

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293239

研究課題名(和文) West症候群の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Mechanistic investigation and new therapeutic development for West syndrome

研究代表者

山形 要人 (YAMAGATA, Kanato)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・分野長

研究者番号：20263262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：West症候群の病態を明らかにするため、原因の一つである結節性硬化症の発症機序を解析した。その結果、今まで考えられてきたmTORC1ではなく、Rhebの活性化がsyntenin増加を介し、スパイン形態異常を起こすことが明らかになった。そこで、モデルマウスのsynteninを減少させたところ、スパイン形態と記憶障害が改善した。次に、自発けいれんを起こすモデルマウスを作製するため、特定のニューロンやグリアのTsc1遺伝子を欠損させ、一部のマウスに自発てんかんや記憶障害が起きる事を確認した。最後に、神経原性およびグリア原性のモデルマウスに対して、Rhebの薬理的阻害が有効であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism for West syndrome, we investigated the pathogenesis of tuberous sclerosis complex (TSC), which is one of the causes of this syndrome. We have clarified a novel mechanism that Rheb activation, but not mTORC1, increases syntenin levels, which impairs dendritic spine morphology. Therefore, we reduced syntenin levels in TSC model mice, resulting in recovery of spine morphology and memory disorder. Next, to generate TSC model mice with spontaneous seizures, we deleted Tsc1 gene in the specific neurons or glial cells. We found some mice showed epilepsy and impaired memory. Finally, we found pharmacological inhibition of Rheb is effective for the symptoms of neuron- and glia-specific Tsc1 knockout mice.

研究分野：神経薬理学

キーワード：West症候群

1. 研究開始当初の背景

West 症候群は、生後数か月に難治てんかんで発症し、知的障害を始めとする重篤な脳障害を背景に持つ。そして、その原因の一つとして、結節性硬化症が知られている。結節性硬化症は、結節と呼ばれる過誤腫が全身に出来る神経皮膚症候群であり、責任遺伝子が *Tsc1/Tsc2* であることが判明している。そして、*Tsc1/2* の変異が低分子量 GTP 結合タンパク質 Rheb の活性化を介して、mTORC1 を活性化する (Nat Cell Biol. 5:578-81, 2003)。そのため、mTORC1 阻害薬であるラパマイシンアナログ (ラパログ) が結節性硬化症の治療薬として用いられてきた。

代表者は、結節性硬化症の中核病態を明らかにするため、*Tsc2* 変異ラットから海馬ニューロンを当時培養し、野生型ニューロンと比較していた。その結果、結節性硬化症では、樹状突起スパイン形成が障害され、樹状突起に直接シナプスを作る、シャフトシナプスが増加していることを突き止めていた。さらに、その形態異常は、ラパマイシンを添加しても回復しなかったことから、結節性硬化症のシナプス異常は mTOR 非依存的であると考えていた。

さらに、結節性硬化症では Rheb と結合する syntenin という PDZ 蛋白質が増加し、CASK の機能を抑制するため、スパイン形成が障害されることも当時明らかにしていた。

2. 研究の目的

以上の結果から、結節性硬化症のスパイン形態異常は、mTORC1 非依存的であり、Rheb-syntenin が関与すると考えられた。そこで、本研究では、*syntenin* siRNA を *Tsc2* 変異ラット (Eker) の脳内へ導入することにより、スパイン形態や行動異常が回復するかどうかを検証する。さらに、*Tsc2*^{-/-} マウスと *syntenin*^{+/-} マウスを交配することにより、siRNA と同様の効果が認められるかを検証する。

上記のメカニズムは結節性硬化症の精神遅滞や自閉症の発症機構の一端を説明すると考えられるが、てんかん発作はこのラットでは生じない。しかし、予備的実験から、グリア特異的に *Tsc1* を完全ノックアウトすると、自発性のてんかん発作が起きることを当時観察していた。そこで、これを West 症候群のモデルと考え、グリア原性のてんかん発症機構も解析する。

