

—— 研究助成報告 ——

Collybistin欠損を示すてんかん患者由来iPS細胞による 病態解析と治療研究

Biological analysis and treatment research for epilepsy using iPS cells derived
from a patient with a collybistin deficit

下 島 圭 子¹⁾, 山 本 俊 至¹⁾, 今 井 克 美²⁾

要旨：神経疾患の病変組織を採取することは困難である。疾患iPS細胞による病態解析はその困難を克服するbreakthroughとなった。これまでParkinson病などの病態解析に応用され、一部では治療研究に結びつき始めている。我々は小児難治性てんかんを示す患者の病態を解明するため、疾患患者由来iPS細胞を用いた病態解析に取り組んできた。病態に迫るには、疾患の原因となる一次的な因子の特定が前提となる。これまでのゲノム解析により様々なゲノム変異によるてんかん患者を同定してきており、それらのうち、患者家族の同意が得られた患者から細胞を採取してiPS細胞を樹立させてきた。X染色体q11.1領域に存在する*ARHGEF9*の欠失による難治てんかん患者はそのうちの1例である。*ARHGEF9*はcollybistinをコードしているが、collybistinはGDP/GTP交換因子familyに属しており、抑制系ニューロンにおけるシナプス後膜の裏打ちタンパクであるgephrinと結合し、GABAA受容体において重要な役割を果たしている。collybistinの機能喪失により抑制系ニューロンの機能が阻害され、興奮性ニューロンが優位になり、てんかんを生じていることが考えられる。患者由来iPS細胞を樹立し、神経系細胞に分化誘導させた。8日目の遺伝子発現状態を解析したところ、*FOXG1*の発現低下が著明であった。*FOXG1*はRett症候群類似の症状を示す先天性疾患であり、共通する分子基盤が考えられた。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2016 ; 27 : 33-40

Key Words : chromosomal microarray testing, epilepsy, *ARHGEF9*, *FOXG1*, microdeletion, collybistin, 抑制系ニューロン

はじめに

てんかん脳症は、乳児期早期より難治なけいれん発作と重度の精神運動発達の遅れを示す予後不良のてんかん症候群である。遺伝学的解析手法の著しい進歩により、多くのてんかん関連遺伝子が明らかにされてきた。てんかん脳症に関連する遺伝子はX-linked Aristaless-related

homeobox gene (*ARX*) の報告を皮切りに多数報告されており、ヒトのメンデル遺伝病に関するin-silico libraryであるonline Mendelian inheritance in man (OMIM : <http://omim.org/>) には、途中欠番があるものの、連番でEIEE35まで登録がある。これらの遺伝子の中には、*SCN1A*のように細胞膜イオンチャネルとして働く遺伝子を含め、様々な機能を示すも

¹⁾東京女子医科大学統合医科学研究所

²⁾国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター

Keiko Shimojima¹⁾, Toshiyuki Yamamoto¹⁾, Katsumi Imai²⁾

¹⁾Tokyo Women's Medical University Institute for Integrated Medical Sciences, Tokyo

²⁾Department of Pediatrics, National Epilepsy Center, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, Shizuoka

のが含まれている。細胞膜イオンチャネルに関しては、遺伝子導入によるパッチクランプ法やノックアウトマウスによる病態解析などにより、病態がかなり明らかになってきた。その一方、細胞レベルにおける遺伝子機能が明らかでないものも多い。

遺伝子型の同定だけでは、その変異がどのような機能障害を生じて症状の発現に関わっているのかを明らかにすることはできない。特に病巣である中枢神経系は、細胞を直接採取して調べることはできないため、これまで実験動物による病態解析しか手段がなかった。ただ、神経細胞レベルでの病態解析のハードルとなっているのが動物種による表現型の相違である。ヒトホモログをノックアウトしてもヒトと同じ表現型を示さないことはしばしば経験される。そこで我々は、ゲノム変異が明らかな患者から疾患iPS細胞を樹立し、患者の脳細胞を直接バイオプシーすることなく、試験管内で病態を再現することによって病態を理解することを目指してきた。

本研究においては、X染色体長腕セントロメア近傍の微細欠失がどのような病態を示し、将来の治療研究にどう結び付けることができるかについて検討した。

対象

原因不明の精神発達遅滞とてんかんなどの神経症状を示す患者を対象としてマイクロアレイによる網羅的ゲノムコピー数解析を実施した。ゲノムコピー数異常が認められた領域に位置する遺伝子のうち、遺伝子機能から疾患候補遺伝子を推測し、当該遺伝子をターゲットとしたコホート解析を実施した。それにより疾患関連変異が明らかになった患者から、皮膚線維芽細胞を採取し、iPS細胞を樹立した。

