

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861283

研究課題名(和文) NShcホスホチロシンアダプター分子のてんかん原生獲得・進展への関与

研究課題名(英文) Involvement of neuronal phosphotyrosine signal adaptor N-Shc in the kainic acid-induced epileptiform activity

研究代表者

馬場 史郎 (BABA, Shiro)

長崎大学・病院(医学系)・客員研究員

研究者番号：30530430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)-TrkB シグナル伝達系がてんかん原生獲得・進展に関係することが知られているが、その下流シグナル分子の機能解明には至っていない。本研究では、TrkB受容体のアダプター分子の一つであるNShcのカイニン酸誘発けいれんにおける役割を解明することを目的とした。NShc欠損マウスではコントロールマウスと比較して、カイニン酸投与にて誘発されるけいれんの重症度、てんかん性放電、海馬錐体神経細胞死が減少していた。これらの結果からNShcはカイニン酸誘発けいれんの機序に深く携わっていることが解り、NShcシグナル伝達系が新たなてんかん治療の標的になりえると考えられた。

研究成果の概要(英文)：BDNF-TrkB signaling is implicated in experimental seizures and epilepsy. However, the downstream signaling mechanism in epileptiform activity and epileptogenesis caused by TrkB activation is still controversial. Signaling at the TrkB-Shc site is transmitted through the neural-specific phosphotyrosine signal adaptor NShc. Therefore, the aim of this study is to examine whether NShc-mediated signaling pathway is involved in kainic acid (KA)-induced epileptiform activity. We show a significant reduction of both seizure severity and frequency of epileptiform discharges in NShc deficient mice as compared with control mice. KA-induced neuronal cell loss in the CA3 area of hippocampus was also inhibited in NShc deficient mice. These results suggest that NShc is involved in KA-induced epileptiform activity. We propose that the NShc-mediated signaling pathway could provide a potential target for the development of novel therapeutic drugs and/or approaches in the treatment of epilepsy.

研究分野：脳神経外科,脳腫瘍,てんかん外科,機能的脳神経外科

キーワード：NShc epilepsy TrkB receptor BDNF kainic acid hippocampus neuronal cell death seizure

## 1. 研究開始当初の背景

(1) てんかん患者のうち約 20%がけいれん薬で発作をコントロールできない難治性てんかんとなり(Engel Jr., 2001)、発作抑制や発作による神経細胞障害や機能障害を抑制する新しい治療法が求められている。けいれん発作は、ニューロンの過剰な放電に起因し、周囲神経細胞の興奮や抑制の均衡が崩れることにより生じると考えられるが、てんかん原生獲得における分子メカニズムは未だ解明されていない。

(2) 脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)がその特異的受容体 TrkB に結合することでその細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化され、NShc や PLC $\gamma$  といったアダプター蛋白が結合することで下流にシグナルを伝達し、神経細胞の生存・成長・シナプスの機能亢進などの神経細胞の成長を調節していると考えられている(Nakamura et al. 1996, Pelicci et al. 1996, Cattaneo and Pelicci, 1998)。NShc は Grb2 との結合を介して Ras-MAPK シグナル系の活性化に関与すると考えられているが、その機能的役割については未だ多くの点が明らかにされていない。

(3) BDNF-TrkB シグナル系はけいれん発作やてんかんの原生獲得・進展にかかわっていることがこれまで明らかにされてきた(Gall. 1993, Lindvall et al. 1994, Nawa et al. 1995, Binder et al. 1999, Aloyz et al. 1999, Binder et al. 2001, He et al. 2004)。しかし、てんかん原生獲得において TrkB が活性化された後の下流におけるシグナルメカニズムは未だ解明されておらず、NShc 分子の機能的役割については依然不明な点が多い。

これまでの報告から TrkB 受容体の活性化により働く NShc シグナル伝達系がてんかん性活動に関連している可能性は高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

