

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09848

研究課題名(和文) シナプス伝達異常がもたらす難治性てんかんと知的障害発症機序の解明

研究課題名(英文) Circuit mechanisms for intractable epilepsy and intellectual disabilities caused by impairments of synaptic transmission

研究代表者

宮本 浩行 (Miyamoto, Hiroyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90312280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：太田原症候群は難治性てんかんであり重度の精神発達遅滞を伴うが、STXBP1遺伝子の変異が原因として報告されている。STXBP1は神経伝達物質放出に関わるが、その発症機序は不明である。本研究はその病態メカニズムを調べるためStxbp1遺伝子ヘテロ欠損マウスを用いた。Stxbp1マウスはてんかん性脳活動や記憶・学習障害を示した。さらにヒト神経発達障害などでも頻発する攻撃性の顕著な亢進が観察された。さらにグルタミン酸興奮性シナプス伝達を促進するAmpakineの腹腔内投与により攻撃性は有意に低下した。これらの結果は攻撃性は興奮性伝達促進により軽減され得ることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The STXBP1 gene encodes the syntaxin-binding protein 1 that critically controls synaptic transmission. This gene harbors a high frequency of de novo mutations in neurodevelopmental disorders. However, the system and behavioral-level pathophysiological changes caused by these genetic defects remain poorly understood. Constitutional (Stxbp1+/-) mice were subjected to a behavioral test battery examining locomotor activity, anxiety, fear learning, and social interactions including aggression. Stxbp1+/- male mice exhibited enhanced aggressiveness and impaired fear learning. Pharmacological potentiation of the excitatory transmission at active synapses via the systemic administration of ampakine CX516, which enhances the excitatory postsynaptic function, ameliorated the aggressive phenotype of Stxbp1+/- mice. These findings suggest that normalizing the excitatory synaptic transmission is a potential therapeutic option for managing aggressiveness in patients with STXBP1 mutations.

研究分野：神経科学

キーワード：STXBP1 MUNC18-1 シナプス伝達 てんかん 攻撃性 ampakine intellectual disability 太田原症候群

1. 研究開始当初の背景

タンパク分子 Munc18-1 は神経細胞シナプス前膜に存在して、シナプス小胞や syntaxin-1 分子と複合体を形成して神経伝達物質放出を制御している。これをコードする遺伝子 *STXBPI* のホモ欠損により興奮性・抑制性の両神経伝達は消失し、ヘテロ欠損では神経伝達の低下がマウスで示されている。最近 *STXBPI* 遺伝子ナンセンス・ミスセンス変異は、早期 (生後 3 カ月以内) から重篤なてんかんと精神運動発達障害を示す大田原症候群の患者と強い相関をもつ。Munc18-1 の変異・欠損によるシナプス伝達の障害が大田原症候群の発症の背景にあると考えられる。

しかし Munc18-1 の詳細な組織内分布や神経細胞種 (興奮性、抑制性) における分布など詳細は十分ではなく、なぜ Munc18-1 の機能異常あるいはシナプス伝達異常が難治性てんかんや知的障害を引き起こすのかそのメカニズムはほとんど明らかになっていない (マウス脳形態に異常は認められていない)。さらに分子の異常、神経システム異常とてんかんをつなぐ個体レベルの生理学的理解はてんかん研究分野では進んでいるとは言えないことも理由の一つだろう。

我々はこれまでも遺伝子解析により代表的かつ重篤な難治性乳児てんかんのひとつ Dravet 症候群患者と関連が示唆されていた電位依存性ナトリウムチャネル (Nav1.1) 欠損がてんかんの原因となることをマウスモデルを用いて示してきた。本研究でも当研究室のてんかんに関する知見の蓄積を活かし、Munc18-1 ヘテロ欠損マウスを用いて大田原症候群モデルを確立し、組織解剖学・神経生理学・行動テスト・薬理的操作を適用・統合して発症メカニズムを解明することを目的としている。これにより薬物治療に対する抵抗性を示す難治性てんかんに共通する発症の神経機構を見出し、さらに効果的かつ副作用の少ない治療法開発につなげることを視野に入れる。すでに我々は Munc18-1 ヘテロ欠損マウスからてんかんを示唆する異常脳活動を再現的に確認している。

