

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09624

研究課題名(和文) Pten変異マウスを用いた新しいてんかん病理・治療モデルの確立

研究課題名(英文) Development of a new translational medicine for epilepsy using the Pten-mutant mice

研究代表者

酒井 康成 (Sakai, Yasunari)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10380396

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)：本研究では、Pomc陽性ニューロン特異的にPtenを欠失させたコンディショナル・ノックアウトマウスを作製した。本マウスは生後8-9週目に全身けいれんを自然発症し、11週目までに全て死亡した。生化学、顕微鏡学的観察結果を通じて、本マウスの海馬歯状回は、年齢依存的に肥大・変形し、またけいれんに先立って海馬における興奮抑制およびCrh-Pomc (ACTH)バランスが破綻していることを明らかにした。ラパマイシンを使用するとけいれんの発症と早期死亡を抑制した。これらの結果から、PI3K-AKT-mTOR経路は、難治性てんかんに対する新しい治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have generated conditional knockout mice that lacked expression of Pten in the Pomc-expressing neurons in the developing brain. All of these mice started showing generalized seizures from 8-9 weeks of age and died by 11 weeks of age. Biochemical studies and microscopic observation detected the age-dependent hypertrophy and dysmorphic appearance of the hippocampal dentate gyrus. We have also found that excitatory-inhibitory and Crh-Pomc (ACTH) unbalances became prominent in the dentate gyrus before the onset of seizures. We confirmed that the treatment with rapamycin prevented the onset of seizures and premature death of Pten-mutant mice. These data provide evidence that PI3K-AKT-mTOR is a molecular pathway that can be a therapeutic target for intractable epilepsy in future medicine.

研究分野：小児神経学

キーワード：Pten てんかん 自閉症 PI3-AKT-mTOR経路 治療 海馬 ノックアウトマウス Crh-POMC(ACTH)

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害は、コミュニケーション能力の欠如を特徴とする、遺伝的に不均一な疾患群である。自閉症児には、てんかんや言語発達の遅れ、パニックや過食など多彩な症状が合併する(図1A)。この中でとくに、てんかん発作は自閉症児の50-70%に見られ、治療抵抗性のためしばしば診療上大きな問題点となることも多い。しかしながら、両者が合併するメカニズムは明らかにされていない(Viscidi EW, *PLoS One* 2013)。

Phosphatase tensin homolog (PTEN) 遺伝子は、イノシトールリン酸脱リン酸化酵素 PTEN をコードし、AKT-mTOR 経路を負に調節する。PTEN 遺伝子の突然変異を有する Cowden 病患者は、多発腫瘍の他、自閉症様症状を高率に合併するため自閉症関連遺伝子と考えられている(McBride KL, *Autism Res* 2010)。同じく自閉症関連遺伝子として知られる *TSC1 (hamartin)* や *TSC2 (tuberin)* もまた、AKT-mTOR 経路を調節する分子であることから、本リン酸化経路は自閉症だけでなく、てんかんの発症にも密接に関連する重要な細胞内経路と考えられている

今回、脳特異的な *Pten* 遺伝子欠損(コンディショナルノックアウト; *Pten* CKO) マウスを新たに作成したところ、全てのマウスが生後 10 週齢に全身けいれんを発症し、早期死亡した。本マウスを用いて、自閉症とてんかんが併存するメカニズム、難治性てんかんの新たな治療法を開発する。

2. 研究の目的

(1) 脳特異的 *Pten* 欠損 (*Pten* CKO) マウスの分析: 上記マウスを作成し、てんかん発作の発症時期やその電気生理学的特徴を明らかにする。海馬歯状回における興奮・抑制バランス変化を経時的に明らかにし、上記症状出現時期と病理学的変化との時間的相関性を分析する。

(2) ラパマイシン (mTOR 阻害剤) による上記症状の改善効果を明らかにする。*Pten* CKO マウスの海馬に局限する AKT-mTOR シグナル異常を免疫組織学的に検出することができたため、次にこの脳内異常シグナル活性と上記てんかん症状が、ラパマイシンの腹腔内投与によってどの程度改善するかを定量的に評価する。

