

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08334

研究課題名(和文) 結節性硬化症の新たな標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel drugs for tuberous sclerosis complex

研究代表者

久恒 智博 (HISATSUNE, Chihiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：10321803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：結節性硬化症(Tuberous sclerosis complex：TSC)は全身の過誤腫を特徴とする疾患である。てんかん発作などの神経症状を起こすが、その発症メカニズムの詳細は明らかになっていない。本研究では、TSC2欠損型iPS細胞由来のヒト神経細胞ではmTOR依存的なL型カルシウムチャネル(Cav1.3)の発現上昇がみられ、その結果、脱分極刺激時における細胞外からのカルシウム流入が増大することを明らかにした。さらにこのカルシウム流入の増大は、神経可塑性を制御する転写因子CREBの持続的な活性化を引き起こすことや、神経軸索の異常な伸長に關与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TSCは全身の良性腫瘍を特徴とする難病である。その患者の多くが難治性てんかんや知的障害などの神経症状を乳児期から発症するため、治療薬の開発が望まれている。従来TSCはmTORの異常な活性化により発症すると考えられており、「mTORを標的にした治療薬」の開発が世界的に進められてきた。そのため、mTORの阻害剤のラパマイシンやその誘導体のエベロリムスが用いられているが、免疫抑制剤であるために副作用も問題となっている。本研究の結果は、TSCのてんかん症状にカルシウムチャネルの異常が関わることを示唆するものであり、カルシウムチャネルを標的とした結節性硬化症の新薬の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：To examine the possible mechanism of epilepsy onset in TSC, we developed neurons from human iPS cells with TSC2 mutation and analyzed their intracellular Ca²⁺ dynamics by Ca²⁺ imaging. We found that cultured TSC2-deficient neurons exhibited highly synchronized neuronal activity. Moreover, TSC2-deficient neurons presented enhanced Ca²⁺ influx via L-type Ca²⁺ channels (LTCCs), which contributed to the abnormal neurite extension and sustained activation of cAMP response element binding protein (CREB), a critical mediator of synaptic plasticity. Expression of Cav1.3, a subtype of LTCCs, was increased in TSC2-deficient neurons, but long-term rapamycin treatment suppressed this increase and reversed the altered neuronal activity and neurite extensions. Thus, we identified Cav1.3 LTCC as a critical downstream component of TSC-mTOR signaling that would trigger enhanced neuronal network activity of TSC2-deficient neurons.

研究分野：分子生物学

キーワード：カルシウム てんかん

1. 研究開始当初の背景

結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis Complex: TSC) は、脳、腎臓、肺、心臓などのさまざまな部位に過誤腫と呼ばれる良性の腫瘍ができる全身性疾患である。人口 1 万人から数千人に 1 人という割合で発症し、顔面のニキビ様の腫瘍のほか、乳児期から始まる難治性のもくもく病や知的障害、自閉症などの中枢神経系の症状を発症する。

結節性硬化症の原因遺伝子は、*TSC1* と *TSC2* 遺伝子である。*TSC1* と *TSC2* は複合体を形成し、低分子量 G タンパク質 Rheb を GTP 結合型 (活性化型) から GDP 結合型 (不活性化型) にする GTPase 活性化因子として機能する。このため、*TSC1* あるいは *TSC2* の遺伝子変異は Rheb を GTP 結合型にし、その下流の mTOR (リン酸化酵素) の活性化を促進する。結節性硬化症の発症は、この mTOR の恒常的な活性化が深く関わると考えられているが、mTOR がもくもく病や知的障害などの神経症状を引き起こす詳細な発症機構は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

TSC の患者が発症するもくもく病や知的障害の発症メカニズムを解明するために、*TSC2* 遺伝子を欠損したヒト iPS 細胞を樹立して神経細胞へ分化させ、その形態学的特徴や細胞内カルシウム動態に着目することで、TSC の神経症状の発症メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) *TSC2* 変異型 iPS 細胞の作製

