

平成30年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06701

研究課題名(和文)mTORシグナル活性化マウスによる神経機能の解析および疾患モデルの確立

研究課題名(英文)Analysis of mTOR signaling in central nervous systems

研究代表者

葛西 秀俊(Kasai, Hidetoshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：40403232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小脳プルキンエ細胞におけるmTORシグナルの役割を明らかにするために、プルキンエ細胞特異的に活性化型mTORを発現するトランスジェニックマウスの作製・解析を行った。このマウスでは、プルキンエ細胞の細胞体および樹状突起が顕著に肥大化しており、離乳期を過ぎるとプルキンエ細胞のアポトーシスによる細胞死が観察された。プルキンエ細胞の変性に伴い、このマウスは運動失調を呈するようになったが、自閉症様の社会行動異常は観察されなかった。これらの結果より、小脳プルキンエ細胞においてmTORシグナルは細胞の生存およびサイズを制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to examine mTOR functions in cerebellar Purkinje cells (PCs) by establishing a mouse model of chronically activated mTOR pathway in PCs. Using constitutively active mTOR, we established double transgenic mice line, in which active mTOR mutant is expressed specifically in PCs (L7-mTOR Tg mice). Immunohistochemical analysis showed that PCs of L7-mTOR Tg mice were remarkably hypertrophied and significantly decreased in their number at 4 weeks of age. Molecularly, L7-mTOR Tg PCs were immunopositive for cleaved caspase 3 and HIF-1 $\alpha$ , suggesting that PC loss by mTORC1 activation may be caused by apoptotic cell death via hypoxic stress signaling. Behavioral analyses revealed that L7-mTOR Tg mice displayed impaired motor coordination, but normal social behavior. Together, these results indicate that mTORC1 signaling is essential for PC survival and cerebellar functions.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：mTOR トランスジェニックマウス 小脳

## 1. 研究開始当初の背景

mTORは進化的に保存されたセリン/スレオニンキナーゼで、mTORC1およびmTORC2と呼ばれる異なる2つのタンパク質複合体として機能する。mTORC1は成長因子やアミノ酸などに応答して活性化し、タンパク質合成やオートファジーを介して細胞成長やエネルギー恒常性など様々な細胞機能を制御している。mTORC1シグナルの破綻はがんや糖尿病などにおいて見出され、中枢神経系においては結節性硬化症・神経変性疾患・自閉症・てんかんといった多様なヒトの疾患との関連が示唆されている。特に自閉症は社会的にも非常に関心の高い疾患で、社会性やコミュニケーション能力の障害や反復行動などを発症する広汎性発達障害である。一卵性双生児の研究によって、遺伝的要素が比較的高いことが示唆されており、原因遺伝子としてFMR1、PTEN、TSC1/2などが既に同定されている。これらの遺伝子産物はmTORC1シグナルの調節因子であることから、mTORC1が自閉症の発症に深く関与している可能性が示唆されているが、明確な根拠は未だに得られていない。したがって、mTORが関連する疾患モデル動物を樹立・解析することは、いかにして栄養シグナルの破綻が多様な神経症状を引き起こすのかという臨床医学の重要問題につながるとともに、脳機能におけるmTORシグナルの役割を理解するという基礎医学的な観点においても非常に興味深い研究である。

## 2. 研究の目的

本研究では小脳プルキンエ細胞におけるmTORC1シグナルの機能を検証する。小脳は運動協調や運動学習を司る脳領域であり、運動機能・長期抑圧・シナプス刈込みといった解析方法が既に確立されており、様々な神経機能のメカニズムを分子・細胞・個体レベルで明らかにする上で有用なモデルとなる脳領域である。さらに、一部の自閉症の患者において小脳の形態異常やプルキンエ細胞の脱落が報告されていることから、小脳機能と自閉症様症状との関連も示唆されている。そこで、プルキンエ細胞特異的に活性化型mTORを発現するTgマウスを作製し、社会行動を解析することによって自閉症様の症状を発症するかを検証する。また、ロータロッド解析や小脳スライスを用いた電気生理学的解析を行うことによって、運動機能やシナプス機能におけるmTORC1シグナルの役割を明らかにする。これらの行動・細胞レベルでの表現型解析を行うと同時に、mTOR複合体やmTORC1の標的分子の網羅的解析を行うことによって、上記の解析で得られた結果の分子メカニズムを明らかにすることを試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 小脳プルキンエ細胞特異的mTORC1活性化マウスの作製

小脳プルキンエ細胞において活性化型mTORの発現を誘導するために、Tet-offを用いた遺伝子発現システムを利用する。具体的には、L7プロモーターを用いてプルキンエ細胞特異的にtTAを発現するTgマウス(L7-tTA Tg)と、TREプロモーター下流に活性化型mTOR遺伝子を連結したTgマウス(TRE-mTOR Tg)を交配し、二重Tgマウスを作製する。