3. 研究の方法

(1) 海馬特異的 *Pten* 欠損 (*Pten*-CKO) マウ

スの作成、脳波解析: *Pten-flox* マウス(九州大学・鈴木聡教授提供)と *Pomc-Cre* トランスジェニックマウス(米国ジャクソン研究所より購入)を交配させ、*Pten-CKO* およびコントロールマウス (*Pten-flox/flox*; *Pomc-Cre*^{+/+})を得る。*Pten*-CKO マウスは、海馬歯状核顆粒細胞層でのみ *Pten* 発現が欠失した個体である。以上、平成 26 年 10 月現在、マウスは作成済み(本学動物実験倫理委員会の承認済み)。

マウスの脳波は 4 チャンネル Powerlab (ADI Instruments 社)を用いて、生後 8 週目から持続的にモニターする。

(2) 海馬に局限する PIK3-AKT シグナル異常: 上記方法で作成した *Pten*-CKO マウスの脳(0-8 週齢)を灌流・固定し、一般的な手順に従って蛍光免疫染色を行う。本学共通機器として利用可能な共焦点レーザー顕微鏡(ニコン A1)を用いて、リン酸化 AKT およびリン酸化 S6 シグナルを定量的に測定する。海馬歯状回に局限したシグナル変化を確認する。

海馬歯状回に見られる神経前駆細胞数、顆粒細胞層興奮性・抑制性バランス(図4)について、分化段階または細胞系譜特異的なマーカーを指標に、定量的に評価する。また、海馬歯状回の神経新生の活動度について、BrdU 取り込み率から評価する。

(3) 大脳皮質のシグナル異常: 海馬歯状回からの興奮性出力が著しい場合、海馬から投射を受ける大脳皮質に 2 次的なシグナル異常を来す可能性がある。実際、海馬、大脳皮質の NPY シグナル変化を観察した際、この領域で著しい発現の亢進を認めた。さらに大脳皮質内の興奮性ニューロンにおけるてんかん誘発性シグナルの変動を経時的に分析する。cFos やリン酸化 CaMKII など活動依存性のシグナル変化を共焦点レーザー顕微鏡およびウェスタンブロットで定量的に解析する。

4. 研究成果

本マウスは生後 8-9 週目に全身けいれんを自然発症し、11 週目までに全て死亡した。生化学、顕微鏡学的観察結果を通じて、本マウスの海馬歯状回は、年齢依存的に肥大・変形し、またけいれんに先立って海馬における興奮抑制および Crh-Pomc (ACTH) バランスが破綻していることを明らかにした。ビデオモニター下での脳波測定では、海馬起源と考えられるてんかん性放電を捕捉した。mTOR 阻害薬ラパマイシンの投与

により、けいれん症状は軽減し、これらの分子フェノタイプも正常化することを確認した。本研究の成果をアメリカてんかん学会（2016年12月ヒューストン市）で発表し、合わせて英文科学誌に報告した（Matsushita Y, *Sci Rep* 2016）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 33 件)*: 責任著者

1. Sanefuji M, Yamashita H, Torio M, Katsuki D, Akamine S, Ishizaki Y, Kishimoto J, Sakai Y, Takada H, Yoshida K, Ohga S. A rightward saccade to an unexpected stimulus as a marker for lateralized visuospatial attention. *Sci Rep* (2018)
2. Yonemoto K, Ichimiya Y, Sanefuji M, Kaku N, Sakata A, Baba R, Yamashita F, Akamine S, Torio M, Ishizaki Y, Maehara Y, Sakai Y*, Ohga S. Early intervention with adrenocorticotropin for acute encephalopathy-associated epileptic spasms: Report of two cases. *Clin EEG Neurosci* (2018, in press)
3. Nakashima K, Koga Y, Sakai Y*, Takada H, Harimaya K, Ohga S, Taguchi T, Oda Y, Honda H, Ohga S. Radiotherapy for Langerhans cell histiocytosis with paraplegia: a rare oncologic emergency case report in infancy and literature review. *Brain Dev* (2018)
4. Hirofuji S, Hirofuji Y, Kato H, Masuda K, Yamaza H, Sato H, Takayama F, Torio M, Sakai Y, Ohga S, Taguchi T, Nonaka K. Mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of a child with Rett syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 498: 898-904 (2018)
5. Teranishi H, Koga Y, Nakashima K, Morihana E, Ishii K, Sakai Y, Taguchi T, Oda Y, Miyake N, Matsumoto N, Ohga S. Cancer Management in Kabuki Syndrome: The First Case of Wilms Tumor and a Literature Review. *J Pediatr Hematol Oncol* (2018)
6. Uike K, Nagata H, Hirata Y, Yamamura K, Terashi E, Matsuura T, Morihana E, Ohkubo K, Ishii K, Sakai Y, Taguchi T, Ohga S. Effective Shunt Closure for Pulmonary Hypertension and Liver Dysfunction in Congenital Portosystemic Venous Shunt. *Pediatr Pulmonol* 53: 505-511 (2017)
7. Akamine S, Sagata N, Sakai Y*, Kato TA, Nakahara T, Matsushita Y, Togao O, Hiwataishi, A, Sanefuji, M, Ishizaki Y, Torisu H, Saitsu H, Matsumoto N, Hara T,

