脳オルガノイドを用いた遺伝性てんかんの病態解明

―神経活動異常をアンチセンス核酸で軽減―

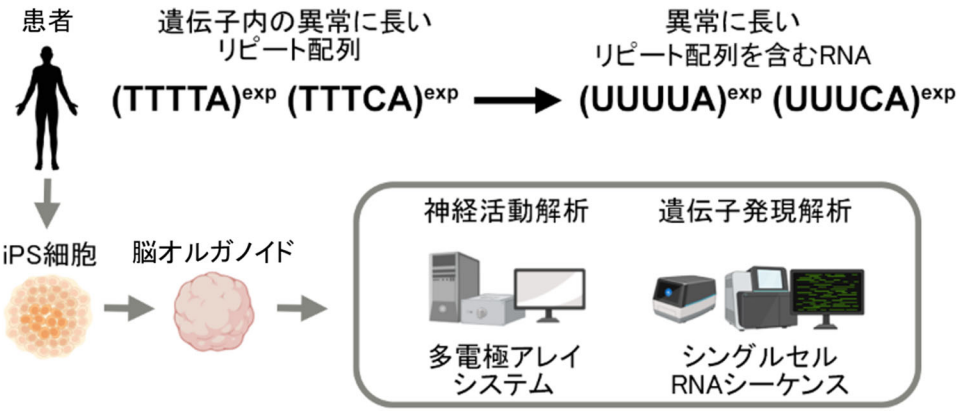
概要

理化学研究所（理研）バイオリソース研究センターiPS 創薬基盤開発チームの菅三佳研究員、井上治久チームディレクター（京都大学 iPS 細胞研究所教授）、京都大学大学院医学研究科の池田昭夫教授（研究当時）、松本理器教授、高橋良輔教授（研究当時）、東北工業大学工学部の鈴木郁郎教授、京都大学 iPS 細胞研究所の山本拓也教授らの共同研究グループは、遺伝性てんかんの原因に関わるRNA[1]を標的とする核酸医薬候補「アンチセンス核酸（ASO）[2]」を設計し、患者由来の「脳オルガノイド[3]」で過剰な神経活動を軽減できることを示しました。

本研究成果は、発作を抑える既存の薬に加え、病気の原因に働きかける治療法の開発につながることが期待されます。

本研究は、病気の再現から、原因に働きかける治療候補の設計と効果の検証までを、良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん（BAFME）[4]の患者由来の iPS 細胞[5]を使って進めた成果です。共同研究グループは、患者由来の iPS 細胞から大脳皮質[3]に似た立体的な組織の脳オルガノイドを作製し、神経細胞が興奮しやすい病態を再現し、その背景にある分子メカニズムを調べました。さらに、病気に関わる RNA に結合する ASO を加えることで、神経活動の異常を軽減できることを見いだしました。

本研究は、科学雑誌『*Cell Reports Medicine*』オンライン版（11 月 13 日付：日本時間 11 月 14 日）に掲載されました。



BAFME 患者由来 iPS 細胞から作製した「脳オルガノイド」の神経活動と遺伝子の働きを解析

背景

脳では、多くの神経細胞が電気信号や化学物質を使って情報をやりとりしています。てんかんは、この活動が一時的に乱れることで発作を繰り返す病気です。現在の薬は、多くの患者で発作を抑える効果を示します。一方、病気の原因その

ものに働きかける治療法を開発するには、神経活動が乱れる仕組みを明らかにする必要があります。良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん（BAFME）は、家族内で受け継がれる遺伝性てんかんの一つです。病名には「良性」とありますが、年齢とともに症状が強くなり、病気の進行を抑える治療法の開発が求められています。

2018 年には、日本の研究などによって、この病気の原因として遺伝子内に 5 塩基（TTTTA（T はチミン、A はアデニン）および TTTCA（C はシトシン））のリピート配列（繰り返し配列）が異常に増えることが明らかになりました[注)]。遺伝子の情報は RNA へと写し取られます。BAFME では、異常に長いリピート配列を含む RNA が細胞の核の中に凝集した塊として、患者の脳で見つかっています。この RNA が神経細胞の働きを妨げる可能性が考えられてきましたが、神経活動の異常につながる過程は分かっていませんでした。

