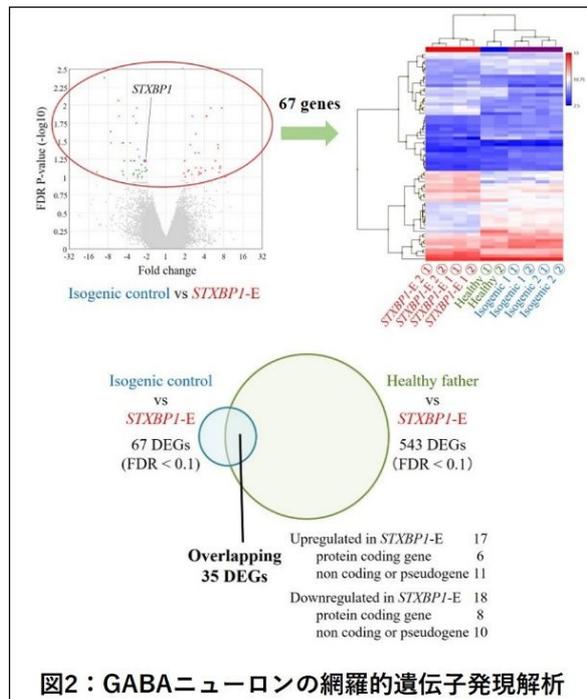


図2：GABAニューロンの網羅的遺伝子発現解析

ショウジョウバエを用いた検討

ヒト *STXBPI* のショウジョウバエ ortholog は *Ras opposite (Rop)* で、相同性は 63%、相似性は 78% である。この *Rop* のヌル変異体をヘテロ接合体で持つハエ (*Rop*^{G27/+}, *Rop*^{A3/+}) の *Rop* タンパク発現量は、野生型と比較し約 20% 低下していた。また、*Rop* が幼虫脳のドーパミン (DA) ニューロンにおいて発現していることを免疫組織化学染色で確認した。

STXBPI のハプロ不全が α Syn による神経毒性に及ぼす影響を調べるため、パーキンソン病モデルとして確立されているヒト α Syn トランスジェニックハエ (α Syn/+) と、*Rop* ノル変異体をヘテロで持つハエ ($Rop^{G27/+}$, $Rop^{A3/+}$) とを交配し、 α Syn を発現し *Rop* ノル変異体をヘテロ接合体でもつハエ (α Syn/ Rop^{G27} , α Syn/ Rop^{A3}) を作成した。日齢 40 日の α Syn/ Rop^{G27} および α Syn/ Rop^{A3} ハエは、 α Syn/+ハエと比較し、複眼変性が有意に悪化した (図 3)。また、 α Syn/ Rop^{G27} および α Syn/ Rop^{A3} ハエは、それぞれ日齢 14 日および 21 日以降に、 α Syn/+ハエと比較し、有意に運動機能が低下した (図 4)。

