

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24249060

研究課題名(和文) 新規遺伝子改変動物と患者 i P S を利用した分子病態に基づくてんかんの革新的治療開発

研究課題名(英文) Development of innovative treatments for epilepsy based upon its molecular pathomechanisms using patient iPS cells and novel genetically engineered animals.

研究代表者

廣瀬 伸一 (Hirose, Shinichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：60248515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 25,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はてんかんの分子病態を明らかとし、治療法の確立のために実施された。多くのてんかんの責任遺伝子変異と、次世代シーケンサーを利用して世界に先駆け小児交互性片麻痺の責任遺伝子を同定した。また、SCN1Aの異常によるドラベ症候群の患者より樹立したiPS細胞により、その分子病態を明らかにした。さらにこの細胞のSCN1Aの異常を修復、また正常細胞に導入することに成功した。Scn1aの遺伝子の微少欠失を持つマウスの作出とScn1aの遺伝子とPcdh19に変異を導入したラットを作出した。現在、樹立したiPS細胞と作出した動物を用いて、病態に基づく治療薬のシーズのスクリーニングを実施している。

研究成果の概要(英文)：This project was to elucidate the pathomechanisms of epilepsy and establish novel treatments based upon them. A number of genetic abnormalities were found and the responsible gene for alternative hemiplegia in childhood was also identified using next generation sequencing. Induced pluripotent stem cells (iPSc) were established from a patient with Dravet syndrome caused by an SCN1A mutation and accordingly the pathomechanisms of Dravet syndrome were uncovered. Furthermore, the mutation of the iPSc was generically repaired and the same mutation was introduced to the iPSc cells established in reverse from a healthy individual. Mice harboring an Scn1a deletion were genetically engineered as were rats bearing Scn1a and Pcdh19 mutations. Now, screenings to find seeds for anti-epileptic drugs are underway using the established iPSc cells and the genetically engineered animal models in this project.

研究分野：小児科学

キーワード：てんかん iPS 遺伝子 けいれん

1. 研究開始当初の背景

てんかんの病態は長い間不明であったが、最近の分子生物学の発展に伴い遺伝子異常が発見されるようになった。しかしながらその遺伝子異常がヒト脳内でどのような病態を引き起こしているかは、ヒト脳を利用する他無く困難と考えられてきた。ところが、最近では技術革新により、ヒト脳の病態研究が望める可能性が生まれた。このため、本研究は遺伝学的背景が要因と考えられるてんかん症候群とけいれん疾患の責任遺伝子を同定し遺伝子改変動物とiPS細胞を用いて発症機序の解明と利用戦略的基盤を構築することをめざした。

2. 研究の目的

- (1) てんかん遺伝子バンクの資料をもとに、てんかんの責任遺伝子変異を同定する。
- (2) 見出された遺伝子変異を有するモデル動物を作出し、てんかんの分子病態を *in vivo* で明らかにする。
- (3) 患者 iPS 細胞から樹立した神経細胞を用いて、てんかんの分子病態を *ex vivo* で明らかにする。
- (4) 分子病態に基づく革新的な治療法を開発する。

3. 研究の方法

- (1) てんかんの原因となる新規遺伝子変異の同定
申請者が収集・管理している遺伝子バンクを利用して既知の中枢神経発現イオンチャンネルの遺伝子を中心に網羅的に変異を高速スクリーニングする。発見された変異が病的か電気生理学的に検証する。
- (2) ヒトてんかんで発見された遺伝子変異を有する遺伝子改変動物の作出と病態解明
遺伝子改変動物の作出は既存のてんかんモデル動物での問題を克服できるため、様々なてんかんの個別病態に基づいた電気生理学的、神経薬理学的さらに神経病理学的な基礎研究が可能になる。独自に開発した。キックイン法による遺伝子改変マウスを作出する。
- (3) 患者 iPS 細胞から分化させた神経細胞樹立
難治性てんかん、Dravet 症候群の数名の患者より得られた線維芽細胞より、iPS 細胞を樹立し抑制系の bipolar neuron に分化誘導を行う。また、女性のみが罹患するてんかん、EFMR の患者より、同様に神経分化にいたる iPS 細胞を樹立して、その病態解明を行う。
- (4) 分子病態に基づく革新的な治療法を開

