

—— 研究助成報告 ——

新規相互作用タンパクに着目した*STXBPI*てんかん性脳症の病態解明

千代延 友 裕

要旨：本研究では、患者iPS細胞からGABAニューロンを選択的に分化誘導し、*STXBPI*脳症の病態を検討した。微小電極アレイ解析により、患者由来GABAニューロンは分化誘導8週以降に自発神経活動が有意に低下した。分化誘導8週のGABAニューロンを用いたマイクロアレイ解析により、患者由来と変異修復の間で発現変動を認めた67遺伝子のうち、35遺伝子は患者由来と健常者由来の間でも共通した発現変動を示し、これらが*STXBPI*脳症の病態に関与する遺伝子群と考えられた。同定した35遺伝子のうちタンパクをコードする遺伝子は14個存在し、その中には神経発達や神経変性に関与する7個の遺伝子 (*KCNHI*, *KCNH5*, *CNN3*, *RASGRF1*, *SEMA3A*, *SLAH3*, *INPP5F*) が含まれていた。*STXBPI*脳症に認める広汎な神経症状の病態にはこれらのタンパクが関与する経路が関わっている可能性がある。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2022 ; 33 : 35-40

Key Words : *STXBPI*脳症, MUNC18-1, iPS細胞, GABAニューロン, 微小電極アレイ

【序論】

*STXBPI*の病的バリエーションにより早期乳児てんかん性脳症 (EIEE : early infantile epileptic encephalopathy) をきたすことが2008年にSaitsuらにより報告された¹⁾。その後、*STXBPI*病的バリエーションはEIEEのみならず種々のてんかん・知的障害・神経発達症の原因となることが明らかとなり、これらは「*STXBPI*脳症」と総称されている²⁾。また、患者では若年性パーキンソンニズムを含む運動異常症を呈することや²⁾、*Stxbp1*ノックアウトマウスが神経変性を生じることから³⁾、*STXBPI*脳症の病態には神経変性も関与すると考えられる。患者のほとんどは機能喪失型変異をヘテロ接合性に有し、ハプロ不全が主な発症メカニズムと考えられている²⁾。*STXBPI*がコードするMUNC18-1は神経細胞においてシナプス小胞の開口分泌に重要な役割を有するが³⁾、そのハプロ不全がてんかん・神経

発達症・神経変性を引き起こす病態の詳細は明らかとなっていない。そのため病態に基づいた最適な治療法は存在しない。

そこで我々は2012年に*STXBPI*ナンセンスバリエーションを有するEIEE患者からiPS細胞を樹立し、分化誘導により得た神経細胞を用いた病態解析に着手した。患者由来の神経細胞ではsyntaxin-1の発現異常、神経突起の伸長障害を認め⁴⁾、他の実験モデルと同様の所見が再現された点で病態モデルとしての有用性を示した^{5, 6)}。しかし、この研究に用いた分化誘導法で得られた神経細胞は大半のグルタミン酸ニューロンに少量のGABAニューロンが混在しているというものであり、特にGABAニューロンに関する検討は不可能であった⁴⁾。一方で、その後に発表されたモデルマウスを用いた研究において、GABAニューロン選択的*Stxbp*^{+/-}マウスが汎ニューロン*Stxbp*^{+/-}マウスよりも寿命が短縮し、重篤なてんかん発作を呈することが明らか

