

—— 研究助成報告 ——

Dravet症候群患者のiPS細胞を用いた創薬ハイスループットスクリーニングシステムの確立に向けた基盤研究

田 中 泰 圭, 廣 瀬 伸 一

要旨：Dravet症候群（DS）は、主に電位依存性Na⁺チャネルNa_v1.1の α サブユニットをコードするSCN1A遺伝子の異常が同定される。DSモデルマウスを用いた研究より、発達期の前脳GABA性介在性神経細胞におけるNa_v1.1のハプロ不全が報告され、GABA作動性神経細胞の機能不全により神経細胞の過剰興奮が誘起され、てんかん発作を発病すると考えられている。本研究では、DS患者より樹立したアイソジェニックなiPS細胞株から神経細胞を分化誘導し、次世代微小電極アレイシステム（Maestro）を用いて病態解析を行った。結果、興奮性グルタミン酸系ニューロンにおいては、健常コントロールとDS病態モデル間で自発的なバースト発火中のスパイク数に顕著な違いは認められなかった。一方で、DSモデルマウスを用いた研究と同様に、抑制性GABA作動性神経細胞については、DS病態モデルの神経機能の低下が確認できた。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2018；29：59-64

Key Words : Dravet syndrome, SCN1A, iPS cell, excitatory neuron, inhibitory neuron

【序論】

Dravet症候群（DS）は、Dravet博士によって記載された乳児ミオクロニーてんかん（severe myoclonic epilepsy in infancy；SMEI）を中核群とするてんかん性脳症である¹⁾。より原因となる遺伝子異常が明確となった数少ない乳児期発症難治性てんかんの一つであり、主に電位依存性Na⁺チャネルNa_v1.1の α サブユニットをコードするSCN1A遺伝子の異常が同定される²⁾。DS患者では、SCN1A遺伝子の変異同定による遺伝子診断は可能だが、発作重積等により約2割の患者が若年死亡し、詳細な分子病態は未だ不明な点が多く、効果的な治療法が未確立である。

DSモデルマウスを用いた研究より、発達期の前脳GABA性介在性神経細胞におけるNa_v1.1のハプロ不全が報告された^{3, 4)}。これにより中枢神経におけるGABA作動性神経細胞を含む神経ネットワークに異常が生じ、脳の抑制性の機能不全により神経細胞の過剰興奮が誘起され、

重篤なてんかん発作を発病すると考えられている。しかしながら、ヒトとモデル動物間での生物学的特性の違いから、患者由来神経細胞を用いたヒト脳神経の*ex vivo*疾患モデルが必要不可欠である。

本研究所は、DS患者より樹立したiPS細胞（D1 iPS）から神経細胞を分化誘導し、病態解析を行った⁵⁾。しかしながら、疾患iPS細胞を用いた病態解析において、しばしば健常コントロールと疾患iPS細胞の遺伝的背景の違いが問題視される。そこで、本研究ではDS患者由来のiPS細胞にTALEN遺伝子編集技術でSCN1Aの遺伝子変異を修復した人工コントロールiPS細胞（D1 TALEN）を作製し、この問題の解決を図った。また、これら疾患iPS細胞と次世代微小電極アレイシステム（Maestro）を併用することで、創薬スクリーニングに対応可能な病態モデルとしての有用性を探った。

【方法】

1. TALENプラスミドのエレクトロポレーション

一週間培養したD1 iPS細胞を1×TrypLE Select (12563011; Thermo Fisher) で37℃で5分間インキュベートし、シングルセルに懸濁した後、100 µLのFreeStyle™ 293 medium (12338018; Gibco) に1×10⁶個の細胞数になるよう回収した。細胞懸濁液にSCN1Aのintron 25を標的とした2種類のTALEN plasmid (EF1a-TALEN-SCN1A-LとEF1a-TALEN-SCN1A-R)⁶⁾ 及びSCN1Aのexon 26のドナーDNA plasmidを各々5 µgずつ加えた。A NEPA cuvetteとNEPA21 electroporator (NEPA GENE) を用いて、125 mv/5 msの条件でエレクトロポレーションを行い、10 µM ROCK inhibitorを加えたiPS培養用培地に播種した。iPS細胞のフィーダーフリー系での培養は、iMatrix-511 (892011; TAKARA) でコートされたディッシュとStemFit AK02N (AJINOMOTO) 培地を用いて行った。

エレクトロポレーションから一週間後、目的の相同組換えが起きた細胞を1.0 µg/mL puromycin含有培地にてセクションした。単一細胞由来のiPS細胞のコロニーを単離し、Puroカセットの除去はCre発現アデノウイルスを用いた。感染から数日後、チミジンキナーゼとガンシクロビルを用いたネガティブセクション及びKAPA Mouse Genotyping Kit (KK7153; KAPA Biosystems) を用いたジェノタイピングによりPuroカセットの除去を確認した。

