

ドラベ症候群iPS細胞モデル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

てんかんシナプス機能解析（課題番号：157102）

研究期間：平成 27 年 7 月 28 日～平成 28 年 3 月 31 日

研究代表者：田中泰圭 研究員：河野洋幸（平成 28 年 2 月 28 日まで）

【緒言】

ドラベ症候群は、乳児期発症難治てんかんの一つであり、重度の発作のみならず、発達や認知・行動の障害を伴い、発症した子供の約 2 割が若年で死亡する。ドラベ症候群では約 80% の患者に、電位依存性 Na^+ チャネル $\text{Na}_v1.1$ 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（Dravet C, et al. John Libbey Eurotext, 2005 他）。*SCN1A* を改変したドラベ症候群モデルマウスを用いた研究が種々行われており、前脳 GABA 性介在神経細胞における $\text{Na}_v1.1$ のハプロ不全が脳の抑制性の機能不全をもたらし、てんかんを発病すると考えられている（Ogiwara I, et al. J Neurosci 2007, Han S, et al. Nature 2012）。しかしながら、その詳細な分子機構は未だ不明なままであり、効果的な治療法は未確立である。げっ歯類とヒト脳における神経細胞基盤の違いは周知の通りであり、モデルマウスが必ずしも患者の病態を反映しているとは言い難く、より複雑な病態が推定されるヒトの病態・治療研究には、患者由来神経細胞を併せて用いることが望ましい。

ヒト人工多能性幹細胞（induced-pluripotent stem cells: iPS cells）は、ヒトの皮膚や血液から採取した細胞を人工的に初期化することで、人体の全ての細胞へ分化誘導可能な細胞種である（Brennan K, et al. Nature 2011 他）。そのため、再生医療への応用が多いに期待されている。一方で、患者より疾患特異的 iPS 細胞を作製し、疾患の標的細胞へと分化させることにより、ex vivo で疾患の表現型を再現可能である。このため、疾患の病態を反映し、臨床の架け橋となる病態モデルのツールとして、疾患の病態解析や創薬への応用が可能であり、多くの分野への幅広い貢献が期待できる（図 1）。

正常な脳は多数の神経細胞がネットワークを形成し、情報をバランス良く伝導・伝達して中枢恒常性を維持し

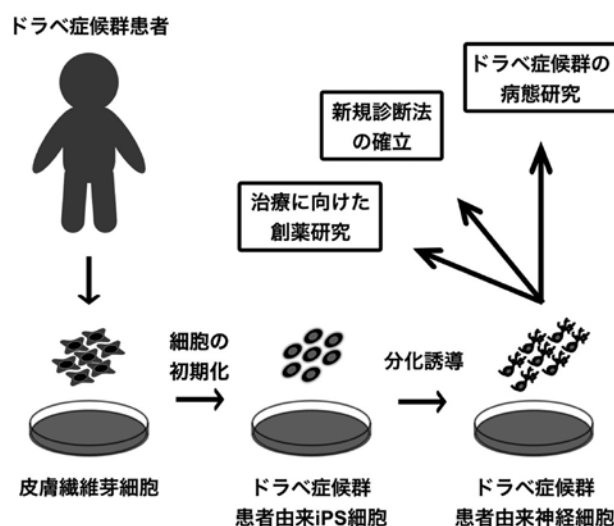


図 1 研究概要図

ている。ニューロンの架け橋である「シナプス」では、化学伝達物質を介して効率的に情報が伝達される。一方で、てんかん発生時の脳内では、体細胞神経ネットワークの興奮性と抑制性のバランスが一過性もしくは持続的に破綻し、シナプス活動が過剰に興奮と考えられている。そこで、本研究はシナプス伝達の解析を目的としているため、その解析に最適な「オータプス培養標本」を利用した。オータプス培養標本とは、区画化して培養されたアストロサイト層（グリア細胞の一種）の領域内で単一ニューロンを培養したものである。通常、広域なアストロサイト層に培養された複数のニューロンは、互いにシナプスを形成し複雑な神経ネットワークを構築するが、領域内には他のニューロンが存在しないため、ニューロンは自己にシナプスを形成しながら発達する（オータプス）。この手法を用いることで、てんかんの病態を「シナプス病態」として捉えることが可能となり、

