

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02777

研究課題名(和文) GABA持続抑制不全の多様性がもたらすアンジェルマン症候群の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Pathophysiological impact of diverse deregulation of tonic inhibition 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) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：アンジェルマン症候群(AS)モデルマウスにおける海馬・皮質興奮性神経細胞ではGABA持続抑制が減弱していたのに対し、視床ニューロンでは減弱を認めなかった。ASマウスの脳波では、低周波成分のパワーが有意に高く、この異常はGABA受容体 5サブユニット選択的活性化剤、MP-022の投与により改善した。視床-皮質間におけるGABA持続抑制の不均衡がASのてんかん・脳波異常の原因となる可能性が示唆された。また、iPS細胞をもちいて、抑制性ニューロンの発火は正常であること、マウス神経細胞のCl⁻濃度を制御するトランスポーターの発現は異常であることも明らかとなり、ASの病態生理の理解が深まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、アンジェルマン症候群(AS)における皮質神経細胞選択的なシナプス外持続抑制の減弱がその病態生理に重要であることを明らかにした。GABA作動性抑制は薬剤により調整可能であり、5サブユニット選択的陽性変力薬がてんかんの治療に有効である可能性が示唆された。持続抑制が全体に下がっているのではなく、領域間の不均等により症状が発生しうる、という結果はこれまで全く報告されておらず、ASのみならず中枢神経疾患全体への病態生理探索に一石を投じるものと思われる。また、クロライドトランスポーターの調整薬であるブメタニドも知的障害の改善に寄与することが示された。将来的な治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated tonic inhibition of cortical pyramidal neuron and thalamic relay neurons in AS mice. Tonic inhibition was decreased in the hippocampus and the cortex, but not in thalamo-cortical relay neurons. AS mice showed significantly higher δ -wave power in intracranial EEG. This epileptic feature was improved by MP-022, positive allosteric modulator for 5 subunit-containing GABA_A receptors. By using iPS cells-derived neurons, we also discovered that intrinsic firing property is maintained in AS interneurons but intracellular Cl⁻ regulating protein was dysregulated in AS model mice. These results suggest that not a global but a relative decrease in tonic inhibition in the cortex/hippocampus can disturb the regular thalamo-cortical networks, resulting in epilepsy of AS. Our findings can contribute to the deeper understanding of pathophysiology of AS and developing a new therapeutic strategy.

研究分野：小児神経

キーワード：アンジェルマン症候群 GABA GABA持続抑制

1. 研究開始当初の背景

AS は母性発現遺伝子 UBE3A を原因遺伝子とする遺伝性疾患であり、重度の精神発達遅滞、てんかん、小脳失調を主徴とする (Kishino ら Nat Genet 1997)。UBE3A は蛋白ユビキチン化に関わり、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 ノックアウトマウス (AS マウス) が作成され、病態生理の解明が進められているものの未だ有効な治療法は確立していない。申請者はこれまでに、小脳失調に係わる機能障害として、①AS 小脳顆粒細胞において、シナプス外 GABA 受容体によって惹起される 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) の分解が UBE3A により制御されていることを明らかにし、GABA 持続抑制が AS の治療のターゲットとなりうることを世界にさきがけて報告した (Egawa ら, Sci. Trans. Med., 2012)。しかし、AS における GABA 持続抑制が脳の各領域でどのように障害され、AS の脳機能障害にどのように関与しているのかという疑問は明らかにされていない。GAT1 の発現パターンは脳領域によってことなり、視床などの基底核や視床下部では GAT1 発現神経細胞はほとんど存在しないとされている。従って AS における GABA 持続抑制減弱も脳領域毎に異なり、AS 脳皮質・海馬では GABA 持続抑制が減少しているのに対し、視床・基底核では正常に保たれている可能性が考えられる。この脳領域間での 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ある。また、AS の発症遺伝形式の差異によって、GABA 作動性抑制がどのように異なり、どのように表現型の差異に影響を与えるのか、についても解明されていない。

2. 研究の目的

GABA 作動性抑制が脳領域によって、また発症遺伝形式によって、それぞれ多様に障害されている可能性を、疾患モデルマウスおよび患者由来 iPS 細胞を用いて検証する。さらに皮質・海馬選択的に GABA 持続抑制を増強させる薬剤 (PAM-GABA_A5) による脳機能障害の改善を検討する。一連の実験により「脳領域間での GABA 持続抑制障害の不均等が、AS 脳機能障害のメカニズムの一つとなるとともに、遺伝形式による表現型の差異の原因となる」との作業仮説を検証することで、AS の病態生理解明と、遺伝的背景に沿ったオーダーメイドな治療法の確立をめざす。

