

—— 研究助成報告 ——

ドラベ症候群患者由来の疾患特異的iPS細胞を活用した発達性てんかん性脳症の病態解明および革新的な創薬・治療基盤研究

田 中 泰 圭

要旨：ドラベ症候群（DS）における発達性てんかん性脳症（DEE）の発症は、群発する難治のてんかん発作により惹起されると考えられている。この群発するてんかん発作に伴った神経毒性や神経変性の関与が疑われているが、DEEにおける重篤な認知機能障害などを含む発達遅滞の発症機構については、未だ不明な点が多い。すなわち、DEEの発症機序を解明すれば、難治性疾患であるDSの根治を目指した革新的な治療研究に繋がることが期待され、苦悩する患者や家族にとって大きな福音となる。そこで本研究では、DS患者iPS細胞から病態への関与が想定される終脳領域の脳オルガノイド（MGEOs）を疾患モデル（*ex vivo*疾患モデル）として活用する。全貌を理解しにくい脳神経疾患であるDDEの病態に関して、脳領域ごとに作り分け単純化することで、認知機能障害などを含む発達遅滞の発症機構の解明に迫った。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2024；35：85-88

Key Words：ドラベ症候群、発達性てんかん性脳症、SCN1A、iPS細胞、脳オルガノイド疾患モデル

【序論】

ドラベ症候群（指定難病140）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⁾。頻度は約15,000人に1人とされ、日本で6,000人程度の患者がいると推定される。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⁾。SCN1A遺伝子の変異同定による遺伝子診断は可能だが、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ため、発作重積等により約3割の患者が若年死亡する。ドラベ症候群の根治を目指すうえで早期の病態解明が急務であり、患者ご家族およびてんかん研究の悲願

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も、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。加えて、DS患者における発達性てんかん性脳症（DEE）の発症は、群発する難治のてんかん発作により惹起されると考えられている。この群発するてんかん発作に伴った神経毒性や神経変性の関与が疑われているが、脳神経疾患であるDDEは発症機序の全貌を理解することが難しく、未だ不明な点が

多い。さらには、DEEの病態・治療研究には患者の脳組織を利用することはできず、適切なモデルがないことも本研究分野のボトルネックとなっている。

そこで本研究では、ヒトiPS細胞から終脳領域への脳オルガノイド誘導法を活用して、DS患者におけるDEEの病態解明を目指す。DS患者iPS細胞から病態への関与が想定される終脳領域の脳オルガノイド(MGEOs)を疾患モデル(*ex vivo*疾患モデル)として活用する。これにより、全貌を理解しにくい脳神経疾患であるDDEの病態に関して、脳領域ごとに作り分け単純化することで、認知機能障害などを含む発達遅滞の発症機構の解明に迫る。

【方法】

1. 患者由来および患者由来人工健常iPS細胞

①健常者由来iPS細胞(201B7; 健常コントロール)、②DS患者由来iPS細胞(D1; *SCN1A* 遺伝子にnonsense変異を有するDSモデル)⁵⁾、③DS患者由来人工健常iPS細胞(D1T; D1細胞株の遺伝子変異を修復したisogenicな人工健常コントロール)^{6,7)}。

2. 終脳領域の脳オルガノイド(MGEOs)の作製

ヒトiPS細胞から3次元の細胞凝集体を浮遊培養にて作製した。この凝集体の神経分化を誘導する成分や脳の領域形成を制御する因子が含まれる培地で培養することで、ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドを作製した。前脳領域の脳オルガノイドを作製するために、前脳領域へ分化誘導可能な因子群を用いて浮遊培養を行った。前脳領域へ分化誘導に必要な因子群や添加の時期については、他の研究グループの方法を参考にした⁸⁾。定量的RT-PCRおよび免疫染色法により、これら3株のiPS細胞より作製したMGEOsの終脳領域特異的なマーカー遺伝子の発現を解析した。同様に、MGEOsに含まれる神経細胞種の同定ならびにNav1.1の発現も解析した。

