

世界に先駆けて てんかんのiPS細胞を作成

—今後の難治てんかんの病態解明・治療薬開発に期待—

日暮憲道^{1,2,3}, 内田琢², Lossin Christoph⁴, 三角佳生⁵, 岡田洋平^{6,7},
赤松和土⁶, 今泉陽一⁶, 瀬川波子⁸, 鍋島一樹⁹, 森誠之¹⁰, 桂林秀
太郎¹¹, 白坂幸義¹², 岡野栄之⁶, 廣瀬伸一^{1,2}

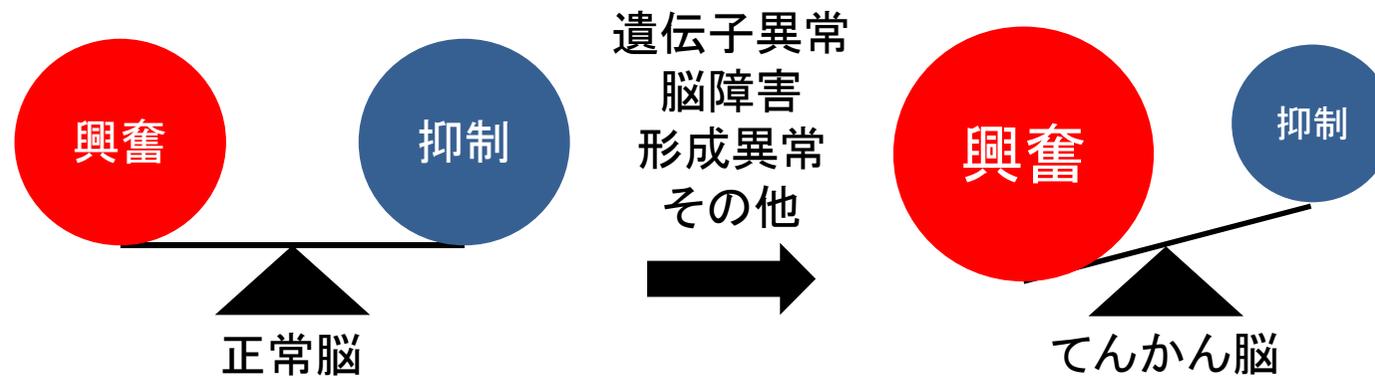
¹福岡大学医学部小児科, ²福岡大学てんかん分子病態研究所, ³東京慈恵会医科大学小児科, ⁴カリフォルニア大学神経科, ⁵福岡大学医学部細胞生物学, ⁶慶應義塾大学医学部生理学, ⁷慶應義塾大学咸臨丸プロジェクト, ⁸福岡大学医学部生化学, ⁹福岡大学医学部病理学, ¹⁰福岡大学医学部生理学, ¹¹福岡大学薬学部神経薬理学, ¹²しらすかクリニック

「てんかん」とは

- ・繰り返す「てんかん発作」を特徴とする脳の状態で、様々な疾患を含みます。8割の患者様は、小児期に発症しています。
- ・てんかん発作は全身をガクガクさせるだけではなく、ぼーっと反応しなくなるだけのものや、瞬間的に全身をビクッとさせるものなど、症状は非常に多彩です。
- ・多くは1剤、あるいは少数の薬剤の組み合わせにより発作を抑えることができますが、**3割の患者様は内服薬で発作を抑えられない「難治てんかん」を患っています。**
- ・そのようなてんかんでは、外科治療、栄養療法、その他いくつかの特殊な治療法も試みられていますが、未だ多くの患者様を救うことは出来ていません。

てんかんの原因

- ・脳の神経細胞は、その電気活動によって情報をやりとりしていますが、電気活動の興奮と抑制のバランスが正常な脳機能を維持するのに重要です。てんかんではこのバランスが崩れ、興奮しやすい状態になることで発症すると考えられています。