### (2) L7-mTOR Tgマウス小脳におけるmTORの発現解析

L7-mTOR Tgマウス的小脳において活性化型mTORの発現を生化学的に検証する。具体的には、FLAGタグ抗体を用いたウエスタンブロットを行い、小脳懸濁液における活性化型mTORの発現を小脳の発達時期を追って定量する。また、mTORC1シグナルの活性を下流分子であるS6タンパク質のリン酸化状態を免疫染色実験によって明らかにする。

### (3) L7-mTOR Tgマウス小脳の形態解析

申請者が既に行った大脳皮質でのmTORC1活性化Tgマウスにおいては、胎生期では神経前駆細胞のアポトーシスによる大脳皮質の萎縮を、成熟期においては神経細胞の肥大化を引き起こした。そこで、L7-mTOR Tgマウスにおいて、プルキンエ細胞におけるmTORC1の活性化が、細胞の生存に与える影響を調べるとともに、プルキンエ細胞のサイズや樹状突起の形状などの変化を組織学的に検討する。

### (4) L7-mTOR Tgマウスの行動解析

mTORC1シグナルが活性化されたL7-mTOR Tgマウスの運動協調および運動学習をロータロッド試験によって検証する。また、オープンフィールドテストによってL7-mTOR Tgマウスの自発運動量を定量化する。さらに、3チャンパーテストによってTgマウスの社会性行動を定量的に検討する。これらの解析によって、小脳におけるmTORC1の活性化が、運動機能の異常や自閉症など神経疾患を発症するかを明らかにする。

### (5) L7-mTOR Tgマウスの電気生理学的解析

プルキンエ細胞は平行線維および登上線維の二種類のシナプス入力を受ける。登上線維は小脳の発達過程において刈込みが行われ、幼若期における複数支配から成熟期における単一支配に移行することが知られている。L7-mTOR Tgマウスより小脳スライスを作製し、プルキンエ細胞におけるこれらの線維の投射を電気生理学的に検証することによって、幼若期におけるmTORC1シグナルの活性化が神経回路形成の形成に与える影響を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 小脳プルキンエ細胞特異的 mTORC1 活性化マウスの作製

L7-tTA Tg および TRE-mTOR Tg マウスは既に作製済みであり、これらを交配することによって、L7-tTA/L7-tTA; TRE-mTOR/TRE-mTOR の遺伝子型を持つ二重 Tg マウスを作製した（以下、L7-mTOR Tg マウスと記述）。この L7-mTOR Tg マウスを用いて以降の解析を行う。なお、各実験はドキシサイクリン非投与群を実験区とし、コントロールとしてドキシサイクリンを連続投与して活性化型 mTOR の発現を抑制した Tg マウスを用いる。

##### (2) L7-mTOR Tg マウス小脳における mTOR の発現解析

L7-mTOR Tg マウスの小脳を用いてタンパク質懸濁液を作製し、ウエスタンブロットによって活性化型 mTOR の発現を検証した。その結果、2 週齢より活性化型 mTOR の発現を確認することができたが、4 週齢以降発現が減弱していた。

また小脳切片を用いてリン酸化 S6 タンパク質の免疫染色を行った。その結果、L7-mTOR Tg マウスにおいてプルキンエ細胞特異的に S6 タンパク質のリン酸化レベルが上昇していた。これらの結果より、L7-mTOR Tg マウスにおいてはプルキンエ細胞特異的に mTORC1 シグナルが活性化していることが明らかとなった。

##### (3) L7-mTOR Tg マウス小脳の形態解析

活性化型 mTOR の発現が 4 週齢以降減弱していたことから、L7-mTOR Tg マウスの小脳の形態を組織学的に検証した。その結果、4 週齢において一部のプルキンエ細胞がアポトーシスによる細胞死を起こしていた。また、残ったプルキンエ細胞の細胞体および樹状突起は顕著に肥大化していることが明らかになった。このことからプルキンエ細胞において mTORC1 シグナルは、細胞の生存およびサイズ制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

##### (4) L7-mTOR Tg マウスの行動解析

L7-mTOR Tg マウスにおいてプルキンエ細胞が減少していたことから、個体の運動機能に影響していることが考えられた。そこでロータロッドテストを行ったところ、コントロールマウスと比較して L7-mTOR Tg マウスは運動協調能が有意に低下していることが明らかとなった。一方、3 chamber test によって社会行動を調べたところ、コントロールと L7-mTOR Tg マウスとの間で社会性に有意な差は観察されなかった。

##### (5) L7-mTOR Tg マウスの電気生理学的解析

mTORC1 シグナルの活性化に伴うプルキンエ細胞でのシナプス伝達などの変化を電気生理学的に調べた。コントロールおよび Tg

マウスより小脳スライスを作製し、膜興奮性を調べた結果、Tg マウスはコントロールと比較して膜興奮性が著しく低いことが明らかとなった。また、Tg マウスのプルキンエ細胞においては、登上線維による入力が多重支配となっていた。したがって、Tg マウスのプルキンエ細胞におけるシナプス伝達や回路形成の異常が、運動協調能の低下につながっていることが考えられた。