Sawa A, Kano S, Furue M, Kanba S, Shaw CA, Ohga S. Early-onset epileptic encephalopathy and severe developmental delay in an association with de novo double mutations in NF1 and MAGEL2. *Epilepsia Open* 3, 81-85 (2018)

8. Takata A, Miyake N, Tsurusaki Y, Fukai R, Miyatake S, Koshimizu E, Kushima I, Okada T, Morikawa M, Uno Y, Ishizuka K, Nakamura K, Tsujii M, Yoshikawa T, Toyota T, Okamoto N, Hiraki Y, Hashimoto R, Yasuda Y, Saitoh S, Ohashi K, Sakai Y, Ohga S, Hara T, Kato M, Nakamura K, Ito A, Seiwa C, Shirahata E, Osaka H, Matsumoto A, Takeshita S, Tohyama J, Saikusa T, Matsuishi T, Nakamura T, Tsuboi T, Kato T, Suzuki T, Saitsu H, Nakashima M, Mizuguchi T, Tanaka F, Mori N, Ozaki N, Matsumoto N. Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. *Cell Rep* 22:734-747 (2018).

9. Takada Y, Sakai Y*, Matsushita Y, Ohkubo, K, Koga Y, Akamine S, Torio M, Ishizaki Y, Sanefuji M, Torisu H, Shaw CA, Kagami M, Hara T, Ohga S. Sustained endocrine profiles of a girl with WAGR syndrome. *BMC Med Genet* 18:117 (2017)

10. Sagata N, Kato TA, Kano S, Ohgidani M, Shimokawa N, Sato-Kasai M, Hayakawa K, Kuwano N, Wilson AM, Ishizuka K, Kato S, Nakahara T, Nakahara-Kido M, Setoyama D, Sakai Y, Ohga S, Furue M, Sawa A, Kanba S. Dysregulated gene expressions of MEX3D, FOS and BCL2 in human induced-neuronal (iN) cells from NF1 patients: a pilot study. *Sci Rep* 7:13905 (2017)

11. Murata K, Motomura Y, Tanaka T, Kanno S, Yano T, Onimaru M, Himoyama A, Nishio H, Sakai Y, Oh-hora M, Hara H, Fukase K, Takada H, Masuda S, Ohga S, Yamasaki S, Hara T. Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signaling pathway in a murine model of Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 190:54-67 (2017)

12. Imagawa E, Higashimoto K, Sakai Y, Numakura C, Okamoto N, Matsunaga S, Ryo A, Sato Y, Sanefuji M, Ihara K, Takada Y, Nishimura G, Saitsu H, Mizuguchi T, Miyatake S, Nakashima M, Miyake N, Soejima H, Matsumoto N. Mutations in genes encoding polycomb repressive complex 2 subunits cause Weaver syndrome. *Hum Mutat* 38: 637-648 (2017)

13. Ohyama N, Torio M, Nakashima K, Koga Y, Kanno S, Nishio H, Nishiyama K, Sasazuki M, Kato H, Asakura H, Akamine S, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sakai Y*, Ohga S.

