

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15863

研究課題名(和文) てんかん性脳症の新規原因遺伝子NSFの分子病態解析

研究課題名(英文) Elucidation of the pathomechanism in developmental and epileptic encephalopathy related to NSF

研究代表者

横山 淳史(Atsushi, Yokoyama)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90529447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膜融合は、様々な細胞内での生理現象に関わっている。細胞膜同士が融合するためには、それぞれの膜上のSNARE蛋白が複合体を作ることが必要である。複合したSNARE蛋白はNSFによって解離され、次の膜融合でリサイクルされる。本研究では、乳児期発達性てんかん性脳症の患者において同定されたNSF遺伝子の変化に関して、患者iPS細胞等を用いてNSFの働きを解析した。その結果、mTOR経路の異常な亢進やオートファジー障害によって、神経変性が生じている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NSF遺伝子は発達性てんかん性脳症の新規の原因として2019年に報告されたが、その病態背景は明らかにはなっていなかった。今回、NSF遺伝子の変化によって、小胞分泌において膜蛋白リサイクルが障害されていること、mTOR経路の過剰な活性化やオートファジー障害が神経変性に関与していることが示唆された。また、mTOR経路を阻害するラパマイシンが治療薬となる可能性も示唆された。NSF関連発達性てんかん性脳症の病態の一部を明らかにし、治療薬候補を同定したてんかんにおいて学術的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Membrane fusion is involved in a variety of intracellular physiological processes. In order for the membranes to fuse, the SNARE proteins on each membrane need to form a complex. The SNARE complex is dissolved by NSF and recycled in the next membrane fission. Alterations in the NSF gene were identified in patients with developmental and epileptic encephalopathy (DEE) in infancy. This study analyzed the function of the altered NSF using the patient's iPS cells. As a result, it was suggested that the pathomechanism of neurodegeneration in NSF-related DEE may be associated with an abnormally activated mTOR pathway and disrupted autophagy.

研究分野：小児神経学

キーワード：発達性てんかん性脳症 NSF 小胞分泌 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

小胞輸送は、ゴルジ体などの膜で囲まれたオルガネラや細胞膜の間で蛋白等を輸送するだけでなく、神経伝達物質や細胞傷害性物質等の開口放出にも関わっている。小胞輸送における膜融合の過程は、SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) 蛋白質が媒介している。小胞 SNARE とターゲット SNARE が複合体を形成し、膜融合が起こる。その後、複合体は NSF により解離し、SNARE 蛋白質はリサイクルされる。SNARE 蛋白質の異常がアルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患に関与すると報告されているが (Ramakrishnan NA, et al. *Mol Cell Neurosci*, 2012)、NSF 遺伝子異常と人の疾患との関連はこれまで報告が無かった。

申請者らは、出生直後から重篤なてんかんと発達遅滞を呈する発達性てんかん性脳症 (Developmental and epileptic encephalopathy, DEE) 患者 2 人において、NSF 遺伝子に 2 種類の *de novo* ヘテロ接合性ミスセンスバリエント (A459T、P563L) を同定し、遺伝学的考察および *Drosophila* モデルを用いた実験から病的変異として報告した (Suzuki H, et al. *Ann Clin Transl Neurol*, 2019)。しかしながら、NSF 遺伝子異常が人においててんかん性脳症を起こす分子病態は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、NSF 遺伝子異常がヒトにおいて DEE を引き起こす病態を、分子学的手法を用いて解明することを主要な目的とする。てんかん発作に発達遅滞を伴う DEE は様々な遺伝子が関わる多様な病態と考えられるが、その大多数では有効な治療が存在しない。本研究の中で、DEE の病態理解が深まり、新たな治療ターゲットとなり得る分子や経路を同定することも期待できる。

3. 研究の方法

まず、神経分泌モデルとして広く使用されているラット副腎褐色細胞腫由来細胞株 (PC12 細胞株) に野生型 (WT) NSF または変異型 NSF (P563L、A459T、E715K) を安定的に発現させ、小胞分泌の解析を行った。E715K は比較的軽度の症状の患者で同定された、病原性の低いバリエントである。PC12 細胞は KCl 刺激により小胞分泌が促進されるので、(Westerink RH, et al. *Acta Physiol*, 2008)、KCl 刺激前後での小胞の状態を評価するため Giantin (ゴルジ体・小胞マーカー) での免疫染色や電子顕微鏡での評価を行った。

次に、膜融合に関わる生化学プロセスとしてオートファジーおよびその調整因子である mTOR 経路を、タンデム蛍光標識 LC3 のトランスフェクションや mTOR ターゲットのリン酸化を評価した。

