

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870617

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いた早期乳児てんかん性脳症の病態解明と薬剤評価系の構築

研究課題名(英文) Modeling the neuronal phenotype of epileptic encephalopathy using patient-derived iPSCs

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：早期乳児てんかん性脳症は生後早期から難治の発作を認め、重度の発達遅滞を呈する疾患である。我々は、STXBP1遺伝子変異を有する乳児てんかん性脳症患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立した。このiPS細胞を神経分化させた後に、STXBP1のmRNAおよびタンパク発現を検討した。患者由来クローンでは対照に比して発現が約半量に低下しており、STXBP1ハプロ不全の有用なin vitroモデルと考えた。患者由来クローンではSNAREタンパク複合体のひとつであるsyntaxinの発現が低下しており、神経突起伸長に障害を認めた。これらの細胞表現型はてんかん性脳症の病態の一部を再現していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We generated iPSC lines from a patient with Ohtahara syndrome (OS) harboring a heterozygous nonsense mutation of STXBP1 and performed neuronal differentiation. Both STXBP1 mRNA and STXBP1 protein expression levels of OS-derived neurons were approximately 50% lower than that of control-derived neurons, proving that OS-derived neurons are a suitable model for elucidating the pathophysiology of STXBP1 haploinsufficiency. Through western blot assays, we found that OS-derived neurons show reduced levels of syntaxin-1, a component of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) proteins. In addition, OS-derived neurons have impaired neurite outgrowth. In conclusion, this model enables us to investigate the neurobiology of STXBP1 encephalopathy throughout the stages of neurodevelopment. Reduced expression of STXBP1 leads to changes in the expression of syntaxin-1 that may contribute to the devastating phenotype of STXBP1 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 STXBP1

### 1. 研究開始当初の背景

サプレッションバーストを伴う早期乳児てんかん性脳症(大田原症候群; Ohtahara syndrome; OS)は生後早期に頻回かつ難治のてんかん性スパズムで発症し、重度の発達遅滞を呈する極めて予後不良なてんかん症候群である。しかし、その病態は明らかとなっておらず、有効な治療はない。OSの病因は様々であり、脳構造異常や先天代謝異常が同定される症例がある一方、それらを認めない症例で、最近 *STXBP1* 遺伝子異常(ハプロ不全)が原因として同定された。OSの病態を解明するうえで、この遺伝子異常がもたらす神経細胞機能異常を明らかにすることは重要である。

*STXBP1* がコードする蛋白 Munc18-1 は、神経細胞において syntaxin-1A と結合し、シナプス小胞の開口放出に重要な役割をしていることが明らかとなっている。しかしながら、*STXBP1* のハプロ不全によりどのような神経細胞機能障害が出現し、OSの発症に至るのかは明らかとなっていない。STXBP1 ホモ欠損マウスは、神経伝達物質の開口放出が全く認められず、呼吸ができずに生後すぐに死亡する。一方で、STXBP1 ヘテロ欠損マウスはてんかんを発症せず、ハプロ不全による OS の病態を再現するモデルとはならない。従って、本症の病態解明にはヒト神経細胞を用いた研究が必須である。

患者神経細胞を非侵襲的に採取することは不可能であるため、従来ヒト神経細胞を用いた研究は困難であった。近年、患者から樹立した iPS 細胞を神経細胞に分化誘導する技術により、この問題は克服され、多くの神経難病研究で目覚ましい成果が得られている。本研究は、*STXBP1* 変異を有する OS 患者から iPS 細胞を樹立し、OS の病態解明を目指したものである。

### 2. 研究の目的

iPS 細胞神経分化系を用いて、OS のヒト細胞モデルを確立する。  
上記モデルを用いて、OS 発症に至る病態を明らかにし、新規治療標的を探索する。

### 3. 研究の方法

*STXBP1* 変異を有する OS 患者の皮膚線維芽細胞にエピソーマルプラスミドを用いて初期化因子を導入し、iPS 細胞を樹立する。  
樹立した iPS 細胞を SFEBq 法により神経細胞に分化誘導し、得られた神経細胞の分子細胞学的解析を行う。