その解明には、患者の遺伝的特徴を保った細胞で、神経細胞同士のつながりと活動を調べる必要があります。しかし、生きた患者の脳組織を取り出して研究することは難しく、病気の特徴を十分に再現する動物モデルも確立されていません。そこで共同研究グループは、さまざまな細胞へ変化できる iPS 細胞を用いて、患者の脳の特徴の一部を培養皿の中で再現することに取り組みました。

注）2018 年 12 月 7 日東京大学の解説ページ「てんかんの新しい発症機構の解明」
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0508_00052.html
2018 年 3 月 6 日日本医療研究開発機構のプレスリリース「てんかんの新しい発症機構の解明」
https://www.amed.go.jp/news/release_20180306-04.html

研究手法と成果

共同研究グループは、BAFME の患者の血液細胞から iPS 細胞を作製し、神経細胞などから成る立体的な組織を培養皿の中で培養しました。この組織は「脳オルガノイド」と呼ばれ、脳の表面にある大脳皮質の細胞構成や構造の一部を再現します。

患者由来と健常者由来の脳オルガノイドは、いずれも神経細胞を含む層状の構造を形成しました。一方、患者由来の脳オルガノイドでは、細胞の核の中に RNA の凝集体が見られました（図 1）。これは、患者の脳で報告されている特徴と共通するものでした。

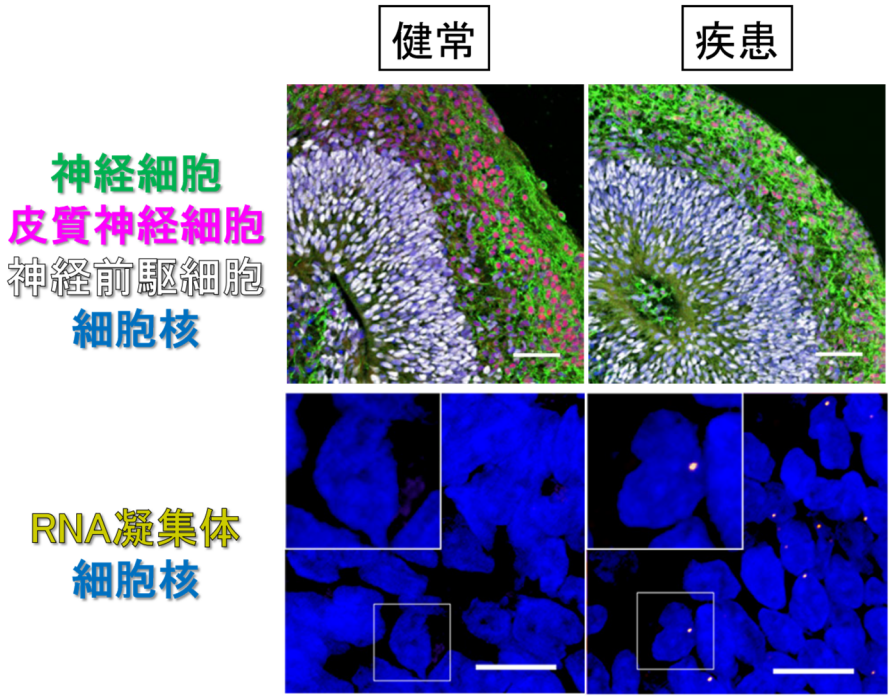


図 1 患者由来の脳オルガノイドに集積するリピート RNA 凝集体

（上）脳オルガノイドの断面の染色像。神経前駆細胞の層の外側に皮質神経細胞の層が形成される。神経細胞（緑）、皮質神経細胞の細胞核（赤紫）、神経前駆細胞の細胞核（白）、細胞核（青）。脳オルガノイドの組織内では細胞が整列して立体的な層構造が形成される。スケールバーは 100 マイクロメートル（μm、1μm は 100 万分の 1 メートル）。（下）脳オルガノイド内部の細胞の細胞核の染色像。BAFME の患者由来の iPS 細胞から作製した脳オルガノイド（疾患）の細胞では、細胞核（青）の中に、長いリピート配列を持つ異常な RNA の凝集体（黄）が集積する。スケールバーは 20μm。