3. 研究の方法

3-1 AS マウスの脳領域毎に異なる GABA 持続抑制機能不全

AS マウス、WT マウスから皮質・海馬・視床・視床下部を含む冠状断脳急性スライスを用意し、各々の領域の興奮性神経細胞に電位クランプによるパッチクランプ法を適応し、GABA 受容体アンタゴニスト投与による電流シフトにより GABA 持続抑制を比較・評価した。GABA 持続抑制減弱の原因となる GAT1 について、脳領域毎について Western blotting (WB)、免疫染色にて発現を評価し、機能不全とその多様性の機序を解析した。また、GABA 作動性抑制における重要な制御因子であるカチオンクロライドトランスポーター (Cl⁻を取り込む NKCC1、汲み出す KCC2) の発現についても WB 法にて解析した。

3-2: AS 発症遺伝形式による GABA 作動性抑制の差異についての検証

ドキシサイクリン誘導下に興奮性あるいは抑制性神経に分化が可能となる遺伝子が組み込まれた iPS 細胞をもちいて、遺伝的機序の異なる患者由来興奮性ニューロン・抑制ニューロンを分化させた。それぞれにパッチクランプ法を適応し、細胞の発火能を検証した。

3-3: GABA 持続抑制の多様性がもたらす神経機能障害と治療可能性の検証

マウスの脳波異常、行動異常に対し、PAM-GABA_A5 (MP-III-22、国際共同研究者 Dr James Cook より供与) を投与し、その改善を検証した。また、カチオンクロライドトランスポーターの機能を調整する薬剤、ブメタミドを慢性投与し、認知機能障害、脳波異常に対する効果を検証した。

4. 研究成果

3-1 AS マウスにおける皮質・海馬選択的 GABA 持続抑制の不全が脳波異常、不安様行動の原因となる。

急性脳スライス標本よりパッチクランプ記録を行い、AS モデルの海馬・皮質錐体細胞では GABA 持続抑制が減少しているのに対し、視床皮質投射ニューロンでは差異がないことを明らかにした。次に GABA 受容体アンタゴニストであるフルロセニルをもちいてけいれん誘発実験を行い、AS マウスは成人～中年に相当する時期にけいれん閾値が有意に低下することを明らかにした。皮質・海馬優位に発現し GABA 持続抑制を惹起する GABA 受容体 $\alpha 5$ サブユニットの陽性変力作用 (MP-III-022) を投与すると、AS マウスのてんかん発作閾値は上昇し、逆に視床優位に発現す

る δ サブユニットの陽性変力薬 (Gaboxadol) 投与では逆に低下した(図 1)。脳波の周波数解析を行い、AS にみられる $\delta \sim \theta$ 帯域のパワー亢進は、MP-III-022 で改善し、Gaboxadol で悪化することを明らかにした。また、オープンフィールド試験でみとめられた不安様行動も MP-III-022 で改善することを明らかにした(図 2)。これらの結果から、脳領域間での GABA 持続抑制の不均等が AS のてんかん、および自閉症様症状に重要な役割を果たし、GABA 受容体 $\alpha 5$ サブユニットの活性化は有望な治療戦略であることが示唆された。