さらに、グリアだけでなく、特定ニューロン (海馬の顆粒細胞など) の *Tsc1* 遺伝子ノックアウトにより、てんかん発作が生じるかどうかを調べる。

最後に、上記のマウスがてんかん発作を起こした場合、脳波記録や神経細胞の形態変化、そして光遺伝学を用いた発作抑制を試みる。しかし、発作を起こす時期が予測

できない等の重大な問題点が明らかになれば、光遺伝学ではなく、薬理的な発作抑制を検討する。薬物を用いる方が、光遺伝学を用いるよりも実用的であるため、本来の目的に沿っていると考えられる。

3. 研究の方法

平成 25 年度は、*syntenin* を個体レベルでノックダウンあるいはノックアウトし、結節性硬化症モデル動物のスパイン形成と異常行動が改善するかどうかを検証する。平成 26 年度以降は、自発けいれんを起こす結節性硬化症モデル動物を作成するため、特定のニューロンあるいはグリア特異的に *Tsc1* 遺伝子をノックアウトし、自発発作の有無を調べる。最後に、神経原性・グリア原性の疾患モデルについて、光遺伝学あるいは薬理的な発作制御を試みる。

4. 研究成果

(1) *Syntenin* siRNA 脳内注入による、*Tsc2*^{-/-} ラットのスパイン形態異常と記憶障害の回復

結節性硬化症のスパイン形態異常のメカニズムを明らかにしている。すなわち、正常では Rheb と *syntenin* の複合体がプロテアソームによって分解されるため、*syntenin* 量は低く抑えられるが、結節性硬化症では *syntenin* が分解されずに蓄積し、スパイン形成を障害することを見出ししている。そこで、*Tsc2*^{-/-} ラットにおける *syntenin* の役割を検証し、以下の結果を得た。

Syntenin siRNA の導入による *in vivo* スパイン形成の回復: *Tsc2*^{-/-} ラットの脳内に *syntenin* siRNA を電気穿孔法により導入し、スパイン形成が回復することを確認した。神経細胞の樹状突起を可視化し、樹状突起スパインの巾・長さ・密度などを scrambled siRNA 間で比較したところ、巾は広く、長さが短いキノコ型へ変化していることが分かった。

Syntenin siRNA の脳室内注入による異常行動の改善: *Tsc2*^{-/-} ラットは、文脈依存的恐怖弁別学習の異常を示すが、*Tsc2*^{-/-} ラットの脳室内に *syntenin* siRNA を持続注入したところ、この異常が改善されることを確認した。

(2) *Tsc2*^{-/-} マウスのスパイン形態や発作伝播の異常と *syntenin* ノックアウトによる正常化

Tsc2^{-/-} マウスでも、培養海馬ニューロンや脳切片の海馬錐体細胞のスパイン形態を調べたところ、*Tsc2*^{-/-} ラットと同様、やはりスパイン形態が異常であることがわかった。そこで、*Tsc2*^{-/-} マウスと *syntenin*^{+/-} マウスを交配し、*Tsc2*^{-/-} マウスのスパイン形態が正常化することを確認した。

次に、*Tsc2*^{-/-} マウスのてんかん原性が野生型に比べて亢進しているかどうかを検証するため、化学的キンドリング実験を行った。ペンチレンテトラゾールを連続投与し、発作

の進展過程を野生型と比較したところ、*Tsc2*^{-/-}マウスではてんかん発作の伝播が有意に速いことがわかった。さらに、このマウスの *syntenin* をノックアウトしたところ、発作伝播が抑えられた。また、海馬のグリオシスも抑制された。

(3) West 症候群のモデルマウスの作製

海馬歯状回特異的ノックアウトマウスの作製

結節性硬化症の原因である *Tsc1* 遺伝子あるいは大田原症候群から West 症候群を起こす *CASK* 遺伝子のノックアウトマウスを作製した。まず脳全体でノックアウトを試みたが、両系統とも生後すぐに死亡した。そこで、各 floxed マウスを海馬顆粒細胞特異的に Cre を発現する *Pomc-Cre* マウスと交配し、ホモノックアウトマウスを作製した。交配で得られた *Pomc-Tsc1*^{-/-}あるいは *Pomc-CASK*^{-/-}マウスに、自発のてんかん発作が生じているかを行動的および脳波記録により確認した。*Pomc-CASK*^{-/-}マウスでは最初、全身が震える振戦様の発作が生じ、脳波上スパイクも観察されたが、交配が進むにつれてそのような発作は消失した。また、*Pomc-Tsc1*^{-/-}ではてんかん発作は認められなかった。