次に、培養皿上に小さな電極を並べた「多電極アレイシステム[6]」を使い、組織内の神経細胞が生み出す電気信号を測定しました（図 2A）。この装置では、神経細胞の発火に伴う短い信号である「スパイク」と、周囲の神経細胞の活動が重なって生じる「局所場電位（LFP）[7]」を同時に記録できます。スパイクは発火の回数やタイミングを、LFP は神経細胞集団の活動のリズムや強さを調べる手掛かりになります。約 6 カ月培養した脳オルガノイドでは、LFP の波形に繰り返し現れるヒトの脳波のような振動性の活動が観察され、患者由来の組織は健常者由来の組織よりも過剰に活動していました（図 2B）。

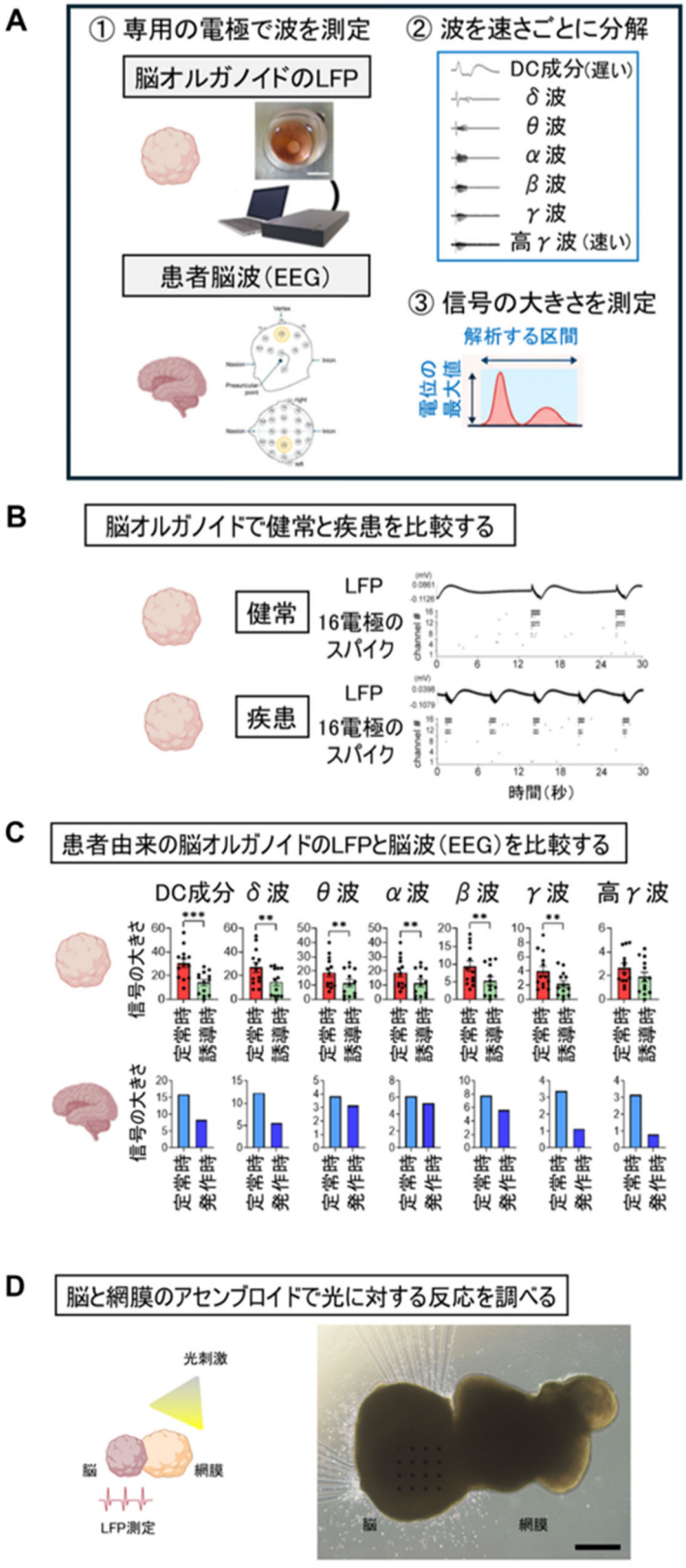


図 2 脳オルガノイドの神経ネットワーク活動の解析

（A）解析の概要。16 電極の多電極アレイシステムを用いて脳オルガノイドの神経活動を解析し、患者の

脳波との比較を行う。（B）神経細胞集団の活動を示す LFP の波形は局所の神経発火スパイクが同期するときにピークを迎える。BAFME の患者由来の脳オルガノイド（疾患）では、健常由来の脳オルガノイドに比べて LFP の波形の間隔が狭くなっており、神経細胞の振動性の活動が過剰になっている。（C）患者由来の脳オルガノイドで、薬剤を用いてさらに過剰な神経活動を誘導したとき、それぞれの速さの波の大きさが小さくなった。この変化は、ミオクローヌスが起こったとき（発作時）に患者の脳波で観察された変化と共通していた。「＊＊」有意水準 1%での有意差あり、「＊＊＊」有意水準 0.1%での有意差あり。（D）脳オルガノイドと網膜オルガノイドを接続したアセンブロイド。これを用いて光で網膜を刺激した際に脳の神経ネットワーク（LFP）が変化するかを調べる。スケールバーは 500μm。