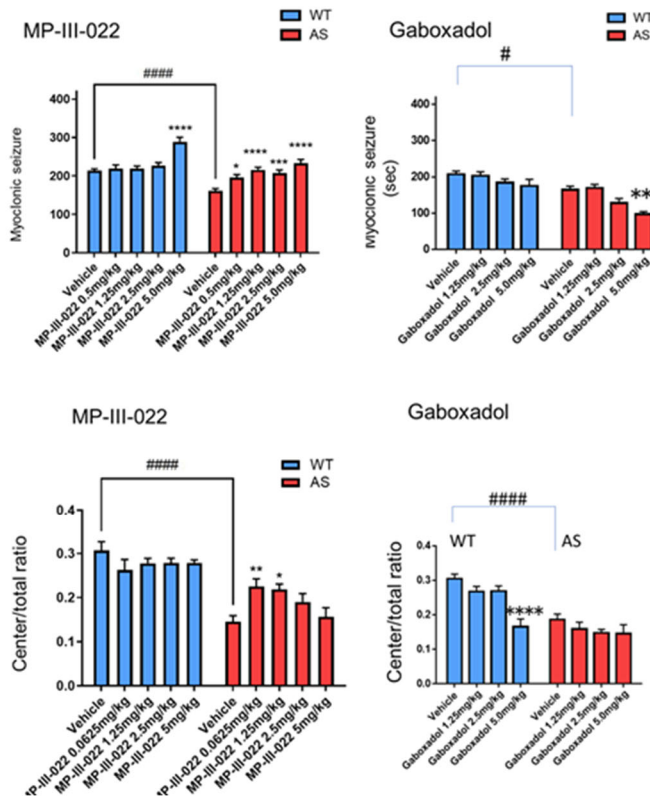


図 1 AS けいれん閾値低下に対する薬理的介入

$\alpha 5$ サブユニット含有 GABA 受容体を活性化させる MP-III-022 の少量投与で AS のけいれん閾値は上昇する。一方、 δ サブユニット含有 GABA 受容体アゴニストである Gaboxadol では高容量で発作閾値はむしろ低下する。

図 2 AS 不安様行動に対する薬理的介入

オープンフィールド法で AS マウスはフィールドの中央にいる時間が有意に WT に比べて短い。この結果は AS の不安様行動を反映する。少量の MP-III-022 投与で AS マウスが中央スペースにいる時間は有意に長くなり、AS マウスに対し、MP-III-022 は抗不安作用を有することを示す

3-2 抑制介在ニューロンの発火は遺伝型で差異がない

各遺伝型の患者より作成した iPC 細胞より興奮性ニューロン、抑制性ニューロンをそれぞれ分化させ、発火能を検討したが、遺伝型毎で差異をみとめなかった。シナプス性抑制に関して、遺伝型によって差異はないことが示唆された。

3-3 AS マウスにおけるカチオンクロライドトランスポーターの発現異常が認知機能に関与し、ブメタニドの投与によって症状は改善する。

海馬において Cl⁻を取り込む NKCC1 の発現は AS モデルマウスで有意に亢進しており、KCC2 は逆に減少していることを明らかにした。これらの結果からは、AS モデルマウスの神経細胞では細胞内クロライド濃度が上昇していることを予想したが、グラミシジン穿孔パッチクランプ法により評価すると神経細胞内のクロライド濃度は平均すると差がなく、AS マウスの方が高い値を示すものから低い値を示すものまで細胞毎の分散(ばらつき)がより大きいという結果が得られた(図 3)。GABA 持続電流の減少が、これらカチオンクロライドトランスポーターの発現異常による細胞内クロライド濃度上昇を補償している可能性が考えられた。AS モデルマウスは物体認識記憶の低下を示し、患者における知的障害を反映すると考えられる。NKCC1 を抑制することが知られている利尿剤ブメタニドを Alzet 浸透圧ポンプにより慢性投与すると、物体認識記憶は改善することが明らかとなった(図 4)。過剰となっている NKCC1 は、細胞内クロライド濃度の平均に差がなかったとしても神経機能障害をきたしうることを示された。

一連の結果から、GABA 持続抑制の領域間不均等および、細胞内 Cl⁻濃度を制御する NKCC1、KCC2 の発現の不均等が AS の脳機能障害に関与することが明らかとなった。このような GABA 作動性抑制の制御不均等は薬剤で介入しうるものであり、今回もちいた薬剤、MP-III-022 およびブメタニドは AS の治療法として有望である可能性が考えられた。AS に対してはこれまで有効な薬物療法が提示されておらず、AS 患者の症状緩和に貢献しうる成果と考えられる。

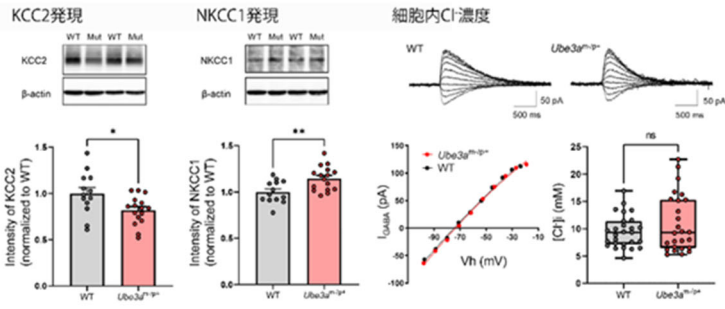


図3. 海馬 KCC2、NKCC1 発現と細胞内クロライド濃度。アンジェルマン症候群モデルマウスでは、クロライドを汲み出す KCC2 は減少、汲み入れる NKCC1 は増加している。細胞内クロライド濃度は AS マウスでより分散している。