時期特異的あるいは海馬錐体細胞特異的 *Tsc1* ノックアウトマウスの作製

次に、*Camk11-CreER;Tsc1*^{-/-}マウスを作製し、タモキシフェンを投与することにより、興奮性ニューロン特異的に *Tsc1* 遺伝子をノックアウトした。その結果、タモキシフェン投与後約 10 日前後で自発けいれん発作を起こすようになり、2-3 週後に死亡した。また、海馬 CA3 錐体細胞特異的に *Tsc1* をノックアウトするため、*Grik4-Cre* マウスと *Tsc1*^{fl/fl} マウスを交配した。CA3 錐体細胞特異的に *Tsc1* 遺伝子がノックアウトされると、生後 2 か月前後からてんかん発作が生じた。

Camk11-CreER;Tsc1^{-/-}マウスにタモキシフェンを投与すると顕著なてんかん発作を起こすものの、すぐに死亡するため、海馬や大脳皮質に大きな形態学的変化は認められなかった。一方、*Grik4-Cre;Tsc1*^{-/-}マウスでは、CA3 領域が拡大し、細胞構築の乱れが認められた。

以上の結果から、興奮性ニューロン全般で *Tsc1* をノックアウトする、あるいは海馬錐体細胞特異的に *Tsc1* をノックアウトすることにより、自発てんかん発作を起こす West 症候群のモデルマウスを作製出来た。しかし、その組織学的変化は異なっており、より詳細な解析が必要と考えられた。

(4) West 症候群モデルマウスの治療法開発

当初の計画では、West 症候群責任遺伝子 (*Tsc1* あるいは *Tsc2*) を脳の海馬特異的に欠損させ、光遺伝学を用いて発作を抑制する計画であった。しかし、責任遺伝子を脳全体

(*Camk11* プロモーター下)で欠損させると激しい発作を起こし、すぐに死亡した。また、海馬特異的 (*Pomc* あるいは *Grik4* プロモーター下)に欠損させると全く発作を起こさないか、起こしたとしても発作が予測不能という問題が明らかになった。光遺伝学の効果を調べるためには、焦点が局所かつ任意の時期に発作を起こす必要があり、現時点でこの手法をてんかん病態へ応用することに限界があると考えられた。そこで、West 症候群の症状 (難治のてんかん発作や知的障害など) を軽減する方法の開発へと計画を変更し、モデルマウスのてんかん発作や記憶障害を軽減する薬物の探索を開始した。

West 症候群モデルマウスのスパイン形態およびてんかん発作に対する Rheb 阻害薬の作用

まず、*Tsc2*^{-/-}マウスの海馬ニューロンを初代培養し、そのシナプス形態異常を回復させる薬物をスクリーニングした。これまでの解析から、*Tsc2*^{-/-}マウスのスパイン形態異常は Rheb が活性化し、*syntenin* が増加するためであることを見出している。そこで、Rheb 機能を抑制する薬物 (Rheb 阻害薬) を添加したところ、*Tsc2*^{-/-}ニューロンのスパイン形態が正常化することがわかった。さらに、これらの薬物を *Camk11-CreER;Tsc1*^{-/-}マウスに投与し、てんかん発作に対する効果を調べたところ、てんかん発作を軽減することも明らかになった。以上の結果から、Rheb 機能を薬理的に抑える方が、光遺伝学的手法を用いるよりも、West 症候群の中核症状を改善させると考えられた。

West 症候群モデルマウスの記憶障害や社会性異常に対する Rheb 阻害薬の効果

West 症候群では、てんかん発作だけでなく、知的障害も大きな問題である。そこで、*Tsc2*^{-/-}マウスが記憶障害を示すかどうかを調べたところ、海馬依存的な文脈記憶が障害されていることがわかった。そこで、*Tsc2*^{-/-}マウスに Rheb 阻害薬を投与し、文脈記憶を想起させたところ、記憶が回復することがわかった。