理化学研究所から入手したヒト iPS 細胞 (409B2 株) に、Cas9 発現プラスミドおよび *TSC2* のエキソン 4 をターゲットとした sgRNA をエレクトロポレーション法にて導入した。導入した細胞から DNA を抽出して目的変異部位を含む領域を PCR で増幅後、T7 endonuclease I で消化して変異の有無を確認した。さらに DNA シーケンスをして変異の詳細を解析し、*TSC2* 欠損型 iPS 細胞を取得した。

(2) ヒト iPS 細胞の神経細胞への誘導

iPS 細胞は StemMACS iPS-Brew XF 培地 (Miltenyi Biotec) を用いてマトリゲルコートした dish で培養継代を行った。iPS 細胞から N2 培地 (DMEM/F12, N2, B27-RA, 2mM Glutamax, 1 mM Dorsomorphin, 10 mM SB431542) 培地中で胚様体および Rosettes (N2 培地 + 1 mg/ml ラミニン) を形成させたのち、NPC 培地 (DMEM/F12 (Gibco), N2(x1) (Gibco), B27-RA(x1) (Gibco), 2mM Glutamax, 1 mg/ml laminin (Sigma), 20 ng/ml FGF (Wako)) により神経前駆細胞に分化させた。その後、興奮性神経細胞への分化は Neural Maintenance 培地 (500ml DMEM:F12, 2.5 mM Insulin (Sigma), 50 mM 2-mercaptoethanol (Sigma), Non essential amino acids (1x) (Sigma), 0.5 mM Sodium Pyruvate (Sigma), Pens/Strep, N2(0.5X), B27(0.5X), 2mM Glutamax (Gibco), 500ml Neurobasal, CultureOne™ Supplement (1X) (Thermo Fischer) /1L) 中で行い、週に 2 回半量の培地を交換して維持した。

(3) 神経細胞の形態解析

神経細胞に EGFP を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV-Synapsin promoter-EGFP) を低濃度で感染させ、神経細胞の軸索伸長や細胞体の大きさを測定した。

(4) カルシウムイメージング法

神経細胞に 5 mM Fluo-8-AM (AAT Bioquest) を室温 30 分間ロードした。細胞を洗浄後、BSS 緩衝液 (20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM Glucose, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) 中にて蛍光顕微鏡を用いて蛍光変化を測定した (X20 レンズ、励起フィルター 470-495 nm、吸収フィルター 510-550 nm、ダイクロイックミラー 505 nm, 1 sec/flame, 3 分間撮影した)。

4. 研究成果

CRISPR-Cas9 法により *TSC2* 変異型ヒト iPS 細胞を作製し、大脳皮質の興奮性神経細胞に分化させた。GFP を発現する AAV を感染させてその形態を野生型の神経細胞と比較した結果、*TSC2* 欠損型ヒト神経細胞は細胞体が大きく軸索が長いことがわかった。これらの形態変化は mTOR 阻害剤のラパマイシンで抑制されたため、mTOR 依存的な現象であることがわかった (図 1)。