発する

(2) の動物と患者神経細胞を用い *ex vivo* と *in vivo* 両面より、革新的抗てんかん薬の創薬を目指した研究を行う。

4. 研究成果

てんかん遺伝子バンクの資料を基に 500 種以上のてんかんの責任遺伝子変異を見だし、また次世代シーケンサーを利用して世界に先駆けてんかんを来す小児交互性片麻痺の責任遺伝子を明らかにした。これら変異による病態を電気生理学的、細胞生物学的に明らかにした。

ナトリウムチャンネルをコードする遺伝子、SCN1A の異常により起こるドラベ症候群の患者より樹立した iPS 細胞から神経を分化させることに世界に先駆け成功した。これにより、ドラベ症候群の分子病態を明らかにすることが出来た。

さらにこの細胞をもちいて、その SCN1A の異常を TALEN による方法で、修復また正常細胞に導入することに成功した。

ドラベ症候群でみられるような SCN1A の遺伝子の微少欠失を持つマウスの作出に成功した。さらに TALEN 技術を使い、ラットの SCN1A の遺伝子と PCDH19 に変異を導入することに成功した。

現在、樹立した iPS 細胞を用いて、病態の回復を指標として多種の薬剤をスクリーニングすることにより、効果のある薬剤のシーズの探索を行なっている。同様に作出した動物を用いて、病態に基づく治療薬のシーズとなる薬剤のスクリーニングを計画している。

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 35 件)

1. Yamamoto T, et al. 22 人 (21 番目) 査読有り Single Nucleotide Variations in CLCN6 Identified in Patients with Benign Partial Epilepsies in Infancy and/or Febrile Seizures. PLoS ONE. 2015;10(3):e0118946. DOI:10.1371/journal.pone.0118946
2. Sohda M, et al. 7 人 (5 番目) 査読有り Trans-Golgi protein p230/golgin-245 is involved in phagophore formation. Biochem Biophys Res Commun. 2015;456(1):275-81. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.071
3. Saitoh M, et al. 17 人 (5 番目) 査読有り Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline. Brain Dev.