2. 未分化マーカー遺伝子の発現解析

iPS細胞は4% PFAで固定した。細胞のブロッキング及び抗体反応にはブロッキングバッファー (0.2% Triton X-100/5% FBS/1×PBS) を用いた。Pluripotency markerの一次抗体はOCT4, SSEA4, TRA-1-60とTRA-1-81 (SCR001, ES Cell Characterization Kit; EMD Millipore) を用いた。Alexa Fluor 488-あるいは555-conjugatedの二次抗体 (diluted

1:1000; Invitrogen) を用いた。細胞核の染色はHoechst 33258 (1:1000, B2261; Sigma) を用いた。画像の撮影及び解析は蛍光顕微鏡 (BZ-X700; KEYENCE) を用いた。

3. *In vitro*三胚葉分化

iPS細胞のコロニーを7.5% KSR/FGF-2不含のES細胞培地で二週間培養した。形成したEBをMatrigelでコートしたディッシュで培養した。三胚葉分化マーカーの一次抗体はbIII-tubulin (1:1000, T8660; Sigma), SMA (1:100, M0851; Dako), and AFP (1:100, MAB1368; R&D Systems) を用いた。Alexa Fluor 488-あるいは555-conjugatedの二次抗体 (diluted 1:1000; Invitrogen) を用いた。細胞核の染色はHoechst 33258 (1:1000, B2261; Sigma) を用いた。画像の撮影及び解析は蛍光顕微鏡 (BZ-X700; KEYENCE) を用いた。

4. 核型解析

G-band法により核型異常の有無を解析した (Nihon Gene Research Laboratories, Inc.)。

5. TALENのoff-target解析

Whole-genome sequenceは東京大学にて実施した。TALENのoff-target解析はPROGNOS (<http://bao.rice.edu/Research/BioinformaticTools/prognos.html>)⁷⁾ を用いた。

6. 神経細胞への分化誘導及び機能解析

慶応義塾大学医学部生理学教室と共同開発した分化誘導方法を一部改変し、興奮性あるいは抑制性の神経細胞への選択的分化誘導を行った。分化の程度は定量的PCR法および各種抗体を用いた免疫組織学的解析により判定した。iPS細胞を次世代微小電極アレイシステム (Maestro; Axion) の48穴プレート内で選択的に神経細胞に分化させ、自発的な活動電位を記録した。