次に、モデルマウスが社会性の異常を示すかどうかを調べた。アストロサイト特異的に *Tsc1* 遺伝子をノックアウトした *GFAP-Cre;Tsc1*^{-/-}マウスは 3 チャンバー試験において社会記憶の異常を示した。そこで、これらのマウスに Rheb 阻害薬を長期投与したところ、社会記憶も改善した。

Rheb 阻害薬の薬理作用

Rheb 阻害薬の作用メカニズムを解析し、Rheb の活性化を間接的に抑制することを明らかにした。また、回路レベルでの有効性を検証するため、記憶想起に伴って海馬歯状回で活性化されるニューロンを Arc 抗体で標識した。野生型では、記憶想起によって Arc 陽性ニューロンが増加したが、*Tsc2*^{-/-}マウスで

は有意な増加は見られなかった。しかし、Rheb 阻害薬を *Tsc2*^{-/-} マウスに投与し、記憶を想起させたところ、Arc 陽性ニューロンが野生型と同様に増加することがわかった。

以上の結果から、モデルマウスに対する Rheb 阻害薬の効果は、Rheb 機能を抑えることにより、シナプスや回路を正常化し、記憶を回復させるためと考えられた。

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 11 件)

Shimada T, Yoshida T, Yamagata K.
Neuritin Mediates Activity-Dependent
Axonal Branch Formation in Part via FGF
Signaling. *J Neurosci*. 36: 4534-48,
2016. 査読有
DOI:10.1523/JNEUROSCI.1715-15.2016_

Masui K, Tanaka K, Ikegami S, Villa GR,
Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Yamagata
K, Arai N, Cavenee WK, Mischel PS.
Glucose-dependent acetylation of
Rictor promotes targeted cancer
therapy resistance. *Proc Natl Acad Sci
U S A* 112: 9406-11, 2015. 査読有
DOI:10.1073/pnas.1511759112

Hiroko Sugiura, Shin Yasuda, Shutaro
Katsurabayashi, Hiroyuki Kawano,
Kentaro Endo, Kotaro Takasaki,
Katsunori Iwasaki, Masumi Ichikawa,
Toshiyuki Kobayashi, Okio Hino and
Kanato Yamagata. Rheb activation
disrupts spine synapse formation
through accumulation of syntenin in
tuberous sclerosis complex. *Nature
Communications* 6: 6842, 2015. 査読有
DOI:10.1038/ncomms7842

Hosotani R, Inoue W, Takemiya T,
Yamagata K, Kobayashi S, Matsumura K.
Prostaglandin transporter in the rat
brain: its localization and induction
by lipopolysaccharide. *Temperature* 2:
423-434, 2015. 査読有
DOI:10.1080/23328940.2015.1062953_

Shimada T, Takemiya T, Sugiura H,
Yamagata K. Role of Inflammatory
Mediators in the Pathogenesis of
Epilepsy. *Mediators Inflamm*. 2014:
901902, 2014. 査読有
DOI:10.1155/2014/901902

Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S,
Shimada T, Tanaka H, Takasaki K,
Iwasaki K, Kobayashi T, Hino O,

Yamagata K. Activation of Rheb, but not
of mTORC1, impairs spine synapse
morphogenesis in tuberous sclerosis
complex. *Sci Rep* 4: 5155, 2014. 査読
有
DOI:10.1038/srep05155

Oda, A., Yamagata, K., Nakagomi, S.,
Uejima, H., Wiriyasermkul, P., Ohgaki,
R., Nagamori, S., Kanai, Y., and Tanaka,
H. Nicotine induces dendritic spine
remodeling in cultured hippocampal
neurons. *J Neurochem*. 128: 246-55,
2013. 査読有
DOI:10.1111/jnc.12470