- 2015;37:463-70.
DOI: 10.1016/j.braindev.2014.07.010
4. Kouga T, et al. 9人(7番目) 査読有り
Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome. *Brain Dev.* 2015;37(2):243-9.
DOI:10.1016/j.braindev.2014.04.003
 5. Higurashi N, et al.14人(14番目) 査読有り
Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy. *Seizure.* 2015;27:1-5.
DOI: 10.1016/j.seizure.2015.02.006
 6. Fukasawa T, et al. 8人(8番目)査読有り
A case of recurrent encephalopathy with SCN2A missense mutation. *Brain Dev.* 2015;37(6):631-4.
DOI: 10.1016/j.braindev.2014.10.001
 7. Tomonoh Y, et al. 21人(21番目) 査読有り
The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy. *PLoS ONE.* 2014;9(2):e88549.
DOI: 10.1371/journal.pone.0088549
 8. Tomioka NH, et al. 19人(15番目) 査読有り
Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nat Commun.* 2014;5:4501.
DOI: 10.1038/ncomms5501
 9. Sasaki M, et al.34人(34番目) 査読有り
Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology.* 2014;82(6):482-90.
DOI:10.1212/WNL.000000000000102
 10. Sasaki M, et al.4人(4番目) 査読有り
Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Mov Disord.* 2014;29(1):153-4.
DOI:10.1002/mds.25659
 11. Maeda T, et al. 7人(6番目) 査読有り
Exacerbation of benign familial neonatal epilepsy induced by massive doses of phenobarbital and midazolam. *Pediatr Neurol.* 2014;51(2):259-61.
DOI:10.1016/j.pediatrneurol.2014.04.004
 12. Koyama S, et al. 7人(7番目) 査読有り
Obesity attenuates D2 autoreceptor-mediated inhibition of putative ventral tegmental area dopaminergic neurons. *Physiol Rep.* 2014;2(5):e12004.
DOI: 10.14814/phy2.12004
 13. Jingami N, et al. 8人(6番目) 査読有り
A novel SCN1A mutation in a cytoplasmic loop in intractable juvenile myoclonic epilepsy without febrile seizures. *Epileptic Disord.* 2014;16(2):227-31.
DOI: 10.1684/epd.2014.0657
 14. Ishii A, et al.14人(14番目)査読有り
Association of nonsense mutation in GABRG2 with abnormal trafficking of GABAA receptors in severe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2014;108(3):420-32.
DOI:10.1016/j.epilepsyres.2013.12.005
 15. Inoue T, et al. 10人(10番目) 査読有り
Early onset and focal spike discharges as indicators of poor prognosis for myoclonic-astatic epilepsy. *Brain Dev.* 2014;36(7):613-9.
DOI: 10.1016/j.braindev.2013.08.009
 16. Inoue S, et al. 11人(11番目)査読有り
Case of Desbuquois dysplasia type 1: potentially lethal skeletal dysplasia. *Pediatr Int.* 2014;56(4):e26-9.
DOI: 10.1111/ped.12383
 17. Heinzen EL, Arzimanoglou A, Brashear A, Clapcote SJ, Gurrieri F, Goldstein DB, Johannesson SH, Mikati MA, Neville B, Nicole S, Ozelius LJ, Poulsen H, Schyns T, Sweadner KJ, van den Maagdenberg A, Vilsen B, for the ATPAWG, (Hirose S, et al,). Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. *Lancet Neurol.* 2014;13(5):503-14.
DOI:10.1016/S1474-4422(14)70011-0
 18. Yamada J, et al. 14人(4番目) 査読有り
A novel prophylactic effect of furosemide treatment on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE). *Epilepsy Res.* 2013;107(1-2):127-37.
DOI:10.1016/j.epilepsyres.2013.08.018
 19. Sugawara T, et al. 6人(5番目) Detection of SCN1A mutations in patients with severe myoclonic epilepsy in infancy by custom resequence array. *Journal of Epileptology.* 2013;21:5-13.
DOI: 10.1515/joeppi-2015-0001
 20. Shinohara M, et al. 17人(5番目)査読有り
ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology.* 2013;80(17):1571-6.
DOI: 10.1212/WNL.0b013e31828f18d8
 21. Nakazawa M, et al. 7人(6番目)査読有り
Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy. *Brain Dev.* 2013;35(7):667-9.
DOI: 10.1016/j.braindev.2012.10.011
 22. Nakamura Y, et al. 8人(7番目) 査読有り
Novel HCN2 Mutation Contributes to Febrile Seizures by Shifting the Channel's Kinetics in a Temperature-Dependent Manner. *PLoS ONE.* 2013;8(12):e80376.
DOI: 10.1371/journal.pone.0080376
 23. Migita K, et al. 7人(6番目)査読有り
Properties of a novel GABA_A receptor 2