さらに、神経成長因子を添加した PC12 細胞と P563L バリエントを有する患者から樹立した iPS 細胞を用いて、神経突起の形態を評価した。

4. 研究成果

P563L と A459T (DEE 関連バリエント) を発現する PC12 細胞では、小胞マーカーである

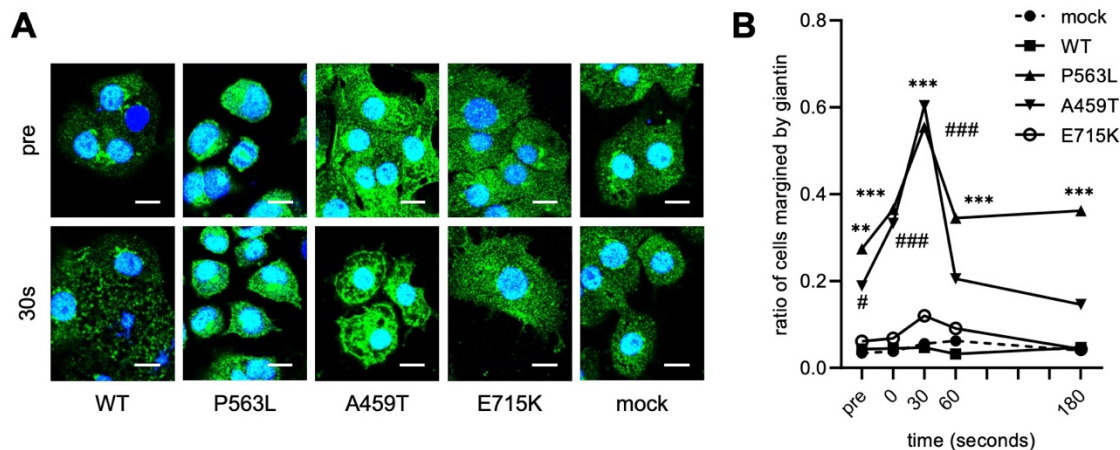


図 1: (A) PC12 細胞の Giantin での免疫染色。(B) 細胞表面に Giantin が蓄積している細胞の割合

Giantn が細胞表面に蓄積し、分泌刺激によりその傾向がさらに増強されることが分かった (図 1)。さらに、野生型 NSF を一過性に発現させることで、Giantin の蓄積はほぼ完全に改善した。正常な細胞では、分泌刺激に伴って小胞サイズが増大することが知られているが、電子顕微鏡における小胞の形態評価を行ったところ、DEE 関連バリエントを発現する PC12 細胞では小胞サイズの増大が障害されており、野生型 NSF の一過性発現により改善することが分かった。これらのことから、DEE 関連バリエントを持つ NSF では小胞膜蛋白のリサイクルが障害されていることが示唆された。

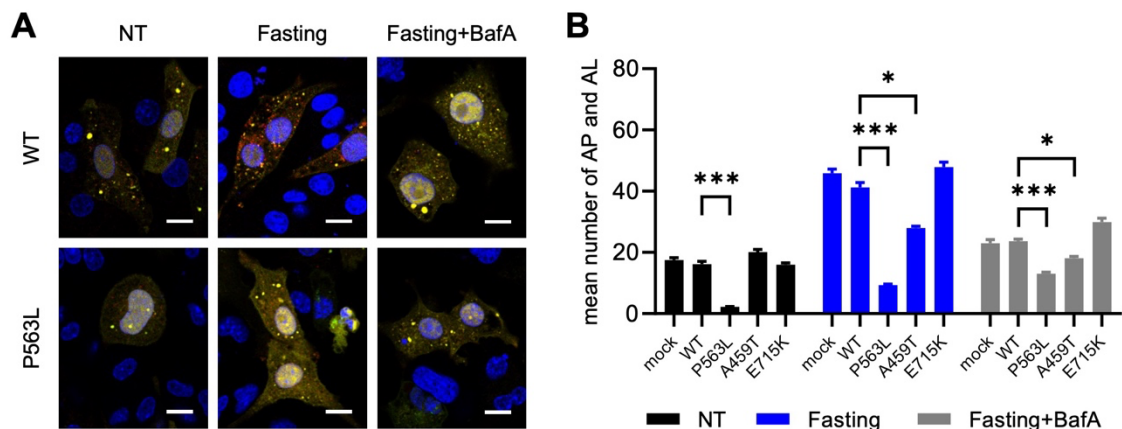


図 2: (A) タンデム蛍光標識 LC3 トランスフェクション。黄はオートファゴソーム (AP)、赤はオートライゾソーム (AL) を示す。(B) AP と AL の合計数。NT, no treatment; BafA, bafilomycin A1