- A childhood-onset intestinal toxemia botulism during chemotherapy for relapsed acute leukemia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16:61 (2017)
14. Takemoto R, Yamamura K, Nagata H, Kawaguchi N, Sakai Y, Matsuura T, Tomoaki T, Ohga S. Disappearance of basal ganglia lesions in T1-weighted magnetic resonance images after the ligation of congenital portosystemic venous shunt. *Pediatr Neonatol* 58, 465-466 (2017)
 15. Ichimiya Y, Kaku N, Sakai Y, Yamashita F, Matsuoka W, Muraoka M, Akamine S, Mizuguchi S, Torio M, Motomura Y, Hirata Y, Ishizaki Y, Sanefuji M, Torisu H, Takada H, Maehara Y, Ohga S. Transient dysautonomia in an acute phase of encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev* 39: 621-624 (2017)
 16. Hara T, Nakashima Y, Sakai Y, Nishio H, Motomura Y, Yamasaki S. Kawasaki disease: a matter of innate immunity. *Clin Exp Immunol* 186: 134-143 (2016)
 17. Lee S, Sanefuji M, Torio M, Kaku N, Ichimiya Y, Mizuguchi S, Baba H, Sakai Y, Ishizaki Y, Torisu H, Kira R, Hara T, Ohga S. Involuntary movements and coma as the prognostic marker for acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *J Neurol Sci* 370: 39-43 (2016)
 18. Kanemasa H, Sakai Y*, Fukai R, Torio M, Miyake N, Lee S, Ono H, Akamine S, Nishiyama K, Sanefuji M, Ishizaki Y, Torisu H, Saitsu H, Matsumoto N, Hara T. De novo p.Arg756Cys mutation of ATP1A3 causes an atypical form of alternating hemiplegia of childhood with prolonged paralysis and choreoathetosis. *BMC Neurology* 16:174 (2016)
 19. Suzuki T, Miyake N, Tsurusaki Y, Okamoto N, Alkindy A, Inaba A, Sato M, Ito S, Muramatsu K, Kimura S, Ieda D, Saitoh S, Hiyané M, Suzumura H, Yagyu K, Shiraiishi H, Nakajima M, Fueki N, Habata Y, Ueda Y, Komatsu Y, Yan K, Shimoda K, Shitara Y, Mizuno S, Ichinomiya K, Sameshima K, Tsuyusaki Y, Kurosawa K, Sakai Y, Haginoya K, Kobayashi Y, Yoshizawa C, Hisano M, Nakashima M, Saitsu H, Takeda S, Matsumoto N. Molecular genetic analysis of 30 families with Joubert syndrome and related disorders. *Clin Genet* 90:526-535 (2016).
 20. Yamaguchi Y, Torisu H, Kira R, Ishizaki Y, Sakai Y, Sanefuji M, Aiba H, Ichiyama T, Oka A, Kishi T, Kimura S, Kubota M, Takanashi J, Takahashi Y, Tamai H, Natsume J, Hamano S, Hirabayashi S, Maegaki Y, Mizuguchi M, Minagawa K, Yoshikawa H, Kira J, Kusunoki S, Takada H, Hara T. A nationwide survey of pediatric acquired demyelinating syndromes in Japan. *Neurology* 87:2006-2015 (2016)
 21. Sakai Y*, Fukai R†, Matsushita Y, Miyake N, Saitsu H, Akamine S, Torio M, Sasazuki M, Ishizaki Y, Sanefuji M, Torisu H, Shaw CA, Matsumoto N, Hara T. De novo truncating mutation of TRIM8 causes an atypical form of epileptic encephalopathy. *Ann Hum Genet* 80:235-240 (2016).
 22. Matsushita Y, Sakai Y*, Shimmura M, Shigeto H, Nishio M, Akamine S, Sanefuji M, Ishizaki Y, Torisu H, Nakabeppu Y, Suzuki A, Takada H, Hara T. Hyperactive mTOR signals in the proopiomelanocortin-expressing hippocampal neurons cause age-dependent epilepsy and premature death in mice. *Sci Rep* 6: 22991 (2016).
 23. Inoue H, Nishio H, Takada H, Nanishi E, Sakai Y, Ochiai M, Onimaru M, Chen SJ, Matsui T, Hara T. Activation of Nod1 signaling induces fetal growth restriction and death through fetal and maternal vasculopathy. *J Immunol* 196:2779-87 (2016)
 24. Fukai R, Saitsu H, Tsurusaki Y, Sakai Y, aginoya K, Takahashi K, Hubshman M, Okamoto N, Nakashima M, Tanaka F, Miyake N, Matsumoto N. De novo KCNH1 mutations in four patients with syndromic developmental delay, hypotonia and seizures. *J Hum Genet* 61:381-7 (2016)
 25. Fukai R, Saitsu H, Okamoto N, Sakai Y, Fattal-Valevski A, Shiina M, Kitai Y, Torio M, Kojima-Ishii K, Ihara K, Nakashima M, Tanaka F, Miyake N, Chernuha V, Matsumoto N. De novo missense mutations in NALCN cause developmental and intellectual impairment with hypotonia. *J Hum Genet* 61:451-5 (2016)
 26. Baldwin PR, Curtis KN, Patriquin MA, Wolf V, Viswanath H, Shaw CA, Sakai Y, Salas R. Identifying diagnostically-relevant resting state brain functional connectivity in the ventral posterior complex via genetic data mining in autism spectrum disorder. *Autism Res* 9:553-62 (2016)
 27. Saitsu H, Fukai R, Ben-Zeev B, Sakai Y, Mimaki M, Okamoto N, Suzuki Y, Monden Y, Saito H, Tziperman B, Torio M, Akamine S, Takahashi N, Osaka H, Yamagata T, Nakamura K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N. Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. *Eur J Hum Genet* 24:129-34 (2016)

