

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Exploratory investigation for seeds of evolutionary drug developments by drug repositioning with iPS cells derived from Dravet syndrome patients.
- 研究開発担当者 (日本語) 廣瀬 伸一
所属 役職 氏名： (英語) Shinichi Hirose,
Professor and Chairman Department of Pediatrics School of Medicine,
Fukuoka University
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

ドラベ症候群は最も難治性のもてんかん性脳症の一つで乳児期に発症する稀少難病である。一般的に乳児期中期に発熱に伴いけいれん重積として発症する。罹患小児は発症までの発達は正常であるが、頻回のけいれんを来し、やがて重度の精神発達を呈する。既存の抗てんかん薬はけいれん発作に、ほぼ無効であり、精神発達の遅れを止めることはできない。また、突然死の頻度は高く、患者本人や家族の病脳ははかりしれない。このため、分子病態に基づく革新的な抗てんかん薬の開発が望まれている。原因としてNa⁺チャネルの $\alpha 1$ サブユニットをコードするSCN1A遺伝子のヘテロ変異が報告されているが、詳細な病態は緒に就いたばかりであり、分子病態に基づく治療薬の開発が行えていない。本研究ではドラベ症候群の疾患特異的人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用いて既存認可薬をハイスループットでスクリーニングしてドラベ症候群の病態に基づく革新的医薬品の開発シーズ探索をめざし実施された。

初年度からは、複数の患者由来 iPS 細胞の樹立を行った。ドラベ症候群では現在までに 900 に及ぶ様々な SCN1A 遺伝子変異が報告されている。遺伝子型で多様なドラベ症候群に対し普遍的に効果がある医薬品を開発するために、遺伝子型が異なる複数の患者由来 iPS 細胞が必要であった。このため、典型的なドラベ症候群を来す、SCN1A 遺伝子変異のトランケーション変異を $\alpha 1$ サブユニットの異なる部位に有する3名の患者の皮膚繊維芽細胞より、iPS細胞の樹立を行った。その後、現在までにiPS細胞の品質確認を行い実験に供することができることを確認した。

続く年度からは上記と並行して、SCN1A 遺伝子変異以外遺伝学的に同一な、疾患特異的な iPS 細胞または、健常対照 iPS 細胞を得るために遺伝子編集技術で健常対照 iPS 細胞にドラベ症候群の SCN1A 遺伝子変異のトランケーション変異を導入した iPS 細胞（人工患者 iPS 細胞）、またドラベ症候群の患者由来の iPS 細胞の変異を矯正した iPS 細胞（人工健常 iPS 細胞）の作成を、TALEN 遺伝子編集技術で実施し、いずれの細胞も得ることに成功した。現在前項で樹立した複数のドラベ症候群の患者由来の iPS 細胞に対して、CRISPR/Cas9 を利用して遺伝子編集を実施中である。

初年度から最終年度を通じて、iPS 細胞を用いて既存認可薬をハイスループットでスクリーニングする方法として、マエストロ微小電極アレイシステムを設置して、まず 6 ウエルプレート内を用いて iPS 細胞を神経細胞に分化させ電気信号がとれるか観察した。これを正確に行うため iPS 細胞をグルタミン酸系あるいは GABA 系の、すなわち興奮性、抑制系性の神経細胞に選択的かつ正確に分化誘導する方法を新規に開発した。実際にドラベ症候群疾患特異的な iPS 細胞と対照 iPS 細胞を本手法にてマエストロ微小電極アレイシステムプレート内で分化させることに成功した。これを用いて、分化神経細胞の自発発火による活動電位を興奮性、抑制系性の神経細胞別にマエストロ微小電極アレイシステムで観察したところ、抑制系性の神経細胞の活動が対照のそれにくらべて有意に低下していることを観察した。この所見はすでに我々が別個の方法で分化誘導した疾患特異的 iPS 細胞を用いて、パッチクランプ法で観察した電気生理学的所見と一致していた。すなわち、マエストロ微小電極アレイシステムで抑制系分化誘導した神経細胞の自発発火を指標に既存認可薬をハイスループットでスクリーニングできることが実証できた。現在、FDA 認可 500 種の医薬品のスクリーニングを準備中である。

