

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791095

研究課題名(和文)患者iPS細胞とモデルラットによる女性に限定されるてんかんと精神遅滞の病態研究

研究課題名(英文) Research on PCDH19 female epilepsy by using patient-derived iPS cells and a rat model

研究代表者

日暮 憲道 (Higurashi, Norimichi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40568820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：女性に発症するPCDH19関連てんかんの病態や有効な治療を同定するため、患者由来iPS細胞の樹立と解析、疾患モデルラットの作成、新規患者の同定と臨床的解析を行った。ではiPS細胞から神経細胞を作成し、細胞形態やPCDH19発現に関して検討したが、現時点で有意な異常は見いだせていない。ではTALENと呼ばれるゲノム修飾技術を用い、研究期間中に無事作出することに成功した。では20例以上の新規患者を同定し(本邦患者数は計40例)、臨床的な特徴の理解を深めるとともに、発作に対するステロイドの有効性と免疫の関与を明らかにした。今後、モデルラットを用いた分子病態解明を進めていく。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenic mechanisms and effective treatments of PCDH19 female epilepsy, we established 1) patient-derived iPS cells and 2) a model rat, and 3) further investigated the clinical aspects of newly identified patients. 1) We compared iPS cell-derived neurons among a normal control cell line, paternal X (mutated PCDH19)-active patient cell lines, and maternal X (wild type PCDH19)-active patient cell lines focusing on their morphology and PCDH19 expression. However, no significant pathogenic alteration was detected. 2) A Pcdh19-knockout rat was successfully established by using the TALEN technology and will be used for our future research. 3) We newly identified more than 20 Japanese patients and deepened our understanding of the clinical aspects of PCDH19 female epilepsy, specifically initial seizure characteristics, an excellent efficacy of corticosteroids for seizure clusters, and a possible involvement of immune processes in the pathogenic mechanisms.

研究分野：医歯薬学

キーワード：てんかん 女性 遺伝子 疾患モデル動物 免疫 血液脳関門 接着分子 小児

1. 研究開始当初の背景

PCDH19 関連てんかん (旧名: 女性に限定されるてんかんと精神遅滞) は、女性にのみてんかんや知的障害が出現し、男性は無症状となる特異な X 連鎖性疾患である。てんかん発症は乳児期から幼児期早期で、発作は一旦再発すると日に何度も繰り返す「発作群発」を特徴とし、多くの患者で知的障害、発達・行動障害が徐々に進行する。本症の発作は頑固かつ難治であり、有効な治療法は未だ明らかではない。

PCDH19 は接着分子カドヘリンファミリーの一つ、プロトカドヘリン 19 (PCDH19) をコードしている。PCDH19 は中枢神経の発生・発達・機能に強く関与すると推測されているが、PCDH19 分子同士の接着能は低く、その詳細な役割や本症の分子病態は明らかになっていない。さらに、PCDH19 異常をヘミでもつ男性が発症から逃れる機序として、PCDH19 発現が正常な細胞と異常な細胞との体細胞モザイク (女性で生ずるランダムな X 染色体の不活化による) が発症に必須であることが理論上は推測されているが、分子学的証明には至っていない。

PCDH19 異常が原因であることは 2008 年に同定されたが、これを受け我々は、2010 年からサンガー法、Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) 法などの手法を用いて本邦患者の PCDH19 解析に着手し、前申請研究 (若手研究 B、22791011) において遺伝学的・臨床的特徴を明らかにした (Higurashi N, et al., *Epilepsy Res* 2012;99:28-37)。その中で、本症の遺伝子変異の大半は細胞外ドメインをコードするエクソン 1 に存在し、下流エクソンにはトランケーション変異のみが同定されている。一方で表現型が異なる 1 例で PCDH19 関連てんかんとは言えないものの、細胞質領域をコードするエクソン 6 の、特に保存性の高い CM2 モチーフに隣接するミスセンス変異 (p.Arg974Trp) が同定され、Polyphen-2 解析では Probably damaging (score 1.000) の結果であり、本変異の機能障害の実証は、臨床的にも、PCDH19 の機能や本症の解明においても重要と考えられた。