新奇物体認識試験による認知機能評価

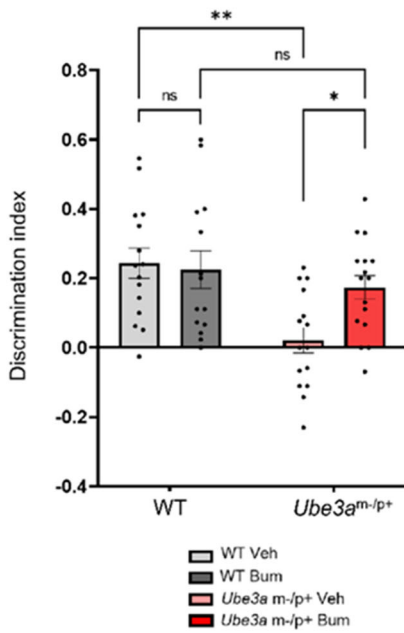


図4. 新奇物体認識試験による認知機能評価。新奇の物体を認識する分別係数は、ブメタニド非投与群では有意に低いですが、投与群では改善している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Egawa Kiyoshi, Saitoh Shinji, Asahina Naoko, Shiraishi Hideaki	4. 巻 43
2. 論文標題 Variance in the pathophysiological impact of the hemizygoty of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit genes between Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 521 ~ 527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2020.12.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Egawa Kiyoshi, Nakakubo Sachiko, Kimura Shuhei, Goto Takeru, Manabe Atsushi, Shiraishi Hideaki	4. 巻 43
2. 論文標題 Flurothyl-induced seizure paradigm revealed higher seizure susceptibility in middle-aged Angelman syndrome mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 515 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2020.12.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Egawa Kiyoshi, Saitoh Shinji, Asahina Naoko, Shiraishi Hideaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Short-latency somatosensory-evoked potentials demonstrate cortical dysfunction in patients with Angelman syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eNeurological Sci	6. 最初と最後の頁 100298 ~ 100298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ensci.2020.100298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Egawa Kiyoshi, Watanabe Miho, Shiraishi Hideaki, Sato Daisuke, Takahashi Yukitoshi, Nishio Saori, Fukuda Atsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Imbalanced expression of cation-chloride cotransporters as a potential therapeutic target in an Angelman syndrome mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32376-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kiyoshi Egawa, Yoshihiro Hirata, Mitsuru Ishikawa, Hideaki Siraishi, Shinji Saito, Yukitoshi Takahasi, Hironobu Okuno, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Electrophysiological properties of excitatory or inhibitory neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) in Angelman syndrome.
3. 学会等名 The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Egawa K, Shiraishi H, Savic M, Li G, Cook J.
2. 発表標題 Imbalanced Tonic Inhibition Between the Cortex and Thalamus Causes Epileptiform Activity in Mice Model of Angelman Syndrome.
3. 学会等名 American Epilepsy Society, 63th Scientific meeting, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江川潔
2. 発表標題 遺伝性てんかん・発達障害動物モデルにおける認知機能評価の難しさ アンジェルマン症候群モデルマウスにおける経験
3. 学会等名 第53回日本てんかん学会総会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田快洋、石川充、白石秀明、佐藤大介、斎藤伸治、高橋幸利、奥野博庸、岡野栄之、江川潔
2. 発表標題 アンジェルマン症候群患者由来iPS細胞より誘導された興奮性 / 抑制性神経細胞の機能解析
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江川潔、平田快洋、白石秀明、佐藤大介、齋藤伸治、高橋幸利、奥野博庸、石川充、岡野栄之
2. 発表標題 アンジェルマン症候群患者iPS細胞由来ニューロンの電気生理学的検討
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiyoshi Egawa and Atuo Fukuda
2. 発表標題 Pathophysiological impact of diverse dysregulation of tonic inhibition in Angelman syndrome
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	岡野 栄之 (Okano Hideyuki) (60160694)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Univ of Wisconsin, Dept. of Chemistry		