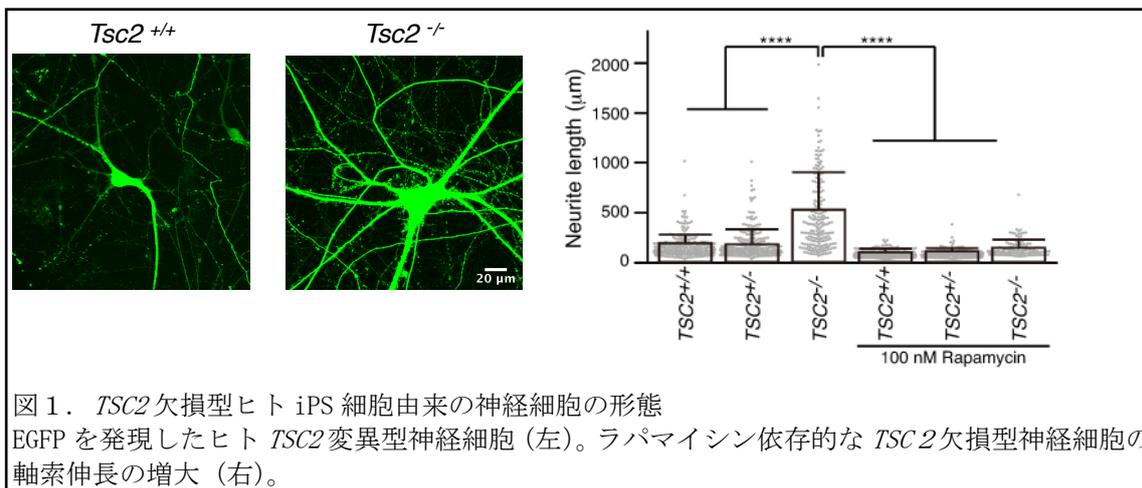


図1. *TSC2*欠損型ヒト iPS 細胞由来の神経細胞の形態
EGFP を発現したヒト *TSC2*変異型神経細胞 (左)。ラパマイシン依存的な *TSC2*欠損型神経細胞の軸索伸長の増大 (右)。

さらにカルシウムイメージング法を用いて自発的な神経活動を測定した結果、*TSC2* 欠損型ヒト神経細胞は野生型に比べて高頻度に発火し、同調した神経活動を示すことを明らかにした (図2)。この *TSC2* 欠損型ヒト神経細胞の同調した神経活動は長期的なラパマイシン処理により正常型に戻ることも明らかにした (図3)。

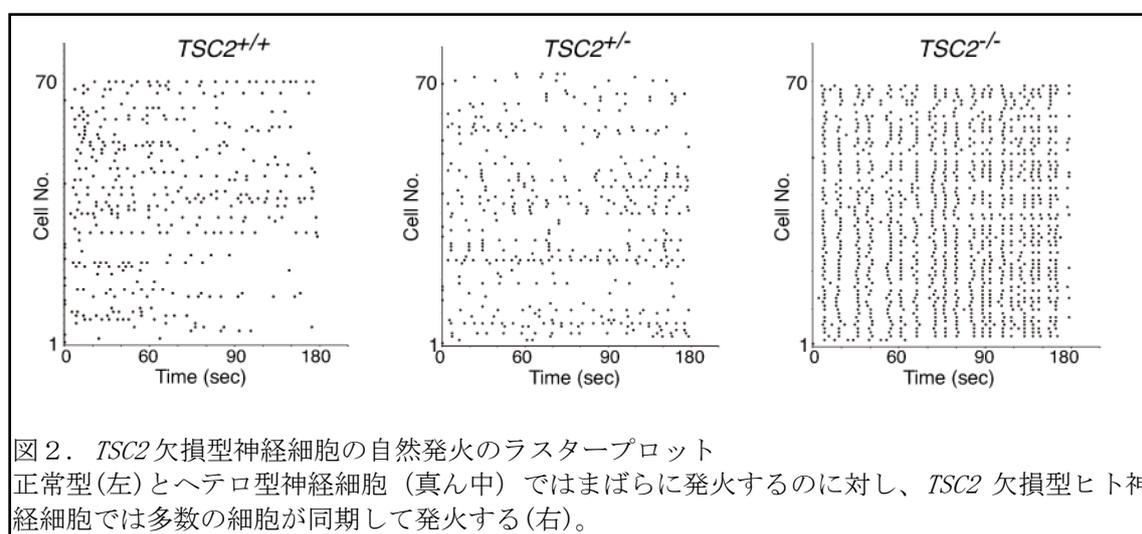


図2. *TSC2*欠損型神経細胞の自然発火のラスタープロット
正常型(左)とヘテロ型神経細胞 (真ん中) ではまばらに発火するのに対し、*TSC2* 欠損型ヒト神経細胞では多数の細胞が同期して発火する(右)。