われわれは、TrkB 受容体の活性化により働く NShc シグナル伝達系がてんかん性活動に関連しており、NShc の抑制することで、けいれん発作やてんかん原生獲得・進展を抑制できると仮説を立てた。本研究では、N-Shc 遺伝子欠損マウスを用いて、てんかん原生獲得や進展における BDNF-TrkB シグナル系、NShc アダプター分子の機能を探索することと目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

本実験には 4 から 8 週齢の雄 NShc 欠損マウス(NShc $^{-/-}$ )を用いた。またコントロールとして NShc $^{+/+}$ マウスと同腹仔の野生型マウス(NShc $^{+/+}$ )および C57BL/6 マウスを用いた。

### (2) カイニン酸誘発けいれんおよびけいれ

### ん評価法

NShc $^{-/-}$ 、NShc $^{+/+}$ および C57BL/6 マウスに対し、カイニン酸(KA)腹腔内投与(30mg/kg i.p.)後に生じるけいれん発作を、投与直後より 320 分間観察した。けいれん発作は Racine seizure scale (Racine 1972): 1.mouth and facial clonus; 2.head nodding; 3.forelimb clonus;4.rearing;5.rearing and falling (full motor seizure with loss of postural control) and status epilepticus; and 6.death.を用いて定量化し、経時的変化を観察・評価を行った。

### (3) K252a 前投与による TrkB の抑制

C57BL/6 マウスに対し TrkB inhibitor (K252a 1  $\mu$ M) および対照薬(0.1%DMSO)を脳室内投与後にカイニン酸腹腔内投与を行い、同様に Racine seizure scale を用いてけいれん発作を観察・評価を行った。

### (4) KA、TrkB 関連タンパクの発現 (ウエスタンブロット)

NShc $^{-/-}$ および C57BL/6 マウスの脳を摘出し、大脳皮質、海馬、視床組織に分け、それぞれウエスタンブロット法を用いて TrkB レセプターおよび NShc、カイニン酸レセプター(KA1, KA2)、グルタミン酸レセプター(GluR6)の発現を各郡で検討した。

### (5) カイニン酸投与後の海馬脳波記録

N-Shc $^{-/-}$ および C57BL/6 マウスを麻酔下に開頭し、定位的に海馬電極を留置固定(bregma から 2.5 mm 後方、2.25 mm 側方、2.25 mm 深部)を行った。術後 1 週間後にデジタル脳波計に接続し、カイニン酸投与前後の脳波記録を行った。棘波や鋭波などでんかん性発射をカイニン酸投与後から 2 時間計測し、各郡における違いを検討した。

### (6) カイニン酸投与後の海馬錐体細胞の組織学的検討

NShc $^{-/-}$ 、NShc $^{+/+}$ マウスおよび C57BL/6 マウスに対しカイニン酸腹腔内投与から 1 日目と 7 日目に灌流固定を行い、脳を摘出、凍結標本とし、冠状断のスライス標本を作成した。Nissl 染色を行い、海馬 CA3、CA1 領域の神経細胞死を組織学的に解析し、カイニン酸による錐体細胞死に対する N-Shc の影響を検討した。

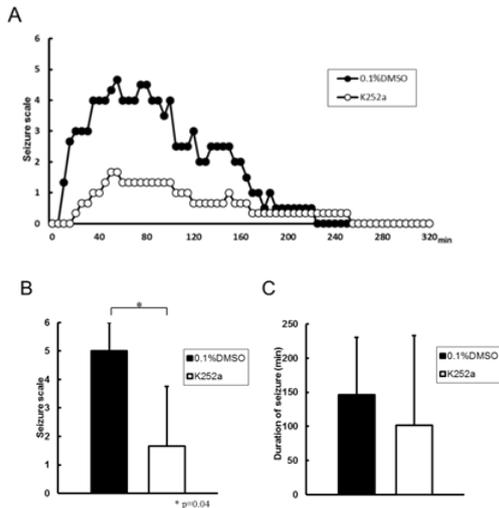
## 4. 研究成果

### (1) TrkB レセプターの抑制によるカイニン酸誘発けいれんの減少。

C57BL/6 マウスに対し、TrkB インヒビターである K252a 1 $\mu$ M (5 $\mu$ l) および対照(DMSO, 5 $\mu$ l) 脳室内投与を行い、30 分後にカイニン酸(KA) 30mg/kg 腹腔内投与後のてんかん発作を Racine seizure scale(1~6)を用