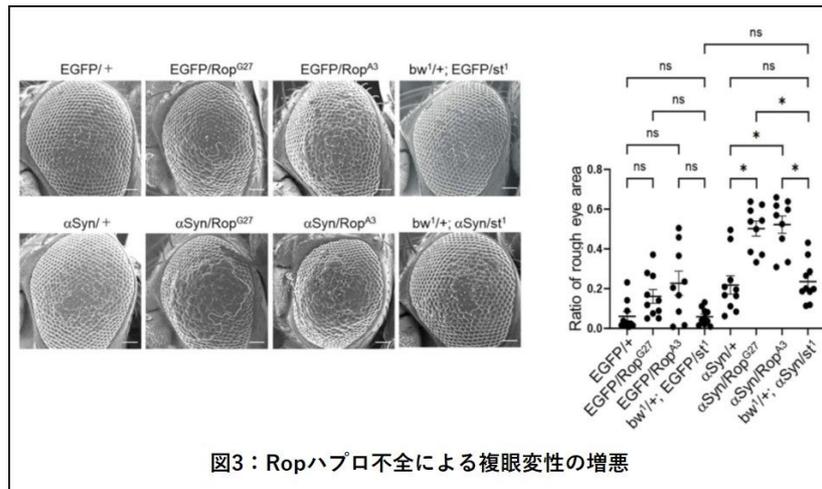


図3：Ropハプロ不全による複眼変性の増悪

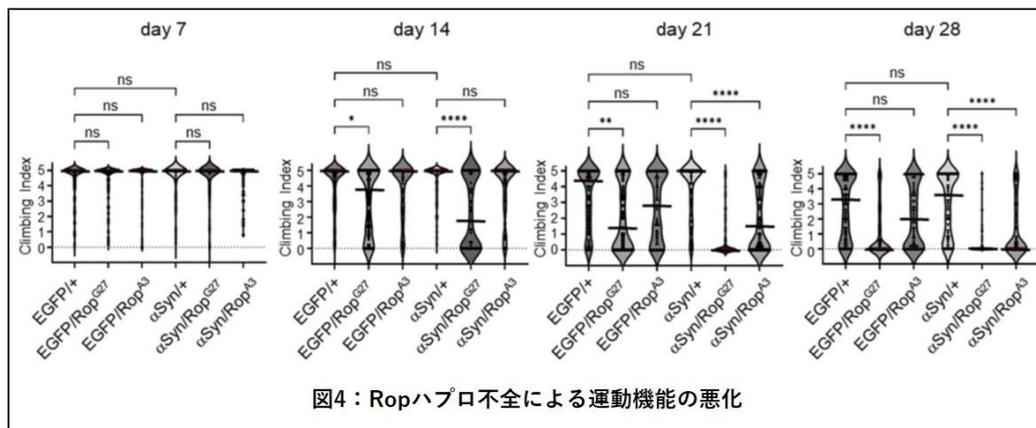


図4：Ropハプロ不全による運動機能の悪化

続いて、*Rop* のハプロ不全が α Syn トランスジェニックハエの表現型を悪化した機序を調べるため、 α Syn の凝集性を immunoblotting 解析で評価した。日齢 30 日の成虫の頭部を 1% Triton X-100 で溶解し、1% Triton X-100 可溶性画分と 1% Triton X-100 不溶性画分とに分類した。1% Triton X-100 不溶性画分には、細胞毒性を持つ凝集型 α Syn が含まれることが知られている。 α Syn/ Rop^{G27} ハエでは、 α Syn/+と比較し、1% Triton X-100 可溶性画分の α Syn が有意に減少し、1% Triton X-100 不溶性画分の α Syn が有意に増加していた (図 5)。

