

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09611

研究課題名(和文) アンジェルマン症候群における認知記憶機能障害のメカニズムと治療法の探索

研究課題名(英文) Mechanisms and therapeutic strategy for cognitive dysfunction in Angelman syndrome

研究代表者

江川 潔 (EGAWA, Kiyoshi)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：40450829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：以前我々はアンジェルマン症候群(AS)モデルマウスの小脳において、「GABA持続抑制」というGABA作動性シナプス性抑制とは異なる抑制機構が減少していることを示し、ASの小脳失調の原因である可能性を示した。本研究では、GABA持続抑制の程度を他の脳領域で広く評価し、ASの多彩な神経症状への関与を検討した。ASマウス海馬・皮質の錐体細胞ではGABA持続抑制の減少がみられたが、視床では減少はみられなかった。GABA持続抑制を脳全体で増強させる薬剤を投与したが、ASの認知機能障害などは改善しなかった。これらの結果から、GABA持続抑制の脳領域間での不均等がASの病態生理に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Angelman syndrome (AS) is a neurodevelopmental disorder caused by loss of function of the UBE3A gene. We have recently shown that tonic form of GABAergic inhibition is significantly decreased in the cerebellar granule cells of Ube3a knockout mice (AS mice). Because tonic inhibition is ubiquitously present within CNS, deregulation of tonic inhibition may be involved in pathophysiology of various in AS. To clarify this, we investigated GABAergic function in the hippocampus and thalamus of AS mice. Tonic inhibition of CA1 hippocampal pyramidal neurons was significantly decreased in AS mice, while thalamic relay neurons not. Thus, deregulation of tonic inhibition in AS mice differs by brain region. THIP, a enhancer of tonic inhibition in the entire brain, did not improve cortical dysfunctions such as epilepsy or memory deficit, suggesting that the discrepancy of intensity of tonic inhibition among brain regions itself may contribute to the pathophysiology of AS.

研究分野：小児神経学、細胞神経生理学

キーワード：アンジェルマン症候群 自閉症スペクトラム GABA

1. 研究開始当初の背景

Angelman 症候群 (以下 AS) は生後発達期に著明となる重度の精神発達遅滞, てんかん, 運動機能障害を含む小脳失調を主徴とする遺伝性疾患であり、母性発現遺伝子 UBE3A を原因遺伝子とする (Kishino ら *Nat Genet* 1997)。UBE3A は蛋白ユビキチン化に関わるユビキチンリガーゼ E6-AP をコードし、E6-AP を基質とする蛋白の分解が阻害されることで神経機能障害をきたすと考えられている。AS モデルマウスとして母性 Ube3a ノックアウト (K.O.) マウス (AS モデルマウス) が作成されており、認知機能障害, 小脳失調等 AS の臨床症状を良好に反映する。その検討から神経機能障害のメカニズムとして、興奮性シナプス可塑性に係わる蛋白の異常がこれまで報告されているものの (Weeber ら *J Neurosci.* 2003)、E6-AP を基質とする蛋白の同定には至っておらず、認知機能障害を含めて病態生理の多くは未解明である。また、薬理的治療法も提示されていない。

申請者はこれまでに AS 患者の体性感覚誘発反応を検討し、GABA 抑制系の機能障害が AS の病態の一部である可能性を示した (Egawa ら *Neuroimage* 2008)。さらに、GABA 抑制系機能障害の詳細を明らかにする目的に AS モデルマウスを用いたパッチクランプ法による電気生理学的検討を行い、小脳失調に係わる GABA 抑制系の機能障害として、①脳顆粒細胞における非シナプス性 GABA 作動性持続抑制 (以下 GABA 持続抑制) が著明に減弱していること②その分子機構として細胞外 GABA 濃度を調整する GABA トランスポーター1 (GAT1) が UBE3A により制御されていることを明らかにした (Egawa ら *Sci. Transl. Med.* 2012)。GABA 持続抑制はシナプス外 GABA 受容体によりもたらされ、その受容体構成、薬理特性はシナプス性受容体と大きく異なる。そのため、新たな治療戦略の構築という観点から、(非シナプス性) GABA 持続抑制の中枢神経疾患病態生理への関与が近年注目されている (Egawa and Fukuda, *FNIR*, 2013)。我々は AS モデルマウスにシナプス外 GABA 受容体 (δ サブユニットを有する GABA 受容体) 選択的アゴニストである THIP を急性投与し小脳顆粒細胞の GABA 持続抑制を増加させることで運動障害が一時的に改善することを示した (Egawa ら *Sci. Transl. Med.* 2012)。この結果は GABA 持続抑制低下が特定の神経回路網の神経情報処理機能を阻害し AS の小脳機能障害に関与する事を示すとともに、AS に対する GABA 持続抑制をターゲットとした薬理的治療の可能性を示唆している。しかしながら、THIP の他の脳機能障害への効果、慢性投与の効果はこの先行研究では明らかにされなかった。

