

学位授与番号：乙3075号

氏名：日暮憲道

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成25年12月25日

学位論文名：

患者由来人工多能性幹細胞を用いたヒトドラベ症候群モデルの確立

主論文名：

A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells.

（患者由来人工多能性幹細胞を用いたヒトドラベ症候群モデルの確立）

学位審査委員長：岡野ジェームズ洋尚教授

学位審査委員：加藤総夫教授、井口保之教授

論文要旨

論文提出者名	日暮 憲道	指導教授名	井田 博幸
主論文題名			
A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells (患者由来人工多能性幹細胞を用いたヒトドラベ症候群モデルの確立) Molecular Brain 2013;6:19.			
<p>【背景】ドラベ症候群は、乳児期に発症する難治なてんかん発作に加え、重度の認知障害、自閉症状、行動異常などを伴う破局的なてんかん症候群である。患者の1割以上が、てんかん発作重積を含む何らかの原因により若年で死亡している。本疾患は、電位依存性 Na⁺チャネル Nav1.1 の$\alpha 1$サブユニットをコードする遺伝子、<i>SCN1A</i> の異常により発症する。疾患モデルマウスも作製され、病態解明が進んでいるが、ヒト患者における重要な病態の確認や、有効な治療薬(法)の開発は急務である。近年、種々の疾患において、患者由来人工多能性細胞(iPS細胞)が疾患モデリングに有用であると報告されているが、これまでにてんかんに関する報告はなかった。</p> <p>【方法】ドラベ症候群患者の皮膚より iPS 細胞を樹立した。樹立に際し初期化4遺伝子は、レトロウイルスベクターを用いて皮膚線維芽細胞に導入した。樹立した iPS 細胞は神経細胞へと分化させ、分子生物学的、免疫組織学的、電気生理学的にその特性を解析し、疾患に関連した細胞レベルでの表現型変化を検討した。</p> <p>【結果】ドナー症例は <i>SCN1A</i> 変異 (c.4933C>T) をもつ女性であった。この変異は Nav1.1 を第4相同ドメイン内で切断し、チャネル機能を喪失させるナンセンス変異である (p.R1645*)。本研究で分化させた神経細胞において、Nav1.1 陽性細胞の主体は GABA 作動性ニューロンであった (>50%)。それらの電気生理学的解析では、特に大きな脱分極刺激を与えた際に、患者由来ニューロンにおける活動電位発生能が有意に低下していることが明らかとなった。グルタミン酸作動性ニューロンの出現はわずかであり、その機能解析は困難であった。</p> <p>【結論】本研究結果は、ドラベ症候群患者の脳神経細胞、特に GABA 作動性ニューロンにおける機能低下を示すもので、大脳の GABA 性抑制能の低下が本疾患の主要な病態であるとするモデルマウス研究で示唆された仮説は、ヒト患者においても支持されるものであった。患者由来 iPS 細胞は、てんかんを含む種々の素因性疾患の今後の研究において、有用な研究基盤となりうることが期待された。</p>			

論文審査の結果の要旨

日暮憲道氏の学位申請論文は、主論文 1 編からなり、主論文は「A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells」という題名の英文論文で、2013年に *Molecular Brain* 誌 (IF=4.202)に発表されております。以下、主論文の要旨と審査委員会の審査結果をご報告いたします。

ドラベ症候群は、乳児期に発症する難治なてんかん発作に加え、重度の認知障害、自閉症状、行動異常などを伴う破局的なてんかん症候群です。患者の1割以上が、てんかん発作重積を含む何らかの原因により若年で死亡しています。本疾患は、電位依存性 Na⁺チャネル Na_v1.1 の $\alpha 1$ サブユニットをコードする遺伝子、*SCN1A* の異常により発症することが知られています。ドラベ症候群の疾患モデルマウスも作製され病態解明が進んできていますが、有効な治療薬（法）の開発のためには、ヒト患者における病態の確認は極めて重要であります。近年、種々の疾患において、患者由来人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が疾患モデリングに有用であると報告されていますが、これまでにてんかんに関する報告はありませんでした。そこで、日暮氏は、ドラベ症候群患者の皮膚由来線維芽細胞より iPS 細胞を樹立しました。ドナー症例は *SCN1A* 変異 (c.4933C>T) をもつ女性で、同変異は Na_v1.1 を第 4 相同ドメイン内で切断し、チャネル機能を喪失させるナンセンス変異でした。樹立に際し初期化 4 遺伝子は、レトロウイルスベクターを用いて導入し、iPS 細胞から神経細胞を誘導した後、分子生物学的、免疫組織学的、電気生理学的に患者由来細胞の特性を解析し、疾患に関連した細胞レベルでの表現型変化を検討しました。分化させた Na_v1.1 陽性神経細胞の主体は GABA 作動性ニューロンでした。電気生理学的解析の結果、特に大きな脱分極刺激を与えた際に、患者由来ニューロンにおける活動電位発生能が有意に低下していることが明らかになりました。

本研究結果は、ドラベ症候群患者の脳神経細胞、特に GABA 作動性ニューロンにおける機能低下を示すもので、「大脳の GABA 性抑制能の低下が本疾患の主要な病態である」とするモデルマウス研究で示唆された仮説が、ヒト患者においても支持されるものでした。患者由来 iPS 細胞は、てんかんを含む種々の素因性疾患の今後の研究において有用な研究基盤となりうると結論しました。

去る平成25年12月10日、加藤総夫教授、井口保之教授のご臨席のもと、公開学位審査委員会を開催し、日暮憲道氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験を行いました。

席上、

- ・ ウイルスベクターによる遺伝子導入効率はどうくらいか？
- ・ 分化誘導後のグルタミン酸作動性ニューロンの割合はどうくらいか？
- ・ 病態へのepigeneticな影響の可能性は考えられるのか？
- ・ iPS細胞株間の性質のばらつきは結果の解釈に影響するか？
- ・ コントロールのiPS細胞は細胞供与者の年齢による標準化が行われたか？
- ・ なぜドラベ症候群に注目したのか？
- ・ Nav1.1の細胞内分布は調べたか？また、その細胞内分布と神経機能との関連はあるのか？
- ・ ミオクローヌスてんかんの研究にもiPS細胞を用いた手法が有効と考えるか？
- ・ 患者の遺伝的背景の違いによる実験結果への影響はあるのか？
- ・ 他の電位依存性Na⁺チャネルの遺伝子変異は報告されているのか？

など多くの質問がありましたが、日暮氏は的確に回答いたしました。

その後、加藤総夫教授、井口保之教授と慎重に審議した結果、本論文は学位申請論文として十分価値があるものと認めた次第です。