3. 終脳領域の脳オルガノイド(MGEOs)のRNA-seq解析

作製したMGEOsからRNAを抽出し、網羅的

なRNA-Seqを実施した。健常者と比較しDS患者において発現変化していた遺伝子群をGene Ontology解析等で同定した。

【結果】

1. 患者由来iPS細胞を用いた終脳領域脳オルガノイド(MGEOs)の作製

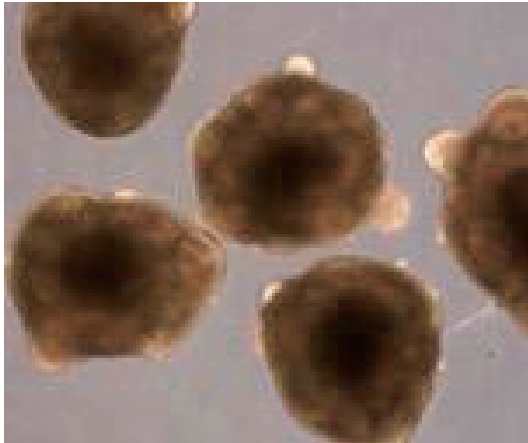
ドラベ症候群患者由来iPS細胞は、*SCN1A* 遺伝子のエクソン26にナンセンス変異(c.4933C>T, p.R1645*)を有するiPS細胞株を用いた⁵⁾。加えて、より詳細な病態解析を行うために、ドラベ症候群患者由来iPS細胞の遺伝子異常を修復したアイソジェニックな人工健常iPS細胞も活用して、以降の実験を実施した^{6,7)}。ヒトiPS細胞から3次元の細胞凝集体を浮遊培養にて作製し、神経分化を誘導する成分や脳の領域形成を制御する因子が含まれる培地で培養することで、ヒトiPS細胞由来脳オルガノイドを作製した(Fig. 1)。前脳領域の脳オルガノイドを作製するために、前脳領域へ分化誘導可能な因子群を用いて浮遊培養を行った。作製した前脳領域の脳オルガノイドでは、MGE領域マーカーであるFOXG1およびNKX2.1の発現が陽性な神経幹細胞が観察され、MGE領域に属する脳オルガノイド(MGEOs)であることが確認した(Fig. 1)。

12週間培養したMGEOsにおいて、BII-tubulin陽性な神経細胞とGFAP陽性なアストロサイトの発現が観察された。加えて、神経細胞においては、VGLUT1陽性なグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞およびVGAT陽性なGABA作動性の抑制性神経細胞が発現していた。抑制性神経細胞のサブタイプの同定を試みた結果、てんかんの病態に重要なParvalbumin(PV)陽性な抑制性神経細胞が含まれていることが分かった(Data not shown)。また、このPV陽性な神経細胞ではNav1.1の発現も認められ、作製したMGEOsがDSの病態モデルとして活用できることが示唆された(Data not shown)。

2. RNA-seq法を用いたMGEOsの遺伝子発現解析

PV陽性な抑制性神経細胞の発現が確認されたMGEOsからRNAを抽出した。健常者、DS

位相差顕微鏡画像



免疫染色画像

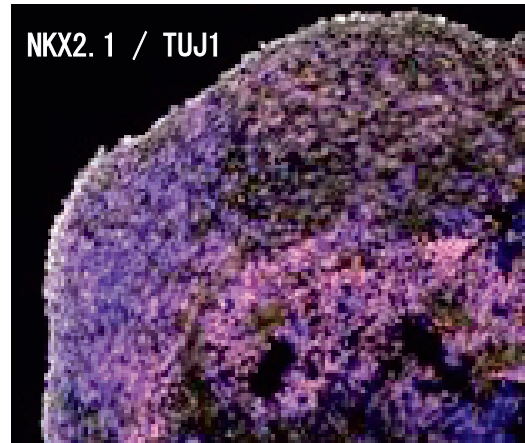


Fig. 1 培養30日目のMGE領域に属するヒトiPS細胞由来の脳オルガノイド (MGEOs)