Dravet syndrome is one of the most devastating epileptic encephalopathies and a rare intractable disease. In general, the disease onset is with status epilepticus observed in the middle of infancy. The patients show a normal psychomotor development until the onset. The frequent seizure attacks followed and profound psychomotor development delay becomes evident. Most conventional

antiepileptic drugs are not effective very much and do not prevent the cognitive deficit. Also, the rate of sudden death is substantially high among the patients. Thus, Dravet syndrome afflicts not only patients themselves but also their care givers. The development of evolutionary drugs, which are developed based upon the molecular pathomechanism of Dravet syndrome, has been urged. As the cause of Dravet syndrome, heterozygous mutations in *SCN1A*, the gene encoding the $\alpha 1$ subunit of neuronal sodium ion channel, Nav1.1 have been reported. Still, the meticulous studies on the molecular pathomechanisms have been just initiated and hence the development of drugs based on the pathomechanism is yet to be underway. The objective of this study is to explore potential seeds of evolutionary drugs for Drave syndrome using high-throughput screening with induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from Dravet syndrome.

From the first year of this study, iPSCs were established from multiple patients with Dravet syndrome patients. In Dravet syndrome, there are various types of *SCN1A* mutations as many as 900. To develop universally effective drugs for Dravet syndrome caused by various genotypes, it is necessary to establish multiple iPSC lines with different *SCN1A* mutations. To this end, iPSCs have been established from skin fibroblasts derived from three Dravet syndrome patients, each of who has a truncation *SCN1A* mutation, a mutation resulting in the typical Dravet syndrome phenotype, at different locations of the $\alpha 1$ subunit of Nav1.1. The quality validation has been done for the established iPSCs and the cells are to be used for the following high-throughput drug screening.

In the following years in the research period, to obtain reference iPSCs bearing identical genetic background except for disease causing *SCN1A* mutations, gene editing technologies were exploited. Thus, *SCN1A* mutations were introduced to iPSCs established from healthy individuals to generate “artificial patient iPSCs”. In turn, *SCN1A* mutations of the patient derived iPSCs were repaired to generate “artificial healthy iPSCs”. These were successfully done with the TALEN gene editing technology. Now, the iPSCs established from multiple Dravet syndrome patients as described are subject to generation of “artificial healthy iPSCs” with the CRISPR/Cas9 gene editing technology.

Throughout the research period, we continuously investigated whether the electrophysiological recording is readily conducted with neurons derived from iPSC on the MAESTO multi micro electrode system, high-though put apparatus. The electrophysiological activities of the neurons were observed in a 6-well-plate as a pilot study whereas the actual high-throughput drug screening is to be done in a 48 or 96 well plate. To conduct this experiment either with excitatory or inhibitory neurons, we have newly established methods to differentiate iPSCs selectively and precisely either into Glutamatergic and GABAergic neurons. In fact, such defferentiation of Dravet syndrome iPSC were successfully achieved in wells of the culture plates for the MAESTO multi micro electrode system. Using this method, we have shown that the number of action potentials in the spontaneous firing of the Drave syndrome derived inhibitory neurons reduced significantly compared with that of the control neurons. This finding well accords with our previous findings of the patch clump electrophysiological studies on the inhibitory neurons derived conventionally from Dravet patient iPSCs. Thus, these findings clearly indicate that high-throughput screening for FDA approved drugs can be readily done with inhibitory neurons differentiated in a well on the MAESTO multi micro electrode system. Now, the screening is underway preparing 500 FDA approved drugs.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4 件、国際誌 7 件)