なお、本研究は東京女子医科大学の遺伝子解析のための倫理委員会の承認に基づき、研究対象者家族から書面によるインフォームドコンセントを得て行った。

方法

1) マイクロアレイ染色体検査

ゲノムコピー数異常の有無をAgilent SurePrint 60K array (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて解析した¹⁾。方法はAgilent Technologies社が提供するマニュアルに従った。

2) FISH法

ゲノムコピー数解析で認められた所見の確認のため、BACクローン (RP11-943J20) を標識したプローブを用いてFISH解析を行った。両親における確認もFISH法により行った¹⁾。

3) 遺伝子解析

患者において認められた欠失範囲に存在する *ARHGEF9* を候補遺伝子とし、発端者と同様の症状を示す23人の患者を対象としたコホート解析を行った。解析は *ARHGEF9* の全翻訳を通常のキャピラリーシーケンサーを用いたサンガーシーケンス法により行った¹⁾。

4) 疾患iPS細胞樹立

発端者から皮膚線維芽細胞を採取し、エレクトロポレーションでhSOX2, KLF4, hOCT3/4, L-MYC, shRNA for p53, Lin28に関するエピゾーマルベクターを導入することにより、疾患iPS細胞を樹立した^{1,2)}。

5) 網羅的遺伝子発現解析

発端者由来iPS細胞と正常コントロールiPS細胞をModified SFEBq法により神経系細胞に分化誘導させ、0日目と8日目に全RNAを抽出し、Whole Human Genome 44K microarray (Agilent Technologies) を用いて網羅的遺伝子発現を解析した^{1,2)}。正常対象細胞についても同様の解析を行い、GeneSpring (Agilent Technologies) を用いて統計解析した^{1,2)}。

結果

1) ゲノムコピー数解析

マイクロアレイによるゲノムコピー数解析によって1例の患者にXq11.1領域の2.8-Mbのゲノムコピー数減少 [arr Xq11.1 (62, 321, 746-63, 058, 548) x0] を認めた (Fig. 1)。欠失範囲に

