

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430064

研究課題名(和文) 神経細胞のサイズ制御の機構とその破綻による病態の解析

研究課題名(英文) Regulation of neuronal cell size control in normal and disease condition

研究代表者

武井 延之 (Takei, Nobuyuki)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：70221372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞のサイズ制御にかかわる鍵となるmTOR(mammalian target of rapamycin)シグナル伝達系の解析を行ない、新たな制御因子を同定した。この経路の活性化により、神経細胞で蛋白合成、脂質合成が亢進すること、またこれらが細胞サイズにリンクしていることを明らかにした。また疾患研究では、限局性皮質形成異常(Focal cortical dysplasia IIb:FCDIIb)における脳の細胞の異形化/大型化はmTORの体細胞変異が原因であることを見だし、本疾患の原因を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the signaling transduction pathways of mammalian target of rapamycin (mTOR), that is a key enzyme of cell size control. We identified several molecules that regulate the activity of mTOR in neurons. We revealed that activation of mTOR leads to the upregulation of protein and lipid synthesis and its link to the cell size in CNS neurons. In disease study, we found novel somatic mutations of mTOR in Focal Cortical Dysplasia IIb (FCDIIb) brain and confirm that these mutations make mTOR hyperactive.

研究分野：神経化学

キーワード：mTOR 細胞サイズ 神経細胞 蛋白合成 BDNF AMPK

## 1. 研究開始当初の背景

一般的に哺乳動物細胞の大きさは比較的一定で、個体や器官の大きさは細胞数に依存している。神経細胞は同一細胞種の中では大きさに多様性があり、小さな介在神経から比較的大きい投射性神経、ベッツ細胞やプルキンエ細胞のようなさらに大きなものまである。細胞サイズのゲノム情報以降の制御は神経回路形成や脳の構築に欠かせない。

酵母やハエの変異実験やがん細胞などの研究から細胞のサイズを制御している主なシグナルはPI3K-Akt-mTORを介したものであることが明かされつつある。しかしながらこれらの研究はゲノムの変異によるシグナル経路の活性化であり、均一な集団での細胞サイズ制御の説明にしかならない。通常の細胞集団の中でこのシグナルが関与しているとすれば、各細胞個別に活性化のON/OFFが起っていると考えられる。

mTOR(mammalian target of rapamycin)は**蛋白の合成や分解を調節し、細胞の成長を制御するキナーゼ**である。このシグナルによる細胞サイズ調節の中で不明な点は2つあり、どのような刺激、細胞外微小環境によって活性調節されているかと、なぜ細胞が大きくなるかである。つまりこの経路の上流と下流が残された疑問点である。

mTORは基質である4EBPやp70S6Kのリン酸化を通じて翻訳活性化を促す。またULK1のリン酸化を通じてオートファジーを抑制している。つまりmTORの活性化は細胞内の蛋白質総量の増加を引き起こす。このことが細胞容量を増やしていると考えられるが、確証はない。また神経細胞でmTORシグナルが細胞サイズを制御しているという証拠も現在までには得られていない。傍証として得られている結果は疾患に由来している。mTORの上流のシグナル分子であるTSCの変異はmTORの活性化をもたらすが、神経細胞を含む細胞の異常成長/増殖を伴う結節硬化症を引き起こす。また病理像が類似した限局性日四t形成異常でもmTORシグナルの活性化が示唆されているが、原因は分かっていない。これらの病態を示す変異変化が、蛋白や脂質合成の増強を引き起こしているかに着いても不明である。

## 2. 研究の目的

神経細胞の細胞体の大きさ、サイズ制御に関してはこれまでほとんど研究されていない。神経突起(軸索&樹状突起)の伸展(これもサイズの増大につながるが)に関しては軸索

ガイダンス因子や神経栄養因子などの作用によって引き起こされることが広く知られているのと対照的である。本研究では神経細胞の細胞体のサイズ制御のシグナル機構を明らかにすると同時に、その破綻による病態を解析し、脳内における細胞のサイズ制御を通じた脳環境の恒常性の維持のメカニズムに迫ることを目的とする。具体的には、

- (1) 神経細胞でmTORシグナルをON/OFFする刺激と蛋白合成、細胞サイズの関係
- (2) 大型異常神経細胞像を呈する疾患のそれらの細胞でのmTORシグナルの活性化の原因はなにか?

を明らかにする。

## 3. 研究の方法

目的の1では主にラット初代培養神経細胞を用い、種々の条件でmTORシグナルの活性化/不活性化を、ウエスタンブロット、免疫染色、酵素活性測定などの方法で調べた。蛋白合成は<sup>3</sup>Sメチオニンを用いた代謝ラベルの他、ピューロマイシン・抗ピューロマイシン抗体を用いたSUnSET法で測定した。脂質合成は<sup>14</sup>Cグルコース/クロロホルム抽出により新規合成総脂質を測定した。細胞サイズは免疫染色による細胞面積の計測(二次元)および、パッチクランプ法によるmembrane capacitanceの計測で

目的の2では共同研究により限局性皮質形成異常(FCDIIb)の患者手術脳(書面インフォームドコンセント/倫理委員会承認済)より次世代シーケンサーによるエクソーム解析によって、mTORシグナル系分子の体細胞変異を探索した。見いだした変異はヒト細胞株(HEK293T)及びラット初代培養神経細胞で活性のvalidationを行った。また患者脳のmTORシグナル系の活性化をウエスタンブロット、免疫染色によって検討した。