1. Takaori T, Kumakura A, Ishii A, Hirose S, Hata D. Two mild cases of Dravet syndrome with truncating mutation of SCN1A. *Brain Dev.* 2017;39(1):72-4.
2. Ishii A, Watkins JC, Chen D, Hirose S, Hammer MF. Clinical implications of SCN1A missense and truncation variants in a large Japanese cohort with Dravet syndrome. *Epilepsia.* 2017;58(2):282-90.
3. Ishii A, Kang JQ, Schornak CC, Hernandez CC, Shen W, Watkins JC, Macdonald RL, Hirose S. A de novo missense mutation of GABRB2 causes early myoclonic encephalopathy. *J Med Genet.* 2017;54(3):202-11.
4. Shi XY, Tomonoh Y, Wang WZ, Ishii A, Higurashi N, Kurahashi H, Kaneko S, Hirose S, Epilepsy Genetic Study Group J. Efficacy of antiepileptic drugs for the treatment of Dravet syndrome with different genotypes. *Brain Dev.* 2016;38(1):40-6.
5. Meisler MH, Helman G, Hammer MF, Fureman BE, Gaillard WD, Goldin AL, Hirose S, Ishii A, Kroner BL, Lossin C, Mefford HC, Parent JM, Patel M, Schreiber J, Stewart R, Whittemore V, Wilcox K, Wagnon JL, Pearl PL, Vanderver A, Scheffer IE. SCN8A encephalopathy: Research progress and prospects. *Epilepsia.* 2016;57(7):1027-35.
6. Ju J, Hirose S, Shi XY, Ishii A, Hu LY, Zou LP. Treatment with Oral ATP decreases alternating hemiplegia of childhood with de novo ATP1A3 Mutation. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):55.
7. Ihara Y, Tomonoh Y, Deshimaru M, Zhang B, Uchida T, Ishii A, Hirose S. Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations. *PLoS ONE.* 2016;11(2):e0150095.
8. 日暮憲道、廣瀬伸一. PCDH19 関連症候群の診断. *新薬と臨床.* 2017;66(2):61-5.
9. 渡邊恵理、小野澤佳織、藤田貴子、友納優子、井原由紀子、安元佐和、西小森綾太、平家俊男、廣瀬伸一. 14歳時に確定診断された SAMHD1 遺伝子変異による Aicardi-Goutières 症候群の臨床経過. *脳と発達 別冊.* 2017;49(1):51-2.
10. 田中泰圭、廣瀬伸一、ドラベ症候群 iPS 細胞モデルを用いた病態解析. *RESEARCH.* 2016;21(2):11-3.
11. 松下浩、岡野創、石井敦士、廣瀬伸一、PRRT2 遺伝子異常があり乳幼児期に多彩なてんかん発作を認めた 1 女児例. *脳と発達 別冊.* 2016;48(5):351-4.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. How to interpret the results of a genetic test for epilepsy, 口頭, Hirose S. 11th Asian & Oceanian epilepsy congress, 2016.5/13-16 Hong Kong 国外
2. Predictions of regression of intellectual disability and measuring efficacy of medication in 286 Japanese cohort of Dravet syndrome with SCN1A missense and truncation mutations 口頭, Ishii A, Watkins J C, Chen D, Hirose S. Hammer M F, the Japanese Febrile Seizures and Epilepsy Working Group. 11th Asian & Oceanian epilepsy congress, 2016.5/13-16 Hong Kong 国外
3. Genetic predisposition to acute encephalopathy with status epilepticus. ポスター発表, Saitoh M, Hoshino A, Ishii A, Ihara Y, Hirose S. Mizuguchi M, The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders (ISAE2016) 2016.7/1-7/3 東京 国内
4. A case of Dravet syndrome affected an acute encephalopathy. ポスター発表 Sokoda T, Nishizawa Y, Matsui J, Nishikura N, Takano T, Takeuchi Y, Ishii A, Hirose S. The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders (ISAE2016) 2016.7/1-7/3 東京 国内
5. The effect of steroid pulse therapy on a case of Dravet, ポスター発表, Fujita T, Ideguchi H, Watanabe E, Tomonoh Y, Ihara Y, Inoue T, Takahashi Y, Hirose S. The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders (ISAE2016) 2016.7/1-7/3 東京 国内
6. Characteristics of SCN1A Mutation locations in a Cohort of 285 Japanese Dravet Syndrome Patients, ポスター発表, Ishii A, Watkins J, Chen D, Hirose S. Hammer M AES Annual Meeting 2016.12/2-12/6 アメリカ 国外
7. Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in intractable childhood disorders 口頭 Hirose S. / 10th Annual World Congress on Pediatrics, Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2017.3.23-25 アメリカ 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願