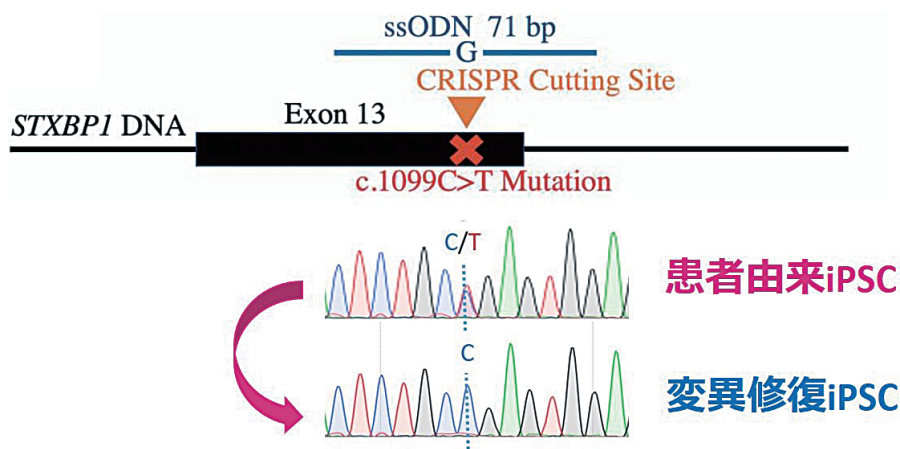
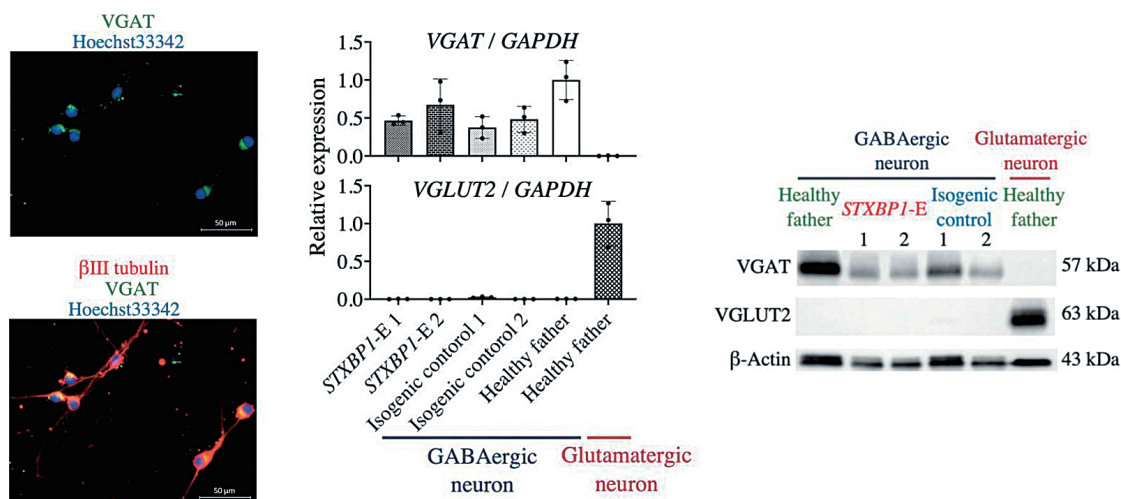


Fig. 1 Isogenic control細胞の作製

Fig. 2 GABAニューロンへの選択的分化誘導 (出典：文献⁸⁾)

にされ、GABAニューロン機能障害による興奮／抑制バランスの破綻がSTXBPI脳症の病態の中心であることが示唆された⁷⁾。

本研究では、患者iPS細胞からGABAニューロンを選択的に分化誘導し、その自発神経活動解析および網羅的遺伝子発現解析を行い、STXBPI脳症の病態を検討した。

【方法】

①変異修復iPS細胞 (isogenic control細胞) の作成

患者由来iPS細胞に認めるナンセンスバリア

ントc.1099C>T (p.R367X) を、CRISPR/Cas9 システムと一本鎖オリゴドナーDNAを用いた相同組み替えにより修復し、変異修復iPS細胞を作製した (Fig. 1)。

②GABAニューロンへの選択的分化誘導

患者由来、変異修復、及び健常父由来iPS細胞に、transposase発現ベクター、rtTA発現ベクター、ASCL1発現ベクター及びDLX2発現ベクターをリポフェクションした。各iPS細胞に、Tet-Onシステムを用いて一過性にASCL1およびDLX2を発現させ、GABAニューロンへ選択