いて評価した。K252 前投与群では DMSO 前投与群に比べ、有意にけいれん発作の重症度が低下した (K252a 1.6, DMSO 5.0;  $p=0.04$ , Figure1)。

Figure1

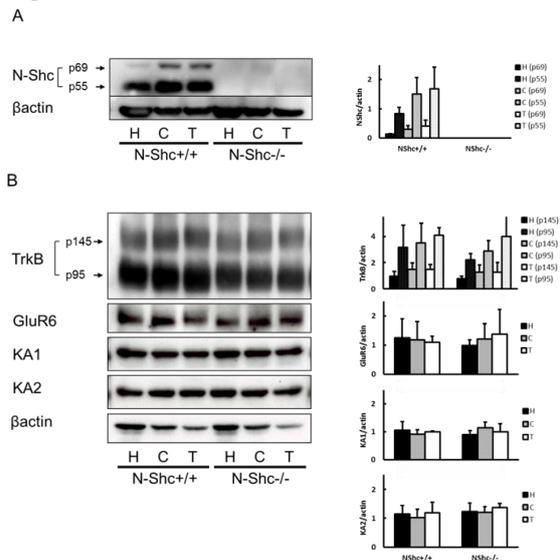


この結果よりカニン酸誘発けいれんにおいても BDNF-TrkB シグナル系がけいれん発生のメカニズムに関連していることが考えられた。

## (2) KA、TrkB 関連タンパクの発現

NShc<sup>-/-</sup>マウスおよび C57BL/6 マウスの脳を摘出し、大脳皮質、海馬、視床組織に分け western blot を行い、TrkB レセプターおよび NShc、カニン酸レセプター (KA1, KA2)、グルタミン酸レセプター (GluR6) の発現を調べた。N-Shc<sup>-/-</sup>マウスでは N-Shc タンパクの発現を認めなかった。両群にて TrkB、KA1、KA2、GluR6 の発現に差はなかった。

Figure2



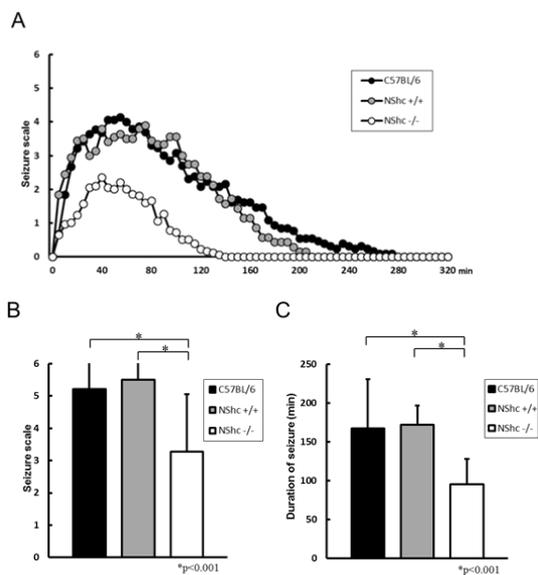
NShc タンパク欠損に伴う TrkB、KA1、KA2、GluR6 の発現に影響はなく、NShc<sup>-/-</sup>マウス

への KA 投与後の効果が NShc タンパク欠損によりもたらされると考えられた。

## (3) NShc 欠損マウスにおけるカニン酸誘発けいれんの減少。

NShc<sup>-/-</sup>, NShc<sup>+/+</sup>, および C57BL6 マウスに対し、KA 腹腔内投与 (30mg/kg) 後のけいれん発作も同様に評価した。NShc<sup>-/-</sup>マウスでは NShc<sup>+/+</sup>, C57BL6 マウスに比べ、有意にけいれん発作の重症度が低下した (C57BL6 5.21, NShc<sup>+/+</sup> 5.50, NShc<sup>-/-</sup> 3.27;  $p<0.001$ )。発作継続時間も NShc<sup>-/-</sup>マウスで有意に短縮した (C57BL6 167min, NShc<sup>+/+</sup> 172min, NShc<sup>-/-</sup> 95min;  $p<0.01$ )。KA 投与後の死亡率は NShc<sup>-/-</sup>マウスで有意に低かった (C57BL6 45.8%, NShc<sup>+/+</sup> 61.8%, NShc<sup>-/-</sup> 18.2%;  $p<0.01$ )