Shimada, T., Fournier, A.E., and
Yamagata, K. Neuroprotective Function
of 14-3-3 Proteins in
Neurodegeneration. *BioMed. Res. Int.*
2013, 564534, 2013. 査読有
DOI:10.1155/2013/564534

Shimada, T., Sugiura, H., and Yamagata
K. Neuritin: A therapeutic candidate
for promoting axonal regeneration.
World J. Neurol. 3: 138-143, 2013. 査
読有
DOI:10.5316/wjn.v3.i4.138

Takeuchi, C., Yamagata, K. and
Takemiya, T. Variation in experimental
autoimmune encephalomyelitis scores
in a mouse model of multiple sclerosis.
World J. Neurol. 3 : 56-61, 2013. 査
読有
DOI:10.5316/wjn.v3.i3.56_

山形要人、杉浦弘子、安田 新 神経活動
によるスパイン形態制御と脳疾患
日本薬理学雑誌 142: 106-111, 2013.
査読無
DOI:10.1254/fpj.142.106

[学会発表](計 10 件)

Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura, and
Kanato Yamagata “Astrocyte-specific
Tsc1 knockout mice show abnormal
behavior and harbor severe gliosis”
第 40 回日本神経科学大会 2017.

Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura, and
Kanato Yamagata “アストロサイト特異
的 *Tsc1* 欠損マウスにおける神経膠症と
行動異常” 第 58 回日本神経病理学会
総会学術集会 2017.

山形要人、杉浦弘子、島田忠之、守屋敬
子 結節性硬化症の新しい発症メカニ
ズムと治療薬 第 25 回多摩キャンパス

神経カンファレンス 2017.

山形要人 結節性硬化症の新しいメカニズムと治療薬 第 58 回日本小児神経学会学術集会シンポジウム「結節性硬化症の現状と今後」2016.

山形要人、てんかんモデル動物の作製と新しい治療薬の探索、第 5 回都医学研シンポジウム「てんかん研究の最前線」2015.

山形要人、てんかん・精神遅滞の新しいメカニズムと治療薬の探索、第 17 回応用薬理シンポジウム 2015.

山形要人、安田新、杉浦弘子、島田忠之、桂林秀太郎、岩崎克典、小林敏之、樋野寛夫、結節性硬化症における mTORC1 非依存的スパイン形態制御 第 131 回日本薬理学会関東部会、2014.

Yamagata K., Sugiura H., Yasuda S., Shimada T., Katsurabayashi S., Takemiya T., Iwasaki K., Kobayashi T., Hino O. Novel mechanism for the pathogenesis of tuberous sclerosis complex. 第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014.

Yasuda S., Sugiura H., Katsurabayashi S., Shimada T., Tanaka H., Takasaki K., Iwasaki K., Kobayashi T., Hino O., Yamagata K. Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、2014.

Shin Yasuda, Hiroko Sugiura, Shutaro Katsurabayashi, Katsunori Iwasaki, Toshiyuki Kobayashi, Okio Hino, Kanato Yamagata. 第 36 回日本神経科学大会、2013.

〔図書〕(計 2 件)

Yasuda S., Sugiura H. and Yamagata K., Springer, Encyclopedia of Signaling Molecules, 2018, 3042-3052.

Shimada T., Sugiura H. and Yamagata K., Springer, Encyclopedia of Signaling Molecules, 2018, 4673-4681.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：知的障害又は自閉症治療薬
発明者：山形要人、島田忠之、杉浦弘子、安田新
権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所
種類：特許
番号：特願 2017-215726 号
出願年月日：平成 29 年 11 月 8 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：スパイン形成異常を抑制するための医薬組成物
発明者：山形要人、杉浦弘子、島田忠之、安田新
権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所
種類：特許
番号：特許第 6215205 号
取得年月日：平成 29 年 9 月 29 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/plasticity.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 要人 (YAMAGATA, Kanato)
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・分野長
研究者番号：20263262

(2) 研究分担者

藤原 浩樹 (FUJIWARA, Hiroki)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：50433868

(2) 研究分担者

田中 秀和 (TANAKA, Hidekazu)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：70273638

(3) 連携研究者

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI, Shutaro)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：50435145