

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： Dravet（ドラベ）症候群患者由来 iPS 細胞を用いた認可医薬品スクリーニングによる革新的な医薬品開発のシーズ探索研究
2. 研究開発代表者： 氏名 廣瀬 伸一（福岡大学）
3. 研究開発の成果

研究目的：

Dravet（ドラベ）症候群の iPS 細胞（人工万能幹細胞）由来神経細胞を用いて、多数の認可医薬品をスクリーニングして治療薬のシーズを探査する研究である。患者由来の iPS 細胞から分化させた神経細胞を使い、ハイスループットの電気生理検査機器で、多数の既存の認可医薬品を網羅的にスクリーニングする。これにより既存薬の適応拡大、またはシーズを見つけて、病態に基づく画期的な治療法の開発に繋げることである。

研究方法：

1. 患者 iPS 細胞から各種神経細胞への分化誘導：樹立した iPS 細胞を興奮性グルタミン酸神経細胞や抑制性 GABA 神経細胞へ分化させ、分子生物学的、免疫細胞化学的、電気生理学的に解析を行い、機能変化の有無を探索する。Dravet（ドラベ）症候群患者の iPS 細胞、および、健常者の iPS 細胞に遺伝子変異を導入した細胞を疾患特異的 iPS 細胞とする。健常者の iPS 細胞と患者 iPS 細胞の遺伝子変異を矯正した細胞を対照とする。
2. 患者 iPS 細胞由来神経細胞を用いた認可医薬品のハイスループットスクリーニング：iPS 細胞を次世代微小電極アレイシステムの 48 穴プレート内で神経細胞に分化させ、認可医薬品 500 種程度を培養液中に加える。患者 iPS 細胞由来の神経細胞の活動電位は対照と比べ低下しており、活動電位の正常化を指標にスクリーニングする。統計上優位な効果を認めた薬剤を候補薬剤として選定する。
3. 患者 iPS 細胞由来神経細胞を用いた電気生理学的な候補薬剤の薬理研究：上記の各種神経細胞を用いて、活動電位の正常化を指標に認可医薬品をスクリーニングする。選抜された薬剤の薬理作用を神経細胞のパッチクランプ法により検証する。また、選抜された薬剤のシナプスへの薬理作用を iPS 細胞からオータップスを形成させることにより、候補薬剤のシナプスへの効果を検証する。ドラベ症候群の *SCN1A* 遺伝子変異による神経ネットワーク形成に対する影響を多角的に解析する。

結果と考察：

ドラベ症候群の患者皮膚より iPS 細胞を樹立し、抑制性の GABA 作動性神経細胞に分化させることに成功した。分化させた神経細胞を健常対照者から同様な方法で得られたそれと比較検討し、その電気生理学的異常を明らかにした。ドラベ症候群における詳細な病態解析を遂行するために、GABA 作動性神経サブタイプへの分化誘導および興奮性のグルタミン酸作動性神経への系譜付けを目指す。

神経細胞への詳細な薬理作用を検証するため、TALEN を用いた *SCN1A* 遺伝子のゲノム編集によりドラベ症候群のアイソジエニックな疾患モデル iPS 細胞群（①：健常対照 iPS 細胞 ②：人工患者 iPS 細胞 ③：ドラベ症候群患者 iPS 細胞 ④：人工健常対照 iPS 細胞）を樹立した。樹立したアイソジエニックな iPS 細胞群の全ゲノムシークエンスより、目的通りのゲノム編集が確認され、また TALEN による off-target 効果は認められなかった。

健常対照およびドラベ患者 iPS 細胞より分化誘導した神経細胞を用いて、次世代微小電極アレイシステムによる電気生理学的特性の測定結果より、健常対照とドラベ患者由来神経細胞では神経のネットワークバースト頻度に差異が見られた。また、これらの神経ネットワークバーストはカリウム過多の条件では興奮性が増大した。次世代微小電極アレイシステムによる分化誘導した神経細胞活動のアッセイ系より、安定的に薬剤スクリーニングが可能となり、神経細胞のネットワークバースト（模擬てんかん作用）

の差異を比べることで、今後の薬剤スクリーニングによる候補薬剤の同定をスムーズに行えるものと思われる。

結論 :

ドラベ症候群の疾患特異的な isogenic iPS 細胞群の樹立および抑制性神経系細胞への分化誘導系が整い、病態に基づいたアッセイが可能となりつつある。当研究グループ内において創薬スクリーニングを効率的に行う方法が確立しつつあり、今後、創薬シーズの同定が期待される。

4. その他