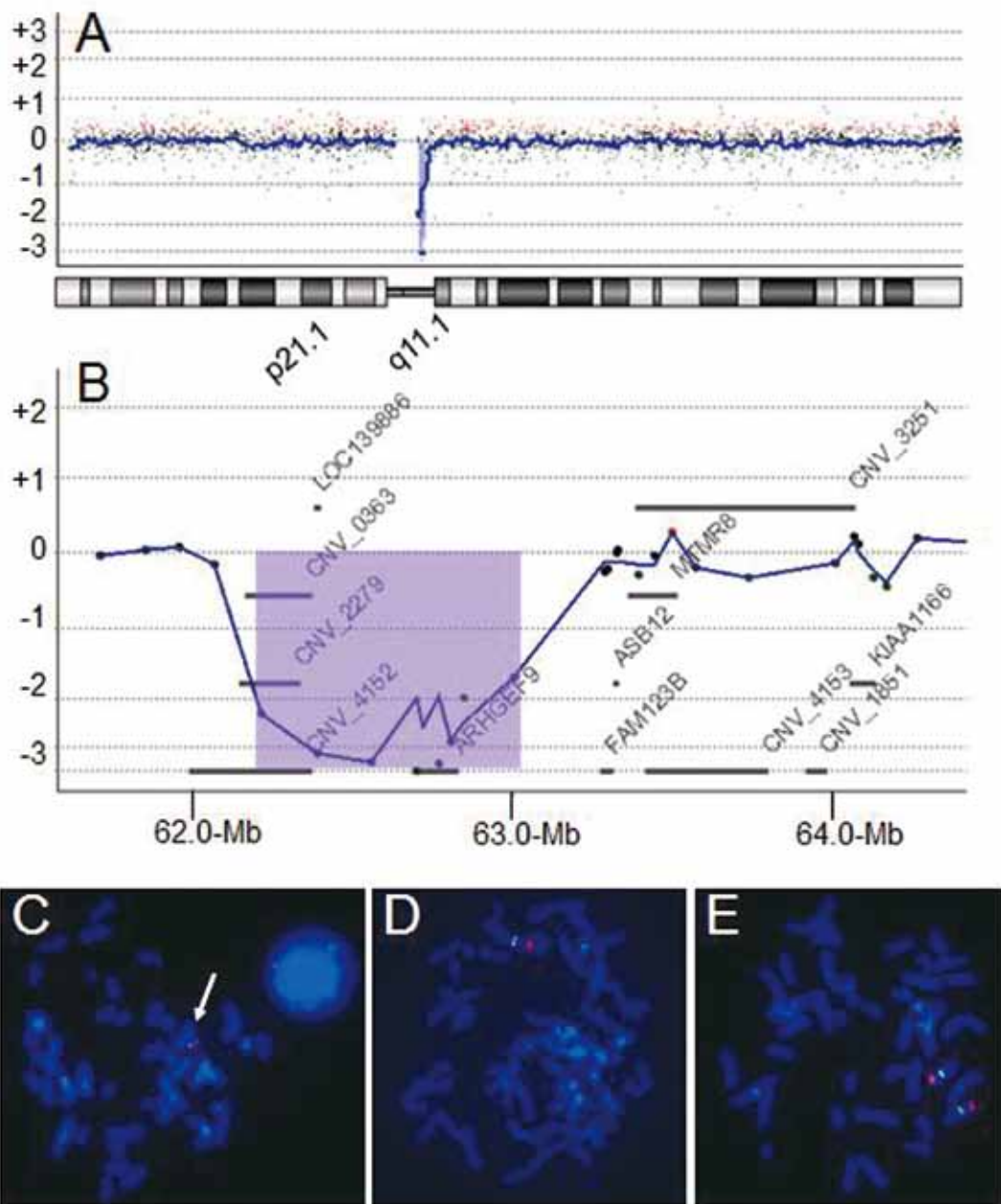


Fig. 1 The result of microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). Chromosome view by Agilent Genomic Workbench (Agilent Technologies) indicates a microdeletion at Xq11.1 (A), which is expanded in Gene view (B). FISH analyses for the patient (C), his father (D) and mother (E). The patient shows a red signal of RP11-75D20 on the X chromosome, but no green signal of RP11-943J20 covering *ARHGEF9* (arrow) (C). His father and mother show 1 and 2 normal X chromosomes, respectively (D, E).

存在するBACクローン，RP11-943J20をプローブとして行ったFISH解析により，同プローブシグナルの欠失を認められたことからXq11.1

領域が欠失していることを再確認した (Fig. 1)。両親におけるFISH解析の結果，異常は認められず，突然変異であった。

2) 発端者の臨床表現型

発端者は5歳男児。健康な兄があり、家族歴に特記すべきことはなかった。生後9カ月頃より精神運動発達遅滞を指摘されていた。1歳で座位を獲得し、1歳1ヶ月で寝返りした。2歳時に複雑部分発作で発症し、発作は毎月認められたがバルプロ酸でコントロールされた。脳波では両側頭葉に独立して発作波が認められた。頭部MRI検査で前頭葉優位の容量低下が認められた (Fig. 2)。Gバンド法による染色体検査は正常男性核型を示した。現在有意語はなく、支えなければ立位保持ができない。身辺自立は未獲得である。

3) *ARHGEF9*コホート解析

Xq11.1において認められた染色体微細欠失の領域内には、データベースの情報によれば、3個の既知の遺伝子が存在していた。このうち、中枢神経において強い発現を示す遺伝子は *ARHGEF9*のみであったので、*ARHGEF9*のハプロ不全が本症例における中枢神経症状に強く関与していると考えられた。

*ARHGEF9*の変異が、本症例と同様の症状を示す他の患者の原因になっている可能性を考え *ARHGEF9*の全10エクソンについて、コホート解析を行った。それまでにマイクロアレイによるゲノムコピー数解析で異常なしとされた23人