## 4. 研究成果

### (1) mTORシグナル調節機構

これまで神経細胞において神経栄養因子BDNFや栄養素であるロイシン、グルコースがmTORを短期間に活性化し、一方、AMPK活性化剤や神経ペプチドが不活性化することを明らかにしてきた。さらに神経細胞における主要なシグナルであるCa<sup>2+</sup>がmTOR活性を調節していることを見いだした。BAPTA-AMによる細胞内Ca<sup>2+</sup>の阻害とイオノフォア(ionomycin)によるCa<sup>2+</sup>の過剰な流入は共にmTOR活性を阻害した。また蛋白合成も同様に阻害された。このことは神経細胞のmTORの活性にはCa<sup>2+</sup>濃度の[window]が存在することを示唆している。現在さらにCa<sup>2+</sup>によるmTOR活性調節のメカニズムを検討して論文作成中である。

### (2) 細胞サイズとの関連

これまでBDNFの長期作用(1週間-10日)として蛋白合成能の増加を報告しているが、mTOR活性の上昇も見られた。またこの時、membranecapacitance (pF)が約1.3倍に増加していたことから、mTOR活性、蛋白合成能、細胞サイズがパラレルに動いていることが明らかとなった。因果関係を明らかにするため、mTOR依存性のCap-dependentな翻訳の阻害剤である4EGIを用いて、更なる検討を加えている。

### (3) 疾患脳における解析

FCDIbのてんかん手術脳サンプルと血液サンプルの比較から、mTORの体細胞変異を4つ見いだした。これら患者脳組織において、mTOR下流のS6のリン酸化が亢進していることをウエスタンブロットで、この亢進は異型かつ大型の細胞(dysmorphic neuron, balloon cell)に見られることを免疫組織化学で明らかにした。さらにこれらの体細胞変異は活性型変異体であることをHEK293T細胞、およびラット初代培養神経細胞で明らかにした。蛋白合成の亢進も確認され、細胞の異型化大型化とmTORの活性化、蛋白合成の亢進が一つの流れとして病態を形成していることを明らかにした。

### 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6件)(代表者分のみ)すべて査読有り

- 1) Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirouzu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng YJ, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N (2015) Somatic Mutations in MTOR Cause Focal cortical dysplasia Type IIb *Ann. Neurol.* Sep;78(3):375-86. doi: 10.1002/ana.24444.
- 2) Takei N, Furukawa K, Hanyu O, Sone H, Nawa H (2014) A possible link between BDNF and mTOR in control of food intake. *Front. Psychol.* doi: 10.3389/fpsyg.201401093
- 3) Takei N and Nawa H. (2014) mTOR signaling and its roles in normal and

abnormal brain development. *Front Mol Neurosci.* 7:28. doi: 10.3389/fnmol.2014.00028

- 4) Nawa H, Sotoyama H, Iwakura Y, Takei N and Namba H (2014) Neuropathologic implication of peripheral neuregulin-1 and EGF Signals in dopaminergic dysfunction and behavioral deficits relevant to Schizophrenia: Their target cells and time window *Biomed Res Int.* 2014;2014:697935.
- 5) Ishizuka, Y., Kakiya, N., Witters, LA, Oshiro N, Shirao, T, Nawa, H. and Takei, N. (2013) AMP-activated protein kinase (AMPK) counteracts brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in neurons. *J. Neurochem.* 127:66-77
- 6) Wang R, Iwakura Y, Araki K, Keino-Masu K, Masu M, Wang X, Takei N, Higashiyama S and Nawa H. (2013) ErbB2 dephosphorylation and anti-proliferative effects of neuregulin-1 in ErbB2-overexpressing cells; Re-evaluation of their low-affinity interaction. *Sci. Rep* 3:1402. doi: 10.1038/srep01402.

[学会発表](計8件)(代表者分のみ)

- 1) 武井延之 (2015) mTOR シグナル系と脳形成異常 BMB2015 ワークショップ 12/4 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- 2) Takei N, Yokomaku D, Ushiki T, Nawa H (2015) EGF downregulates presynaptic maturation and suppresses synapse formation in vitro and in vivo 25<sup>th</sup> ISN Meeting

Cairns, Australia

- 3) **Takei, N** (2014) mTOR mediates neuronal maturation and cell size control. Satellite Symposium of ISN Special Conference [Key molecules for neuronal maturation] Tokyo

など

〔図書〕(計 2 件)(代表者分のみ)

- 1) **武井延之** (2015) neurotrophin TrkA-C サイトカイン・増殖因子キーワード事典(宮園浩平、秋山徹、宮島篤、宮澤恵二、田中伸幸/編) 羊土社 東京pp272-275
- 2) **武井延之** (2013) 神経栄養因子 「脳神経科学イラストレイテッド第三版」羊土社 東京 pp200-207

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**武井 延之** (TAKEI, Nobuyuki)  
新潟大学・脳研究所・准教授  
研究者番号：70221372

### (2) 研究分担者

**柿田 明美** (KAKITA Akiyoshi)  
新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号：80281012

### (3) 連携研究者