

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07577

研究課題名(和文) シナプス伝達異常がもたらす攻撃性亢進の脳責任領域の探索と病態機序の解明

研究課題名(英文) Identification of the brain regions responsible for epilepsy and aggression induced by impaired synaptic transmission

研究代表者

宮本 浩行 (Miyamoto, Hiroyuki)

東京大学・ニューロインテリジェンス国際研究機構・特任准教授

研究者番号：90312280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Munc18-1タンパク質(遺伝子STXBP1)は神経シナプスに局在し、神経伝達物質放出に必須の分子であり、STXBP1遺伝子変異はてんかんや神経発達障害において広く報告されている。これら疾患に攻撃性の亢進が伴うことも多いが、申請者はStxbp1欠損モデルマウスにてんかん、記憶障害、攻撃性の亢進を見出した。このマウスを用いた本研究において、大脳皮質から線条体への興奮性シナプス伝達低下がてんかんを誘発するという新規の病態生理機構が明らかとなった。てんかんと攻撃性など種々の精神症状との関連も指摘され、てんかんを誘発する神経回路と攻撃性等との関係を追究することで研究の展開に寄与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで大脳皮質-視床回路が中心かつ唯一の欠神てんかんの発生機構であるという従来の説に対して、大脳皮質から大脳基底核への興奮性入力低下によって欠神てんかんが生じ得ることが明らかとなり従来説の再考を促すことになった。今後てんかんに対する的確な診断や効果の高い治療法の開発に貢献することが期待される。またこれまで運動機能、記憶・学習などの認知機能への深い関与が知られる大脳基底核であるが、意識状態を含め脳回路全体の安定化にも寄与している側面も浮かび上がったと考える。

研究成果の概要(英文)：The Munc18-1 synaptic protein (gene STXBP1) is essential for neurotransmitter release. STXBP1 gene mutations are widely observed in patients with epilepsies, although the circuit basis remains elusive. We show that mice with Stxbp1 haploinsufficiency exhibit absence seizures with spike-and-wave discharges (SWDs) initiated by reduced cortical excitatory transmission into the striatum. In Stxbp1 haploinsufficient mice, there is a reduction in excitatory transmission from the neocortex to striatal fast-spiking interneurons (FSIs). FSI activity transiently decreases at SWD onset, and pharmacological potentiation of AMPA receptors in the striatum suppresses SWDs. Furthermore, in wild-type mice, pharmacological inhibition of cortico-striatal FSI excitatory transmission triggers absence and convulsive seizures. These findings suggest that impaired cortico-striatal excitatory transmission is a plausible mechanism that triggers epilepsy in Stxbp1 haploinsufficient mice.

研究分野：神経科学

キーワード：Stxbp1 Scn2a シナプス伝達 欠神てんかん 皮質-線条体 攻撃性 発達障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞シナプス前膜に存在しシナプス小胞や syntaxin-1 分子と複合体を形成する Munc18-1 タンパク分子は神経伝達物質放出を制御している。これをコードするマウス遺伝子 *Stxbp1* のホモ欠損により興奮性・抑制性のシナプス伝達が消失し、ヘテロ欠損ではシナプス伝達の低下が示されている。最近ヒト *STXBP1* 遺伝子ナンセンス・ミスセンス変異が症候性てんかん、知的障害、自閉症などの発達障害や統合失調症など精神疾患に幅広く見出されている。また乳児の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の強い相関も報告されている。*Munc18-1* の変異・欠損によるシナプス伝達の障害がこれら病態発症の背景にあると考えられる。しかし有力な原因遺伝子候補にもかかわらず *Stxbp1* ヘテロ欠損マウス (*Stxbp1* マウス) の包括的な行動表現型解析は少なく、てんかんも報告されていなかった。そこで私たちは一連の行動解析を進め、てんかん、記憶・学習障害、そして *Stxbp1* マウスの顕著な攻撃性の亢進を見出した。さらに薬理的な興奮性シナプス伝達の増強による攻撃性の顕著な抑制(運動機能は阻害しない)を発見した (Miyamoto et al. 2017)。しかし *Stxbp1* 欠損によるシナプス伝達の低下がどのようにして脳神経回路の不安定化であるてんかんや、認知機能障害、攻撃性などの種々の精神症状に結びつくのかその病態生理は未解決の問題である。