### 4. 研究成果

iPS 細胞の樹立と品質確認

OS 患者の皮膚線維芽細胞にエピソーマルプラスミドを用いて初期化 6 因子 (*SOX2*,

*KLF4*, *OCT3/4*, *L-MYC*, *LIN28*, p53 shRNA) を導入し、iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞が幹細胞マーカーを発現していることを RT-PCR および免疫染色で確認した。さらに三胚葉すべてへの分化能を有していることを *in vitro* three-germ layer assay で確認した(図1)。

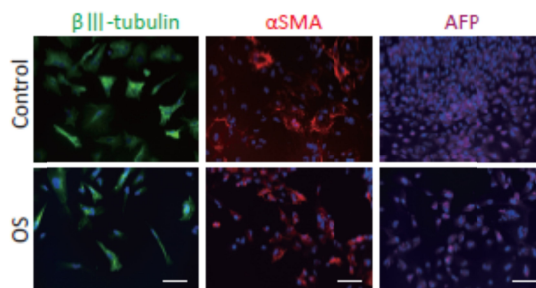


図1 *in vitro* three-germ layer assay (外胚葉: III-tubulin、中胚葉: SMA、内胚葉: AFP)

また患者クローン、対照クローンのいずれも染色体核型(G 分染法)は正常であり、患者クローンのみが *STXBP1* 変異を有することをサンガー法で確認した(図2)。

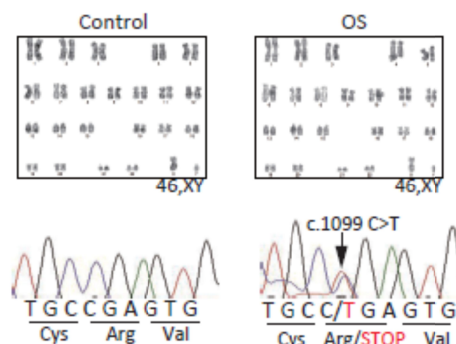


図2 iPS 細胞の変異解析

iPS 細胞から神経細胞への分化誘導

患者クローンおよび対照クローン iPS 細胞を SFEBq 法により神経細胞への分化誘導を行った。両者の分化効率に差はなく、患者クローンは対照と同様の神経分化能を有していることを明らかにした(図3)。

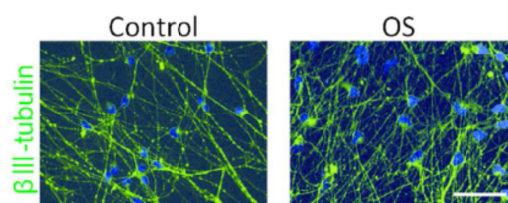


図3 分化誘導した神経細胞

さらに、分化誘導した神経細胞に対し、定量 PCR 法、ウエスタンブロット法で *STXBP1* の mRNA およびタンパク発現を検討したところ、患者クローンでは対照に比して発現が約半量に低下していることを明らかにした(図 4)。従ってこの細胞分化系は *STXBP1* ハプロ不全の *in vitro* モデルとして有用であると考えられた。

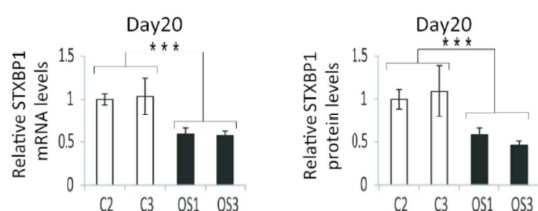


図 4 *STXBP1* の mRNA およびタンパク発現  
\*\*\*  $p < 0.001$

#### OS の病態解析

*STXBP1* は syntaxin-1A の分子シャペロンとして作用し、syntaxin-1A の正常な発現に必要であることが他の動物種由来細胞の先行研究で明らかとなっている。ヒト神経細胞において *STXBP1* ハプロ不全が syntaxin-1 の発現に影響をおよぼすかをこの細胞分化系を用いて検討した。分化 20 日目の neural aggregate において、syntaxin-1 の発現をウエスタンブロットで検討したところ、患者由来のクローンでは対照に比して syntaxin-1 の発現が低下していることが明らかとなった(図 5)。

