

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300106

研究課題名（和文）

神経細胞成長・シナプス可塑性・行動学習における mTOR キナーゼの役割

研究課題名（英文）

Roles of mTOR in neuronal development, synaptic plasticity and learning and memory

研究代表者

饗場 篤 (AIBA ATSU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20271116

研究成果の概要（和文）：

mTOR シグナルは結節性硬化症や自閉症といったヒトの疾患に深く関与することから、神経細胞において重要な役割を担っていることが考えられる。そこで、活性化型 mTOR 変異体を用いて、神経細胞において直接 mTOR 経路を亢進することができるトランスジェニックマウスの作製・解析を行った。前脳における mTOR の活性化はてんかん発作および神経変性を引き起こし、小脳においてはプルキンエ細胞の形態とシナプス除去に異常が観察された。これらの研究を通して mTOR 経路の破綻による疾患の理解が深まることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Aberrant activation of mTOR pathway has been found in many human neurological diseases such as tuberous sclerosis and autism. To determine mTOR function in neurons, transgenic mice having constitutively active mTOR mutant were generated and analyzed. Forebrain-specific active mTOR transgenic mice displayed epileptic seizure and neurodegeneration. Abnormalities of both neuronal morphology and synapse elimination were induced by the activation of mTOR pathway in cerebellar Purkinje cells. These results will provide insights into pathogenic mechanisms of human diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：脳・神経、遺伝学、シグナル伝達、神経科学

1. 研究開始当初の背景

Mammalian target of rapamycin (mTOR)は、免疫抑制剤ラパマイシンの標的として同定

されたセリン・スレオニンキナーゼである。mTOR は栄養状態や細胞増殖因子、神経伝達物質等からのシグナルを受け、タンパク質合

成、オートファジー、細胞のサイズ決定等、様々な細胞機能の制御にも関与し、mTOR 経路の異常が、癌や糖尿病、代謝異常等の疾患の発症に関与することが明らかになってきた。近年、mTOR 経路による神経細胞の成長とそれにとまなうサイズの決定が脳機能にとって重要であることが示唆されている。例えばPI₃Kの負の制御因子であるPTENのノックアウトマウスではPI₃K/Akt/mTOR 経路の活性化や神経細胞および樹状突起の増大による大頭症が生じ、てんかんや自閉症様の表現型を示す(Kwon et al., *Neuron*, 2006)。これは、PTEN に変異を持つヒトで多発する大頭症、てんかん、精神遅滞、自閉症の原因が mTOR 経路の活性化によって引き起こされることを示唆している。また、mTOR 経路によるタンパク質合成制御が、シナプス可塑性や記憶学習に関連している報告もある。結節性硬化症の原因遺伝子である TSC2 は mTOR の活性化因子 Rheb の負の制御因子であり、そのヘテロ型変異マウスでは、mTOR 経路の活性化、海馬 CA1 での異常な長期増強、海馬依存的な学習の異常を示す。さらにこれらの異常は、ラパマイシンの投与による mTOR の阻害により抑制することが可能である (Ehninger et al., *Nat Med*, 2008)。さらに、統合失調症脆弱性因子である DISC1 が Akt 結合タンパク質である KIAA1212 を介して Akt-mTOR 経路を調節し、神経発生を制御しているという報告もあり (Kim et al., *Cell*, 2009)、mTOR は自閉症のみならず、統合失調症の発症に関与している可能生も示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、活性化型 mTOR を神経細胞で時期特異的に発現することにより、mTOR が神経細胞のサイズ、樹状突起・シナプスの形状およびサイズ、さらには神経可塑性、個体

レベルでの行動・学習においてどのような役割を有するのかを明らかにする。前述のように間接的に mTOR 経路を活性化させたマウスでは自閉症様の表現型を示し、神経細胞および樹状突起の増大による大頭症を示すなどヒトの疾患への mTOR の関与も示唆されている。本研究では活性化型 mTOR が神経細胞で発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、中枢神経系で mTOR 経路を直接活性化することによってその役割を明らかにする。

3. 研究の方法

活性化型 mTOR を大脳皮質・海馬を含む前脳または小脳プルキンエ細胞でそれぞれ特異的に発現する mTOR Tg マウスを作製する。これらの mTOR Tg マウスを用いて神経細胞における mTOR の役割を決定する。具体的には、神経細胞および樹状突起のサイズ・形状等の組織学的に解析し、シナプス伝達・シナプス可塑性を電気生理学的に解析する。また、mTOR 経路が関与するとされている自閉症様の行動異常や運動機能に障害が生じているかどうかを検討し、mTOR 経路の活性化がシナプス可塑性や行動レベルにおいてどのような影響を及ぼすかを総合的に解析する。

4. 研究成果

(1) TRE- mTOR トランスジェニック (Tg) マウスの作製

テトラサイクリン応答因子 (TRE) 下流に FLAG タグのついた活性化型 mTOR cDNA を連結したトランスジーンを構築した。このトランスジーンを C57BL/6 系統の前核期受精卵 200 個にマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスに移植したところ 35 匹の産仔を得ることができた。得られたマウスのゲノム DNA の PCR 解析を行った結果、5 匹の founder