2. 研究の目的

本研究は、発達障害や精神疾患に高頻度に伴うてんかんや攻撃性に着目し、【1】どの脳領域のシナプス伝達低下が主因となるのか、【2】シナプス伝達を補強して症状を緩和できるか、を問いとしてシナプス伝達低下によって引き起こされる病態分子・生理メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Stxbp1* 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した。

(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った。

(3) 興奮性細胞、抑制性細胞あるいは脳領域・神経投射特異的に *Stxbp1* を欠損させ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した。

(4) シナプス伝達が *Munc18-1* 欠損によって障害されることは培養細胞で確認されているが、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(グルタミン酸) 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した。また脳スライスを用いた細胞種ごとのシナプス伝達も併せて検討した。

(5) てんかん生成における責任領域や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った。ついて脳局所的に興奮性または抑制性シナプス伝達を強化・減弱させる薬理的手法、抑制性細胞をターゲットとした薬理遺伝学的手法、局所微小電気刺激法等を適用しててんかん活動の制御を試みた。

(6) てんかん責任領域における神経活動の in vivo 記録を自由行動下で行い、てんかん脳波との相関を調べた。

4. 研究成果

今研究期間においててんかん生成に関する神経回路の理解について研究が大きく進展した。この成果を中心に述べたい。

【要旨】*Stxbp1* ヘテロ欠損マウスは棘徐波 (Spike-and-Wave Discharges: SWDs) を伴う欠神発作を呈する (図1)。さらに大脳皮質から線条体への興奮入力低下がてんかんとしての脳回路の活動異常を引き起こす原因であることを突き止め報告した (Ogiwara, Miyamoto et al., *Commun Biol.* 2018, Miyamoto et al., *Nat Commun.* 2019) (図2)。大脳基底核もまた種々の精神症状に関与することが知られており、皮質 - 線条体経路の異常が攻撃性などの行動異常に結びつく可能性が示唆された。最終年度においては本研究成果を踏まえ、脳活動をリアルタイムで分析し脳にフィードバック刺激を与えることで対象行動の長期的変容をもたらす神経生理学

の方法を検討した。

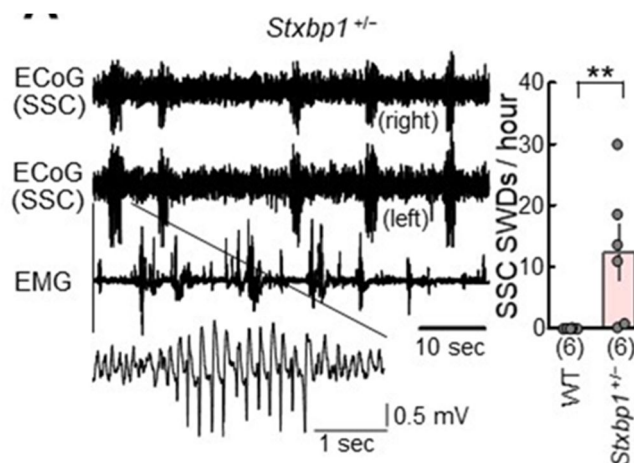


図1 Stxbp1^{+/-}マウス脳波 (ECoG) で両側に観察される棘徐波 (Spike-and-Wave Discharges: SWDs)。SSC: 体性感覚野、EMG: 筋電図、WT: 野生型マウス。

【研究成果の詳細】

(1) Stxbp1 ホモ欠損 (Stxbp1^{-/-}マウス) で生育する個体を得ることはなかったが、Stxbp1 ヘテロ欠損マウス (Stxbp1^{+/-}マウス) は成熟し、運動障害等はなく観察上は野生型との差異はみとめられなかった。しかし各種行動解析の結果、情動性記憶・学習の障害や攻撃性の亢進が明らかになっている。Stxbp1^{+/-}マウスは SWDs を伴う欠神てんかん性の異常脳波を示した。SWDs は覚醒・睡眠時ともに観察されるが非けいれん性で、覚醒時の SWDs には行動停止が伴った。このマウス SWDs はヒト治療に用いられる抗てんかん薬 ethosuximide により有意に抑制された。SWDs は両側性で広い脳領域に認められたが、特に大脳皮質と線条体 (大脳基底核群の一部で大脳皮質から興奮性入力を受けている) において強く観察された。これら Stxbp1^{+/-}マウスの SWDs 特性は Scn2a ヘテロ欠損マウス (Scn2a^{+/-}) やナンセンス変異ノックインマウス (Scn2a^{RX/+}) の SWDs でも共通に観察された。なお Scn2a 遺伝子は電位依存性ナトリウムチャネル サブユニット (Nav1.2) をコードし、大脳皮質などの興奮性神経細胞に発現している。