- subunit mutation associated with seizures. *J Pharmacol Sci.* 2013;121(1):84-7.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/121/1/121_12222SC/_pdf
24. Ishii A, et al. 19人(19番目) 査読有り Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choreoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev.* 2013;35(6):524-30.
 DOI: 10.1016/j.braindev.2012.09.006
25. Ishii A, et al. 10人(9番目) 査読有り A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy. *Gene.* 2013;531(2):467-71.
 DOI: 10.1016/j.gene.2013.08.096
26. Ishii A, et al. 13人(13番目) 査読有り Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e56120.
 DOI: 10.1371/journal.pone.0056120
27. Inoue T, et al. 15人(13番目) 査読有り A case of severe progressive early-onset epileptic encephalopathy: unique GABAergic interneuron distribution and imaging. *J NEUROL SCI.* 2013;327(1-2):65-72.
 DOI: 10.1016/j.jns.2013.01.038
28. Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, Kauffman M, Tan NC, Lowenstein DH, Sisodiya SM, Ottman R, Berkovic SF, Genetics Commission of the International League Against E. SCN1A testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia.* 2013;54(5):946-52. 査読有り
 DOI: 10.1111/epi.12168
29. Higurashi N, et al. 14人(14番目) 査読有り A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain.* 2013;6:19.
 DOI: 10.1186/1756-6606-6-19
30. Higurashi N, et al. 4人(3番目) Current Trends in Dravet syndrome Research. *J Neurol Neurophysiol.* 2013;4(3).
<http://dx.doi.org/10.4172/2155-9562.1000152>
31. Higurashi N, et al. 3人(3番目) 査読有り The effect of SCN1A mutations on patient-derived GABAergic neurons: what are the implications for future Dravet syndrome therapeutics? *Future Neurol.* 2013;8(5):487-9
 DOI: 10.2217/fnl.13.34
32. Higurashi N, et al. 24人(24番目) 査読有り PCDH19-related female-limited epilepsy: further details regarding early clinical features and therapeutic efficacy. *Epilepsy Res.* 2013;106(1-2):191-9.
 DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2013.04.005
33. Yamakawa Y, et al. 10人(8番目) 査読有り A boy with a severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Brain Dev.* 2012;34(2):107-12.
 DOI: 10.1016/j.braindev.2011.05.003
34. Wang JW, et al. 8人(8番目) 査読有り Epilepsy Genetic Study Group J. Prevalence of *SCN1A* mutations in children with suspected Dravet syndrome and intractable childhood epilepsy. *Epilepsy Res.* 2012;102(3):195-200.
 DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2012.06.006
35. Shi X, et al. 7人(7番目) 査読有り Clinical spectrum of *SCN2A* mutations. *Brain Dev.* 2012;34(7):541-5.
 DOI: 10.1016/j.braindev.2011.09.016
- [学会発表](計 17 件)
- てんかんと iPS 細胞 (麿瀬伸一) 第 44 回日本臨床神経生理学会 2014 年 11 月 19 日 ~ 2014 年 11 月 21 日 福岡
 - A Recurrent KCNT1 Mutation in Two Sporadic Cases with Malignant Migrating Partial Seizures in Infancy, Okumura A, (Hirose S), The 16th Annual Meeting of The Infantile Seizure Society (ISES 2014), Cappadocia, Turkey 2014.6.22-25
 - A Neonatal Case of Malignant Migrating Partial Seizures in Infancy. Sato T, (Hirose S), The 16th Annual Meeting of The Infantile Seizure Society (ISES 2014), Cappadocia, Turkey, 2014.6.22-25
 - The pathomechanisms of Dravet syndrome: Lessons From Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs), (Hirose S), The 16th Annual Meeting of The Infantile Seizure Society (ISES 2014), Cappadocia, Turkey, 2014.6.22-25
 - 最新技術でてんかんへ挑む 麿瀬伸一 第 217 回日本小児科学会宮城地方会 2014.6.8 宮城
 - Novel HCN2 mutation found in febrile seizure patients affects temperature sensitivity, Nakamura Y, (Hirose S), The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences, Hamamatsu, Japan 2013.9.4-7
 - Molecular basis of benign familial infantile epilepsy and related syndromes, (Hirose S), 30th