2. 研究の目的

本研究は Munc18-1 欠損マウスでてんかん脳波を含む異常脳活動の検出や、記憶・学習に関連した行動異常を定量することで因果関係を明らかにする。ついでてんかん焦点とその波及を多点同時・局所電場電位記録により関与する神経回路・システム同定した上で、興奮性あるいは抑制性シナプス伝達を遺伝的・薬理的に操作しててんかんの増強・抑制を調べ、てんかん発生機序の推定とその制御を試みる。

3. 研究の方法

① Munc18-1 ヘテロ欠損マウス (ホモ欠損は胎生期に死亡) の脳波・筋電図記録とビデオ観察によるてんかんを含む異常脳波と発作の検出と定量をおこない、Munc18-1 タンパク機能低下 (loss-of-function) がてんかんの要因であることを決定する。

② てんかん発生部位 (てんかん焦点)、全般性・局所性の有無、てんかんの伝搬経路を同定するために各脳領域における脳活動の同時記録を行う。

③ 興奮性細胞あるいは抑制性細胞特異的に Munc18-1 を欠損したコンディショナルノックアウトマウスの脳波記録により、てんかん生成への興奮性・抑制性シナプス伝達のそれぞれの寄与を分析する。

④ シナプス伝達は Munc18-1 欠損によって障害されることは脳スライスや培養細胞ですでに確認されているが、生体レベルではどのように変化しているか不明である。*In vivo* マイクロダイアリシス法を用いて自由行動中のマウス脳から興奮性神経伝達物質 (Glutamate)、抑制性神経伝達物質 (GABA) の放出を定量し、野生型マウスと比較する。

⑤ てんかん生成における脳領域間の相互作用 (独立的か協同的) を推定するため、脳活動計測と局所的脳不活性実験を行う。ついで興奮性または抑制性シナプス伝達を強化・減弱させることでてんかん活動の制御を試みる。

⑥ 大田原症候群は重度の精神遅滞をもたらす。Munc18-1 欠損の影響を記憶・学習に関与する行動実験によって評価するとともに脳内活動とを対応させる。

⑦ 計画⑥で検討した、てんかんへの薬理効果が学習行動の改善にもつながるかを検討する。

4. 研究成果

本研究期間においてまず *Stxbp1* マウス行動解析の結果がまとめ、攻撃性の亢進を興奮性シナプス伝達増強によって緩和できる知見を得たのでここに報告する (Miyamoto et al., 2017)。

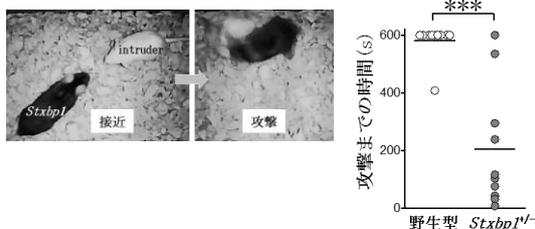
Stxbp1 ホモ欠損マウスは生後間もなく死亡するが、*Stxbp1* ヘテロ欠損マウス (*Stxbp1* マウス) は野生型に比して体重の低下はあるも離乳時の外見は野生型と区別がつかず離乳後も性成熟し繁殖も可能であった。Western blot 解析により *Stxbp1* ホモ・ヘテロ欠損マウスの全脳 Munc18-1 タンパク量はそれぞれ半減・消失していた。

Novel open field activity test において *Stxbp1* マウスに運動障害等は見出されず、行動量に野生型との差は見出されなかった。次

に不安傾向を見るためelevated plus maze testとlight-dark transition testを行った結果、elevated plus maze testでは野生型と差を見出さなかったが、light-dark transition testにおいては明るいボックスへの移動が有意に低下していた。環境・文脈によっては不安傾向の指標に差が現れると考えられる。大田原症候群など神経発達障害はしばしば重度の知的障害を伴うことから、fear conditioning memory testを用いて *Stxbp1* マウスの記憶・学習能力を調べた。音と電気ショックでマウスは恐怖条件付けされたが、24時間後の音のみの条件刺激に対してのすくみ(freezing)反応は野生型に比して有意に低下していた。Contextual fear memoryも *Stxbp1* マウスでは低下していた。記憶の保持や再生など記憶・学習機能の重度の障害が示唆された。なおY-maze testの結果に差はなく、短期記憶・作業記憶の低下は起きていない可能性がある。