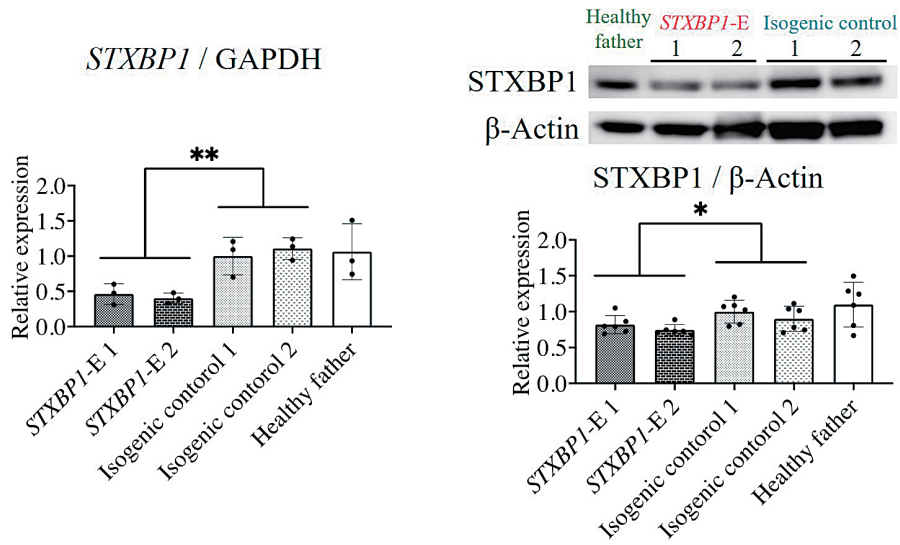


Fig. 3 患者由来GABAニューロンにおけるSTXBP発現低下（出典：文献⁸⁾）

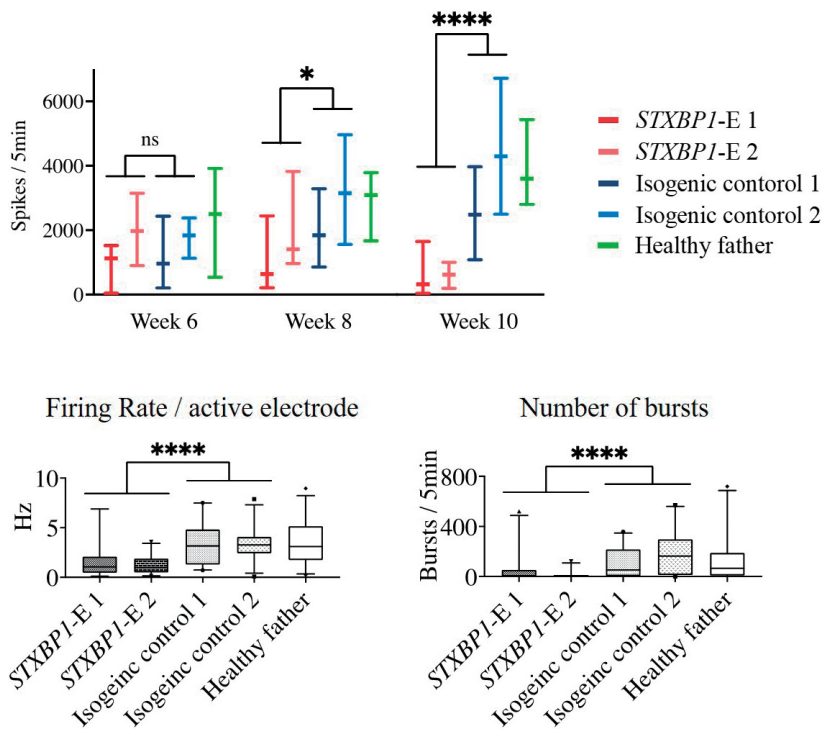


Fig. 4 患者由来GABAニューロンにおける自発活動低下（出典：文献⁸⁾）

的に分化誘導した。

③自発神経活動解析

微小電極アレイ（Maestro PRO, AXION

Biosystems社）を用いて，分化誘導10週まで経時的に自発神経活動の計測を行った。神経活動は1週間毎に37℃の条件下で5分間計測し，AxIS software（AXION Biosystems社）で解