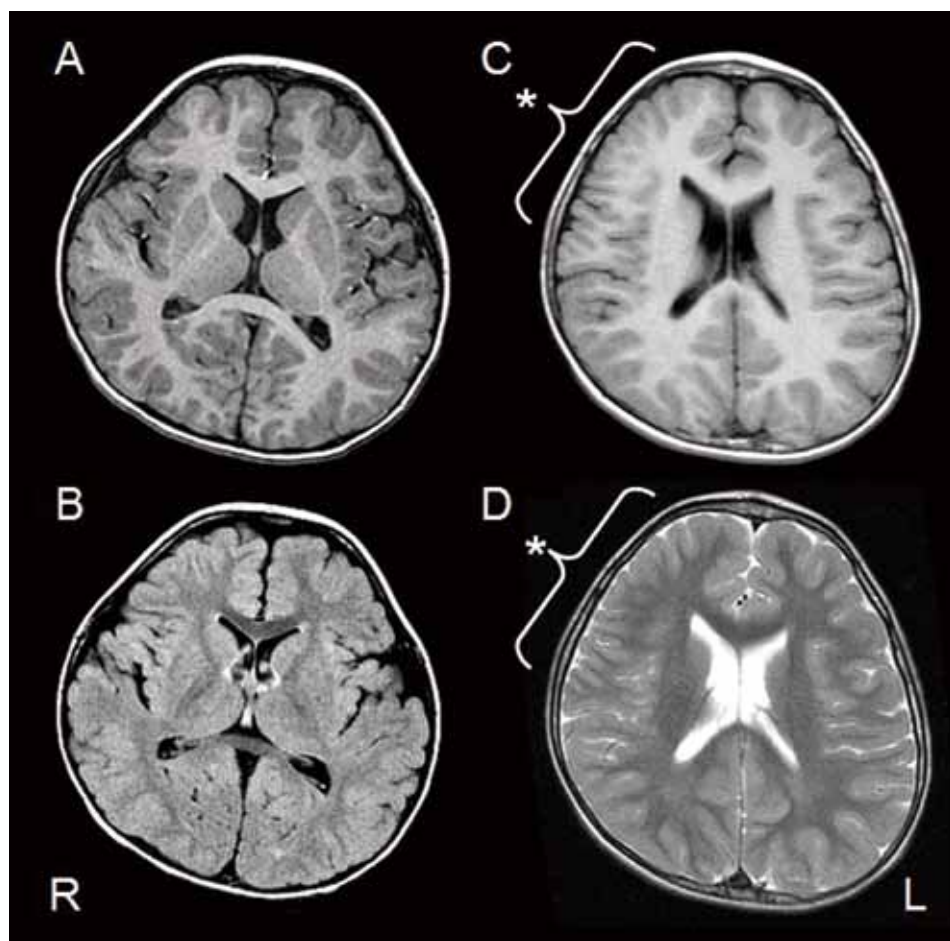


Fig. 2 The results of brain MRI for the patients. Patient 1 (A, B) shows relatively small frontal lobes, and patient 2 (C, D) shows right fronto-temporal polymicrogyria (*). (A) spoiled gradient recalled (SPGR) image, (B) fluid attenuated IR (FLAIR) image, (C) T1-weighted image, (D) T2-weighted image.

の男性患者のサンプルを対象とした。その結果、1つのナンセンス変異 (c.4C>T[p.Q2X]) を同定した (Fig. 3)。母親はこのナンセンス変異のヘテロ保因者であった。

この患者は現在5歳の男児であり、同胞はいない。家族歴に特記すべきことなし。生後4ヵ月で頸が座り、6ヵ月で寝返りを始めたが、お座りは12ヵ月、独歩が1歳8ヵ月と遅れが認められた。1歳8ヵ月時に初めてけいれん発作を来し、難治に経過した。睡眠時脳波では突発波が持続的に認められた。頭部MRI検査で右前頭葉にpolymicrogyriaを認めた (Fig. 2)。現在、重度の精神運動発達遅滞を示し、有意語はなく、失調性歩行を示す。

4) 疾患iPS細胞の樹立

Xq11.1微細欠失が認められた発端者から、皮膚線維芽細胞を採取し、iPS細胞を樹立した。iPS細胞の品質管理のため、3胚葉への分化能力を確認し、エピソードベクターの残存がないことを確認した。

5) 網羅的遺伝子発現解析

解析ソフトを用いて遺伝子発現が低下してい

る遺伝子についてを調べたところ、*ARHGEF9*は常に発現が低下していた (Tab. 1)。*ARHGEF9*と同様に欠失範囲に存在する*SPIN4*も8日目には発現が低下していた。*TTLL12*遺伝子は常に発現が低下していたが、機能未定な遺伝子であり、その意義は不詳である。その一方、*FOXG1*は8日目において最も発現低下が著しかった。