2. 研究の目的

PCDH19 関連てんかんの病態解明と有効な治療法の同定・開発を目的とする研究である。具体的な目標は、(1)患者から人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞を

樹立し、神経細胞へ分化誘導し、細胞レベルの異常を同定する。(2)保存性の高い細胞内モチーフに存在するエクソン 6 ミスセンス変異による影響の検討とともに、これを利用して PCDH19 の細胞内関連分子を同定する。(3)前申請研究から引き続き新規患者の同定を目指し、新たな臨床的、遺伝学的知見を蓄積し、疾患病態や有効な治療法の同定を目指す。(4)PCDH19 関連てんかんモデルラットを作成し、分子生物学的、免疫組織学的、電気生理学的に解析から、本症の病態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)患者由来 iPS 細胞の樹立・神経細胞分化: 患者の皮膚線維芽細胞に 4 種の初期化遺伝子 (*Sox2*, *Oct3/4*, *Klf4*, *c-Myc*) をレトロウイルスベクターにより導入し、iPS 細胞を樹立した。多分化能を維持した品質のよいクローンを複数選択した後、アンドロゲン受容体遺伝子を用いた方法 (メチル化感受性制限酵素で切断後 PCR) により X 染色体の不活化解析を行い、活性アレルが父由来、母由来、それぞれを 2 クローンずつ選択した。神経細胞分化は iPS 細胞コロニーから浮遊培養により胚葉体、さらにニューロスフェアを作成後、接着培養により成熟神経細胞へ分化させた。分化神経細胞の PCDH19 発現パターンを免疫染色により確認した。

(2)エクソン 6 変異 (p.Arg974Trp) を利用した PCDH19 の関連分子の探索: PCDH19 の cDNA に HA タグ 2 つを直列に付加し、発現ベクター (pIRES-EGFP) に導入したコンストラクトを作成した。さらにこれにエクソン 6 変異を導入したものを作成した。それぞれを HeLa 細胞にリポフェクション、あるいはエレクトロポレーションを用いて導入し、数日間培養後に免疫染色での発現パターンの違いを検討した。さらに細胞からタンパク質を抽出・精製し、ビーズ付き抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降されたタンパクの泳動パターンの違いを検索した。

(3)新規患者の同定と臨床的・遺伝学的解析: 前申請研究で明らかにした本症の臨床的特徴 (乳幼児期発症、繰り返す発作群発、発熱関連性、難治、女性の家族歴など) に合致する女児例を中心に患者収集を行い、PCDH19 解析を行った。解析はサンガー法、

MLPA 法により行い、欠失が疑われた例では Fluorescence in situ hybridization (FISH) を追加し診断した。

- (4) 本症モデルラットの作成: *Pcdh19* を切断する TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) コンストラクトを作成し、ノックアウトラットの作成を試みた。

4. 研究成果

- (1) 患者 iPS 細胞の樹立・神経細胞分化

クローン選択: 本研究開始時、すでに樹立中であった患者 iPS 細胞 (エクソン 1 にトランケーション変異あり) について、6 つのクローンを選択し、X 染色体不活化解析を行った。うち活性化アレルが父あるいは母に偏っているクローンをそれぞれ 2 つずつ選択した。

正常 iPS 細胞由来神経細胞の PCDH19 発現: mRNA を精製し定量 PCR を行ったところ、iPS 細胞でも発現が確認出来たが、胚葉体、ニューロスフェア、神経細胞でリッチな発現が確認された。免疫染色では、細胞間の発現差異はあるものの、多数の細胞で発現が確認された。発現部位は軸索のこともあったが、樹状突起 (分岐部、肥厚部、棘など) や細胞体に強い発現が認められた。てんかんの病態に重要な GABA 作動性神経細胞における発現について検討したが、染色のあるものも全くないものもあり、一定の傾向は認めなかった。