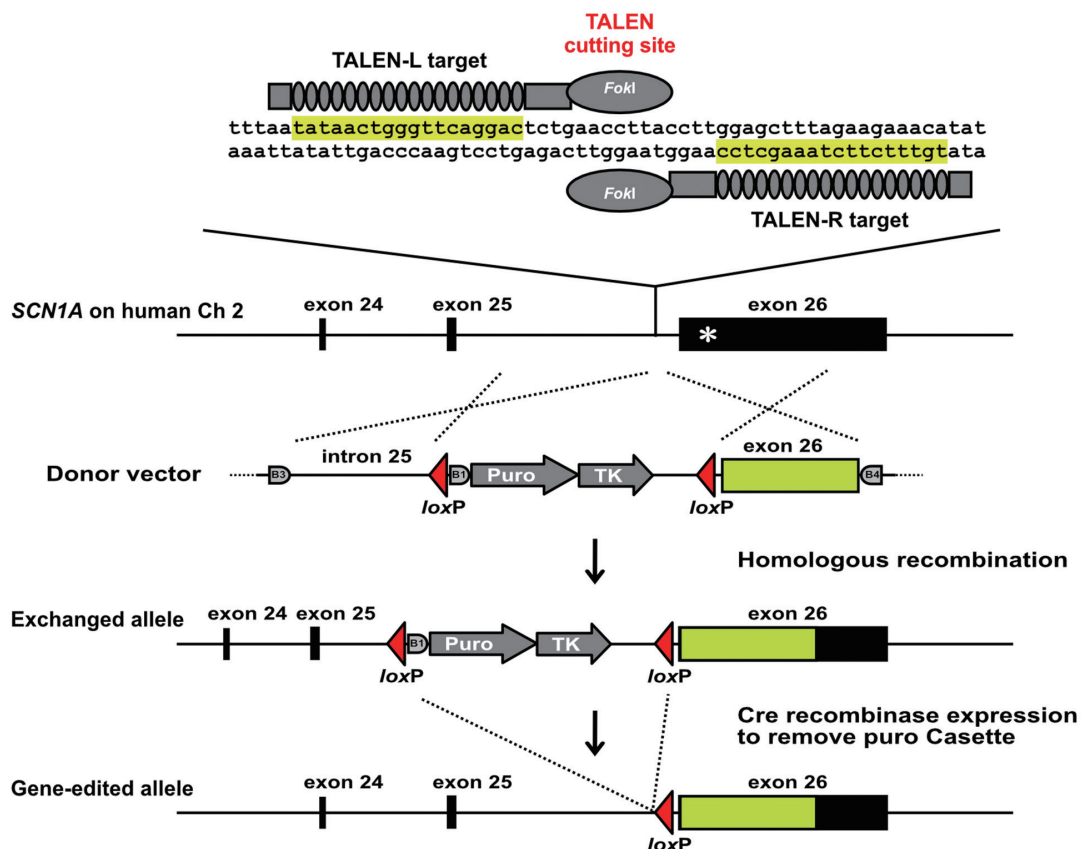


Fig. 1 Schematic overview of the genome editing strategy for c.4993CNT mutation in the exon 26 of SCN1A gene by TALEN.

【結果】

1. TALEN法を用いた人工コントロールiPS細胞の作出

より詳細な病態解析を行うために、アイソジェニックなDS iPS細胞を樹立した。TALEN法を用いて、SCN1A遺伝子のエクソン26にナンセンス変異 (c.4933C>T, p.R1645*) を有するDS患者由来iPS細胞 (D1 iPSCs) の遺伝子異常の修復を試みた (Fig. 1)。Puromycinの薬剤選別により、24個のPuromycin耐性コロニーを単離した。サンガー法を用いたSCN1A遺伝子における標的領域の配列解析より、1個の細胞株で目的通りにエクソン26にナンセンス変異 (c.4933T) が正常型の塩基 (c.4933C) へ修復されていることを確認した (Fig. 2)。TALENのoff-target効果により、他の遺伝子に変異が

導入されていないことをPROGNOS及びwhole-genome sequencingにより確認した。また、この細胞株の核型は正常型 (46, XX) を示した (Fig. 3B)。このiPS細胞は4種類の未分化マーカー遺伝子 (OCT4, SSEA4, TRA-1-60とTRA-1-81) の発現が見られ、未分化能を有していることを確認した (Fig. 3C)。加えて、iPS細胞から作成した胚様体由来の細胞において、三胚葉分化マーカー遺伝子 (β III-tubulin; 外胚葉, AFP; 内胚葉, SMA; 中胚葉) の発現が見られ、多能性幹細胞であることを確認した (Fig. 3D)。このiPS細胞をDS iPS細胞 (D1) のアイソジェニックな人工健常コントロールiPS細胞 (D1 TALEN iPSCs) とした⁸⁾。

2. 神経細胞への分化誘導及び機能解析

慶応義塾大学医学部生理学教室と共同開発し

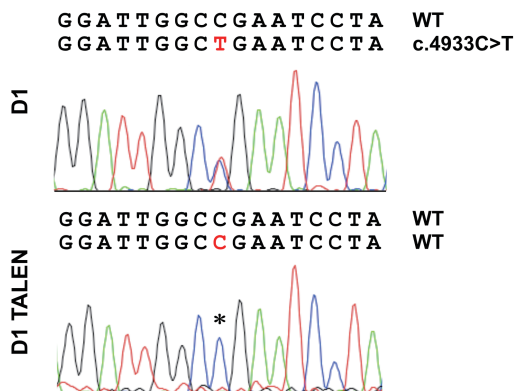


Fig. 2 Sequencing chromatograms of the targeted region of the SCN1A gene. Asterisk indicates the c.4933T>C substitution site.

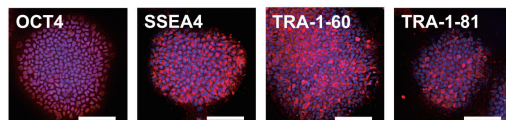
た分化誘導方法を一部改変し、興奮性あるいは抑制性の神経細胞への選択的分化誘導可能なiPS細胞株の樹立を試みた。正常コントロールiPS細胞として、健常者由来201B7 iPSCsとアイソジェニックな人工健常コントロールiPS細胞であるD1 TALEN iPSCsを用いた。DS iPSC細胞としてD1 iPSCsを用いた。iPS細胞をより選択的に分化誘導した神経細胞において、定量的PCR法及び免疫組織学的解析により、興奮性および抑制性神経細胞の両者で神経細胞マーカー遺伝子である β III-tubulinの良好な発現を確認した。興奮性神経細胞マーカー遺伝子であるVGULT2の発現は、興奮性神経細胞でのみ陽性を示した。一方で、抑制性神経細胞マーカー遺伝子であるGAD67の発現は抑制性神経細胞でのみ陽性を示した。これらの結果より、iPS細胞より分化した全ての神経細胞が、選択的に興奮性あるいは抑制性神経細胞へ分化誘導されたことが分かり、興奮性あるいは抑制性の神経細胞への選択的分化誘導可能なiPS細胞株の樹立に成功した。