一方で近年の研究から、GABA 持続抑制は長い

タイムスケールにおいてより多様な機序で多岐にわたる脳機能を制御することが明らかになってきた。Whissell らは最近、 δ サブユニット K.O. により GABA 持続抑制を減弱させたマウスにおいて、海馬歯状回の新生顆粒細胞の成熟が阻害され長期記憶機能が低下すること、ヘテロ型 K.O. マウスでは THIP の長期投与により記憶機能障害がレスキューされることを示し、GABA 持続抑制が長期の認知記憶機能に関するシナプス可塑性に重要な役割を有することを明らかにした (Whissell ら *Annals of Neurology* 2013)。興味深い事に、同様な歯状回新生神経細胞の未熟性、および認知記憶機能の異常は AS モデルマウスにおいても過去に報告されている (Miura ら *Neurobiol Dis.* 2002、Mardirossian ら *Exp. Neurology*, 2009)。UBE3A, GAT1 は共に中枢神経ニューロンに広く発現することが過去に示されており (Gustin ら *Neurobiol Dis.* 2010、Dalby ら *Eur. J. Pharm.*, 2003)、海馬でも GABA 持続抑制が減弱し、新生細胞の成熟を阻害することで AS における認知記憶障害の原因となっているのではないかと、この仮説に至り本研究を着想した。

2. 研究の目的

まず上記の作業仮説①AS モデルマウス海馬において、GABA 持続抑制が減少している可能性を AS マウス海馬スライスを用いて検証する。次に、AS マウスにおける海馬認知記憶機能を *in vitro*, *in vivo* で評価する。得られた所見について THIP の慢性投与あるいは急性投与によるレスキューを検証する事で、作業仮説②: AS モデルにおける GABA 持続抑制の減弱が海馬顆粒細胞新生、移動を阻害することで AS の認知記憶障害の病態生理に関与する可能性を検証する。

3. 研究の方法

AS モデルマウスの認知機能障害およびてんかんに焦点をあて、脳急性スライスを作成しボルテージクランプによるパッチクランプ法を用いて特に GABA 抑制系に関する神経生理学的解析をおこなった。具体的には、生後 3 週齢のマウスから、急性脳スライスを作成し、人工脳脊髄液を還流したチャンバーに移し、微分干渉位相差顕微鏡下で神経細胞を確認後、ガラス電極をもちいてホールセルパッチクランプを電位固定化で行った。人工脳脊髄液にはあらかじめグルタミン酸受容体および GABA 受容体の競合的拮抗剤を加えており、伝達物質により惹起される電流としては GABA 受容体由来のもののみを観察できる状態とした。この条件下で、GABA 受容体により惹起されるシナプス性あるいは非シナプス性 (持続性) 電流を記録し、UBE3A 機能欠失マウスおよび対象コントロールマウスにおける抑制機能を比較検討した。次にマウス

の認知機能・てんかんを評価するために、①新奇物体認識試験：マウスが新奇性のある物体を好む性質を利用し、学習をおこなったのち、どれだけ新奇物体により興味をしめしたか、を解析することで認知機能を評価する②脳波記録：頭蓋内に電極を 2ch 埋め込み、差分アンプをもちいて長時間 (24 時間) の頭蓋内電位を記録した。さらに海馬急性スライスから電気刺激で誘発される細胞外電位記録を行い、連続刺激後のみられる細胞外電位の長期増強減少を評価した。