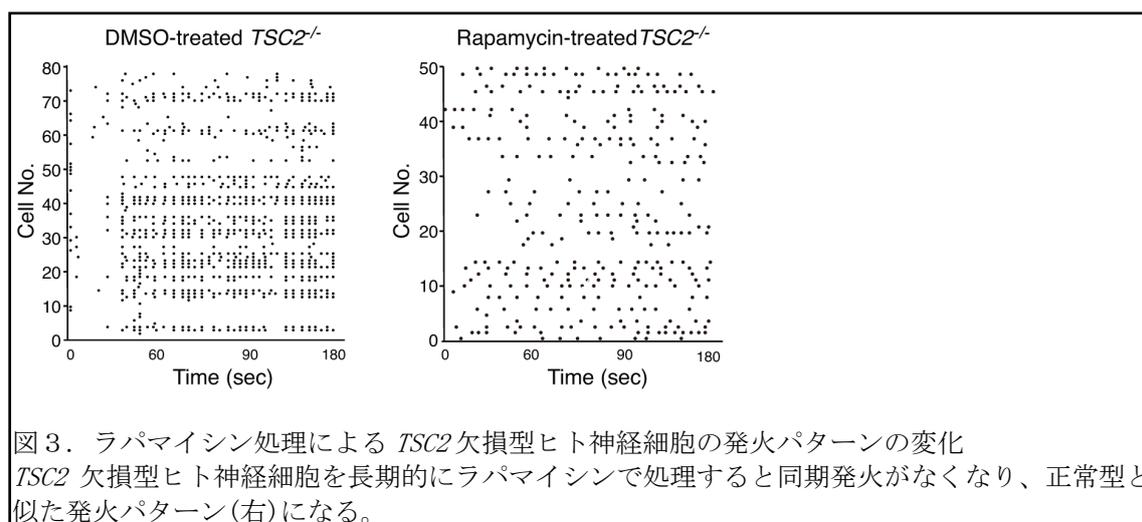


図3. ラパマイシン処理による *TSC2*欠損型ヒト神経細胞の発火パターンの変化
TSC2 欠損型ヒト神経細胞を長期的にラパマイシンで処理すると同期発火がなくなり、正常型と似た発火パターン(右)になる。

神経細胞の活動に影響する要因の一つに細胞内カルシウム濃度が挙げられる。そこで細胞内カルシウム濃度を詳しく調べたところ、*TSC2* 欠損型ヒト神経細胞において脱分極刺激時のカルシウム流入が正常型細胞に比べて顕著に増大していることを発見した。この現象も同期発火や軸索伸長と同様に、長期的なラパマイシン処理で正常型に戻るということがわかった(図4)。

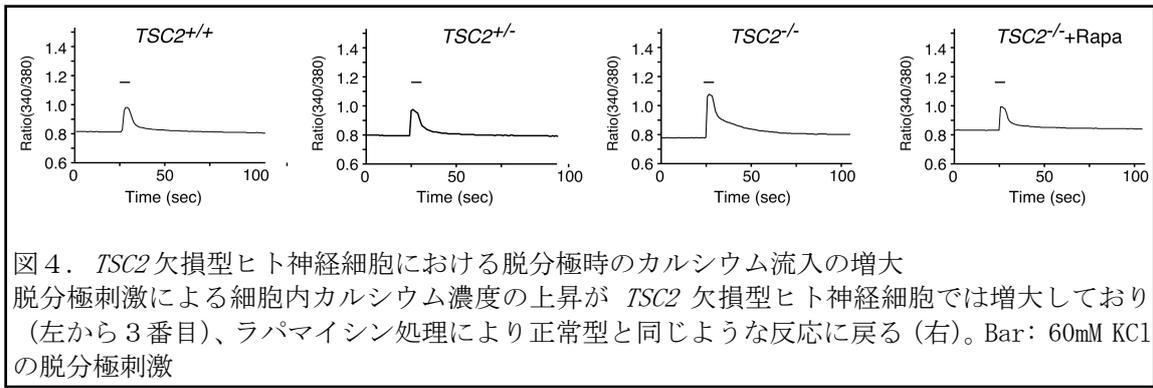


図4. *TSC2*欠損型ヒト神経細胞における脱分極時のカルシウム流入の増大
脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇が *TSC2* 欠損型ヒト神経細胞では増大しており (左から3番目)、ラパマイシン処理により正常型と同じような反応に戻る (右)。Bar: 60mM KCl の脱分極刺激