X 不活化による PCDH19 発現への影響: iPS 細胞のドナー例の変異は父由来である。このため、父由来 X が活性であるクローンでは、nonsense-mediated mRNA decay により変異 mRNA は破壊され、母由来 X が活性なクローンでは、正常 mRNA 発現のみが発現されると予測される。実際に父由来 X クローンをシクロヘキシミド処理すると、未処理に比べ変異 mRNA の検出レベルが明らかに増加し、nonsense-mediated mRNA decay が生じていることがわかった。しかし、どちらのクローンどちらにおいても、正常 mRNA も変異 mRNA もしばしば検出され、免疫染色でも PCDH19 の染色状況に、明らかな違いは認めなかった。また、神経細胞の形態などにも明らかな違いは認めなかった。

- (2) エクソン 6 変異を利用した PCDH19 の関連分子の探索: 野生型 PCDH19 を導入した

HeLa 細胞において、EGFP、HA、PCDH19 の染色は合致しており、発現ベクターが確実に作用していることが確認できた。ウェスタンブロットでも発現を確認した。しかし、変異 PCDH19 ベクターによるものと比較して、免染による発現パターンには違いは認めなかった。その後、正常ベクターと変異ベクターそれぞれ導入した細胞からタンパクを抽出し免疫沈降後、回収したタンパクをアガロースゲルに泳動、銀染色を行い、正常 PCDH19 の法でのみ検出されたバンドを切り出し、質量分析を行ったが、有意なタンパクの検出には至らなかった。

- (3) 新規患者の同定と解析: 本研究期間中に新たに 20 例以上を同定し、本邦症例は合計約 40 例 (うち 3 例が PCDH19 全領域を含む欠失、2 例がエクソン 2、4 のトランケーション変異、残りは全てエクソン 1 の変異) となった。変異の由来は新規 (de novo) が 54% と半数以上を占め、父由来が約 30%、母由来が約 16% であった。新規症例を含めより詳細に臨床的解析を行ったところ、以下の点を新たに同定した。1) ほとんどが初発時より群発を呈し、その多くは有熱時発症であった。2) 初発時の群発出現パターンが 2 通りあり、一つは数日間の激しい発作群発が二相性に出現するパターンで、もう一つは低い発作頻度で始まるが、その後激しい発作群発となり、多相性かつ数週間と長期に続くものであった。特に後者から、髄液や MRI で異常がないにも関わらず群発が断続的に数週間続く症例では、初発時でも本症を疑うべきであると考えられた。3) 大脳辺縁系や前頭葉内側面が、本症の発作の主座である。4) 有効薬剤に関する後方視的な検討でフェニトイン、ベンゾジアゼピン、臭化カリウム、トピラマートの有効性が比較的高い。ただしいずれも効果は不安定で、確実な治療法は明らかにならなかった。

しかし、その後もさらなる検討を続けたところ、本症の発作に免疫学的機序の関与という新たな一側面が明らかになってきた。本症の発作群発に対してステロイド投与が、一時的ではあるが、高率かつ迅速に発作を停止させる例が多くみられ、さらに抗グルタミン酸受容体の抗原など、神経成分に対する自己抗体の非特異的な産生が高頻度に生じていることがわかった。これらの状況から、本症における血液脳関門の関与が強く推測されるようになった。実際、脳血液関門における PCDH19 発現が高いことは、去