Gamma活動は認知活動に関連すると推定されており、その異常は統合失調症や自閉症スペクトラムの疾病モデル動物でも報告されている。恐怖条件付け前後の *Stxbp1* マウスの脳波及び局所電場電位記録法を用いて覚醒中の脳活動について検討した。条件付け前の覚醒時では海馬CA1のガンマ活動(50-70 Hz)が野生型に比して有意に低下しており、条件付けから24時間後では前前頭葉、扁桃核、視床において上昇していた。これら脳領域のガンマ活動の変化は *Stxbp1* マウスの認知活動情報処理の障害を反映している可能性がある。

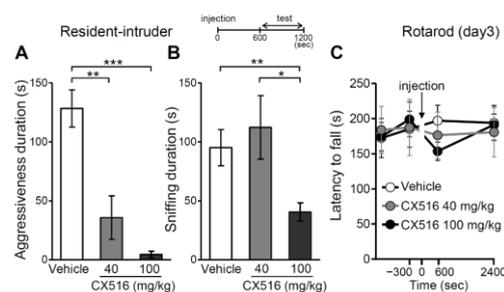
STXBPI 変異をもつ患者に自閉傾向が報告されていることから、*Stxbp1* マウスの社会性行動を検討した。しかしthree-chambered social interaction testで差は検出されなかった。一方、open field interaction testやresident-intruder testでは、*Stxbp1* マウスは相手マウスへの攻撃潜時が短縮し、攻撃回数、時間ともに有意に増加していた(下図)。攻撃性の亢進と一致して、通常のホームケージ内でも頻繁な闘争とケガが観察された。



さらに興奮性あるいは抑制性伝達の *Stxbp1* マウス攻撃性への寄与を推定するため、
 [1] *Emx1*-Cre (大脳皮質、海馬、扁桃核などの終脳の興奮性細胞に特異的) ライン
 [2] *Vgat*-Cre (全脳の抑制性細胞に特異的) ラインと交配したconditional knockout マ

ウスを作製し、resident-intruder testを行ったが攻撃性に有意な差を得なかった。

Stxbp1 ハプロ不全は興奮性シナプス伝達の急速な低下をもたらすことから、興奮性シナプス伝達の補強によって *Stxbp1* マウスの攻撃性亢進を緩和できるかを検討した。Ampakineはシナプスにおけるグルタミン酸存在下でグルタミン酸AMPA受容体の機能を促進させることが知られており、これまでも認知機能を促進させる薬物として種々の動物モデルで効果が確認されている。CX516は第一世代のAmpakineで短期の半減期を有するが、resident-intruder testの10分前に腹腔内投与すると *Stxbp1* マウスの攻撃性を用量依存的に劇的に低下させた。一方、運動機能の変化は観察されず、rotarod testで評価した運動能力にもvehicle 投与群と有意差はなかった(下図)。



今回の研究により、*Stxbp1* ハプロ不全によるシナプス伝達の障害が記憶・学習などの認知機能不全と攻撃性亢進が生じることが示唆された。さらに興奮性シナプス伝達の促進により攻撃性を緩和することができた。攻撃性は種々の精神疾患、神経発達障害(てんかん、自閉症、統合失調症、うつ病、認知症)に随伴することが知られている。*Stxbp1* マウスはこれら疾病の臨床症状の一部を再現していると考えられる。大田原症候群患者で攻撃性の亢進の報告はないが、重度の精神運動遅滞によるためかもしれない。大田原症候群の75%がWest症候群に、さらにその59%はLennox-Gastaut症候群に移行するが、高い比率で攻撃性を示す。

我々の知る限り、グルタミン酸興奮性伝達の強化によって攻撃性の緩和を示した最初の報告である。運動障害は観察されず、これまでCX516などampakineは種々の認知機能を促進することが示されてきており、感覚・運動・認知系の非特異的な鈍麻によって攻撃性が低下したとは考えにくい。近年導入された抗てんかん薬perampanelは非競合的AMPA受容体拮抗薬だが、時に攻撃性の出現が副作用として報告される。本研究結果はペランパネルによる攻撃性を説明するかもしれない。