また薬理的な特徴によりこのカルシウム流入の増大に L 型カルシウムチャネルが寄与していることがわかった。そこで L 型カルシウムチャネルのうちどのタイプのカルシウムチャネルの発現量が変化しているかを PCR 法、ウエスタン法、免疫染色法を用いて調べたところ、CACNA1D (Cav1.3) の発現量が *TSC2* 欠損型ヒト神経細胞で増大していることを明らかにした (図5)。

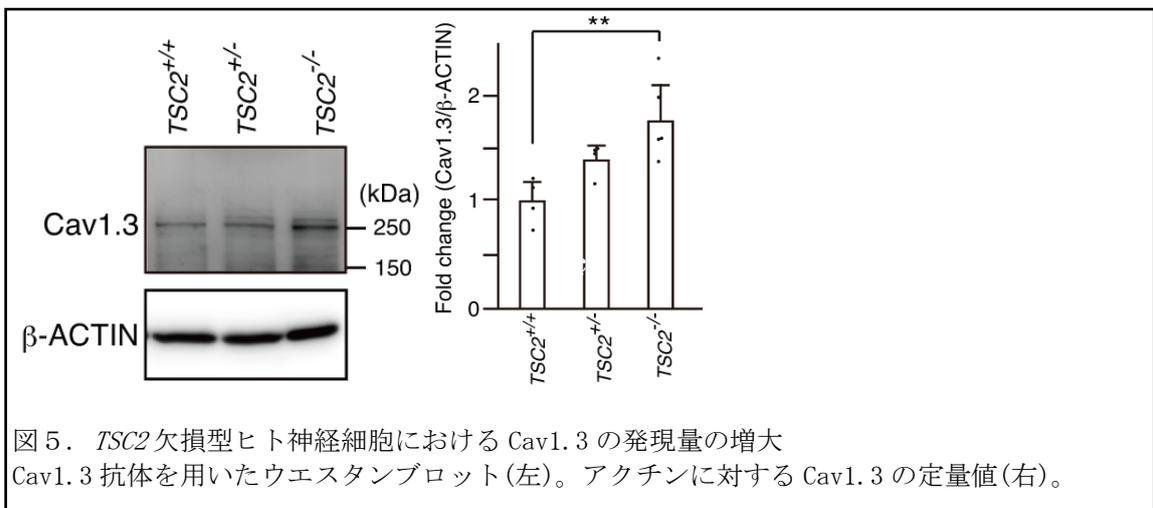


図5. *TSC2*欠損型ヒト神経細胞における Cav1.3 の発現量の増大
Cav1.3 抗体を用いたウエスタンブロット (左)。アクチンに対する Cav1.3 の定量値 (右)。

さらに mTOR の活性化によるカルシウム流入の増加と Cav1.3 の発現上昇を別の方法で確かめるため、正常型ヒト神経細胞に活性化型 Rheb を強制発現させて mTOR を活性化し、Cav1.3 チャネルの発現量とカルシウムの流入量への影響を調べた。その結果、活性化 Rheb を強制発現した細胞では脱分極刺激時のカルシウム流入量の増大がみられ (図6左)、Cav1.3 の発現量が増加していることを明らかにした (図6右)。

