

# iPS細胞から分化させた神経幹細胞の脳内移植法の確立

てんかんの細胞治療（課題番号：157006）

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：廣瀬伸一 研究員：内田 琢

## 緒言

Dravet（ドラベ）症候群はてんかん性脳症の一つで、乳児期に発症して頻回で難治のてんかん発作により、重篤な発達の障害を来す。本症の原因として、患者の80%以上に脳内のナトリウムチャンネルをコードするSCN1Aのヘテロの変異が発見される。例外を除いて、患者両親には変異が認められず、変異は新生の突然変異である。しかしながら、この遺伝子変異がどのようにして難治のてんかんを来すかは不明の点が多々ある。このため根治療法は確立されていない。ドラベ症候群のてんかん発作とそれによる発達の障害はきわめて難治で、既存の抗てんかん薬は無効のことがほとんどである。

このドラベ症候群病態に迫るため、我々はこれまで、SCN1A遺伝子にヘテロのナンセンス変異（p.R1645\*）を持つドラベ症候群患者よりiPS（induced Pluripotent stem）細胞を樹立した。このiPS患者細胞および、対照健常者から樹立したiPS細胞を分化させ神経細胞とした。両者の生理学的機能を調べたところ、抑制系神経であるGABA系の神経細胞の活動電位が患者で低下していることが明らかとなった。すなわち、SCN1A遺伝子の変異により抑制系神経の不全が生じ、相対的に脳神経の興奮であるてんかん発作が継続するものと判明した。このため、この抑制系神経の不全を補正がドラベ症候群の治療に利用できることが明らかになった。

これと並行して、ドラベ症候群の原因のSCN1Aの遺伝子に変異を持つ遺伝子改変動物を作出した。マウスに我々が独自の方法で開発したキックイン作出法により、マウス*Scn1a*に微小欠失をもつ遺伝子改変ドラベ症候群モデル動物を作出したところ、ヒトと同様に激しいてんかん発作を来たして、突然死が多くみられた。同様な手法により作出されたマウスの実験により、上述のヒトiPS細胞より分化誘導された神経細胞を用いた実験と同

様に、病態はSCN1Aの遺伝子に変異による抑制神経系の不全によるものと証明されている。

以上から難治のてんかん性脳症であるドラベ症候群の脳内に、正常な抑制神経細胞を移植することによる治療を創案した。ヒトに応用前にドラベ症候群モデルマウスに、正常iPS細胞より分化誘導した抑制神経細胞を導入することにした。（図1）

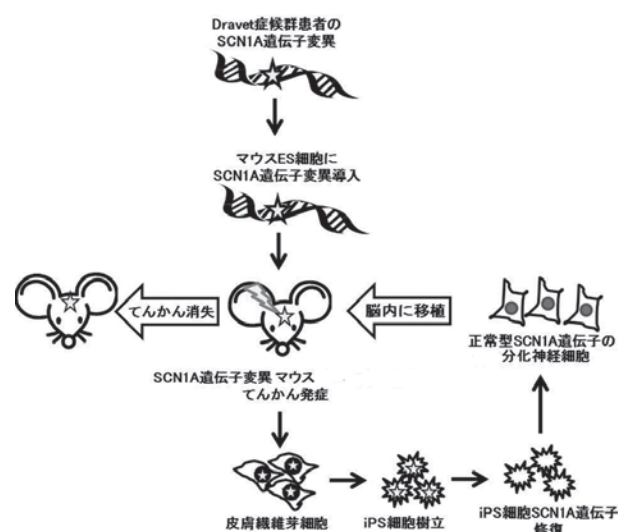


図1 本研究の概念図  
難治のてんかん性脳症であるドラベ症候群の脳内に、正常な抑制神経細胞を移植することによる治療を目指す。自己細胞移植による拒絶反応がない移植を目指し、CRISPR-Cas9などの遺伝子編集技術を用いて疾患iPS細胞の遺伝子異常を修復して、正常型iPS細胞として神経細胞への誘導をおこなったのち、脳内移植をはかる。