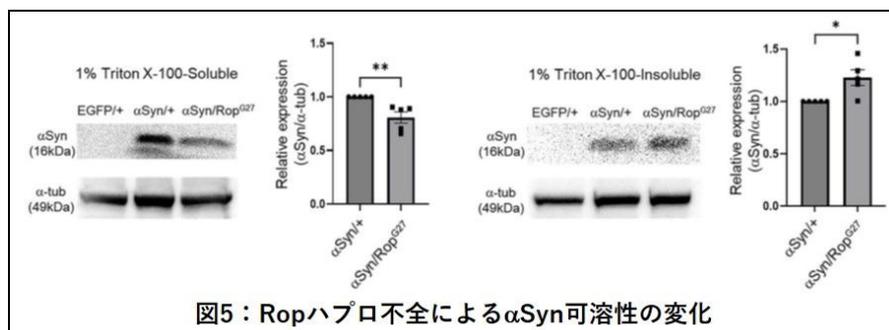


図5：Ropハプロ不全による α Syn可溶性の変化

次に、神経変性疾患の様々なモデルにおいて神経保護効果を示すトレハロースが、*Rop* のハプロ不全によって悪化した α Syn の神経毒性を軽減できるかを検証した。トレハロースは *in vitro* において変異型および野生型の STXBP1 のタンパク発現量を増加させ、*in vivo* においては不溶性画分の変異型 α Syn を減少させるとともに、DA ニューロンの変性を緩和させることが過去に報告されている。 α Syn / *Rop*^{G27} ハ工に異なる濃度のトレハロース (0, 50, 200, 400 mM) を与えたところ、日齢 28 日には濃度依存的に運動機能の改善が見られた(図 6)。一方、対照群のハ工 (EGFP/+) はトレハロースを与えても運動機能の回復は示さなかった。本研究では、 α Syn/*Rop*^{G27} ハ工の *Rop* 発現量は、トレハロースを与えても変化はみられなかったため、トレハロースによる α Syn/*Rop*^{G27} ハ工の表現型の改善は *Rop* 発現量の回復によるものではないことが示唆された。続いて、トレハロースによる α Syn の凝集性の変化を評価した。トレハロースの有無により、 α Syn/*Rop*^{G27} ハ工における 1% Triton X-100 可溶性画分の α Syn に差は認めなかったが、1% Triton X-100 不溶性画分の α Syn はトレハロースにより有意に減少した(図 7)。一方、 α Syn/+ハ工では、トレハロースの有無に関わらず、1% Triton X-100 可溶性および不溶性画分ともに α Syn に差は見られなかった。

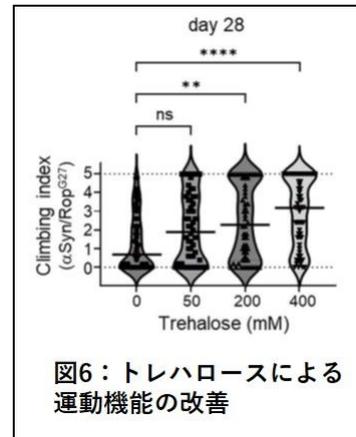


図6：トレハロースによる運動機能の改善

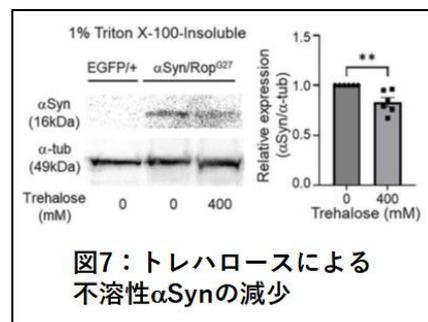


図7：トレハロースによる不溶性 α Synの減少

最後に、*Rop* のハプロ不全による DA ニューロンの変性への影響を評価するため、成虫脳における DA ニューロンの数を免疫組織化学染色により定量した。日齢 3 日のハ工では、いずれの系統においても DA ニューロンの数に差はなかった。一方、日齢 30 日の α Syn/+ハ工は、GFP/+ハ工と比較し DA ニューロンの数が有意に減少した。さらに、 α Syn/*Rop*^{G27} ハ工では、 α Syn/+ハ工と比較し DA ニューロンの数が有意に減少した。これらの結果は、*Rop* のハプロ不全が神経変性を悪化させることを示している。さらに、 α Syn/*Rop*^{G27} ハ工における DA ニューロンの変性は、トレハロースを与えることで有意に軽減された(図 8)。