シナプス機能の回復機序を解明することで、根本的なてんかん治療および創薬への一助となる。

そこで本研究では、手始めにドラベ症候群患者より作製したiPS細胞を神経細胞（ニューロン）へと分化誘導した。分化誘導したiPS細胞由来のニューロンを用いて、シナプス伝達の解析に最適なオータプス培養標本の作製を試みたので報告する。

【方法】

(1) iPS細胞の培養

iPS細胞の培養は下記のフィーダーフリー系で培養した (M. Nakagawa et al. Scientific Reports 2014)。iMatrix511 (Nippi) を $0.3 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングしたカルチャーディッシュを培養に用いた。StemFit® AK02N培地 (Ajinomoto) を用いて 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で培養した。継代の翌日に培地交換を行い、以降は2日に一度の割合で培地交換を行った。継代初日のみ Y-27632 (Wako) を $10\mu\text{M}$ の濃度で添加した培地で培養した。

(2) 神経細胞への分化誘導

既存の方法を改変して神経分化誘導を行った (Maroof A.M., et al. Cell Stem Cell. 2013, Imaizumi K., et al. Stem Cell Reports. 2015 他)。iPS細胞に各種増殖因子や低分子化合物を作用させながら、接着培養および浮遊培養を組み合わせることでニューロスフェアを介して神経細胞（ニューロン）へ分化誘導した。

(3) 島状アストロサイト培養標本の作製

桂林らと東北大学電気通信研究所との共同開発による「コーティング用スタンプ」を用いて、細胞接着エリアをカバーガラス上で均一化されるようにコーティングした。これによりカバーガラス上に付着する島状アストロサイト層の大きさのパラツキを最小限にして均等に培養可能とした。

生後 0-1 日 齢の ICR マウス 大脳皮質を Trypsin/EDTA ($0.05\%/0.02\%$) (Wako) で処理し、 $10\% \text{FBS}/\text{DMEM}$ (Invitrogen) 培地を用いて 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で二週間培養した。培養ボトル底面に接着しているアストロサイトを剥離し、島状アストロサイト培養用 6-well plate (BD Falcon) に播種した。5-6 日後にアストロサイトが島状に培養されていることを確認し、過度の細胞増殖を止めるために 2'-デオキシ-5-フルオロウリジン (sigma) とウリジン (sigma) の混合液を各ウェルに添加した。

(4) 島状アストロサイトとiPS細胞由来神経細胞の共培養

iPS細胞より分化誘導した神経細胞を準備した島状ア

ストロサイト培養プレートに播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で培養した。培養液は $2\% \text{B27}$ を添加した KBM Neural stem cell kit (Kojin Bio) を用い、3日に一度の割合で培地交換を行った。

【研究成果】

(1) ドラベ症候群患者由来iPS細胞からの神経分化誘導

これまでに日暮らは、SCN1A遺伝子の exon 26 にナンセンス変異 (p.R1645*, c.4933 C>T) を有する患者の上皮細胞からiPS細胞を樹立することに成功した (Higurashi N, et al. Mol Brain 2013)。ドラベ症候群患者由来iPS細胞を用いて神経細胞への分化誘導を行った。神経分化誘導因子を添加した培地でiPS細胞を7日間培養することで、未分化マーカーである *NANOG* と *OCT3/4* の発現量の減少および神経幹細胞マーカーである *Pax6* の発現量の増大が見られ、神経幹細胞の Neurosphere の形成を確認できた (図2)。Neurosphere を接着培養することで全ての細胞が神経細胞へ分化した (図2)。分化誘導した全ての細胞が神経細胞マーカーである $\beta \text{III-tubulin}$ の陽性を示した (Data not shown)。

(2) ドラベ症候群患者iPS細胞由来の神経細胞を用いたオータプス標本の作製

オータプス培養標本とはドット状 (一辺の長さが $300 \mu\text{m}$ 程度の四角い島状) に培養したアストロサイトと単一神経細胞 (ニューロン) を共培養した培養標本である (図3)。島状アストロサイト層を培養したウェルに、