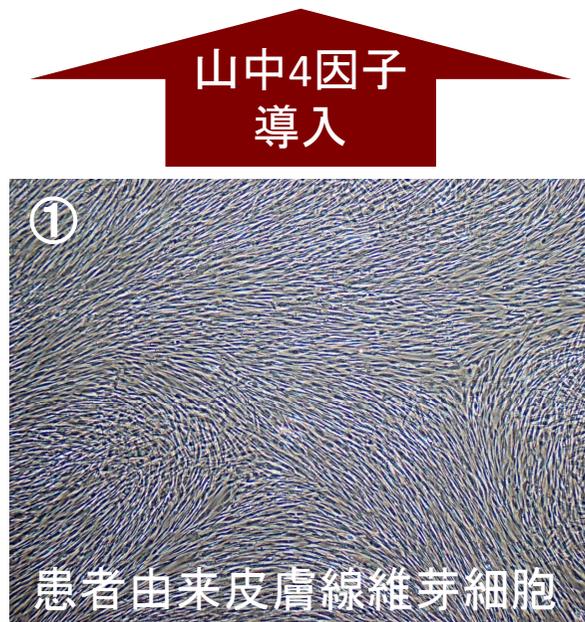
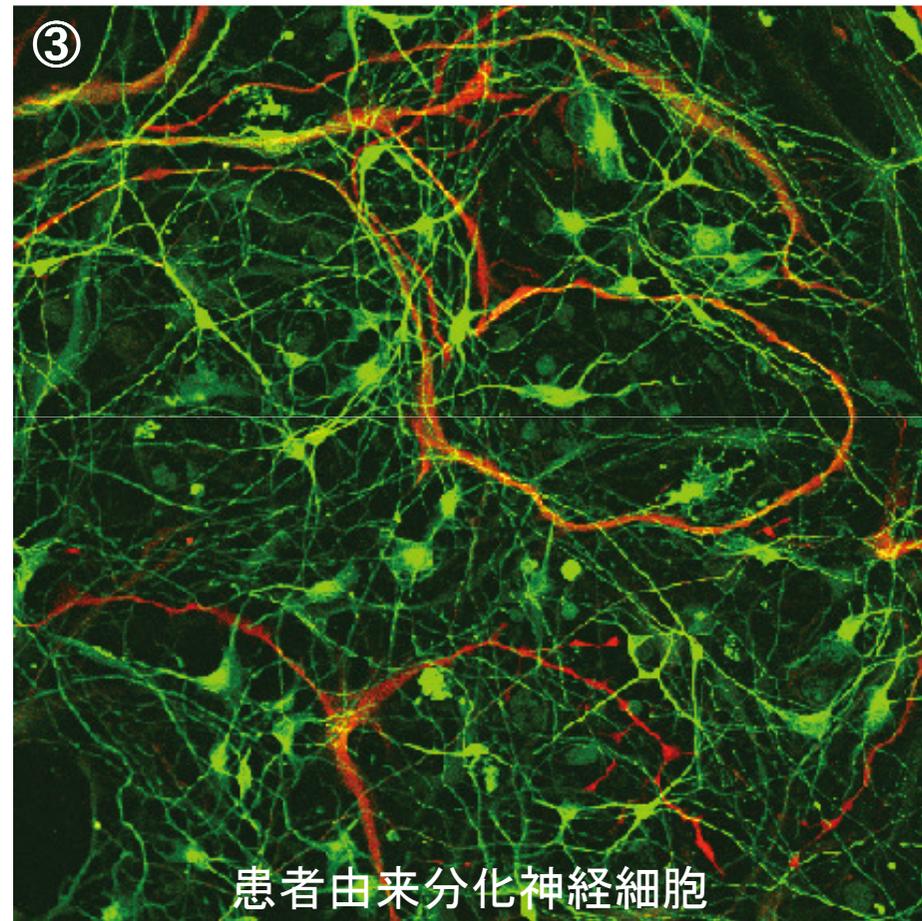
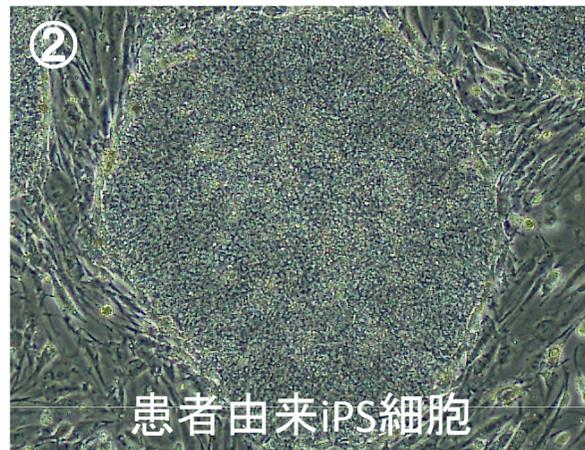