4. 研究成果

海馬シナプス性抑制についてシナプス前の伝達物質放出確率、シナプス伝達頻度、シナプス後細胞の受容体機能について網羅的に検討をおこない、アンジェルマン症候群モデルではシナプス性抑制については異常がないことが判明した。(図 1)

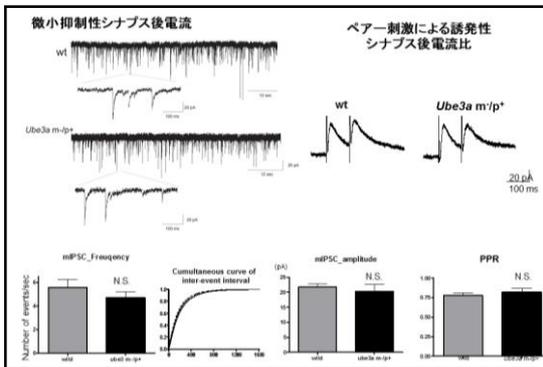


図 1 : AS モデルマウス (UBE3A 機能欠失) マウスでは抑制性シナプス後電流に変化をみとめない

また、ニューロンの発火特性にも異常をみとめず(図 2)、図 1 の結果と合わせて、抑制性シナプス伝達には異常がないことがあきらかになった。

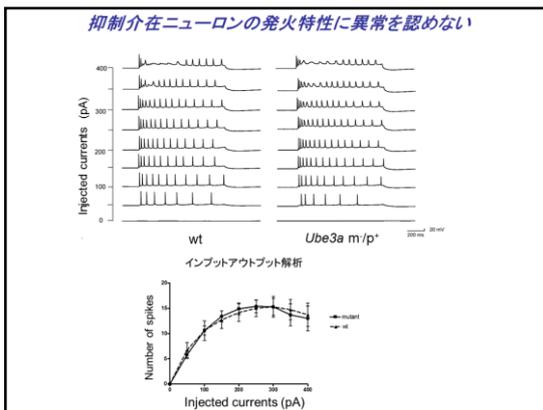


図 2 : アンジェルマン症候群モデル、UBE3A 機能欠失のマウスではニューロンの発火特性に異常をみとめない

シナプス外 GABA 受容体により惹起される GABA 持続電流について、GABAA 受容体拮抗剤を投与する前後での電流値のベースライン変化を計測することで評価した。その結果、

UBE3A 機能欠失では海馬 CA1 のシナプス外持続抑制が著明に減弱していることがあきらかとなった(図 3)。このような持続抑制の減弱は、近年他の自閉症スペクトラム障害モデル(レット症候群、脆弱 X 症候群など)においても報告されており、我々の結果は、自閉症スペクトラムに共通する病態生理である可能性を示唆するものとなった。

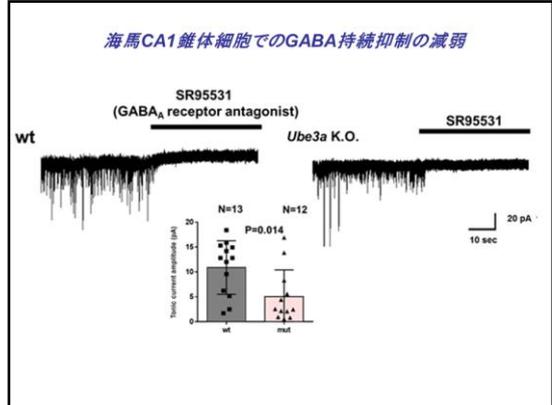


図 3 AS モデルマウスでは海馬 CA1 錐体細胞において GABA 持続抑制が減弱している

次に、海馬 CA1 錐体細胞でみられた GABA 持続抑制の減弱が、他の脳領域でも観察されるかを検討した。視床における視床皮質投射ニューロンは、皮質-視床間のネットワーク形成に大きな役割を担っている。視床皮質脳スライスを作成し、視床皮質投射ニューロンに対して GABA 持続電流の大きさを検証したところ、視床においては GABA 持続抑制は減弱していないことが判明した(図 4)。