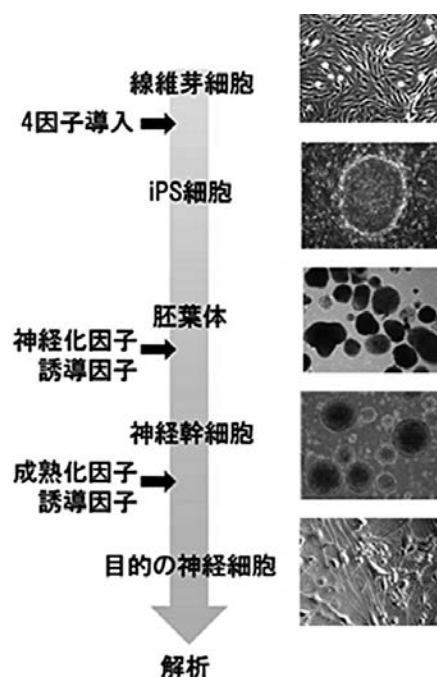


図2 樹立したiPS細胞から神経細胞への分化誘導

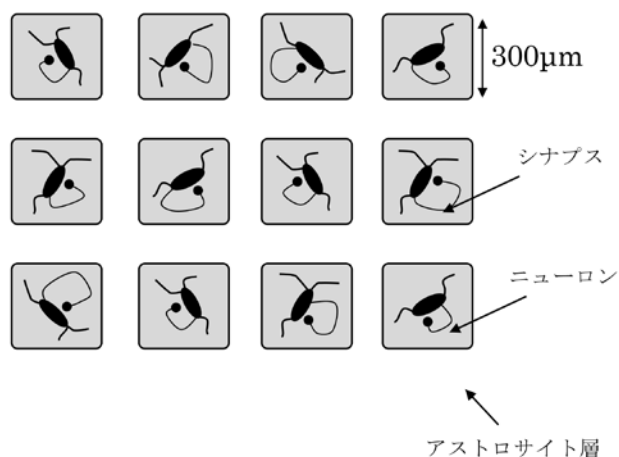


図3 オータプス培養標本の模式図

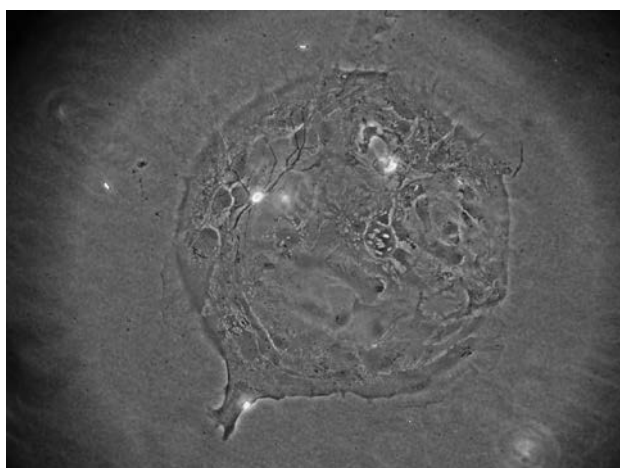


図4 iPS細胞から分化誘導した神経細胞を用いたオータプス培養標本

ドラベ患者iPS細胞由来の神経細胞を播種してオータプス培養標本を作製した。神経細胞の培養開始から二週間後には良好なオータプス培養標本の作製に成功した（図4）。このオータプス培養標本を用いてパッチクランプ法による神経細胞の機能解析を試みたが、神経細胞の活動電位を測定することができなかった。神経細胞の成熟度を高める目的で30日間の長期培養を試みたが、アストロサイト層の形態変化に伴ってオータプス標本培養が崩れてしまった。そのため、神経細胞の活動電位を測定するまでに至らなかった。

【まとめ】

ドラベ症候群の疾患特異的iPS細胞から分化誘導した神経細胞を用いて、オータプス培養標本の作製にも成功した。しかし、一ヶ月間の長期培養中に島状アストロサイトの形態変化に伴ってオータプス培養標本が崩れた。そのため、本研究期間中では、神経細胞の電気生理学的

な機能評価を行うまでには至らなかった。

今後の研究課題として、シナプス伝達を解析するためにオータプス培養標本の長期培養を可能にしなければならない。iPS細胞由来神経細胞のシナプス機能の解析が可能となれば、根本的なてんかんの治療に向けた創薬基盤研究に応用できる。

【今後の研究課題】

発現が認められなかったParvalbumin陽性のGABA作動性神経の分化誘導を試みる。また、興奮性のグルタミン酸作動性神経への分化誘導や、多種の神経によるネットワークが形成された状況での影響を多角的に解析する必要がある。上記のことを踏まえて、ドラベ症候群の疾患特異的iPS細胞から分化誘導した神経細胞を疾患モデルとして、てんかんの病態解析に取り組む。また、てんかんの治療に向けて、薬剤スクリーニングへ応用し、シーズ研究の基盤構築から発展に向けて研究を遂行していく。