上記のiPS細胞群を次世代微小電極アレイシステム (Maestro) の48穴プレート内で選択的に神経細胞に分化させ、自発的な活動電位測定を行った。Maestroを用いた神経細胞の機能解析より、興奮性グルタミン酸系ニューロンにおいては、健常コントロールとDS病態モデル間で自発的なバースト発火中のスパイク数に顕著な違いは認められなかった。一方で抑制性

A



B



C

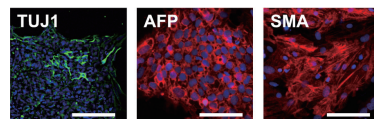


Fig. 3 Characterization of D1 TALEN iPSCs. (A) The karyotype analysis of D1 TALEN iPSCs. (B) Immunofluorescence analysis of pluripotency markers OCT4, SSEA4, TRA-1-60 and TRA-1-81 in FUi001-A iPSCs. Pluripotency markers are shown in red, with Hoechst 33258-stained nuclei in blue; scale bars are 100 μ m. (C) in vitro differentiation assays of FUi001-A iPSCs. Immunostaining analysis for marker proteins representative of the three germ layers, green, bIII-tubulin; red, AFP and SMA; blue, nuclei. scale bars are 100 μ m.

GABA作動性神経細胞については、DS病態モデルの神経機能の低下が確認できた。

【考察】

興奮性神経と抑制性神経の機能バランスの破綻が引き金となり、てんかんが発症すると考えられている。本研究の結果は、抑制性神経の機能減衰がてんかん発作の発症に寄与するという最近の報告と矛盾しておらず、それ故にSCN1Aの遺伝子異常による抑制性神経の機能破綻が、てんかんを発症する原因であることを強く支持する。加えて、本研究で示したMaestroを用いてのドラベ症候群の病態解析系は、ハイスルー

プット化可能な方法であり、創薬スクリーニングへの応用が十分に期待される。しかしながら、抑制性GABA神経細胞サブタイプの同定が不十分であり、パルブアルブミン陽性細胞を初め、ソマトスタチン陽性やカルレチニン陽性な抑制性神経細胞のてんかん発症への関与については今後の研究を必要とする^{3, 9, 10)}。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご鞭撻いただきました慶應義塾大学医学部生理学教室の岡野栄之教授、石川充特任助教に心よりお礼申し上げます。さらに、本研究に多大なご協力をいただきました東京慈恵医科大学小児科講座の日暮憲道講師に心より感謝申し上げます。

【文献】

- 1) Dravet C, Bureau M, Oguni H, Fukuyama Y, Cokar O: Severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome). In *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. 4th edition. Edited by Roger J, Bureau M, Dravet C, Genton P, Tassinari CA, Wolf P. Montrouge: John Libbey Eurotext ; 2005 : 89-113.
- 2) Depienne C, Trouillard O, Saint-Martin C, Gourfinkel-An I, Bouteiller D, Carpentier W, et al. Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients. *J Med Genet* 2009 ; **46** : 183-274.
- 3) Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci* 2007 ; **27** : 5903-5917.
- 4) Han S, Tai C, Westenbroek RE, Yu FH, Cheah CS, Potter GB, et al. Autistic-like behaviour in Scn1a+/- mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 2012 ; **489** : 385-390.
- 5) Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi, Y, Okada Y, Akamatsu W, et al. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain* 2013 ; **6** : 19.
- 6) Sakuma T, Ochiai H, Kaneko T, Mashimo T, Tokumasu D, Sakane Y, et al. Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep* 2013 ; **3** : 3379.
- 7) Fine JE, Cradick JT, Zhao LC, Lin Y, Bao G, An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage. *Nucleic Acids Res* 2014 ; **42**(6) : e42.
- 8) Tanaka Y, Sone T, Higurashi N, Sakuma T, Suzuki S, Ishikawa M, et al. Generation of D1-1 TALEN isogenic control cell line from Dravet syndrome patient iPSCs using TALEN-mediated editing of the SCN1A gene. *Stem Cell Research* 2018 ; **28** : 100-104.
- 9) Ogiwara I, Iwasato T, Miyamoto H, Iwata R, Yamagata T, Mazaki E, et al. Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of Dravet syndrome. *Hum Mol Genet* 2013 ; **22** : 4784-4804.
- 10) Rubinstein M, Han S, Tai C, Westenbroek RE, Hunker A, Scheuer T, et al. Dissecting the phenotypes of Dravet syndrome by gene deletion. *Brain* 2015 ; **138** : 2219-2233.