Tg マウスを得ることができた。founder マウスを野生型 C57BL/6 を交配することによって、Tg マウス系統の樹立することができた (TRE-mTOR Tg マウス)。

(2) 大脳皮質・海馬における活性化型 mTOR Tg マウスの解析

TRE-mTOR Tg マウスを CaMKII-tTA Tg マウスと交配し、Tet-off システムによって生後に活性化型 mTOR を発現する Tg マウス

(CaMKII-mTOR Tg マウス) を作製した。

CaMKII-mTOR Tg マウスは生後発達とともに大脳皮質における活性化型 mTOR の発現が増加し、S6 キナーゼのリン酸化が亢進していたことから、mTORC1 経路が活性化していることが明らかとなった。CaMKII-mTOR Tg マウスは生後の発育遅滞が引き起こされ、15 日齢前後に全て死亡した。生後 12 日齢における CaMKII-mTOR Tg マウスの前脳の組織学的解析を行った結果、S6 のリン酸化が大脳皮質および海馬で上昇しており、大脳皮質の著しい肥厚が観察された。また、個々の大脳皮質ニューロンは細胞体が肥大しており、ユビキチン陽性の細胞質封入体が多数見出された。大脳皮質においてマイクログリア細胞の増殖や活性化も観察されたことから、生後脳における mTOR 経路の活性化は、神経変性疾患様の表現型を引き起こすことが示唆された。さらに CaMKII-mTOR Tg マウスの行動を詳細に観察したところ、重篤なてんかん様の発作を頻繁に起こしていることが明らかとなった。自由行動下において大脳皮質の脳波を記録したところ、てんかん発作時に著しい脳波の乱れが観察された。ヒトにおける結節性硬化症においても mTOR 経路の活性化とてんかんの関連性が指摘されていることから、CaMKII-mTOR Tg マウスはヒト疾患のモデルマウスとして有用であると期待できる。

(3) 小脳プルキンエ細胞における活性化型 mTOR Tg マウスの解析

TRE-mTOR Tg マウスを L7-tTA Tg マウスと交配することによって、小脳プルキンエ細胞において活性化型 mTOR を発現する Tg マウスの作製を行った (L7-mTOR Tg マウス)。この Tg マウスは明らかな小脳失調は観察されず、ロータロッド解析においてもコントロールと比較して有意な運動協調能の差は認められなかった。L7-mTOR Tg マウスの組織学的な解析を行ったところ、プルキンエ細胞の細胞体および樹状突起・スパインが著しく肥大していることが明らかとなった(下図)。

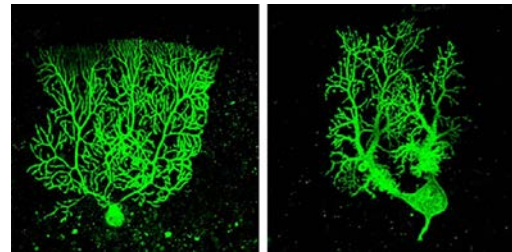


図 コントロール(左)および L7-mTOR Tg マウスのプルキンエ細胞の形態

さらに、L7-mTOR Tg マウスの小脳スライスを用いてプルキンエ細胞の電気生理学的解析を行ったところ、成熟マウスにおいても複数の登上線維による支配を受けていた。このことから、mTOR の活性化は発達過程におけるシナプス除去に異常をもたらすことが考えられた。また、Tg マウスは加齢とともにプルキンエ細胞の数が減少していることが観察されたことから、CaMKII-mTOR Tg マウスと同様に神経変性を引き起こしていることが示唆された。mTOR の活性化はオートファジーを抑制するため、活性化型 mTOR Tg マウスにおいては細胞質封入体の蓄積によって、神経変性が引き起こされていることが考えられた。

(4) 今後の展望

大脳皮質・海馬における活性化型 mTOR Tg マウスについては、てんかんの原因が mTOR シグナルの亢進による神経細胞の肥大に起因するのか、神経細胞のシナプス伝達の異常に起因するものなのかを明らかにする実験を行う。この実験によって結節性硬化症におけるてんかん症状の理解と治療戦略につなげたい。小脳における活性化型 mTOR Tg マウスについては、自閉症のメカニズムの理解を目指して、社会行動テストなどの行動解析を行う。結節性硬化症の一部の患者においては自閉症様の行動およびプルキンエ細胞の脱落が観察される。このことから、プルキンエ細胞における mTOR シグナルの破綻が自閉症を引き起こす可能性が考えられる。また、本研究で作製した Tg マウスは Tet-Off システムを用いて活性化型 mTOR の発現を制御している。このため、Tg マウスに対してドキシサイクリンを非投与・投与することによって、活性化型 mTOR の発現を時期特異的に ON・OFF することができる。このシステムを利用して、脳の発達期および成熟期を区別して mTOR シグナルの機能を明らかにしていきたい。

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 10 件)

