

氏名	うちの こうや 内野 鉦也		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	甲第 1991 号		
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）		
学位論文題目	てんかん治療薬開発を目指した <i>Scn1a</i> 変異マウスの病態解析並びに新規シナプス薬効標本の確立		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	桂林 秀太郎
	(副査) 福岡大学	教授	右田 啓介
	福岡大学	教授	道具 伸也

内容の要旨

【背景・目的】

てんかんは、神経細胞の過剰な電氣的興奮に伴って、意識障害やけいれんなどを発作的に起こす慢性的な神経疾患である。熱性けいれんを含めると全人口の 1%に及ぶ非常に高頻度な疾患であり、多くは小児期に発症する。一般的には抗てんかん薬による治療が行われるが、約 3 割の患者では抗てんかん薬が無効なてんかんを有している。また、難治性てんかん発症の分子メカニズムはほとんど分かっておらず、根本的な治療法の開発や創薬が困難な疾病の一つである。加えて、難治性の小児てんかん患者は発達障害や精神遅滞などの合併症も生ずることがあり、成人になっても社会生活に対する不安を伴う場合もある (Hirose et al., 2000, 2002)。そこで本研究では、難治性てんかんである Dravet 症候群モデルマウス (*Scn1a* キックインマウス) のシナプス機能及びアストロサイトの活性を評価した。第 1 章では *Scn1a* キックインマウスにおける興奮性および抑制性ニューロンのシナプス病態について検討した。第 2 章では *Scn1a* キックインマウスにおけるアストロサイトの活性を評価した。さらにヒトのアストロサイトに着目したシナプス薬効評価モデルの確立を目的として、第 3 章ではヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有した新規シナプス薬効標本を確立した。

【実験方法・結果】

第 1 章では、生後 0~1 日齢 ICR マウス大脳皮質のアストロサイトをドット状に培養し、その上に *Scn1a* キックインマウス (Het) 及び野生型マウス (WT) の海馬、もしくは線条体ニューロンを共培養して単一ニューロン培養標本 (オータプス培養標本) を作製した。ニューロン培養 13~17 日目に、シナプス伝達をパッチクランプ法により解析し、神経細胞のシナプス数を免疫染色法により定量した。その結果、Het マウスの抑制性ニューロンではシナプス小胞開口放出確率の減少及び抑制性シナプス数の減少により、抑制性シナプス伝達が低下することが明らかとなった。さらに細胞外 Ca^{2+}

高濃度時には通常時にもまして E/I バランスの崩壊が起きることが明らかとなった。

第 2 章では、WT 及び Het マウス的大脑皮質よりアストロサイトを単離培養し、アストロサイトの Ca^{2+} 発火を解析した。その結果、Het アストロサイトにおいて自発的に流入する Ca^{2+} の流入速度は増加した。さらに、Het アストロサイトにおいて誘発的刺戟により流入する一時的な Ca^{2+} 流入量、及び流入速度は増加した。

第 3 章では、ヒト iPS 細胞から分化誘導したアストロサイトを有したオータプス培養標本 (HiAACs) を作製した。作成した標本の神経機能をパッチクランプ法及び免疫染色法にて解析した。その結果、HiAACs のニューロンはニューロン単独培養と比較して発達しており EPSC や mEPSC を示す機能的なシナプスを有していた。加えて、HiAACs はニューロン培養後 2 週から 4 週にかけて成熟し、培養 6 週においても実験に使用できた。

【考察・結論】

第 1 章及び第 2 章では *Scn1a* に変異を有するマウスのシナプス機能とアストロサイトの Ca^{2+} 発火を解析し、Dravet 症候群の新たな病態メカニズムを解析した。第 3 章ではヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本を確立した。

てんかんの治療は主に薬物療法であり、これまで、原因因子であるニューロンのみを治療標的とする既存の抗てんかん薬を頼りに薬物治療が行われている。しかしながら、てんかん患者の約 30% が発作を十分にコントロールできていないのが現状である。近年、てんかんの原因にアストロサイトに依存した神経機能崩壊が加わったことから (Coulter and Steinhäuser, 2015)、てんかんの根本的治療のために、病態アストロサイトに作用する“グリア創薬”が求められている。本研究で作製したヒト iPS 細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本は、患者由来の iPS 細胞を用いることで様々な病態を反映できる。よって、てんかんを含む多くの中枢神経疾患の病態解析、並びに新薬開発への一助となると確信している。

【参考文献】

Hirose S, Okada M, Kaneko S, Mitsudome A. Are some idiopathic epilepsies disorders of ion channels?: A working hypothesis. *Epilepsy Res.* 2000 Oct;41 (3) :191-204. doi: 10.1016/s0920-1211 (00) 00141-8.

Hirose S, Okada M, Yamakawa K, Sugawara T, Fukuma G, Ito M, Kaneko S, Mitsudome A. Genetic abnormalities underlying familial epilepsy syndromes. *Brain Dev.* 2002 Jun;24 (4) :211-22. doi: 10.1016/s0387-7604 (02) 00056-6.

Coulter DA, Steinhäuser C. Role of astrocytes in epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Mar 2;5 (3) :a022434. doi: 10.1101/cshperspect.a022434.