この脳オルガノイドの LFP と患者の脳波の波形を詳しく解析し、脳オルガノイドで人工的に発作を誘導したときと、ミオクローヌス[4]を起こしたときの患者の脳波の共通点を探りました（図 2C）。さらに、脳オルガノイドと網膜オルガノイドを接続したアセンブロイド[8]をつくり、光の刺激によって脳オルガノイドの LFP の波形が変化するかどうかを調べる実験システムをつくりました（図 2D）。アセンブロイドでは、光刺激後に LFP が変化する様子が観察され、光が発作のきっかけとなる光感受性てんかん[9]の研究モデルにつながる第一歩となりました。

次に、過剰な神経細胞の活動の背景を調べるため、細胞を一つずつ解析し、どの遺伝子がどの程度働いているかをシングルセル RNA シーケンス[10]で調べました。その結果、患者由来の神経細胞では、神経細胞間で興奮を伝える仕組みに関わる遺伝子の働きに変化が生じ、特に、興奮信号を受け取る「AMPA 受容体[11]」の機能が変化していることが予測されました。そこで、神経細胞を調べると、AMPA 受容体が集まった小さな構造が患者由来の組織では増えていました（図 3）。AMPA 受容体の働きを抑える薬ペランパネル[12]を組織に加えると、神経細胞の過剰な活動が抑えられました。これらの結果から、AMPA 受容体を介した情報伝達が、BAFME の神経細胞の過剰な活動に関わる可能性が示されました。