- international Epilepsy Congress Montreal, Canada, 2013.6.23-27
8. KCNQ2 and KCNQ3 abnormalities in benign neonatal epilepsy (BNE): a genetic analysis of BNE in Japan, Ihara Y, (Hirose S), The Epilepsy Genetic Study Group Japan, 30th international Epilepsy Congress, Montreal, Canada, 2013.6.23-27
 9. Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japan, Ishii A, (Hirose S), 30th international Epilepsy Congress Montreal, Canada, 2013.6.23-27
 10. Frequency of Mutations of KCNQ2 and KCNQ3 in Benign Neonatal Epilepsy in Japan, (Hirose S), Korean Epilepsy Congress 2013, Seoul, Korea, 2013.6.13-15
 11. KCNQ2 Mutation Enhances Firing Activity of Gabaergic Interneurons in the Hippocampus of Neonatal Mice, Uchida T, (Hirose S), Korean Epilepsy Congress 2013, Seoul, Korea, 2013.6.13-15
 12. Electrophysiological Analysis of Mutant HCN Channels Found in Febrile Seizure Patients, Nakamura Y, (Hirose S), Korean Epilepsy Congress 2013, Seoul, Korea, 2013.6.13-15
 13. A Genetic analysis of Benign Neonatal Epilepsy in Japan Ihara Y, Ishii A, (Hirose S), International Symposium on Neonatal Seizures and Related Disorders (ISNS) The 15th Annual Meeting of Infantile Seizure Society (ISS), Tokyo, Japan, 2013.4.12-14
 14. Genetic analysis of Alternating Hemiplegia of Childhood. Ishii A, (Hirose S), 10th European Congress of Epileptology London, U.K. 2012.9.30
 15. Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, in infantile convulsions with choleoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis Ishii A, (Hirose S), 2012 Korea Epilepsy Congress. Incheon, Korea. 2012. 6.8
 16. Genetics of benign neonatal seizures. (Hirose S), 12th International Child Neurology Congress / 11th Asian and Oceania Congress of Child Neurology Brisbane, Australia 2012. 5.27-6
 17. Neural Hyperexcitability and the Effects of KCNQ Channel Openers on Pentylentetrazole Induced Seizures on Model Mice in BFNS. Tomonoh Y. (Hirose S) 12th International Child Neurology Congress / 11th Asian and Oceanian

Congress of Child Neurology. Brisbane, Australia 2012. 5.27-6

〔図書〕(計4件)

1. Hirose S. Prog Brain Res. Genetics of Epilepsy 2014年 31ページ(55-85)
2. 廣瀬伸一 診断と治療社 小児科研修ノート第2版 2014年 3ページ(96-98)
3. 廣瀬伸一 希少難治てんかん診療マニュアル 遺伝学的診断マニュアル 2013年 5ページ(109-113)
4. Steinlein OK, Kaneko S, Hirose S Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies Nicotinic acetylcholine receptor mutations 2012年 6ページ(118-123)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬伸一 (Shinichi Hirose)
福岡大学 医学部 教授
研究者番号: 60248515

(2) 研究分担者

該当なし ()
研究者番号:

(3) 連携研究者

三角佳生 (Yoshio Misumi)
福岡大学 医学部 准教授
研究者番号: 10148877

荒木喜美 (Kimi Araki) 熊本大学 生命資源研究・支援センター 疾患モデル教授
研究者番号: 90211705

斎藤亮 (Ryo Saito)
福岡大学 薬学部 講師 退職
研究者番号: 80122696

高野行夫 (Yukio Takano)
福岡大学 薬学部 教授 退職
研究者番号: 50113246

弟子丸正伸 (Masanobu Deshimaru)
福岡大学 理学部 准教授
研究者番号: 70309889

井上隆司 (Ryuji Inoue)

福岡大学 医学部 教授
研究者番号：30232573

桂林 秀太郎 (Shutaro Katsurabayashi)
福岡大学 薬学部 准教授
研究者番号：50435145