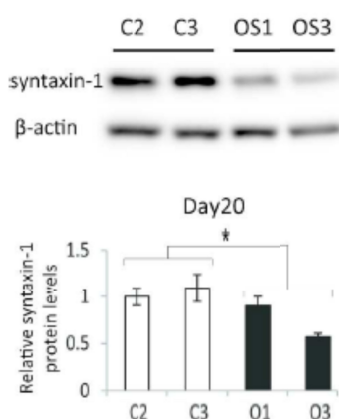


図 5 患者クローンの syntaxin-1 発現低下  
\*  $p = 0.01$

ボツリヌス毒素 C は syntaxin-1 を切断する作用を有し、ボツリヌス毒素 C に暴露された神経細胞は神経突起伸張に障害をきたす。このことから、本細胞モデルにおいて、syntaxin-1 の発現低下が神経突起伸張障害

を引き起こすとの仮説を立て、神経突起伸張の定量を行った。分化 20 日目の neural aggregate を接着培養し、24 時間後の神経突起長を計測した。その結果、患者クローンでは神経突起伸張に障害があることが明らかとなった(図 6)。

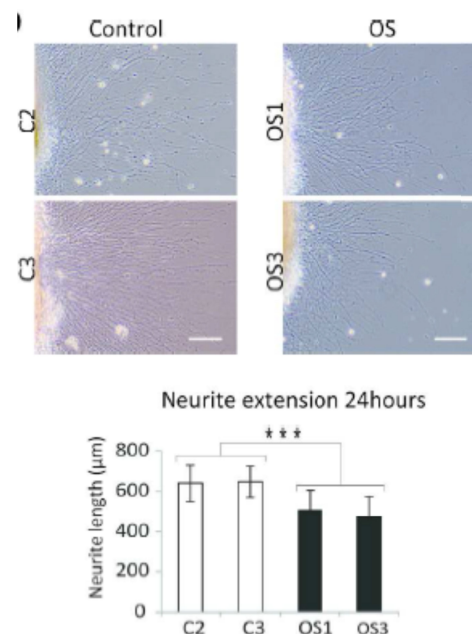


図 6 患者クローンでの神経突起伸張障害  
\*\*\*  $p < 0.001$

以上の結果から *STXBP1* ハプロ不全は、ヒト神経細胞において syntaxin-1 の発現低下をきたし、神経突起伸張に障害をきたすことが示唆された。この細胞レベルでの異常は、OS 患者でみられる顕著な発達遅滞、脳梁低形成などの表現型と関連している可能性があり、今後さらなる検討が必要である。また、細胞レベルでの異常の改善を示す化合物のスクリーニングは OS の予後を改善させる新規薬剤開発につながる可能性があり、本研究で確立した細胞分化系は新規薬剤の評価系としても用いることができると考えられる。

#### 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 1 件)

Chiyonobu T, Inoue N, Morimoto M, Kinoshita T, Murakami Y. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency caused by mutations in *PIGW* is associated with West syndrome and hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 51, 2014, 203-207. DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-102156. 査読有

[学会発表](計2件)

Chiyonobu T, Inoue N, Morimoto M, Kinoshita T, Murakami Y. Inherited GPI anchor deficiency is associated with West syndrome. The 16<sup>th</sup> Annual Meeting of Infantile Seizure Society. 2014年6月23日~25日. Cappadocia (Turkey).

Chiyonobu T, Inoue N, Morimoto M, Kinoshita T, Murakami Y. Inherited GPI anchor deficiency: biochemical, molecular, and clinical presentation of a patient with *PIGW* mutation. American Society of Human Genetics 64<sup>th</sup> Annual Meeting. 2014年10月18日~22日. San Diego (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