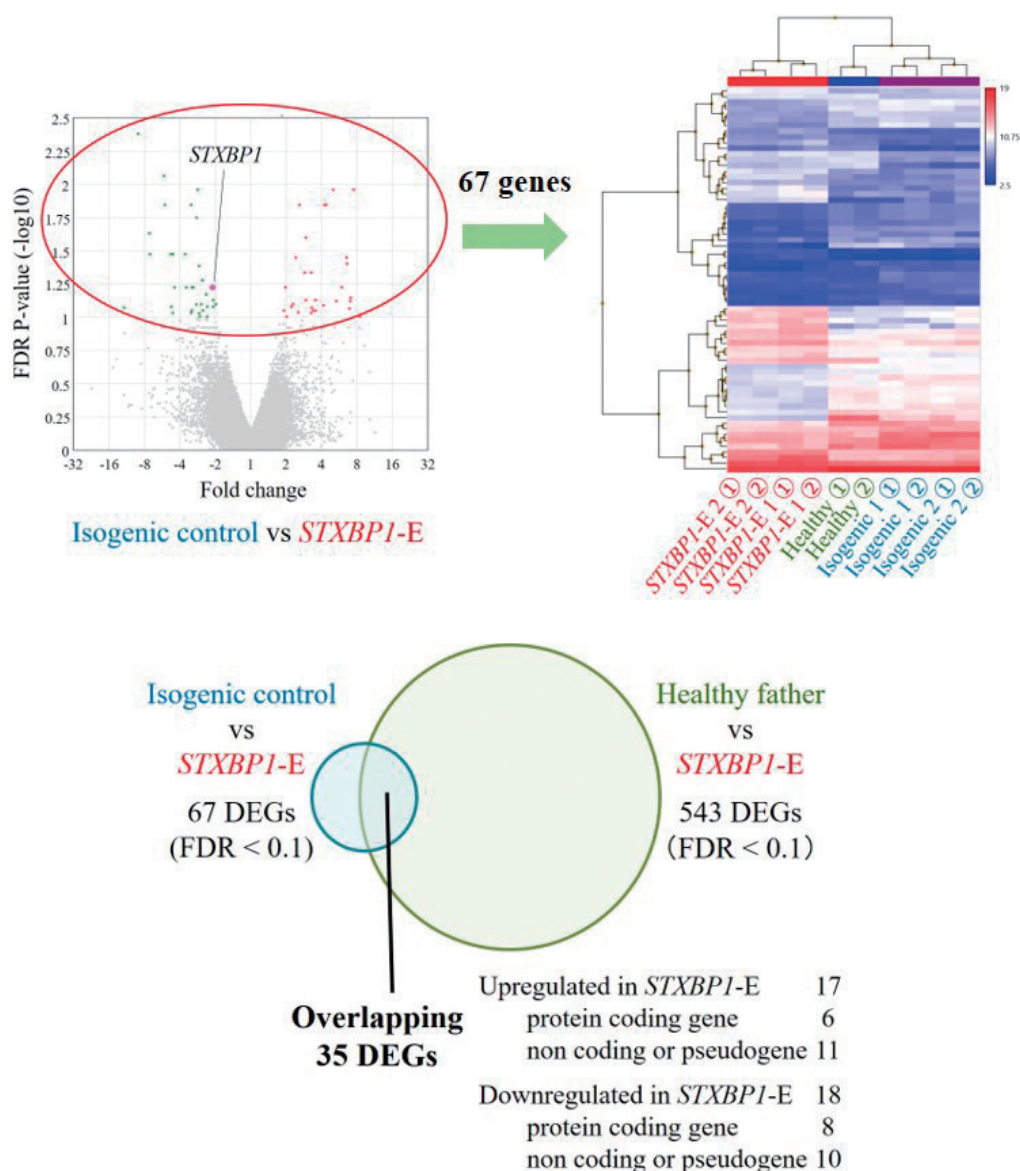


Fig. 5 分化誘導8週のGABAニューロンを用いた網羅的遺伝子発現解析 (出典: 文献⁸⁾)