## 方法

- i. ドラベ症候群iPS細胞のSCN1A遺伝子を修復する。  
将来のヒトへの神経細胞の移植に備えて、自家移

植を可能とするために遺伝子編集技術のTALENを使用してドラベ症候群iPS細胞のSCN1Aの遺伝子に変異を修復した。使用したドラベ症候群iPS細胞は29歳の典型的ドラベ症候群の日本人患者の生検皮膚から樹立した。本症例はSCN1A遺伝子にヘテロの新生ナンセンス変異 (c.4933C>T, pR1645\*) が確認されていた。山中4因子をレトロウイルスにより導入してiPS細胞を樹立した。その細胞より選抜した二細胞系統の内一系統D1-1をその後の実験に用いた。D1-1にはc.4933C>T, pR1645\*が残されていることその他、三胚葉への分化能はヌードマウスへの移植で確認した。

c.4933C>T, pR1645\*変異はSCN1A遺伝子のexon 26に位置し、ドメインIVのセグメント5に新生のストップコドンを生じさせる。D1-1の変異c.4933TをCに修復するため、TALEN遺伝子修復技術を利用した。修復の確認はPCRシーケンスにて行い、併せてoff targetによる変異が導入されていないか、全ゲノムシーケンス解析にて確認した。

ii. 健常者由来のiPS細胞にドラベ症候群のSCN1A遺伝子変異を導入する。

移植による治療実験に備えて、i)の実験と対照関係となる、異常対照としてのドラベ症候群のSCN1A遺伝子変異を導入した人工疾患iPS細胞の作出を行った。導入した変異はSCN1A遺伝子のc.2904C>A, pC968\*のナンセンス変異で、実際に日本人のドラベ症候群の患者でヘテロ変異として発見されている。変異はexon 15内の変異でドメインIIのセグメント6に位置していた。

変異の導入はi)と同様TALEN遺伝子編集を利用した。導入を行ったiPS細胞として白人健常者由来のiPS細胞、201B7を使用した。

変異の導入はi)と同様に変異導入の確認はPCRシーケンスにて行い、併せてof targetによる変異が導入されていないか、全ゲノムシーケンス解析にて確認した。

iii. 樹立神経幹細胞にドラベ症候群のSCN1A遺伝子変異の導入

iPS細胞の神経誘導に際して、抑制系また興奮性の神経への誘導が必ずしも容易でないことから、継代できるヒト(生後19週の男児)脳海馬由来樹立神経幹細胞(HIP-009, PhoenixSongsより購入)を用いることとした。i)、ii)異なり、遺伝子編集技術はCRISPR-Cas9を利用した。本法はTALENより遺伝子編集効率が良いとされる。ドラベ症候群のSCN1A遺伝子のc.2904C>A, pC968\*のナンセンス変異を導入することにした。導入の検定もi)、

ii)と同様にPCRシーケンスにて行い、併せてoff targetによる変異が導入されていないか、全ゲノムシーケンス解析にて確認することとした。

iv. マウス脳へのiPS細胞の移植

本研究の予備的実験として、iPS細胞を野生株のマウスに蛍光を持つマウスiPS細胞を脳定位装置を用いて海馬部分への移植を計画した。

結果

i. ドラベ症候群iPS細胞のSCN1A遺伝子を修復する。

ドラベ症候群由来のD1-1のc.4933C>T, pR1645\*変異をTALENを用いて正常配列D1-1の変異c.4933TをCに修復に改変を行った。修復の確認はPCRシーケンスにて行い、変異が修復した細胞株を得た。しかしながら、いずれの細胞株も染色体分析で核型が3倍体であることが確認された。このため、現在再度、変異を修復中である。

ii. 健常者由来のiPS細胞にドラベ症候群のSCN1A遺伝子変異を導入する。

健常者由来のiPS細胞201B7にドラベ症候群のSCN1A遺伝子変異であるc.4933C>T, pR1645\*変異をTALENを用いて導入を行った。

複数の遺伝子導入された人工患者細胞株を樹立した。多能性は維持されており、また染色体分析により46,XXであることを確認した。

導入部分のPCRシーケンスによりヘテロにSCN1A遺伝子のc.4933C>T, pR1645\*変異が導入されていることを確認した。また全ゲノムシーケンスを行い大きなoff target変異がないことを確認した。(論文作成中)

iii. 樹立神経幹細胞にドラベ症候群のSCN1A遺伝子変異の導入

脳海馬由来樹立神経幹細胞(HIP-009)にSCN1A遺伝子のc.4933C>T, pR1645\*変異導入するべく、CRISPR-Cas9を利用して導入を開始した。複数の候補細胞株を樹立して、現在導入部をPCRシーケンスにて行い確認中である。