Emx1-Cre依存的な終脳(大脳皮質、海馬など)興奮性細胞特異的 *Stxbp1* 欠損では攻撃性は生じなかったことから皮質下構造、とくに

脳幹セロトニン系や視床下部への興奮性伝達が*Stxbp1*マウスの攻撃性に関与している可能性がある。非定型の向精神薬が統合失調症、自閉症、認知症にともなう攻撃性の緩和に用いられる場合があるが、今回の知見は、これらとは薬理学的にスペクトルの異なる興奮性伝達の調整によっても攻撃性をコントロールできる可能性を示す。

発達障害はてんかんを併発することも多く、*STXBPI*は自閉症、知的障害との関連でも多くの変異がヒトで報告されている。これらマウスモデルの基本的知見が大田原症候群を含め広く発達障害の病態生理の理解につながることを期待される。

さらに*Stxbp1*ヘテロ欠損マウス大脳皮質からてんかんに特徴的な陰性棘徐波の出現を確認し、生成メカニズムを中心に新規てんかん回路モデルを提唱している (Miyamoto, et al. 投稿中)。

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)

1: Bailey JN, de Nijs L, Bai D, Suzuki T, **Miyamoto H**, Tanaka M, Patterson C, Lin YC, Medina MT, Alonso ME, Serratos JM, Durón RM, Nguyen VH, Wight JE, Martínez-Juárez IE, Ochoa A, Jara-Prado A, Guilhoto L, Molina Y, Yacubian EM, López-Ruiz M, Inoue Y, Kaneko S, Hirose S, Osawa M, Oguni H, Fujimoto S, Grisar TM, Stern JM, Yamakawa K, Lakaye B, Delgado-Escueta AV. Variant Intestinal-Cell Kinase in Juvenile Myoclonic Epilepsy. *New England Journal of Medicine* 378:1018-1028 (2018). (査読有)

2: Raveau M, Shimohata A, Amano K, **Miyamoto H**, Yamakawa K. DYRK1A-haploinsufficiency in mice causes autistic-like features and febrile seizures. *Neurobiology of Disease* 110:180-191 (2017). (査読有)

3: **Miyamoto H**, Shimohata A, Abe M, Abe T, Mazaki E, Amano K, Suzuki T, Tatsukawa T, Itoharu S, Sakimura K, Yamakawa K. Potentiation of excitatory synaptic transmission ameliorates aggression in mice with *Stxbp1* haploinsufficiency. *Human Molecular Genetics* 6:4961-4974 (2017). (査読有)

4: Sugawara T, Hisatsune C, **Miyamoto H**, Ogawa N, Mikoshiba K. Regulation of spinogenesis in mature Purkinje cells via mGluR/PKC-mediated phosphorylation

of CaMKII β .

Proceedings of National Academy of Science USA 114:E5256-E5265 (2017). (査読有)

5: Shimohata A, Ishihara K, Hattori S, **Miyamoto H**, Morishita H, Ornthanalai G, Raveau M, Ebrahim AS, Amano K, Yamada K, Sago H, Akiba S, Mataga N, Murphy NP, Miyakawa T, Yamakawa K.

Ts1Cje Down syndrome model mice exhibit environmental stimuli-triggered locomotor hyperactivity and sociability concurrent with increased flux through central dopamine and serotonin metabolism.

Experimental Neurology 293:1-12 (2017). (査読有)

6: ヘンシュ貴雄、**宮本浩行**

GABA ニューロンによる回路可塑性制御
実験医学 33: 1378-1383, 2015 (査読なし)

[学会発表] (計 1 件)

宮本浩行

てんかん治療研究振興財団 第 29 回 研究報告会 (2018) 千里阪急ホテル 大阪市

[図書] (計 2 件)

2: ヘンシュ貴雄・**宮本浩行**

第 2 章 視覚発達 II 視覚系の臨界期 (分担執筆)
視能学エキスパート 視能訓練学 (若山暁美/長谷部佳世子/松本富美子/保沢こずえ/梅田千賀子編) 医学書院、東京、2 章 視覚発達 視覚系の臨界期 31-41, 2018

1: **宮本浩行**・ヘンシュ貴雄

12 章 睡眠と学習・記憶 (分担執筆)
睡眠科学 (三島和夫編)
化学同人、東京、171-186, 2016

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 浩行 (MIYAMOTO Hiroyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号: 90312280

(2) 研究分担者

分担者無し

(3) 連携研究者

連携者無し

(4) 研究協力者

協力者無し