(2) ついで Stxbp1^{+/-}マウスの大脳皮質、線条体、視床の神経活動を GABA_A 受容体作動薬 muscimol で局所的に抑制すると SWDs 頻度が減少したことから、これら脳領域が SWDs 生成に深く関与していることが予測された。逆に Stxbp1^{+/-}マウス線条体を局所的に短時間かつ単回で微小電気刺激すると SWDs が高い頻度で誘発されたことから、線条体が SWDs 生成回路に組み込まれていることが示唆された。興味深いことに、大脳皮質・海馬の興奮性神経細胞特異的に Stxbp1 もしくは Scn2a をヘテロ欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (Emx1-Cre 依存性) で SWDs が生じたのに対し、全脳の抑制性神経細胞のみでヘテロ欠損させたマウス (VGAT-Cre 依存性) では観察されなかった。この結果は、欠神発作の一次的原因が他のてんかんでしばしば報告されている抑制性神経細胞の機能低下ではなく、興奮性神経細胞の機能の低下にあることが示唆された。

(3) さらに Stxbp1^{+/-}マウスの線条体では興奮性神経伝達物質グルタミン酸放出は低下している (in vivo マイクロダイアリシス法で同時測定した抑制性 GABA 放出は低下していない)。大脳皮質から線条体への興奮性神経伝達を CX516 で薬理的にグルタミン酸 AMPA 受容体の機能を亢進させると SWDs は減少する、大脳皮質 - 線条体投射神経細胞で Stxbp1 もしくは Scn2a を欠損させると SWDs が見られるが、大脳皮質 - 視床投射神経細胞で欠損させても SWDs は見られないことを見出した。これら の結果から、大脳皮質から線条体への興奮性神経伝達の低下が欠神発作 SWDs を引き起こすことが支持された。

(4) さらに Stxbp1^{+/-}マウス線条体では medium spiny neuron (MSN) ではなく介在性の fast-spiking interneuron (FSI) において、大脳皮質からの興奮性入力的大幅な低下が見られること、野生型マウスにおいて Ca²⁺ permeable AMPA 受容体阻害剤 (1-naphthyl acetyl spermine) により線条体抑制性介在細胞 (fast-spiking interneurons: FSI) への興奮性入力を特異的に抑えると、用量依存的に欠神発作 SWDs、ミオクロニー発作、ジストニア、強直間代発作が生じること、Stxbp1^{+/-}マウス線条体 FSI 細胞の発火を薬理遺伝学的手法 (DREAAD 法) で亢進させると SWDs が減少すること、自由行動中の Stxbp1^{+/-}マウス線条体 FSI 細胞は SWDs の発生に一致・先行して神経発火が一時的に低下することなど一貫した結果を見いだした。以上 から、大脳皮質から線条体 FSI 細胞への興奮性入力の低下が SWDs を引き起こしていることが強く推察された。

(5) また多くの研究グループで長く典型的な欠神てんかんモデルとみなされてきた Genetic

Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) ラットにおいても線条体への一連の薬理的操作に対する脳応答に整合する結果を得たことから本神経回路モデルは一般的な欠神てんかん発作 SWDs の発症神経回路である可能性が支持された。

(6) 本研究結果と先行研究の知見を統合し「大脳皮質 - 大脳基底核(間接路) - 視床を介する欠神発作 SWDs の発症神経回路」を私たちは提案した(図2)。大脳皮質 - 視床回路が中心かつ唯一の欠神発作 SWDs 発生機構であるという従来説に対して、大脳皮質から大脳基底核への興奮性入力の低下によって欠神発作が生じ得ることが明らかとなり、従来説の再考を促すことになった。本発症回路が STXBP1 や SCN2A 以外の遺伝子変異によって引き起こされる欠神てんかんでも成立するのか、より重篤なてんかん発作にもこの回路が役割を担っているのかなど、今後の解析が待たれる。また本成果は、今まで想定されていた欠神発作のメカニズムに転換を迫るとともに、今後てんかんに対する的確な診断や効果の高い治療法の開発に貢献することが期待される。またこれまで運動機能、記憶・学習などの認知機能への深い関与が知られる大脳基底核であるが、意識状態を含め脳回路全体の安定化にも寄与している側面も浮かび上がったと考える。