Figure3



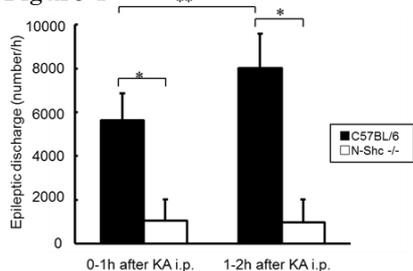
この結果より、カニン酸にて誘発されるけいれん発作は NShc<sup>-/-</sup> マウスで抑制されることが解った。

## (4) NShc 欠損マウスにおけるカニン酸誘発てんかん性放電の減少。

NShc<sup>-/-</sup>および C57BL6 マウスに対し、定位的に海馬 CA3 領域に単極電極を留置。電極留置術後 1 週間後にデジタル脳波計に接続し、カニン酸 (KA) 投与前 30 間、KA 腹腔内投与後 (30mg/kg, i.p.) から 2 時間の脳波記録を行った。棘波や鋭波のてんかん性発射を視察にて計測した。KA 投与前は両群ともに明らかでないてんかん性発射は認めなかった。KA 投与後、両群ともてんかん性発射を観察できたが、振幅、頻度ともに NShc<sup>-/-</sup>マウスで低かった。てんかん性発射の頻度は、投与直後から 1 時間後では C57BL6 マウスが平均  $5642.8 \pm 1210$  回/h に対し NShc<sup>-/-</sup>マウスで平均  $1046 \pm 971$  回/h と有意に低かった ( $p<0.001$ )。1 時間後から 2 時間後では、

C57BL/6 マウスが平均 8040±1573 回/h に対し NShc<sup>-/-</sup>マウスで平均 981.5±1048 回/h と有意に低かった(p<0.001)。

Figure 4



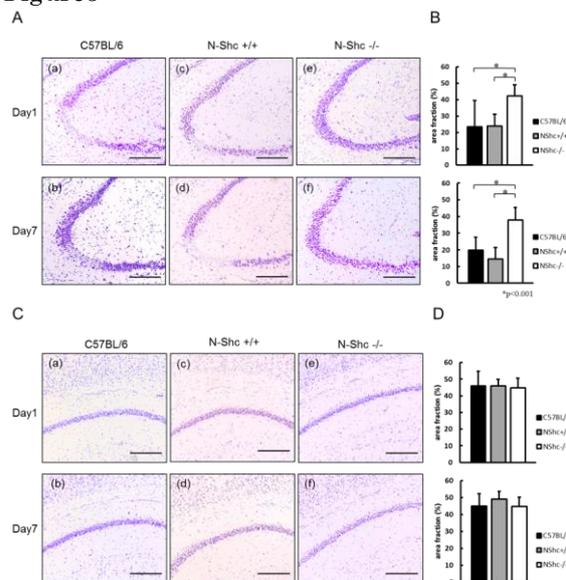
この結果よりカイニン酸誘発けいれんにおける海馬からのてんかん性発射は NShc<sup>-/-</sup>マウスで抑制されることが解った。

(5) NShc 欠損マウスにおける海馬 CA3 領域でのカイニン酸誘発錐体細胞死の減少。

C57BL6, NShc<sup>+/+</sup>, NShc<sup>-/-</sup>マウスに対し、KA 腹腔内投与から 1,7 日目に灌流固定後、脳冠状断切片の Nissl 染色を行い、海馬 CA3 領域の錐体神経細胞死を評価した。NShc<sup>-/-</sup>マウスでは、1,7 日目ともに NShc<sup>+/+</sup>, C57BL6 マウスに比べ、有意に神経細胞死が減少した (C57BL/6 day1 23.3%, day7 19.7%; NShc<sup>+/+</sup> day1 23.9%, day 7 14.5%; NShc<sup>-/-</sup> day1 42.4%, day7 37.7%; p<0.001)