考察

我々はこれまで、原因不明の難治てんかん脳症患者に対して、マイクロアレイを用いた網羅的なゲノムコピー数解析を行い、疾患感受性染色体領域の同定を行ってきた。これにより、様々な染色体領域がてんかんの発症に関わっており、中でも17番染色体短腕末端の*LISI*遺伝子がコピー数依存的に症状を示し、コピー数の減少 (ハプロ不全) で滑脳症を、コピー数の増加では脳重量低下を伴う脳形成障害を示すことなどを明らかにしてきた³⁾。その中で、重度の知的障害を伴う難治てんかん患者において、非常に稀なX染色体長腕セントロメア近傍の微細欠失を見出した¹⁾。

欠失範囲には3つの遺伝子が含まれていたが、

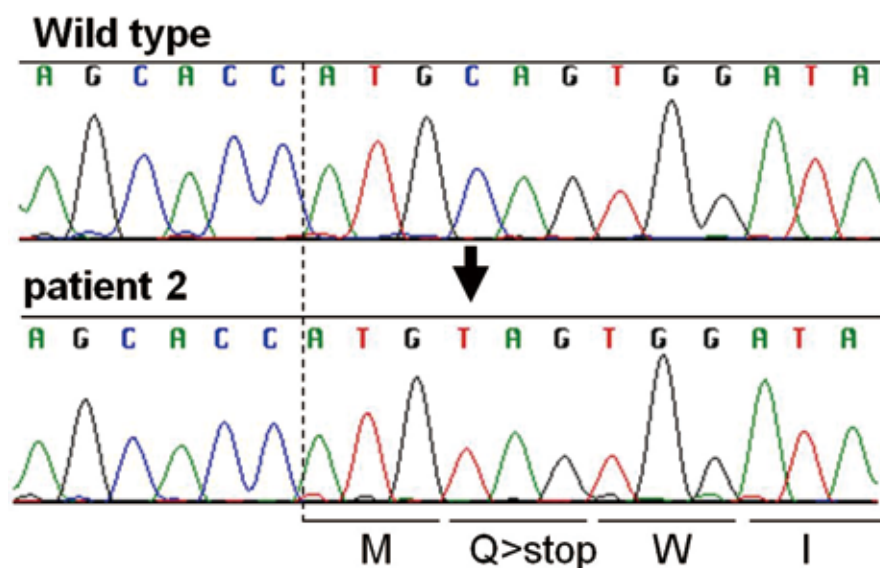


Fig. 3 The electropherograms of Sanger sequencing analysis for exon 1a of *ARHGEF9* shows a C to T transition at the 4th nucleotide in the indicated patient, which is predicated to cause amino-acid alteration Gln(Q) to stop.

Tab. 1 The result of whole gene expression study

	FC	Symbol	Gene Name
Day 0	123	SPIN4	spindlin family member 4
	118 *	ARHGEF9	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9
	95	ZNF585A	zinc finger protein 585A
	81	ZCCH13	zinc finger CCH-type containing 13
	57	TTL12	tubulin tyrosine ligase-like family member 12
	57 *	ARHGEF9	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9
Day 8	221	FOXG1	forkhead box G1
	142	SPRR3	small proline-rich protein 3
	128	KRT17	keratin 17
	125	RAX	retina and anterior neural fold homeobox
	116	INHBA	inhibin beta A
	112	GPR153	G protein-coupled receptor 153
	111 *	SPIN4	spindlin family member 4
	101	CLIC3	chloride intracellular channel 3
	100	HSD3B1	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1
	96 *	ARHGEF9	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9
	94	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
	88	S100A9	S100 calcium binding protein A9
	85	TLR7	toll-like receptor 7
	81	C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10
	75	HRT14	keratin 14
	73	COX6A2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2
	72	TTL12	tubulin tyrosine ligase-like family member 12

The gene names which showed extremely reduced expression are list in order.

*, the genes included in the deletion region (Xq11.1).

OMIMを検索したところ、中枢神経系での発現が示されたのは*ARHGEF9*だけであった。さらにPUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 検索を行うと、染色体転座により*ARHGEF9*の断裂を示す例が過去に2例報告されていた^{4,5)}。2例はともに精神運動発達の遅れと、行動異常を示していた。これらの情報から、*ARHGEF9*がXq11.1微細欠失患者において認められた症状の中核的な責任遺伝子と考えた。そこで*ARHGEF9*変異が関連する症例がほかにないかどうか検証するためコホート解析を行った。その結果、発端者と同様に重度の精神運動発達遅滞とてんかんを示す男児において、*ARHGEF9*のナンセンス変異が認められた。このことは、*ARHGEF9*の機能喪失変異が男児におけるてんかん脳症の原因となることを示している。*ARHGEF9*は我々がはじめて遺伝子変異を同定したことにより、OMIMデー