- ・原因は様々ですが、近年、原因の遺伝子異常が徐々に明らかにされてきています。
- ・その代表が“SCN1A遺伝子”の異常で、「ドラベ症候群」と呼ばれる乳児に発症する難治てんかんの原因となります。

「ドラベ症候群」と病因

- ・重度のてんかん発作のみならず、知的障害、運動障害、行動異常なども伴う、大変重いてんかんです。
- ・その原因となる遺伝子であるSCN1A遺伝子からは、神経細胞の活動に重要なナトリウムチャンネルという物質が作られますが、マウスの研究では、脳の抑制機能を担う神経細胞に存在しているので、この遺伝子の異常によって、脳の抑制能力が弱くなって、てんかんが発症すると考えられています。
- ・ただし、人間とマウスとでは違いますので、実際の患者の病態は、患者の脳神経細胞を使って研究することが望ましいですが、実際にはできません。
- ・そこで、この遺伝子の異常があるドラベ症候群の患者からiPS細胞を作り、神経細胞へ分化し、解析を行うことにしました。しかし、これまでにてんかん患者から作ったiPS細胞の研究報告はありませんでした。

ドラベ症候群患者由来iPS細胞の樹立 と神経細胞の分化誘導

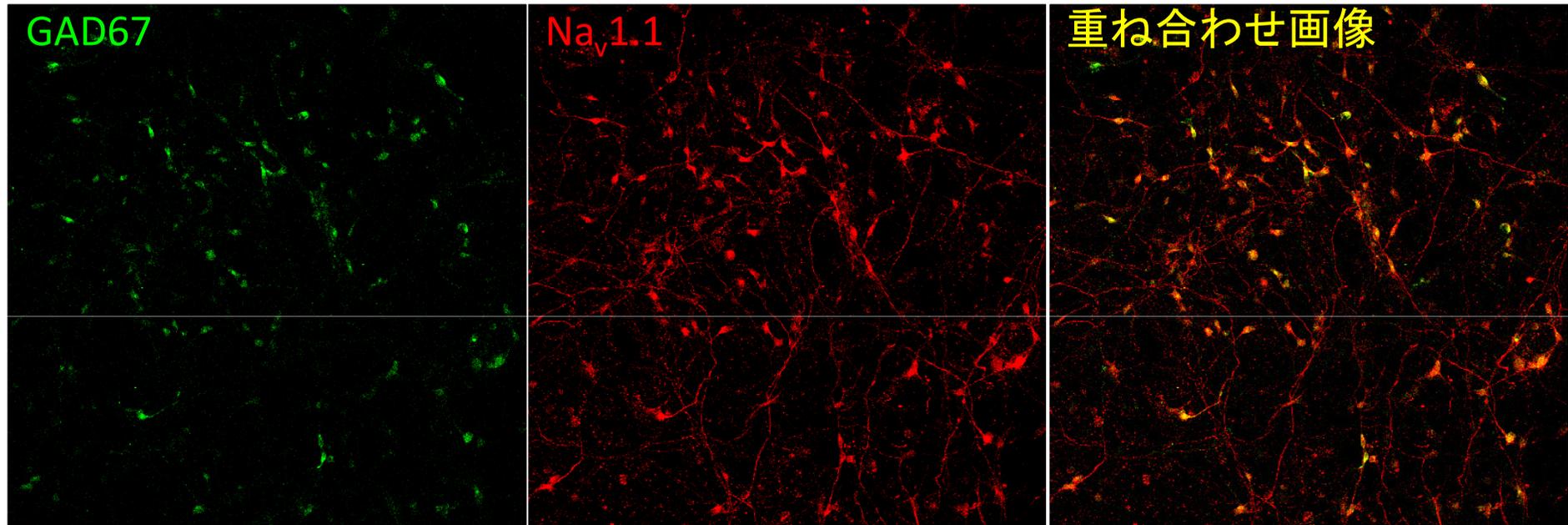


山中4因子
導入

神経細胞マーカー グリア細胞マーカー*

*グリア細胞は神経細胞ではありませんが、脳に存在し神経細胞が生きて活動するのに重要な細胞です。

分化した神経細胞のうち、 $\text{Na}_v1.1$ を発現する細胞の多くが抑制性神経細胞

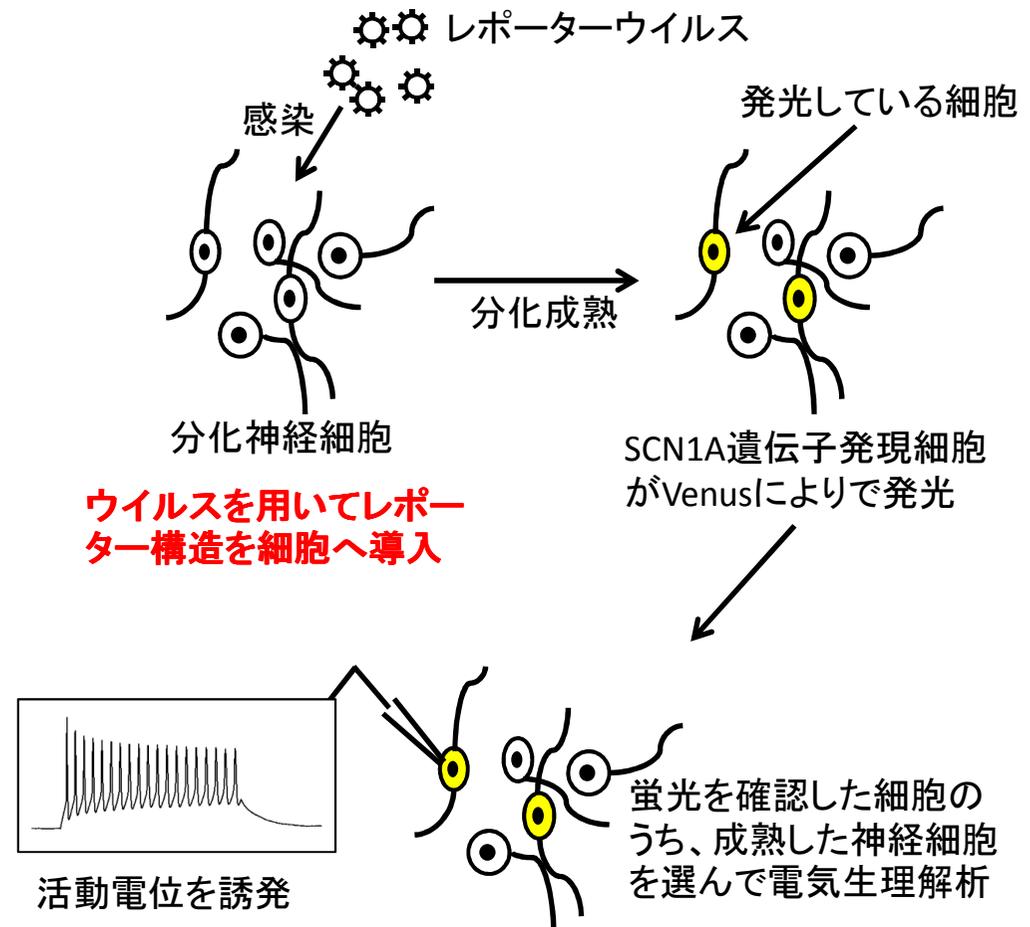
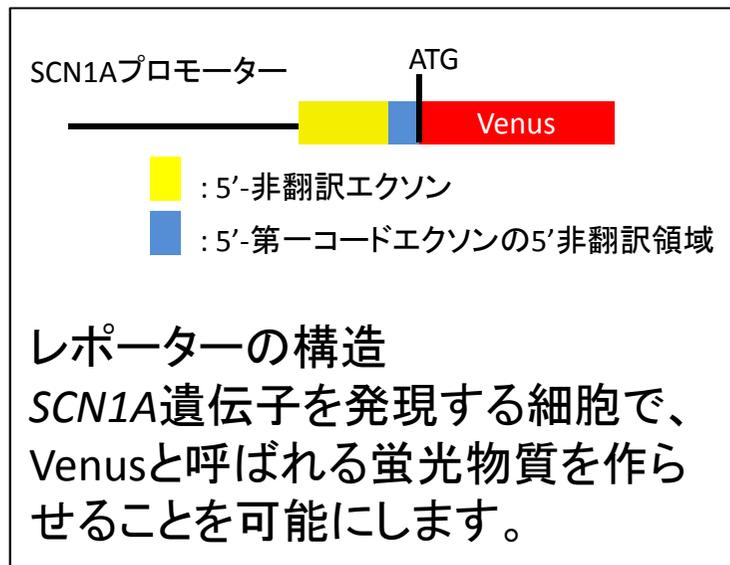