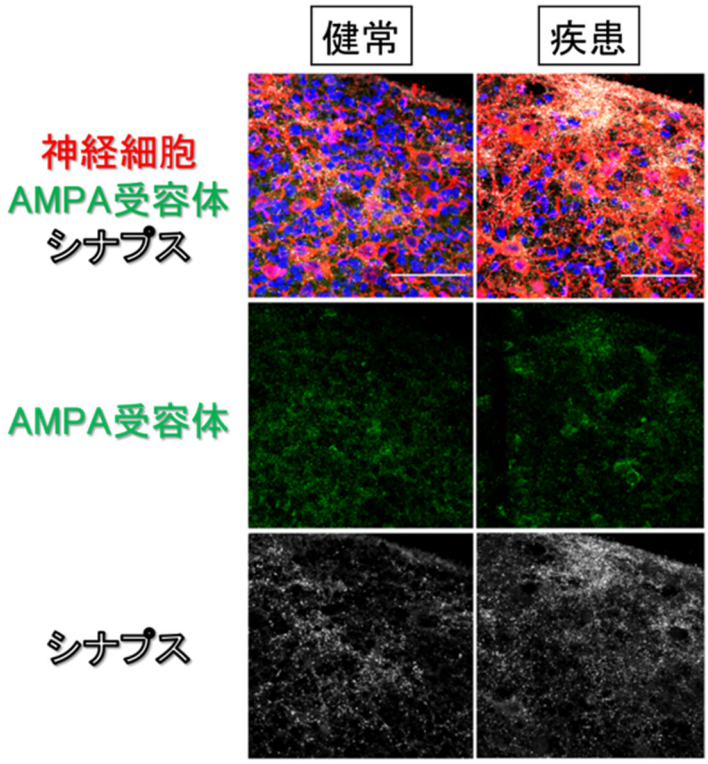


図 3 脳オルガノイドの神経細胞における AMPA 受容体の分布

BAFME の患者の iPS 細胞から作製した脳オルガノイド（疾患）では、神経細胞（赤）のシナプス（白）と AMPA 受容体（緑）の密度が増えている。スケールバーは 50μm。

さらに、共同研究グループは、異常に長いリピート配列を持つ RNA を標的とする「アンチセンス核酸（ASO）」を用いて、神経細胞の活動が変化するかを検証しました。この ASO は、患者由来の大脳皮質神経細胞で核内に集積する異常な RNA の働きを抑制すると考えられます。患者由来の iPS 細胞から作製した脳オルガノイドに、この ASO を投与することにより神経細胞の過剰な活動が軽減しました（図 4）。病気に関わる RNA を標的とすることで、神経細胞の集団の活動異常を軽減できることが示されました。

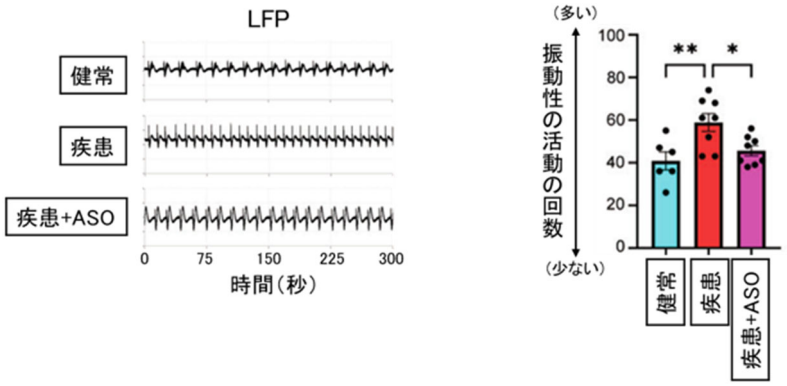


図 4 アンチセンス核酸（ASO）による脳オルガノイドの神経活動の変化

脳オルガノイドの神経細胞集団の振動性の活動の測定。BAFME の患者由来の iPS 細胞から作製した脳オルガノイドでは、健常者由来の脳オルガノイドに比べて神経細胞集団の振動性の活動が異常に活発になるが、リピート配列を持つ RNA を標的とする ASO を 14 日間投与することにより抑制されることが示された。「＊」有意水準 5%での有意差あり、「＊＊」有意水準 1%での有意差あり。