DEE 関連バリエントでは、飢餓状態でのオートファジーの活性化が障害されていることが分かった。タンデム蛍光標識 LC3 トランスフェクションによりオートファジーを詳細に評価したところ、さらにオートファゴソームとオートライゾソームの融合が障害されていた (図 2)。これらのオートファジーに関する変化も野生型 NSF 一過性発現により全て改善した。

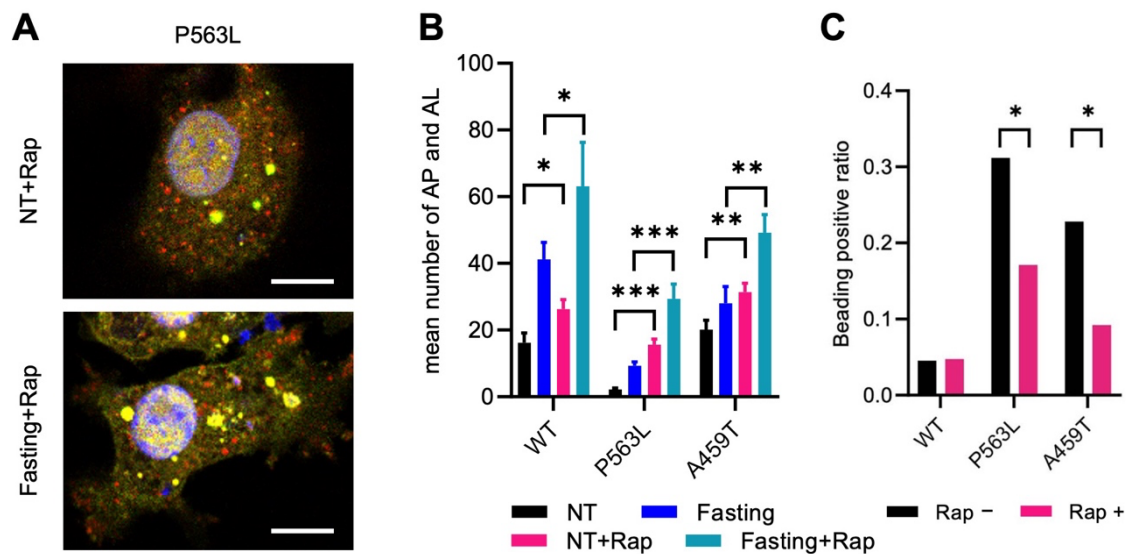


図 3: (A) P563L-PC12 細胞におけるラパマイシン (Rap) 投与。(B) AP と AL の合計数。(C) 神経突起における beading 陽性率。

DEE 関連バリエントでは mTOR 経路の過剰な活性化を認め、mTOR 阻害薬であるラパマイシン投与を行ったところ、オートファジー活性化、オートライゾソーム形成、神経突起の beading (変性所見) が改善した (図 3)。患者 iPS 細胞由来の神経細胞でも同様の結果を確認した。また、NSF は 6 量体構造を取り、構造変化が次々と伝播することで ATP を加水分解すると考えられている。蛋白構造解析から、DEE 関連バリエントは構造変化伝播を阻害し、ドミナントネガティブ効果を示す可能性が示唆された。

以上の結果から、本研究により、NSF 関連 DEE の病態の一部を明らかにし、ラパマイシンが治療薬となる可能性が示唆された (Hayashi T, et al. *Hum Mol Genet* 2023)。

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 1件）

1. 著者名 Hayashi Takahiro, Yano Naoko, Kora Kengo, Yokoyama Atsushi, Maizuru Kanako, Kayaki Taisei, Nishikawa Kinuko, Osawa Mitsujiro, Niwa Akira, Takenouchi Toshiki, Hijikata Atsushi, Shirai Tsuyoshi, Suzuki Hisato, Kosaki Kenjiro, Saito Megumu K, Takita Junko, Yoshida Takeshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Involvement of mTOR pathway in neurodegeneration in NSF-related developmental and epileptic encephalopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1683-1697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddad008	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takahiro Hayashi, Naoko Yano, Kengo Kora, Atsushi Yokoyama, Taisei Kayaki, Kinuko Nishikawa, Mitsujiro Osawa, Akira Niwa, Toshiki Takenouchi, Atsushi Hijikata, Tsuyoshi Shirai, Hisato Suzuki, Kenjiro Kosaki, Megumu K. Saito, Junko Takita, and Takeshi Yoshida
2. 発表標題 Elucidation of the pathomechanism of NSF-related developmental and epileptic encephalopathy
3. 学会等名 第65回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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