のマウスの研究で報告されており、我々も培養したヒトの脳血管内皮細胞におけるPCDH19発現をmRNAレベル、さらに免疫染色において確認している(未報告)。

(4)モデルラット作成：計画では初年度に*Pcdh19*をTALENでノックアウトしたラットを作出することを目標としていたが、遺伝子切断が上手くいかずラットの作出に時間を要したが、最終年度に作出に成功し、現在、繁殖を行い、基礎実験を開始する段階である。今後はこのラットを用いて、本症の病態として一般に推測されている神経細胞やそのネットワーク形成の異常、機能的变化を解析するとともに、前述した通り血液脳関門の関与が強く考えられるため、これに関する検討も平行して開始する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. 宮本晶恵、福田郁江、田中肇、岡隆治、長和彦、日暮憲道、廣瀬伸一. 長期観察しえたPCDH19遺伝子変異をもつてんかん女性の1例. てんかんをめぐって. 2012;31:89-94.
2. 日暮憲道, 廣瀬伸一. 女性に発症するPCDH19関連てんかんの本邦例における臨床的特徴. てんかん治療研究財団研究年報 2013;24:79-86.
3. Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. Mol Brain 2013;6:19. (査読あり) doi:10.1186/1756-6606-6-19
4. Higurashi N, Uchida T, Hirose S, Okano H. Current trends in Dravet syndrome Research. J Neurol Neurophysiol 2013;4:3. doi: 10.4172/2155-9562.1000152 (査読あり)
5. Higurashi N, Okano H, Hirose S. The effect of SCN1A mutations on patient-derived GABAergic neurons: what are the implications for future Dravet syndrome therapeutics? Future Neurol 2013;8:487-489.
6. Higurashi N, Nakamura M, Sugai M, Ohfu M, Sakauchi M, Sugawara Y, Nakamura K,

Kato M, Usui D, Mogami Y, Fujiwara Y, Itoh T, Ikeda H, Imai K, Takahashi Y, Nukui M, Inoue T, Okazaki S, Kirino T, Tomonoh Y, Inoue T, Takano K, Shimakawa S, Hirose S. PCDH19-related female-limited epilepsy: Further details regarding early clinical features and therapeutic efficacy. Epilepsy Res 2013;106:191-199. (査読あり)

7. Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, Sugawara Y, Sakuma H, Tomonoh Y, Inoue T, Hoshina M, Satomi R, Ohfu M, Itomi K, Takano K, Kirino T, Hirose S: Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in *PCDH19* female epilepsy. Seizure 2015;27:1-5. (査読あり)
8. Kano S*, Yuan M*, Cardarelli RA*, Maegawa G*, Higurashi N*, Gaval-Cruz M*, Wilson AM, Tristan K, Kondo MA, Chen Y, Koga M, Obie C, Ishizuka K, Seshadri S, Srivastava R, Kato TA, Horiuchi Y, Sedlak TW, Lee Y, Rapoport JL, Hirose S, Okano H, Valle D, O'Donnell P, Sawa A, Kai M. Clinical utility of neuronal cells directly converted from fibroblasts of patients for neuropsychiatric disorders: studies of lysosomal storage diseases and channelopathy. Curr Mol Med 2015;15:138-145. *equal contribution (査読あり)

[学会発表](計16件)

1. Higurashi N. Dravet Syndrome or EFMR, What Is The Difference? - Can You Tell The Difference?, 12th International Child Neurology Congress & 11th Asian & Oceanian Congress of Child Neurology. Brisbane (Australia). 2012.5
2. Higurashi N, Hirose S: Challenges in The Establishment of A Dravet Syndrome Model Using Patient-Derived iPS Cells. Korea Epilepsy Congress (KEC 2012). Incheon (Korea). 2012.6
3. Higurashi N, Taku Uchida, Lossin C, Okano H, Hirose S: Modeling Dravet Syndrome Using Induced Pluripotent Stem Cells. Pediatric Academic Societies Annual Meeting (PAS 2013). Washington DC (United States).