今後の期待

本研究では、患者由来の iPS 細胞を使い、BAFME に特徴的な RNA 凝集体の蓄積と神経活動の異常を同じ実験系で調べられるようになりました。これにより、遺伝子のリピート配列（繰り返し配列）の異常が神経細胞の働きを乱す仕組みを詳しく調べ、治療薬の効果を神経活動の変化として評価できるようになると期待されます。また、病気の原因そのものに働きかける治療法の開発につながることが期待されます。

論文情報

＜タイトル＞
Expanded Repeat RNAs Drive Aberrant Cortical Network Activity in Benign Adult Familial Myoclonus Epilepsy
＜著者名＞
Mika Suga, Takayuki Kondo, Keiko Imamura, Nami Nagafuku, Yuto Ishibashi, Mio Kabata, Ran Shibukawa, Yaya Taketsuna, Kayoko Tsukita, Katsuya Kobayashi, Takashi Ayaki, Takefumi Hitomi, Ikuro Suzuki, Taro Tsujimura, Takuya Yamamoto, Ryosuke Takahashi, Riki Matsumoto, Akio Ikeda, Haruhisa Inoue
＜雑誌＞
Cell Reports Medicine
＜DOI＞
10.1016/j.xcrm.2026.103168

補足説明

[1] RNA
遺伝子（DNA）の情報を写し取るなどの役割を持つ物質。タンパク質の設計図になるものだけでなく、細胞の働きを調節するものもある。本研究では、異常に長いリピート配列（繰り返し配列）を含む RNA を標的とした。

[2] アンチセンス核酸（ASO）
主に RNA の働きを制御する薬であり、標的遺伝子の RNA に相補的な塩基配列から成る 1 本鎖の核酸（DNA や RNA）である。ASO は antisense oligonucleotides の略。

[3] 脳オルガノイド、大脳皮質
オルガノイドは培養皿の中で幹細胞からつくるミニチュアの臓器。幹細胞の持つ自己複製能と分化能を利用して、自己組織化させることで 3 次元的な組織様構造体として形成される。大脳皮質は大脳の表層を覆う神経細胞の薄い層で、思考、知覚、随意運動といった人間の高度な神経活動（高次脳機能）をつかさどる。本研究では大脳皮質の細胞構成や構造の一部を再現した脳オルガノイドを作製した。

[4] 良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん（BAFME）、ミオクローヌス

BAFME は、主に成人期に、手の震え、体の一部が突然ぴくつく動き、てんかん発作などが現れる遺伝性の病気。家族性成人型ミオクローヌスてんかん（FAME）とも呼ばれる。ミオクローヌスは、筋肉が突然収縮して生じる短いぴくつきを指す。BAFME は Benign Adult Familial Myoclonus Epilepsy の略。

[5] iPS 細胞

人工多能性幹細胞。体を構成するほぼ全ての種類の細胞へ変化（分化）する能力を多能性といい、脊椎動物の初期胚などに見られる。多能性を持ち、試験管内で培養して無限に増やすことができる細胞を多能性幹細胞という。iPS 細胞は、血液や皮膚などの体細胞に初期化因子を導入して人工的に作製した多能性を持つ幹細胞である。

[6] 多電極アレイシステム

培養皿上に多数の微小電極を配置し、神経細胞が生み出す電気信号を、複数の場所で継続的に記録する装置。神経細胞の発火に伴う短い電気信号である「スパイク」と、周囲の神経細胞の活動が重なって生じる「局所場電位（LFP）」（[7]参照）を同時に測定できる。スパイクからは、発火の回数や複数の場所で同じタイミングに活動する程度を、一方、LFP からは、神経細胞集団の活動のリズムやその強さの変化を、調べられる。両者を組み合わせることで、神経細胞がどの程度活発に働き、集団としてどのような活動をしているかを解析できる。