析した。

【結果】

④網羅的遺伝子発現解析

分化誘導8週目のGABAニューロンからtotal RNAを抽出し、マイクロアレイ解析 (Clariom D, Thermo Fisher Science社) を行った。遺伝子発現変動解析はTranscriptome Analysis Console software (Thermo Fisher Scientific社) で行った。

ASCL1およびDLX2の一過性発現で分化誘導した β III-tubulin陽性神経細胞はすべてVGAT陽性であり、RT-qPCRおよびウエスタンブロット解析においてもVGAT陽性、VGLUT2陰性であったことから、GABAニューロンが選択的に分化誘導されたことを確認した (Fig. 2)。また、患者由来GABAニューロンは変異修復

Tab. 1 患者由来GABAニューロンで発現変動を認めたprotein coding genes

患者由来で発現上昇（6遺伝子）

Gene Symbol	Entrez ID	Fold Change	FDR
PRKG1	5592	6.88	0.0866
SLC35F1	222553	5.37	0.0754
PPP1R1C	151242	4.16	0.0812
PRKCE	5581	3.3	0.085
CNN3	1266	2.59	0.0142
SIAH3	283514	2.41	0.0356

患者由来で発現低下（8遺伝子）

Gene Symbol	Entrez ID	Fold Change	FDR
TGFB2	7042	-9.11	0.0042
INPP5F	22876	-7.21	0.0336
PCDH5	26167	-5.5	0.0086
SEMA3A	10371	-3.53	0.0595
RASGRF1	5923	-3.2	0.0142
KCNH5	27133	-3.12	0.0595
KCNH1	3756	-2.63	0.0804
STXBPI	6812	-2.1	0.0595

GABAニューロンと比較して*STXBPI*発現がmRNA, タンパクともに有意に低く, 作成した患者由来GABAニューロンは*STXBPI*脳症モデルとして妥当であると考えられた (Fig. 3)。

微小電極アレイ解析では, 変異修復および健常父由来GABAニューロンは分化誘導10週にかけて経時的に自発スパイクが増加するのに対し, 患者由来GABAニューロンは分化誘導8週以降に自発スパイクが有意に低下した (Fig. 4)。分化誘導10週の患者由来GABAニューロンは活動電極あたりのスパイク頻度や5分間のバースト数にも有意な低下を認めた (Fig. 4)。

分化誘導8週のGABAニューロンを用いたマイクロアレイ解析では, 患者由来と変異修復の比較で*STXBPI*を含む67の発現変動遺伝子を認めた。その67遺伝子の発現プロファイルでは, 変異修復ニューロンは遺伝背景を同じくする患者由来ニューロンよりもむしろ健常父由来ニューロンに近いパターンを示した (Fig. 5)。一方, 患者由来と健常父由来の比較では543の発現変動遺伝子を認め, 両者に共通する35の遺伝子群が*STXBPI*脳症の病態に重要と考えられた (Fig. 5)。このうちタンパクをコードするのは発現上昇している6遺伝子, 発現低下している8遺伝子であり, その中にはてんかん, 神経発達, 神経変性との関与が報告されている7個の遺伝子 (*KCNH1*, *KCNH5*, *CNN3*, *RASGRF1*, *SEMA3A*, *SIAH3*, *INPP5F*) が含まれていた

(Tab. 1)。

【考察】

本研究により*STXBPI*脳症患者由来GABAニューロンにおける自発神経活動の低下を初めて明らかにした。また本モデルを用いた網羅的遺伝子発現解析により, 本症の病態においてこれまで想定されていなかった遺伝子群の発現変動を同定した⁸⁾。