$\text{Na}_v1.1$ はSCN1A遺伝子によって作られるナトリウムチャンネルを指します。GAD67は、GABA作動性神経細胞に発現する物質で、抑制性神経細胞であることを示します。写真を重ね合わせると、 $\text{Na}_v1.1$ (赤)の多くが、GAD67(黄緑)と重なって黄色くなっていることが確認できます。つまり、

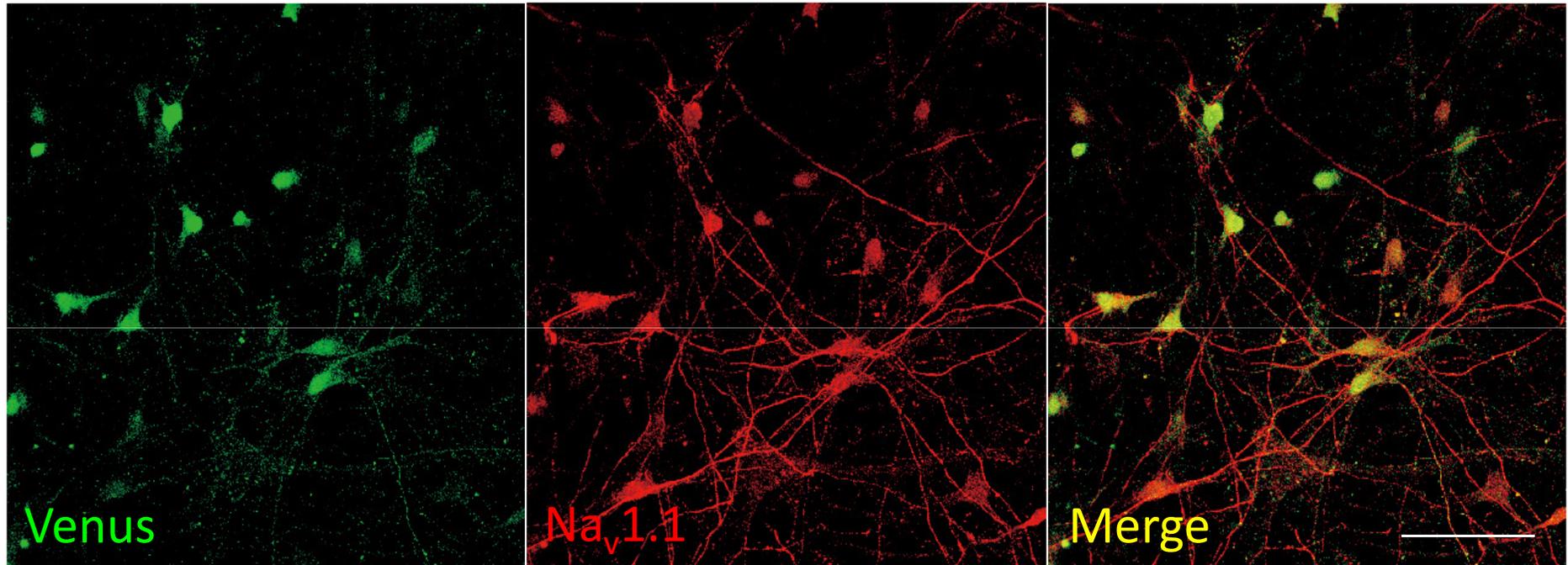
$\text{Na}_v1.1$ 発現細胞のうち、半数以上が抑制性神経細胞であることがわかりました。

SCN1A発現レポーターの作成

SCN1Aを発現する神経細胞がどれかは、そのまま細胞をみてもわかりません。しかし、電気活動を見るためには、それがわかる必要があります。そこで、神経細胞が生きた状態で、その細胞を選択できるレポーターを作成し、ウイルスにより細胞に入れました。