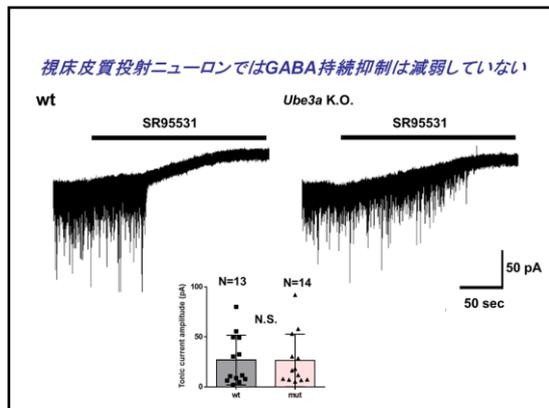


図 4 海馬 CA1 錐体細胞においてみられた AS マウスにおける GABA 持続抑制の減弱は視床皮質投射ニューロンではみられない。

このような、脳の領域毎に GABA 持続抑制減少の程度が異なるとの知見はこれまでに報告がなく、まったく新しい発見である。その機序としては、GABA 持続抑制を制御する GABA トランスポーターの発現が、脳領域毎に異なることが原因と考えられる。免疫染色にて Ube3A、GAT1 の発現を確認すると、確かに AS マウスでは海馬 CA1、皮質の GAT1 発現が亢進しているのに対し、視床では亢進していない

ことが確認された (図 5)。

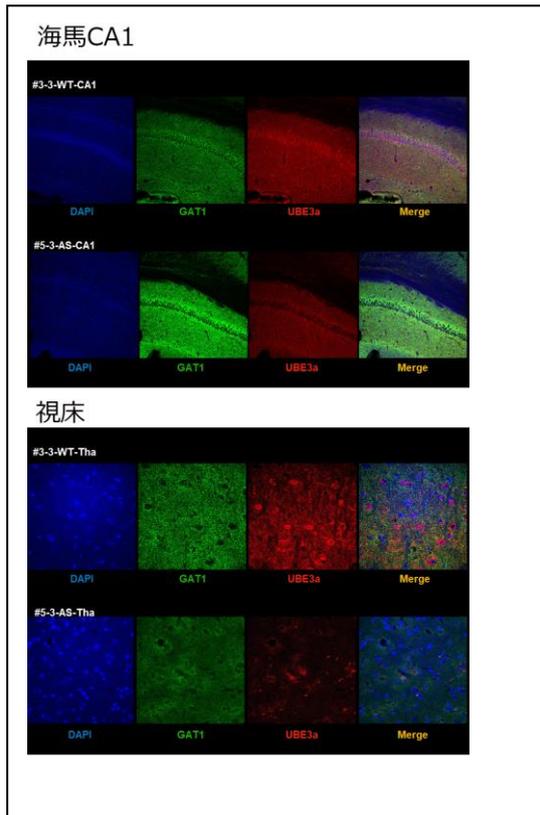


図 5 海馬・視床の GAT1 発現 AS モデルマウスでは海馬視床とも UBE3A の発現は減少している。海馬では GAT1 の発現が亢進している一方、視床では WT、AS とも GAT1 の発現は低く明らかな差をみとめない。