iv. マウス脳へのiPS細胞の移植

現在台北医科大学の張璽博士と共同で細胞移植の予備実験に入った。

考察

ドラベ症候群はきわめて難治で、重篤な発達の障害を

来するため、病態に根ざした治療が必要である。しかしながら、SCN1A遺伝子変異がその原因であることが解明されたのが最近であり、病態の詳細解明研究は緒に就いたばかりである。そのなかで我々はドラベ症候群の患者より樹立したiPS細胞を用いてSCN1A遺伝子変異が、抑制系神経であるGABA系神経のナトリウムチャンネルの不全を引き起こすことがその根本原因であることを明らかにした。すなわち、何らかの方法により、GABA系神経の不全を改善することができれば根治的な治療につながることが示された。以上の結果をもとに、正常な細胞を脳内に移植することを計画した。

最近再生医療で注目されているiPS細胞をこの脳内移植と組み合わせることができれば、理想的な治療が可能となると考えられる。すなわち、患者細胞より樹立したiPS細胞を神経細胞に誘導するなどして用いれば、自己移植となり拒絶反応がない移植が期待できるわけである。しかしながら、患者より樹立したiPS細胞にはSCN1A遺伝子変異が存在するため、分化した神経細胞もGABA系神経の不全を有することになり、移植に適さない。

この問題を解決するために、患者細胞のSCN1A遺伝子変異を修復することを思い立った。今回、残念ながら、患者細胞のSCN1A遺伝子変異を修復することができたが、樹立した細胞の核型が3倍体であったためさらなる実験に用いることができず、再実験をせざるを得なかった。

一方で正常iPS細胞にドラベ症候群の患者で発見されたSCN1A遺伝子変異を導入することに成功して、人工患者細胞を作成することができた。ドラベ症候群は数万人に一人の頻度の稀な疾患であり、様々なSCN1A遺伝子変異を有するiPS細胞を樹立することは容易ではなかった。また一般に皮膚からiPS細胞を樹立することが多く、侵襲を伴う採取に同意の取得が難しい部分があった。しかしながら、今回の成功によりドラベ症候群に限らずたとえ非常に稀な疾患であっても遺伝子の情報がわかれば、人工患者iPS細胞を作成することが可能であることが証明できた。これにより、ドラベ症候群ばかりでなく、そのほかの稀少疾患のiPS細胞を用いた研究が進むと思われる。

そのほかすでに我々の独自に開発した手法、キックイン法によるドラベ症候群のモデル動物が作出されており、さらに様々はSCN1A遺伝子変異を有するモデル動物の作出を行っている。これらを用いた治療研究を始め、細胞移植による治療研究にもこれらにモデル動物を使用予定である。

現在、さらにヒト継代神経幹を用いた遺伝子編集法による遺伝子改変、脳定位技術を用いた細胞移植の予備実験が進行中である。これらの基礎技法の統合により、実際の患者に対する治療法の開発を目指している。

## まとめ

難治性のでんかん脳症のドラベ症候群に対して主にiPS細胞を用いた細胞移植による治療のための予備研究を行った。遺伝子編集技術によりiPS細胞の遺伝子改変に成功し、今後基礎実験を繰り返し、修復自己神経細胞の移植によりドラベ症候群の治療につなげたい。

## 出版参考文献

- Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain*. 2013; 6: 19.
- Higurashi N, Uchida T, Hirose S, Okano H. Current Trends in Dravet syndrome Research. *J Neurol Neurophysiol*. 2013; 4(3).
- Higurashi N, Okano H, Hirose S. The effect of SCN1A mutations on patient-derived GABAergic neurons: what are the implications for future Dravet syndrome therapeutics? *Future Neurol*. 2013; 8(5): 487-9
- Ihara Y, Tomonoh Y, Deshimaru M, Zhang B, Uchida T, Ishii A, Hirose S. Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations. *PLoS ONE*. 2016; 11(2): e0150095. Epub 2016/02/26.
- Tomonoh Y, Deshimaru M, Araki K, Miyazaki Y, Arasaki T, Tanaka Y, Kitamura H, Mori F, Wakabayashi K, Yamashita S, Saito R, Itoh M, Uchida T, Yamada J, Migita K, Ueno S, Kitaura H, Kakita A, Lossin C, Takano Y, Hirose S. The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy. *PLoS ONE*. 2014; 9(2): e88549.

## 研究実績

現在数編の論文を作成中である。