KCNH1, *KCNH5*はそれぞれ電位依存性K⁺チャネルKv10.1, Kv10.2をコードする。Kv10.2発現低下は神経発達症モデルラット海馬において報告されており⁹⁾, *STXBPI*脳症における神経発達症との関連が示唆された。CNN3, RASGRF1, SEMA3Aの発現変動は難治てんかん患者脳組織やてんかんモデル動物において報告されている¹⁰⁻¹²⁾。さらに, SIAH3およびINPP5Fはパーキンソン病との関連が示唆されている^{13, 14)}。*STXBPI*てんかん性脳症に認める広汎な神経症状の病態にはこれらのタンパクが関与する経路が関わっている可能性がある。

【謝辞】

京都府立医科大学小児科学教室神経グループのメンバー, 中でも多くの実験を担当した一瀬栄佑先生に深謝申し上げます。また, 微小電極アレイ解析にご協力いただいた福岡大学医学部小児科の田中泰圭先生と廣瀬伸一教授, 分化誘

導法のご指導をいただいた慶應義塾大学医学部生理学教室の石川充先生と岡野栄之先生にも深謝申し上げます。最後に研究助成をしていただいた財団法人てんかん治療研究振興財団に心より御礼申し上げます。

【文献】

- 1) Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2008 ; **40** : 782-788.
- 2) Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, Accorsi P, Angriman M, Baier H, et al. STXBP1 encephalopathy : a neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 2016 ; **86** : 954-962.
- 3) Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, et al. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 2000 ; **287** : 864-869.
- 4) Yamashita S, Chiyonobu T, Yoshida M, Maeda H, Zuiki M, Kidowaki S, et al. Mislocalization of syntaxin-1 and impaired neurite growth observed in a human iPSC model for STXBP1-related epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 2016 ; **57** : e81-e86.
- 5) Patzke C, Han Y, Covy J, Yi F, Maxeiner S, Wernig M, et al. Analysis of conditional heterozygous STXBP1 mutations in human neurons. *J Clin Invest* 2015 ; **125** : 3560-3571.
- 6) Peng Y, Lee J, Rowland K, Wen Y, Hua H, Carlson N, et al. Regulation of dendrite growth and maintenance by exocytosis. *J Cell Sci* 2015 ; **128** : 4279-4292.
- 7) Kovacevic J, Maroteaux G, Schut D, Loos M, Dubey M, Pitsch J, et al. Protein instability, haploinsufficiency, and cortical hyper-excitability underlie STXBP1 encephalopathy. *Brain* 2018 ; **141** : 1350-1374.
- 8) Ichise E, Chiyonobu T, Ishikawa M, Tanaka Y, Shibata M, Tozawa T, et al. Impaired neuronal activity and differential gene expression in STXBP1 encephalopathy patient iPSC-derived GABAergic neurons. *Hum Mol Genet* 2021 ; **30** : 1337-1348.
- 9) Wang J, Feng S, Li M, Liu Y, Yan J, Tang Y, et al. Increased expression of Kv10.2 in the hippocampus attenuates valproic acid-induced autism-like behaviors in rats. *Neurochem Res* 2019 ; **44** : 2796-2808.
- 10) Han Y, Yin H, Xu Y, Zhu Q, Luo J, Wang X, et al. Increased expression of calponin-3 in epileptic patients and experimental rats. *Exp Neurol* 2012 ; **233** : 430-437.
- 11) Zhu Q, Wang L, Xiao Z, Xiao F, Luo J, Zhang X, et al. Decreased expression of Ras-GRF1 in the brain tissue of the intractable epilepsy patients and experimental rats. *Brain Res* 2013 ; **1493** : 99-109.
- 12) Holmaat AJ, Gorter JA, De Wit J, Tolner EA, Spijker S, Giger RJ, et al. Transient downregulation of Sema3a mRNA in a rat model for temporal lobe epilepsy. A novel molecular event potentially contributing to mossy fiber sprouting. *Exp Neurol* 2003 ; **182** : 142-150.
- 13) Hasson SA, Kane LA, Yamano K, Huang CH, Sliter DA, Buehler E, et al. High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature* 2013 ; **504** : 291-295.
- 14) Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2014 ; **46** : 989-993.