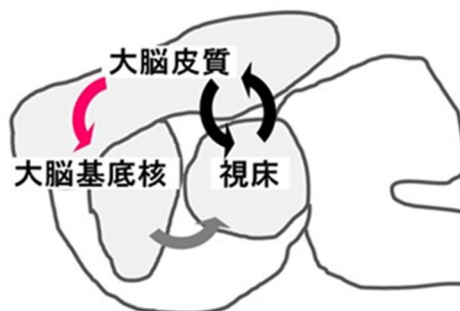


図2 脳皮質 - 大脳基底核(間接路) - 視床を介する欠神発作 SWDs の発症神経回路モデル。大脳皮質から大脳基底核への興奮性シナプス伝達の低下(赤矢印)が欠神発作の引き金になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsuda Yoshi-Taka, Miyamoto Hiroyuki, Joho Rolf H., Hensch Takao K	4. 巻 -
2. 論文標題 Kv3.1 channels regulate the rate of critical period plasticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.04.003	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 該当する

1. 著者名 Hayase Y, Miyamoto H (5/32), Hoshino M et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Down syndrome cell adhesion molecule like-1 (DSCAML1) links the GABA system and seizure susceptibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-020-01082-6	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 Yamagata Tetsushi, Raveau Matthieu, Kobayashi Kenta, Miyamoto Hiroyuki, Tatsukawa Tetsuya, Ogiwara Ikuo, Itohara Shigeyoshi, Hensch Takao K., Yamakawa Kazuhiro	4. 巻 141
2. 論文標題 CRISPR/dCas9-based Scn1a gene activation in inhibitory neurons ameliorates epileptic and behavioral phenotypes of Dravet syndrome model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104954 ~ 104954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2020.104954	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 該当する

1. 著者名 Miyamoto Hiroyuki, Tatsukawa Tetsuya, Shimohata Atsushi, Yamagata Tetsushi, Suzuki Toshimitsu, Amano Kenji, Mazaki Emi, Raveau Matthieu, Ogiwara Ikuo, Oba-Asaka Atsuko, Hensch Takao K., Itohara Shigeyoshi, Sakimura Kenji, Kobayashi Kenta, Kobayashi Kazuto, Yamakawa Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Impaired cortico-striatal excitatory transmission triggers epilepsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09954-9	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 該当する

1. 著者名 Tatsukawa Tetsuya, Raveau Matthieu, Ogiwara Ikuo, Hattori Satoko, Miyamoto Hiroyuki, Mazaki Emi, Itohara Shigeyoshi, Miyakawa Tsuyoshi, Montal Mauricio, Yamakawa Kazuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Scn2a haploinsufficient mice display a spectrum of phenotypes affecting anxiety, sociability, memory flexibility and amphetamine CX516 rescues their hyperactivity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Autism	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13229-019-0265-5	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 該当する

1. 著者名 Ogiwara Ikuo, Miyamoto Hiroyuki, Tatsukawa Tetsuya, Yamagata Tetsushi, Nakayama Tojo, Atapour Nafiseh, Miura Eriko, Mazaki Emi, Ernst Sara J., Cao Dezhi, Ohtani Hideyuki, Itohara Shigeyoshi, Yanagawa Yuchio, Montal Mauricio, Yuzaki Michisuke, Inoue Yushi, Hensch Takao K., Noebels Jeffrey L., Yamakawa Kazuhiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Nav1.2 haploinsufficiency in excitatory neurons causes absence-like seizures in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0099-2	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮本浩行
2. 発表標題 乳児難治性てんかん大田原症候群：二つの独立したモデルマウスの解析による
3. 学会等名 てんかん治療研究振興財団 研究報告会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本浩行
2. 発表標題 知性の源泉としての睡眠
3. 学会等名 世界トップレベル研究拠点プログラム WPI 合同一般講演会「起源への問い」 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本浩行
2. 発表標題 大脳皮質興奮性神経伝達の低下によって生じる欠神てんかんの新たな神経回路メカニズム
3. 学会等名 てんかん治療研究振興財団 研究褒賞受賞記念報告2020年度(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本睡眠学会	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 712
3. 書名 睡眠学	

〔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

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	Baylor College of Medicine	UCSD	Harvard university	他1機関