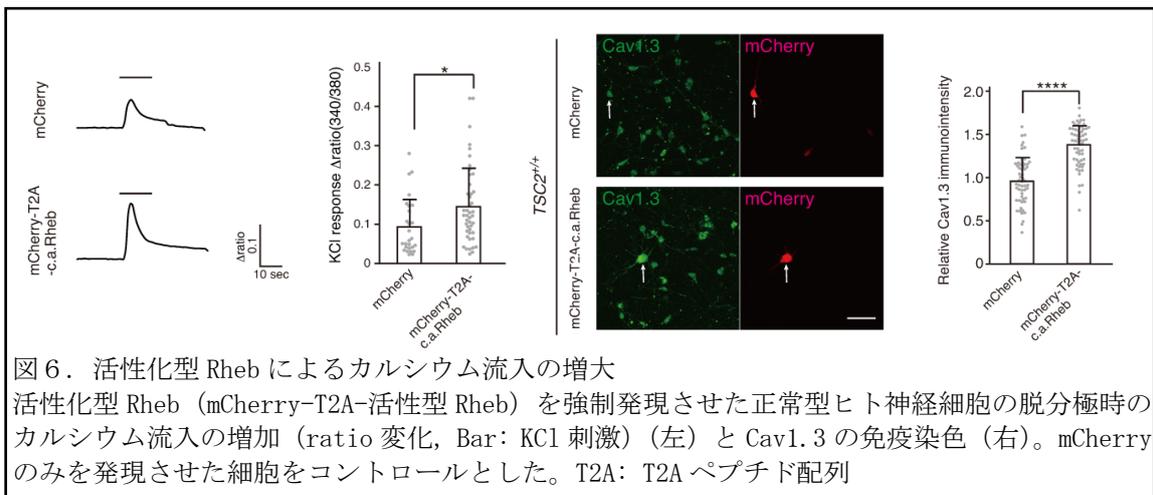


図6. 活性化型 Rheb によるカルシウム流入の増大
活性化型 Rheb (mCherry-T2A-活性化型 Rheb) を強制発現させた正常型ヒト神経細胞の脱分極時のカルシウム流入の増加 (ratio 変化, Bar: KCl 刺激) (左) と Cav1.3 の免疫染色 (右)。mCherry のみを発現させた細胞をコントロールとした。T2A: T2A ペプチド配列

最後に *TSC2* 欠損型ヒト神経細胞における神経軸索の伸長や神経可塑性に関わる転写因子 CREB の活性化に、このカルシウム流入の増大が与える影響について調べた。その結果、*TSC2* 欠損型ヒト神経細胞で L 型カルシウムチャネル阻害剤による軸索伸長の抑制が正常型神経細胞よりも大きいことがわかった。また神経可塑性に関与する転写因子 “CREB” の 133 番目のセリン残基のリン酸化状態を脱分極刺激後に時間を追って調べた結果、正常型神経細胞では KCl 刺激後の転

写因子 CREB のリン酸化が一過性であるのに対し、*TSC2* 欠損型ヒト神経細胞ではより長期的なリン酸化がみられることがわかった。一方 mTOR 阻害剤で処理した *TSC2* 欠損型神経細胞では、正常型神経細胞と同様に CREB のリン酸化状態が一過性になることがわかった(図7)。このことから、正常型神経細胞に比べて、*TSC2* 欠損型神経細胞ではより長期に CREB が活性化されていることが示唆された。