[7] 局所場電位（LFP）

電極の周囲にある神経細胞の活動によって生じる、細胞の外側の電位の変化。主に、神経細胞同士の接続部であるシナプスでの信号の受け渡しに伴う電流を反映し、複数の細胞の活動が重なった波形として記録される。短い電気信号であるスパイクに比べて、ゆっくりした変化を中心に捉える。1 秒に 1 回未満の変化から、数十～数百回の速い変化まで、幅広い成分を含み、波形を周波数ごとに分けると、デルタ帯域、アルファ帯域、ベータ帯域、ガンマ帯域などの成分の強さを調べることができ、神経細胞集団の活動がどのように変化したかを評価できる。LFP は local field potential の略。

[8] アセンブロイド

アセンブロイド（assembloid）とは、英語の「assemble（組み立てる）」と「organoid（オルガノイド：幹細胞からつくった立体的なミニ臓器）」を組み合わせた造語。複数の異なるオルガノイドを 3 次元的に組み合わせて共培養し、組織や臓器のより複雑なつながりを試験管内で再現できる。

[9] 光感受性てんかん

光刺激によって発作が誘発される特殊なてんかん。光過敏てんかんともいう。1997 年にテレビアニメ『ポケットモンスター』の番組内で使用された激しい光の点滅に反応した一部の視聴者が体調不良により救急搬送された事案は、この特殊な反応に社会的関心が集まるきっかけとなった。BAFME では、光刺激によって脳波に特徴的な異常波形が現れるため、診断基準の一つになっている。

[10] シングルセル RNA シーケンス

細胞を一つずつ分け、それぞれの細胞でどの遺伝子がどの程度働いているかを、RNA の種類と量から調べる方法。さまざまな細胞が混在する組織でも、細胞の種類を見分

け、どの細胞にどのような変化が生じているかを詳しく解析できる。

[11] AMPA 受容体
脳内の情報処理の中心的な役割を担う神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体の一つであり、シナプス膜上にイオンチャネルを形成する。人工アミノ酸である AMPA（α-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸）を選択的に受容することから名付けられた。グルタミン酸が AMPA 受容体に結合すると、細胞内にイオンが流入しシナプスが応答するため、シナプス膜上の AMPA 受容体の数が増えるとさらに応答が増強する。

[12] ペランパネル
神経細胞の表面で興奮信号を受け取る AMPA 受容体の働きを抑える抗てんかん薬の一つ。神経細胞同士の過剰な興奮信号の伝達を抑えることで、てんかん発作を抑制する。本研究では、患者由来の脳オルガノイドに加えると、過剰な神経活動が抑えられることを確認した。

共同研究グループ

理化学研究所　バイオリソース研究センター　iPS 創薬基盤開発チーム
研究員　菅　三佳（スガ・ミカ）
チームディレクター　井上治久（イノウエ・ハルヒサ）
（京都大学　iPS 細胞研究所　教授）

京都大学
大学院医学研究科
てんかん・運動異常生理学講座
教授（研究当時、現　客員研究員）　池田昭夫（イケダ・アキオ）
（現　脳病態生理学講座　臨床神経学分野　臨床教授）
脳病態生理学講座　臨床神経学分野
教授　松本理器（マツモト・リキ）
教授（研究当時）　高橋良輔（タカハシ・リョウスケ）
（現　多系統萎縮症治療学講座　特定教授、京都大学副学長、総合研究推進本部本部長、京都大学名誉教授）
iPS 細胞研究所　未来生命科学開拓部門
教授　山本拓也（ヤマモト・タクヤ）

東北工業大学　工学部　電気電子工学課程
教授　鈴木郁郎（スズキ・イクロウ）
（理研　バイオリソース研究センター　iPS 創薬基盤開発チーム　客員研究員）

研究支援

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）再生・細胞医療・遺伝子治療プロジェクト「レジストリ連携による神経変性疾患 iPS 細胞コホートの構築と整備（研究代表者：井上治久、JP22bm0804034）」「次世代医療を目指した再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発拠点（研究代表者：髙橋淳、JP23bm1323001）」「次世代染色体工学による巨大

ヒト疾患ゲノム構造の in vivo 再構成と発症機構解析（研究代表者：香月康宏、26bm1423041）」、キヤノン財団による助成を受けて行われました。