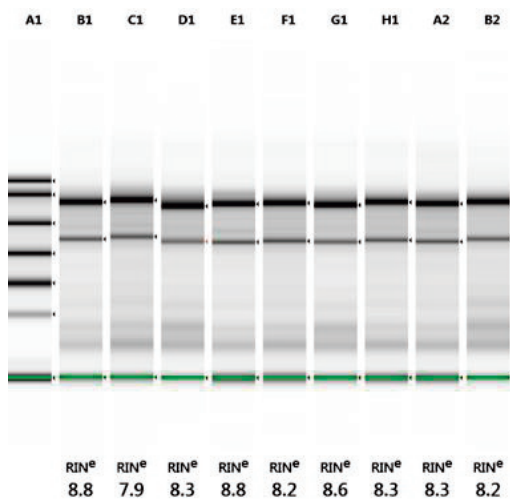


Fig. 2 抽出したRNAの電気泳動写真
Lane A1: 分子量マーカー。Lane B1-D1: iPS細胞。Lane E1-G1: 培養2週間後のMGEOs。Lane H1-B2: 培養12週間後のMGEOs。

患者およびDS患者由来人工健常株のiPS細胞から作製したMGEOsより高品質なRNAを抽出することができた (Fig. 2)。これらのサンプルを用いてRNA-seqを試みた。サンプル間の遺伝子発現の度合いに関して類似性を確認するために主成分分析を実施した結果、iPS細胞群とMGEOs群間での遺伝子発現が異なるクラス

ターに属していることが確認できたことから、両群のクラスター間での遺伝子発現を比較した (Fig. 3)。健常者由来のMGEOsに対してドラベ症候群患者由来のMGEOsでは、12個の遺伝子で発現量の変化が示唆された。特に、アポトーシスを抑制する遺伝子とシナプスオーガナイザーとして機能する遺伝子において、発現量の低下が強く示唆された (Data not shown)。

【考察】

DS患者のDEE発症には、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、群発するてんかん発作に伴った興奮毒性による神経細胞死の誘発が考えられる。また、DSモデルマウスにおいて、Tauタンパク質発現を減少させることで病態の予防に繋がる事が報告されている⁹⁾。このことから、DS患者のDEE発症には神経毒性の関与が示唆されている。本研究で発現量の変化を示した2個の因子は、アポトーシスとシナプスオーガナイザーに関連した遺伝子であり、DS患者由来MGEOsにおいても、DEE発症と神経毒性との関連性を示唆した結果である。今後は、DSモデルマウスにおいても、DS患者由来MGEOsで確認された遺伝子の発現が変化しているか解析する必要がある。

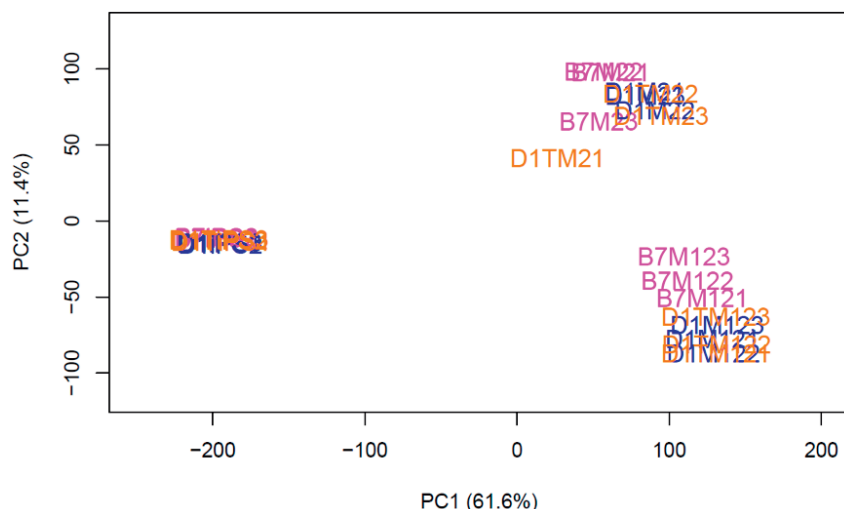


Fig. 3 RNA-seq データの主成分分析

【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) 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.
- 8) Xiang, Y., et al., (2017). Fusion of Regionally Specified hPSC-Derived Organoids Models Human Brain Development and Interneuron Migration. *Cell Stem Cell* **21**, 383-398.
- 9) Gheyara AL., Ponnusamy R., Djukic B., Craft RJ., Ho K., et al. Tau Reduction Prevents Disease in a Mouse Model of Dravet Syndrome. *ANN. NEUROL.* 2014 ; **76** : 443-456.