

論文内容の要旨

論文提出者氏名 一瀬 栄佑

論文題目

Impaired neuronal activity and differential gene expression in *STXBPI* encephalopathy patient iPSC-derived GABAergic neurons

論文内容の要旨

STXBPI 遺伝子は、シナプス前終末における神経伝達物質の開口放出について必要不可欠な分子である、Syntaxin-binding protein 1 (*STXBPI* / *MUNC18-1*) をコードしている。*STXBPI* の病原性変異は大田原症候群、West 症候群などのてんかん性疾患、知的障害、自閉スペクトラム症などの発達障害や、代表的な神経変性疾患である若年性パーキンソン病といった様々な疾患で同定されている。これらの *STXBPI* 変異を原因とする幅広い表現型の疾患群は *STXBPI* 脳症と総称されているが、単一の遺伝子変異によりこのような多彩な症状を来す機序は解明されていない。近年の *Stxbp1*^{+/−}マウスモデルの研究から、*STXBPI* 脳症の要因として GABA 作動性神経の機能障害が示唆されているが、*STXBPI* 脳症患者の GABA 作動性神経の解析を行うことは技術的に困難であり、今まで報告は無い。しかし、近年のヒト幹細胞の技術的革新により、患者由来 induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を特定の神経細胞に選択的分化させて解析する事が可能となった。当教室では以前、*STXBPI* 脳症の患児から iPS 細胞を確立しており、本研究では *STXBPI* 脳症患者由来 iPS 細胞を GABA 作動性神経に選択的分化させ、病態解析を行った。

iPS 細胞を用いた病態解析においては、遺伝子背景が表現型に影響を与えている。そこで、患者由来 iPS 細胞の *STXBPI* 遺伝子変異を CRISPR/Cas9 を用いて修復し、isogenic control として変異修復 iPS 細胞を作成した。そして、患者由来 iPS 細胞、変異修復 iPS 細胞、健常父由来 iPS 細胞に、*ASCL1* と *DLX2* が発現する Tet-On システムを導入し、Doxycycline を添加する事で GABA 作動性神経に分化させた。免疫染色法、RT-qPCR 法およびウエスタンブロット法により、全クローンとも選択的に GABA 作動性神経に分化出来ている事を確認した。さらに RT-qPCR 法およびウエスタンブロット法により、患者 iPS 細胞由来 GABA 作動性神経では *STXBPI* 発現レベルが約 50%、*STXBPI* タンパク質レベルが約 20%低下している事を確認した。こうして、*STXBPI* 脳症患者 iPS 細胞由来 GABA 作動性神経モデルを確立した。

次に、*STXBPI* 脳症患者 iPS 細胞由来 GABA 作動性神経の機能解析のため、Microelectrode array 解析を行った。結果、変異修復、健常父由来 GABA 作動性神経は自発的神経活動が経

時的に増加していった一方、患者由来 GABA 作動性神経では神経分化 8 週後以降、成熟とともに神経活動が低下していった。

更に、*STXBPI* 変異により幅広い表現型を来すメカニズムを解明するため、神経分化 8 週後の iPS 細胞由来 GABA 作動性神経を用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、*STXBPI* 脳症患者由来 GABA 作動性神経において、てんかん、発達障害、神経変性疾患への関連が報告されている遺伝子である、*KCNH1*、*KCNH5*、*CNN3*、*RASGRF1*、*SEMA3A*、*SLAH3*、*INPP5F* の遺伝子発現変動が認められた。

以上のように我々は、*STXBPI* 脳症患者 iPS 細胞由来 GABA 作動性神経に活動性低下を認めることを、ヒト由来神経モデルで初めて確認した。この事は、*STXBPI* 脳症の病態において GABA 作動性神経の機能不全が重要であるという仮説を確固たるものとしている。さらに、*STXBPI* 変異による遺伝子発現の変動が、てんかん、発達障害、神経変性疾患といった *STXBPI* 脳症の幅広い表現型の要因となっていると考えられた。この事は、疾患の病態解明に重要な示唆を与えると共に、将来的には *STXBPI* 脳症の標的治療につながる可能性があると考えられた。