一方、海馬 CA1 領域では各郡での神経細胞死に差はなかった。

Figure5



この結果よりカイニン酸にて誘発される海馬 CA3 領域での錐体細胞死は NShc<sup>-/-</sup> マウスで抑制されることが解った。

<まとめ>

本研究では、(1) TrkB レセプターを抑制することでカイニン酸誘発けいれんが減少した、(2) NShc 欠損マウスでは、カイニン酸にて誘発されるけいれん重症度およびてんかん性放電がコントロールマウスに比べ有意に低下した、(3) NShc 欠損マウスでは、カイニン酸投与後の海馬 CA3 領域の錐体細胞死が抑制された。これらの結果から TrkB レセプターを介した NShc がカイニン酸によって誘発されるてんかん性活動のメカニズムに関連していることを解明した。

TrkB を抑制することでキンドリングが抑えられ、てんかん原獲得を抑制できることは報告されている (He et al. 2004)。一方で TrkB を抑制することで海馬での LTP も障害されることが知られており (Huang et al., 2008)、TrkB を直接抑制することは認知機能や高次機能に影響を与える可能性があると考えられる。われわれはこれまでの研究で N-Shc 遺伝子欠損マウスは海馬での LTP が増強されることにより、野生型マウスよりも認知機能が優れていることを報告した (Miyamoto et al. 2005)。

これらのことから NShc タンパクを標的とすることで、高次機能に影響を与えることなくてんかんを抑制できる新たな治療法を確立できる可能性がある。

<引用文献>

- Engel J Jr. Intractable Epilepsy: Definition and Neurobiology. *Epilepsia* 2001; 42(Suppl. 6): 3.
- Nakamura T, Sanokawa R, Sasaki Y, Ayusawa D, Oishi M, Mori N. N-Shc: a neuralspecific adapter molecule that mediates signaling from neurotrophin/Trk to Ras/MAPK pathway. *Oncogene*1996; 13: 1111-1121.
- Pellicci G, Dente L, De Giuseppe A, Verducci-Galletti B, Giuli S, Mele S, Vetriani C, Giorgio M, Pandolfi PP, Cesareni G, Pellicci PG. A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene* 1996;13: 633-641.
- Cattaneo E, Pellicci PG. Emerging roles for SH2/PTB-containing Shc adaptor proteins in the developing mammalian brain. *Trends Neurosci* 1998; 21: 476-481.
- Gall CM. Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy. *Exp Neurol* 1993; 124: 150-166.
- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmér E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 1994; 17: 490-496.
- Nawa H, Carnahan J, Gall C. BDNF

- protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 1527-1535.
8. Binder DK, Routbort MJ, McNamara JO. Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trk receptors in the mossy fiber pathway of adult rat hippocampus. *J. Neurosci* 1999; 19: 4616-4626.
  9. Aloyz R, Fawcett JP, Kaplan DR, Murphy RA, Miller FD. Activity-dependent activation of TrkB neurotrophin receptors in the adult CNS. *Learn Mem* 1999; 6: 216-231.
  10. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* 2001; 24: 47-53.
  11. He XP, Kotloski R, Nef S, Luikart BW, Parada LF, McNamara JO. Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron* 2004; 43: 31-42.
  12. Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO. Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal synapse. *Neuron* 2008; 57: 546-558.
  13. Miyamoto Y, Chen L, Sato M, Sokabe M, Nabeshima T, Pawson T, Sakai R, Mori N. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc via interaction with the NMDA receptor. *J Neurosci* 2005; 25: 1826-1835.

#### 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 0件)

〔学会発表〕 (計 0件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

馬場 史郎 (BABA, Shiro)

長崎大学・病院 (医学系)・客員研究員

研究者番号 : 30530430