次に、海馬において減少している持続抑制を、 δ サブユニットを有する GABA 受容体特異的アゴニスト、THIP (ガボキサドール) の投与で代償することで、AS の症状が改善するかどうかを検討した。AS の認知機能障害については新奇物体認識試験・急性海馬スライスにおける長期シナプス後電位増強反応にて、またてんかんについては頭蓋内電極埋め込みによる脳波記録にて評価したところ、それぞれ異常を認め、AS 患者の症状をモデルマウスで評価可能なことが示された (図 6)。しかし THIP 投与によってこういった異常所見が改善するという証拠は得られなかった。GABA 受容体 δ サブユニットは脳内のシナプス外に広く分布するため、THIP は脳領域全体で GABA 持続抑制を増強する。従って一連の結果からは、GABA 持続抑制の減弱というよりはむしろ、脳領域間での GABA 持続抑制の不均等性が正常な神経ネットワークを阻害し、AS のてんかん・認知機能障害の原因となっている可能性が示唆される。近年、GABA 持続抑制の制御機構や程度は脳領域毎で異なり、そのバランスが脳機能の安定性に重要である可能性がいわれている。例えば、欠伸てんかんを示すラットでは、皮質ニューロンでは変化がなく、視床皮質投射ニューロンの GABA 持続抑制が

むしろ増強していることがてんかん発作の原因とされた (Cope et al., Nat. Med. 2009)。今回の結果はそのような示唆を支持するもので、アンジェルマン症候群や自閉症の病態生理を考えるうえで重要な知見と考えられた。今回のプロジェクトから、近年開発された海馬および皮質特異的に GABA 作動性持続抑制を増強させる薬剤が治療戦略として有望ではないか、との仮説を立てることができた。今後 AS モデルマウスにおける効果を今後検証していく予定である。

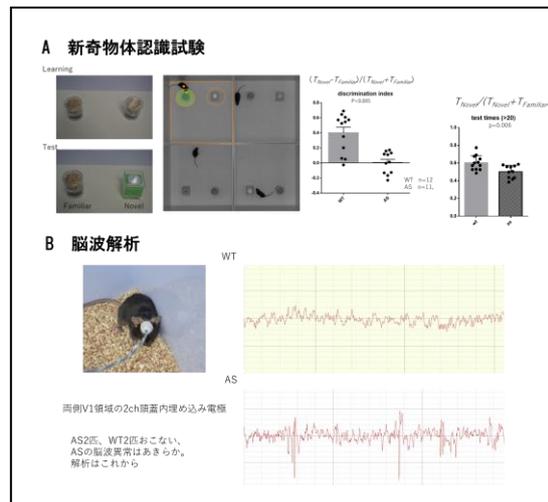


図 6 AS マウスにおける認知機能障害 (新奇物体認識試験, A) と脳波異常 (B)

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 3 件)

① Glykys J, Dzhala V, Egawa K, Kahle K, Delpire M, Staley KJ. Chloride dysregulation, seizures, and cerebral edema: a relationship with therapeutic potential. Trends in Neuroscience May; 40 (5) : 276-294. 2017. DOI: 10.1016/j.tins.2017.03.006. (査読あり)

② Shiraishi H., Egawa K., Ito T., Kawano O., Asahina N., Kohsaka S. Efficacy of perampanel for controlling seizures and improving neurological dysfunction in a patient with dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) Epilepsy & Behavior Case Reports 8 : 44-46, 2017. DOI: doi: 10.1016/j.ebcr.2017.05.004. (査読あり)

③ Ueda Y, Egawa K, Ito T, et al (11 人中 2 番目) The presence of short and sharp MEG spikes implies focal cortical dysplasia. Epilepsy Research. 114:141-146. 2015. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2015.04.020. (査読あり)

あり)

[学会発表] (計 3 件)

① 江川潔 Brain region-dependent deregulation of tonic inhibition in Angelman syndrome 第 121 回日本小児科学会学術集会 2018 年 4 月 21 日 福岡国際会議場 (福岡市)

② 江川潔 Diverse deregulation of tonic inhibition in thalamo - cortical networks of mice model of Angelman syndrome. 第 51 回日本てんかん学会学術集会 ポストコンgresシンポジウム 2017 年 11 月 5 日 京都国際会議場 (京都市)

③ 河野修 Deregulated tonic inhibition in the hippocampus of mice model of Angelman syndrome 第 59 回日本小児神経学会学術集会 2017 年 6 月 15 日 大阪国際会議場 (大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江川 潔 (EGAWA Kiyoshi)
北海道大学・医学研究院・助教
研究者番号：40450829

(2) 研究協力者

河野 修 (KAWANO Osamu)
北海道大学・医学院 大学院生