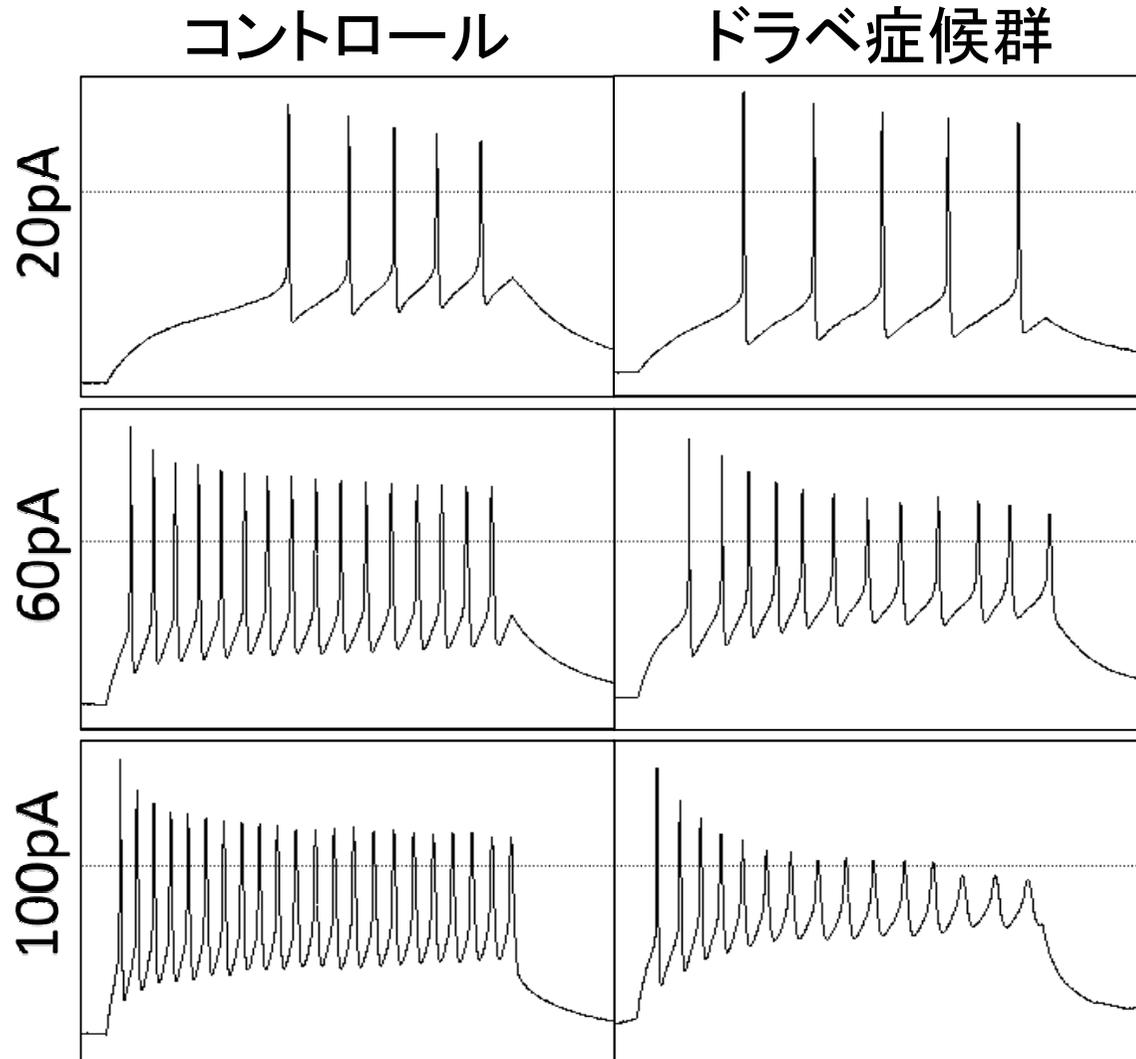
レポーターの蛍光のある細胞における $\text{Na}_v1.1$ 発現



※レポーターによるVenusの検出には、抗GFP抗体を用いています。

SCN1A のレポーターの蛍光が検出できた細胞のうち、多くの細胞で $\text{Na}_v1.1$ の発現が確認できました。つまり、このレポーターがしっかりと目的の細胞を検出していることを意味しています。

iPS細胞から分化させた神経細胞における 活動電位の誘発



ドラベ症候群の神経細胞では、正常人由来のものとは比べ、誘発される電気活動(活動電位、左図の尖った波形)の高さが次第に低くなり、この電気活動の数も少ないことがわかりました。

本研究のまとめ

- 難治てんかんの患者からiPS細胞を作りました。
- てんかんのiPS細胞から分化させた神経細胞では、電気活動の能力が弱くなっていることがわかりました。
→ iPS細胞から分化させた神経細胞は、多くが未熟で、細胞毎の特性のバラツキが大きいため、これまで機能の解析は困難でしたが、我々の用いた方法により、その機能の異常を確認することが出来ました。
- この研究結果は、ドラベ症候群が、GABA作動性抑制性神経細胞の機能が減弱することにより発症する、という、これまでの知見を支持するものでしたが、我々は世界に先駆けて、これを実際の患者様に由来した神経細胞で確認しました。

本研究の今後の展望

- ・今回の結果によって、今後のてんかん研究で、iPS細胞を使って研究をすることが役に立つ可能性が分かりました。
- ・今回は抑制性神経細胞で、その機能障害を確認しましたが、脳には様々な種類の神経細胞があります。
- ・今後は様々な種類の神経細胞について、それぞれの機能を解析していくことが重要です。
- ・これによって、将来的には、これまでマウスを使った研究ではわからなかった、患者様の脳内のみで起こっている、重要なてんかんのメカニズムを発見することが可能となりますので、これまでにない新薬の開発に大きく役立つことが期待されます。