①Asahara S, Shibutani Y, Teruyama K, Inoue HY, Kawada Y, Etoh H, Matsuda T, Kimura-Koyanagi M, Hashimoto N, Sakahara M, Fujimoto W, Takahashi H, Ueda S, Hosooka T, Satoh T, Inoue H, Matsumoto M, Aiba A, Kasuga M, Kido Y, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) regulates glucose-stimulated insulin secretion via

modulation of F-actin., *Diabetologia*, 2013, 査読有

DOI:10.1007/s00125-013-2849-5

②Hirata T, Kumada T, Kawasaki T, Furukawa T, Aiba A, Conquet F, Saga Y, Fukuda A, Guidepost neurons for the lateral olfactory tract: Expression of metabotropic glutamate receptor 1 and innervation by glutamatergic olfactory bulb axons., *Developmental Neurobiology*, 72, 1559-1576, 2012, 査読有
DOI:10.1002/dneu.22030

③Kato HK, Kassai H, Watabe AM, Aiba A, Manabe T, Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP₃ receptor and L-type Ca²⁺ channel in mouse CA1 pyramidal cells., *Journal of Physiology*, 590, 3019-3034, 2012, 査読有
DOI:10.1113/jphysiol.2012.232942

④Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Iimura T, Kassai H, Harada T, Tsukasaki M, Yamamoto G, Tachikawa T, Nakao K, Yamamoto M, Yamaguchi A, Aiba A, Kamijo R, Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development., *Mechanisms of Development*, 129, 38-50, 2012, 査読有
DOI:10.1016/j.mod.2012.02.002

⑤Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich BG, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R, In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling., *Blood*, 119, e45-56, 2012, 査読有
DOI:10.1182/blood-2011-09-381400

- ⑥ Yamamoto K, Ueta Y, Wang L, Yamamoto R, Inoue N, Inokuchi K, Aiba A, Yonekura H, Kato N., Suppression of a neocortical potassium channel activity by intracellular amyloid- β and its rescue with Homer1a., *Journal of Neuroscience*, 31, 11100-11109, 2011, 査読有
DOI:10.1523/JNEUROSCI.6752-10.2011
- ⑦ Yamasaki M, Miyazaki T, Azechi H, Abe M, Natsume R, Hagiwara T, Aiba A, Mishina M, Sakimura K, Watanabe M, Glutamate receptor δ 2 is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells., *Journal of Neuroscience*, 31, 3362-3374, 2011, 査読有
DOI:10.1523/JNEUROSCI.5601-10.2011
- ⑧ Ojima K, Kawabata Y, Nakao H, Nakao K, Doi N, Kitamura F, Ono Y, Hata S, Suzuki H, Kawahara H, Bogomolovas J, Witt C, Ottenheijm C, Labeit S, Granzier H, Toyama-Sorimachi N, Suzuki K, Maeda T, Abe K, Aiba A, Sorimachi H, Dynamic distribution of muscle-specific calpain in mice has a key role in physical-stress adaptation and is impaired in muscular dystrophy., *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 2672-2683, 2010, 査読有
DOI:10.1172/JCI40658
- ⑨ Ueda S, Kitazawa S, Ishida K, Nishikawa Y, Matsui M, Matsumoto H, Aoki T, Nozaki S, Takeda T, Tamori Y, Aiba A, Kahn CR, Kataoka T, Satoh T, Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transport 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma., *The FASEB Journal*, 24, 2254-2261, 2010, 査読有

DOI:10.1096/fj.09-137380

- ⑩ Takeuchi H, Inokuchi K, Aoki M, Suto F, Tsuboi A, Matsuda I, Suzuki M, Aiba A, Serizawa S, Yoshihara Y, Fujisawa H, Sakano H, Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb., *Cell*, 141, 1056-1067, 2010, 査読有
DOI:10.1016/j.cell.2010.04.041

[学会発表] (計4件)

- ① 饗場 篤, 中枢神経系において恒常的活性化型 mTOR を発現するマウスの作製と解析、日本分子生物学会、2012年12月13日、福岡国際会議場 (福岡県)
- ② Aiba A, Genetic dissection of mGluR1 function in cerebellar Purkinje cells, 7th International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, 2011年10月3日, Grande Albergo Capotaormina (Italy)
- ③ 饗場 篤, mTORC1 の恒常的活性化は筋重量の低下を引き起こす、日本分子生物学会、2010年12月10日、神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- ④ 原田 武志、ERKは歯状回顆粒細胞の生存に必要である、日本神経科学学会、2010年9月3日、神戸コンベンションセンター (兵庫県)

[図書] (計1件)

- ① 葛西秀俊, 饗場 篤, 「mTOR シグナルによる脳機能の調節と破綻」
細胞工学, 学研メディカル秀潤社, 31, 1355-1359, 2012

[その他]

ホームページ等

<http://lar.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

饗場 篤 (AIBA ATSU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20271116

(2)研究分担者

葛西 秀俊 (KASSAI HIDETOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40403232

(H22～23→H24：辞退)

原田 武志 (HARADA TAKESHI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30362768

(H22～23→H24：辞退)

(3)連携研究者