タベース内でEIEE8としてオリジナルID MIM#300429が付与された。

*ARHGEF9*は抑制系ニューロンにおけるシナプス裏打ち構造を維持するための構造タンパク質のひとつであるcollybistinをコードしている⁶⁾。同じく裏打ち構造タンパク質であるgephyrinと共に働いている。ただ、collybistinの機能は未だによくわかっておらず、遺伝子発現系に与える影響やシグナル伝達系への影響も不明である。

そこで発端者からiPS細胞を樹立し、神経系における遺伝子発現の状況を解析した。その結果、*FOXG1*が最も低下していることが明らかになった。*FOXG1*はRett症候群に類似した表現型を示す重度発達障害患者において変異が認められており、介在ニューロンの発達に関連しているとされている⁷⁾。*ARHGEF9*のナンセンス変異が認められた患者は、前頭葉に

polymicrogyriaが認められており、神経細胞の遊走にも関連している可能性がある。今のところ、iPS細胞から抑制系ニューロンに効率良く分化誘導させる方法はなく、患者由来iPS細胞から誘導したニューロンにおけるシナプス構造の変異を解析する手段がない。今後、抑制系ニューロンへの効率的な分化誘導法を検討し、シナプス構造の変化を解析する必要がある。

文献

- 1) Shimojima K, Sugawara M, Shichiji M, Mukaida S, Takayama R, Imai K, et al. Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J Hum Genet* 2011 ; **56** : 561-5.
- 2) Shimojima K, Okumura A, Hayashi M, Kondo T, Inoue H, Yamamoto T. CHCHD2 is down-regulated in neuronal cells differentiated from iPS cells derived from patients with lissencephaly. *Genomics* 2015 ; **106** : 196-203.
- 3) Shimojima K, Sugiura C, Takahashi H, Ikegami M, Takahashi Y, Ohno K, et al. Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res* 2010 ; **89** : 303-9.
- 4) Marco EJ, Abidi FE, Bristow J, Dean WB, Cotter P, Jeremy RJ, et al. ARHGEF9 disruption in a female patient is associated with X linked mental retardation and sensory hyperarousal. *J Med Genet* 2008 ; **45** : 100-5.
- 5) Kalscheuer VM, Musante L, Fang C, Hoffmann K, Fuchs C, Carta E, et al. A balanced chromosomal translocation disrupting ARHGEF9 is associated with epilepsy, anxiety, aggression, and mental retardation. *Hum Mutat* 2009 ; **30** : 61-8.
- 6) Grosskreutz Y, Hermann A, Kins S, Fuhrmann JC, Betz H, Kneussel M. Identification of a gephyrin-binding motif in the GDP/GTP exchange factor collybistin. *Biol Chem* 2001 ; **382** : 1455-62.
- 7) Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, et al. FOXG1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 2008 ; **83** : 89-93.

Summary

Biological analysis and treatment research for epilepsy using iPS cells derived from a patient with a collybistin deficit

Keiko Shimojima, Toshiyuki Yamamoto, Katsumi Imai

It is difficult to collect the diseased tissue of neurological disorders for the aim of medical research. Biological analysis by use of disease-specific iPS cells became a breakthrough to overcome its difficulties. It has previously been applied to biological analysis for Parkinson's disease etc and lead to therapy studies. We have used disease patient-derived iPS cells in order to elucidate the pathogenesis of pediatric patients showing neurological impairments, whose genetic abnormalities have been revealed in advance. Many patients with intractable epilepsy associated with developmental delay showed genomic copy number aberrations, which were identified thorough microarray-based genomic copy number analysis. Among them, a male patient showed a microdeletion in Xq11.1. *ARHGEF9*, included in a deletion region, encodes collybistin, which belongs to the GDP / GTP exchange factor family, coupled with gephrin a lining protein of the postsynaptic membrane in the suppression system neurons, plays an important role in the GABAA receptor. Loss of function in collybistin would have inhibited the suppression neuron system and excitatory neurons may become predominant in the patient. That would have caused epilepsy in the patient. The patient-derived iPS cells were established and differentiated into neural cells. Whole gene expression study demonstrated the marked reduction of *FOXG1*, which is a genetic cause of variant Rett syndrome. Therefore, a common molecular basis was considered in patients with impairments in *ARHGEF9* and *FOXG1*.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2016 ; 27 : 33-40