- 2013.5.7
4. 日暮憲道、廣瀬伸一. PCDH19 関連てんかんにおける発症初期の臨床的特徴と治療効果の検討. 第 55 回日本小児神経学会総会. 大分. 2013.5.30
 5. Higurashi N, Uchida T, Christoph L, Okano H, Hirose S: A new research platform for Dravet syndrome using patient-derived induced pluripotent stem cells. XII. Workshop on Neurobiology of the Epilepsy (WONOE 2013). Quebec (Canada). 2013.6.20
 6. Higurashi N, Hirose S: Early clinical features and treatment efficacy of antiepileptic drugs in Japanese patients with *PCDH19*-related epilepsy. 2nd Edition of World Conference on PCDH19. Rome (Italy). 2013.10.17
 7. 日暮憲道: Dravet 症候群と *PCDH19* 関連てんかん-診断・鑑別のポイントと発症病態. 第 47 回日本てんかん学会. 北九州. 2013.10.12
 8. Higurashi N, Uchida T, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S: Modeling Dravet syndrome with patient-derived induced pluripotent stem cells and functional vulnerabilities in differentiated GABAergic neurons. 第 47 回日本てんかん学会. 北九州. 2013.10.11
 9. Higurashi N, Uchida T, Okano H, Hirose S: Potentials of induced pluripotent stem cell-derived neurons in future drug discovery for Dravet syndrome. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. Osaka. 2014.1.16-18
 10. Higurashi N, Hirose S: Research on clinical aspects of *PCDH19*-related epilepsy and induced pluripotent stem cells from a patient with Dravet syndrome: Present findings and future directions. 7th IGAKUKEN International Symposium on "Fever, Inflammation, and Epilepsy". Tokyo. 2014.2.21
 11. Higurashi N, Takahashi Y, Hirose S: High prevalence of autoantibodies to N-methyl-D-aspartate receptor and the efficacy of glucocorticoids in *PCDH19*-related female-limited epilepsy. 13th International Child Neurology Congress. Iguazu Falls (Brazil). 2014.5.5
 12. 日暮憲道: シンポジウム iPS 細胞を用いた小児神経疾患の病態解明への期待とその問題点 てんかんの病態研究とその問題点. 第 56 回日本小児神経学会総会. 浜松. 2014.5.29.
 13. Higurashi N, Hirose S: Dravet syndrome research using patient-derived induced pluripotent stem cells—Present findings and future directions. Korea Epilepsy Congress (KEC 2014). Seoul (Korea). 2014.6.14
 14. Higurashi N, Hirose S: Corticosteroids: A Powerful Treatment Option for *PCDH19*-related Epilepsy. *PCDH19* Pediatric Epilepsy Professional and Family Symposium. San Francisco (UCSF, United States). 2014.9.6
 15. Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, Sugawara Y, Sakuma H, Hoshina M, Ohfu M, Tomonoh Y, Hirose S: Inflammatory aspects of *PCDH19*-related epilepsy. 第 48 回日本てんかん学会. 東京. 2014.10.2
 16. Higurashi N: New technologies in epilepsy research. The 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research (ASPR 2015). Osaka. 2015.4.16
- 〔図書〕(計 7 件)
1. 井原由紀子, 石井敦士, 日暮憲道, 内田琢, 中村友紀, 友納優子, 廣瀬伸一. てんかんの分子病態. Medical Science Digest. 2012 ; 38:292-295.
 2. 日暮憲道, 浜野晋一郎, 廣瀬伸一. 4 章 6. Dravet 症候群: 奥村彰久, 浜野晋一郎編. 子どものけいれん・てんかん 見つけ方・見分け方から治療戦略へ. 中山書店. pp171-175.2013.
 3. 日暮憲道, 廣瀬伸一. 7. 女性に発症する *PCDH19* 関連てんかん: 大槻泰介, 須貝研司, 小国弘量, 井上有史, 永井利三郎編. 稀少難治てんかん診療マニュアル 疾患の特徴と診断のポイント. 診断と治療社. pp.22-24.2013.
 4. 日暮憲道, 井原由紀子, 廣瀬伸一. 症例 31. 遺伝学的診断が臨床上役立つケースは?: 池田昭夫. 症例から学ぶ 戦略的てんかん診断・治療. 南山堂. pp221-227. 2014.
 5. 日暮憲道, 廣瀬伸一: XIV てんかん症候群 その他の重要な病態 女性に発症す

る *PCDH19* 関連てんかん. 日本臨牀別冊
神経症候群 VI. 日本臨牀社 pp468-472.
2014.

6. 日暮憲道, 廣瀬伸一: 遺伝子異常に基づく難治てんかん - Dravet 症候群, 遺伝子医学 MOOK 27 号 iPS 細胞を用いた難病研究 - 臨床病態解明と創薬に向けた研究の最新知見. メディカル ドウ .pp43-47. 2015.
7. 日暮憲道, 廣瀬伸一: *PCDH19* 関連てんかん, 臨床てんかん学. 医学書院. 2015 (印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日暮 憲道 (HIGURASHI Norimichi)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40568820