審査の結果の要旨

てんかんは、神経細胞の過剰な電氣的興奮に伴って、意識障害やけいれんなどを発作的に起こす慢性的な神経疾患である。一般的に抗てんかん薬による治療が行われるが、約3割の患者では抗てんかん薬が無効なてんかんを有している。また、難治性てんかん発症の分子メカニズムはほとんど分かっておらず、根本的な治療法の開発や創薬が困難な疾病の一つである。本研究では、難治性てんかんである Dravet 症候群モデルマウスのシナプス機能及びアストロサイトの活性を評価し、ヒト iPS 細胞を利用したモデル細胞の作製に挑戦した。

第1章 *Scn1a* キックインマウスニューロンのシナプス機能解析

Dravet 症候群は、乳児期に発症して頻回性のてんかん発作により重篤な脳症や発達障害をきたす難治性てんかんである。発症の原因には、患者の約80%以上に電位依存性ナトリウムチャネルである Nav1.1 をエンコードしている *SCN1A* のヘテロ変異が認められている。

第1章では、*Scn1a* ヘテロ変異を有する *Scn1a* キックインマウスを用いて興奮性及び抑制性シナプス機能を解析した。実験には単一ニューロン培養標本であるオートパス培養標本を用いた。ニューロン培養13~17日目に、シナプス伝達をパッチクランプ法により解析した。また、神経細胞のシナプス数を免疫染色法により定量した。

実験の結果、*Scn1a* キックインマウスのニューロンにおいて、興奮性シナプス伝達の亢進作用はなく、抑制性ニューロンではシナプス数の低下、および開口放出確率の低下によって抑制性シナプス伝達が有意に低下していた。加えて、てんかん発作時を近似した細胞外 Ca^{2+} 高濃度条件では、より一層 E/I バランスが崩壊していた。以上のことから、*Scn1a* キックインマウスでは抑制性シナプス機能低下によって E/I バランスが破綻していることが明らかとなった。この研究成果は、博士学位申請者の内野を筆頭著者として原著論文を公表している (Uchino et al., Sci Rep. 2021 May 20;11(1):10634.)。

第2章 *Scn1a* キックインマウスアストロサイトの Ca^{2+} 発火解析

アストロサイトは中枢神経系全般に存在し、ニューロン間のシナプス伝達やシナプスの形成、成熟に関わっている。活動電位を発生させることにより情報伝達を行うニューロンと異なり、アストロサイトは活動電位を発生しないため、非興奮性の細胞であると考えられてきた。Dravet 症候群においては、神経細胞のみの研究にとどまっておらず、アストロサイトに変化が生じているかどうかは不明である。

第2章では *Scn1a* キックインマウスのアストロサイトの Ca^{2+} 活性をカルシウムイメージング法にて解析した。実験には Oregon Green BAPTA-1, AM (OGB1) と Fluo4-AM を使用した。OGB1 ではアストロサイトの自発的な Ca^{2+} 発火を記録し、Fluo4-AM では

ATPにて誘発したCa²⁺発火を記録した。記録したCa²⁺発火の波形の最大値、傾き、面積を野生型及び*Scn1a*キックインマウスのアストロサイトで比較した。

実験の結果、*Scn1a*キックインマウスのアストロサイトにおいて、自発的なCa²⁺発火では波形の傾きが増大し、誘発刺激によるCa²⁺発火では蛍光強度の最大値と傾きが増加していた。このことから、*Scn1a*キックインマウスのアストロサイトでは、Ca²⁺発火が亢進することが明らかとなった。この研究成果は、博士学位申請者の内野を筆頭著者として原著論文を発表している (Uchino et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2023 Feb 5;643:169-174.)。

第3章 ヒトiPS細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本の確立

iPS細胞が開発されたことにより、患者の病態を維持したまま様々な細胞に分化が可能となった。てんかんを含む多くの中枢神経疾患ではアストロサイトの機能異常がみられることから、ヒトの病態アストロサイトによるシナプス異常を同定できる神経回路モデルの開発が期待されている。

第3章ではヒトiPS細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本を確立した。本研究によって、ヒトiPS細胞由来アストロサイトと共培養したニューロンのシナプス数やニューロンの樹状突起形態の解析が単一ニューロンレベルで可能となり、誘発刺激によるシナプス伝達の記録も可能となった。本研究では健常人のiPS細胞由来アストロサイトを使用してオータプス培養標本を作製しているため、今後は患者iPS細胞由来のアストロサイトを使用することで、様々な病態アストロサイトの影響をシナプス機能を通して解析できることが期待される。この研究成果は、博士学位申請者の内野を筆頭著者として原著論文を発表している (Uchino et al., *iScience.* 2022 Jul 16;25(8):104762.)。

本論文は、1) モデル動物のシナプス病態の解明、2) ニューロンの周囲を取り巻くグリア細胞 (特にアストロサイト) の異常の検出、3) ヒトiPS細胞を用いた新たな病態モデルの開発、を包括的に行った研究である。てんかんを含む多くの中枢神経疾患の病態解析、並びに新薬開発への一助となることが期待されることから、博士学位論文として十分な内容であると評価した。また、公聴会での発表態度、発表内容、ならびに質疑に対する応答も相応に対応できたことから、学位を授与するに応分の能力を有すると結論付けた。