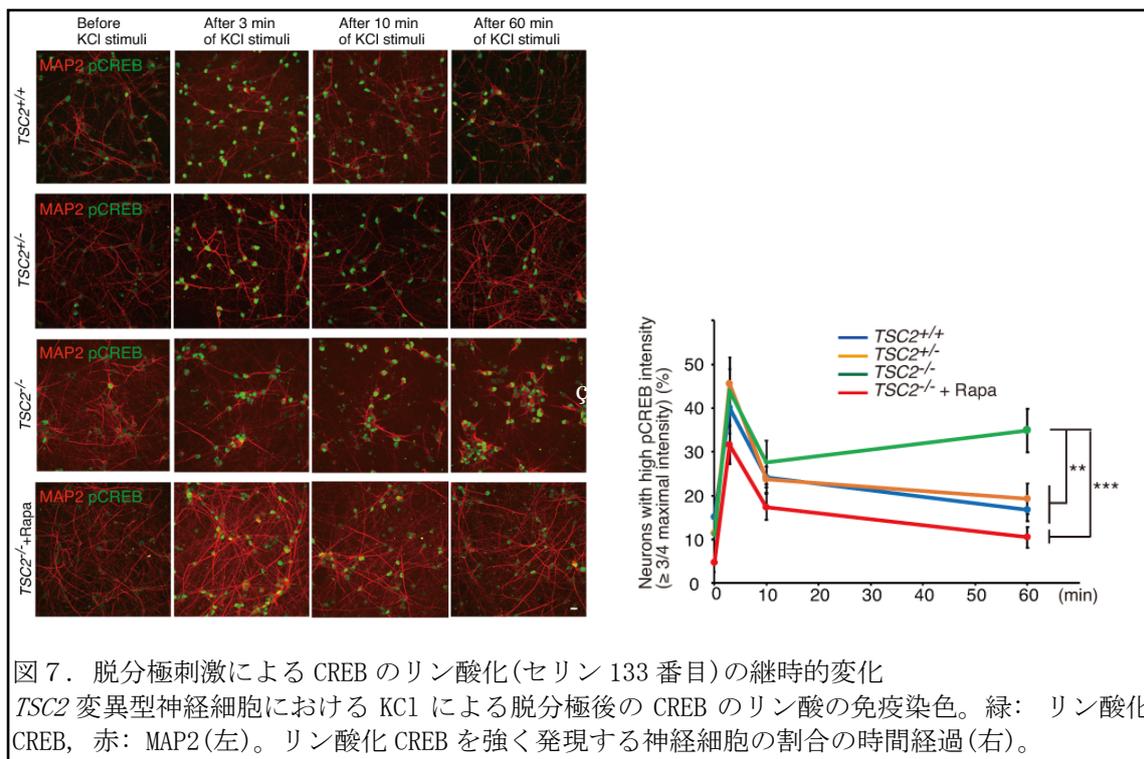


図7. 脱分極刺激による CREB のリン酸化(セリン 133 番目)の継時的変化

TSC2 変異型神経細胞における KCl による脱分極後の CREB のリン酸の免疫染色。緑: リン酸化 CREB, 赤: MAP2(左)。リン酸化 CREB を強く発現する神経細胞の割合の時間経過(右)。

結論

本研究により、TSC-mTOR シグナルの下流で L 型カルシウムチャネルの発現が制御されており、mTOR の活性化で増大したカルシウム流入が神経細胞の軸索伸長や転写因子 CREB の活性化状態に影響することが示唆された。神経細胞の細胞内カルシウム濃度はその興奮性と密接に関わりがあるため、TSC のてんかんなどの神経症状に細胞外カルシウム流入の増大が関与する可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chihiro Hisatsune, Tadayuki Shimada, Akitoshi Miyamoto, Amy Lee, Kanato Yamagata	4. 巻 41
2. 論文標題 Tuberous Sclerosis Complex (TSC) Inactivation Increases Neuronal Network Activity by Enhancing Ca ²⁺ Influx via L-Type Ca ²⁺ Channels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8134-8149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1930-20.2021	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久恒智博、島田忠之、宮本章歳、Amy Lee, 山形要人
2. 発表標題 TSC欠損型ヒト神経細胞はmTOR依存的にL-typeカルシウムチャネルのカルシウム流入増加を引き起こす
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久恒智博、島田忠之、宮本章歳、山形要人
2. 発表標題 TSC2欠損型ヒト神経細胞における細胞内カルシウム動態の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久恒智博、島田忠之、宮本章歳、山形要人
2. 発表標題 TSC2欠損型ヒトiPS細胞由来の神経細胞にみられる神経ネットワーク異常
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

結節性硬化症のてんかん発症に関わる新たなメカニズムの発見
～細胞外カルシウム流入の増大の関与～
<https://www.igakuken.or.jp/public/news/045/cont5.html>

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
---------	---------