##### (6) L7-mTOR Tg マウスのレスキュー実験

上記の実験に加えて、Tg マウスで観察されたアポトーシスの分子基盤を明らかにすることを試みた。Tg マウスのプルキンエ細胞は、低酸素マーカー HIF-1 $\alpha$  の発現が上昇していることを明らかにした。このことから、HIF-1 $\alpha$  阻害剤 PX-478 を用いたレスキュー実験を試みた。3 週齢より活性化型 mTOR Tg マウスの腹腔内に PX-478 の投与を行い、6 週齢においてプルキンエ細胞の形態を観察した。その結果、PX-478 投与群ではコントロールと比較して、プルキンエ細胞の肥大化およびアポトーシスが部分的に抑制されていた。これらの結果より、プルキンエ細胞における mTORC1 の恒常的な活性化によるアポトーシスは、HIF-1 シグナルを介した低酸素ストレスによるミトコンドリアの異常が原因のひとつであることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 6 件)  
全て査読有

1. Makoto Kurano\*, Koichi Tsuneyama, Yuki Morimoto, Tomo Shimizu, Masahiro Jona, Hidetoshi Kassai, Kazuki Nakao, Atsu Aiba, Yutaka Yatomi.

Apolipoprotein M Protects Lipopolysaccharide-Treated Mice from Death and Organ Injury. *Thromb. Haemost.*, in press

2. Narumi Ogonuki, Hiroki Inoue, Shogo Matoba, Yoko K. Kurotaki, Hidetoshi Kassai, Yukiko Abe, Erika Sasaki, Atsu Aiba, Atsuo Ogura\*

Oocyte-activating capacity of fresh and frozen-thawed spermatids in the common marmoset (*Callithrix jacchus*).

*Mol. Reprod. Dev.*, in press

3. Junko Ueda, Yui Murata, Miki Bundo, Arata Oh-Nishi, Hidetoshi Kassai, Tempei Ikegame, Zhilei Zhao, Seiichiro Jinde, Atsu Aiba, Tetsuya Suhara, Kiyoto Kasai, Tadafumi Kato, Kazuya Iwamoto\*

Use of human methylation arrays for epigenome research in the common marmoset (*Callithrix jacchus*).

*Neurosci. Res.*, 120, 60-65 (2017)

4. Ippei Kikuchi, Atsushi Takahashi-Kanemitsu, Natsuki Sakiyama, Chao Tang, Pei-Jung Tang, Saori Noda, Kazuki Nakao, Hidetoshi Kassai, Toshiro Sato, Atsu Aiba, Masanori Hatakeyama\*  
Dephosphorylated parafibromin is a transcriptional coactivator of the Wnt and Hedgehog pathways  
*Nat. Commun.*, 7, 12887 (2016)

5. Ryo Nagahama, Atsushi Yamada\*, Junichi Tanaka, Ryo Aizawa, Dai Suzuki, Hidetoshi Kassai, Matsuo Yamamoto, Kenji Mishima, Atsu Aiba, Koutaro Maki, Ryutaro Kamijo  
Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 470, 813-817 (2016)

6. Mutsuko Oshima-Nakayama, Atsushi Yamada\*, Tamaki Kurosawa, Ryo Aizawa, Dai Suzuki, Yoshiro Saito, Hidetoshi Kassai, Yuki Sato, Matsuo Yamamoto, Tatsuo Shirota, Atsu Aiba, Koutaro Maki, Ryutaro Kamijo  
Cdc42 is crucial for facial and palatal formation during craniofacial development.  
*Bone Rep.*, 5:1-6 (2016)

〔学会発表〕(計 3件)

1. 坂井祐介・葛西秀俊・中山寿子・中尾和貴・前田達哉・橋本浩一・狩野方伸・饗場篤  
Activation of mTORC1 signaling in cerebellar Purkinje cells causes cell death and hypertrophy of Purkinje cells  
第40回 日本神経科学大会 (2017)

2. 坂井祐介・葛西秀俊・中山寿子・中尾和貴・前田達哉・橋本浩一・狩野方伸・饗場篤  
Activation of mTORC1 signaling in cerebellar Purkinje cells causes cell death and hypertrophy of Purkinje cells  
第40回 日本分子生物学会年会 (2017)

3. Hidetoshi Kassai, Yusuke Sakai, Hisako Nakayama, Tatsuya Maeda, Kouichi Hashimoto, Masanobu Kano, Atsu Aiba  
Genetic manipulation of mTORC1 signaling in mouse cerebellar Purkinje cell  
46th annual meeting of the Society for Neuroscience (2016)

〔図書〕(計 2件)

1. 葛西秀俊・坂井祐介・饗場篤  
恒常的活性化型 mTOR による精神神経疾患モデルマウスの作製  
動物/疾患モデルの作製技術・病態解析・評価手法 (2017)

2. 葛西秀俊・饗場篤・前田達哉  
mTOR の活性化変異と疾患発生  
結節性硬化症の診断と治療最前線 (2016)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://lar.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

葛西 秀俊 (KASSAI, Hidetoshi)  
東京大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40403232