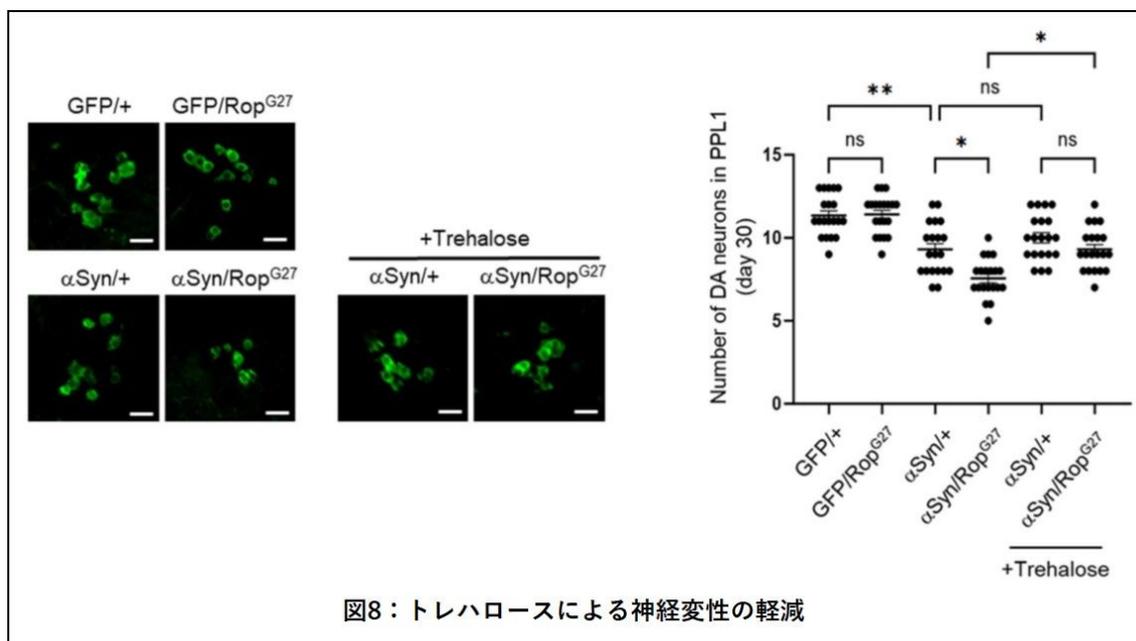


図8：トレハロースによる神経変性の軽減

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ichise Eisuke, Chiyonobu Tomohiro, Ishikawa Mitsuru, Tanaka Yasuyoshi, Shibata Mami, Tozawa Takenori, Taura Yoshihiro, Yamashita Satoshi, Yoshida Michiko, Morimoto Masafumi, Higurashi Norimichi, Yamamoto Toshiyuki, Okano Hideyuki, Hirose Shinichi	4. 巻 30
2. 論文標題 Impaired neuronal activity and differential gene expression in <i>STXBP1</i> encephalopathy patient iPSC-derived GABAergic neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1337 ~ 1348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab113	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 Matsuoka Taro, Yoshida Hideki, Kasai Takashi, Tozawa Takenori, Iehara Tomoko, Chiyonobu Tomohiro	4. 巻 -
2. 論文標題 -Synuclein pathology in <i>Drosophila melanogaster</i> is exacerbated by haploinsufficiency of <i>Rop</i> : connecting <i>STXBP1</i> encephalopathy with -synucleinopathies	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddae073	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ichise E, Chiyonobu T, Ishikawa M, Tanaka Y, Tozawa T, Yamashita S, Yoshida M, Higurashi N, Yamamoto T, Okano H, Hirose S.
2. 発表標題 Functional and transcriptomic analysis of <i>STXBP1</i> encephalopathy iPSC-derived GABAergic neurons.
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ichise E, Chiyonobu T, Ishikawa M, Tanaka Y, Shibata M, Tozawa T, Yamashita S, Yoshida M, Morimoto M, Higurashi N, Yamamoto T, Okano H, Hirose S.
2. 発表標題 Impaired activity and differential gene expression in <i>STXBP1</i> encephalopathy patient iPSC-derived GABAergic neurons.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千代延友裕
2. 発表標題 STXP1脳症の病態解析
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuoka T, Yoshida H, Kasai T, Tozawa T, Chiyonobu T.
2. 発表標題 alpha-Synuclein pathology in Drosophila melanogaster is exacerbated by haploinsufficiency of Rop: Connecting STXP1 encephalopathy with alpha-synucleinopathies.
3. 学会等名 American Society of Human Genetics Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Matsuoka T, Yoshida H, Kasai T, Tozawa T, Chiyonobu T.
2. 発表標題 alpha-Synuclein pathology is exacerbated by haploinsufficiency of Rop, the STXP1 homolog in Drosophila melanogaster.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第68回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	吉田 英樹 (Yoshida Hideki) (30570600)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授 (14303)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	笠井 高士 (Kasai Takashi) (70516062)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	

	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
研究協力者	一瀬 栄佑 (Ichise Eisuke)		
研究協力者	松岡 太郎 (Taro Matsuoka)		

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