28. Ohkubo K, Sakai Y*, Inoue H, Akamine S, Ishizaki Y, Matsushita Y, Sanefuji M, Torisu H, Ihara K, Sardiello M, Hara T. Moyamoya disease susceptibility gene RNF213 controls angiogenesis under PI3K-AKT and PKR pathways in endothelial cells. *Sci Rep* 5:13191 (2015).
29. Ochiai M, Ichiyama M, Iwayama M, Sakai Y, Yoshida K, Hara T. Longitudinal study of very low birth weight infants until 9years of age; attention deficit hyperactivity and autistic features are correlated with their cognitive functions. *Early Hum Dev* 91:783-6 (2015)
30. Isobe N, Sakai Y*, Kira R, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sakata A, Sasazuki M, Torio M, Akamine S, Torisu H, Hara T. Periodic epileptiform discharges in children with advanced stages of progressive myoclonic epilepsy. *Clin EEG Neurosci* 47:317-323 (2015).
31. Akamine S, Ishizaki Y, Sakai Y*, Torisu H, Fukai R, Miyake N, Ohkubo K, Koga H, Sanefuji M, Sakata A, Kimura M, Yamaguchi S, Sakamoto O, Hara T, Saitsu H, Matsumoto N, Ohga S. A male case with CDKL5-associated encephalopathy manifesting transient methylmalonic academia. *Eur J Med Genet.* (2018)
32. Sonoda M, Ishimura M, Ichimiya Y, Terashi E, Eguchi K, Sakai Y, Takada, Hama A, Kanno H, Toki T, Ito E, Ohga S. Atypical erythroblastosis in a patient with Diamond-Blackfan anemia who developed del(20q) myelodysplasia. *Int J Hematol* (2018)
33. Chong PF, Haraguchi K, Torio M, Kirino M, Ogata R, Matsukura M, Sakai Y, Ishizaki Y, Yamamoto T, Kira R. A case of pontine tegmental cap dysplasia with comorbidity of oculoauriculovertebral spectrum. *Brain Dev* 37:171-174 (2015)

〔学会発表〕(計 4 件) 国際学会のみ記載

1. Sakai Y, Akamine S, Sagata N, Kato T, Nakahara T, Matsushita Y, Togao O, Hiwatahi A, Sanefuji M, Ishizaki Y, Torisu H, Saitsu H, Matsumoto N, Hara T, Sawa A, Kano S, Furue M, Kanba S, Shaw CA, Ohga S: De novo double mutations of NF1 and MAGEL2 in a case with early-onset epileptic encephalopathy. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. July 20-23, 2017, Tokyo, Japan
2. Sakai Y: Relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia (RECA). 6th Symposium on ATP1A3 in Disease. Sept 21-22, 2017, Tokyo, Japan
3. Takada-Yamaguchi Y, Torisu H,

Kira R, Sakai Y, Ishizaki Y, Sanefuji M, Hara T, Ohga S: A nationwide survey of pediatric acquired demyelinating syndromes in Japan. The 13th Congress Asian Society for Pediatric Research . October 6-8, 2017, Hong Kong

4. Torisu H, Takada Y, Kira R, Sakai Y, Ishizaki Y, Sanefuji M, Hara T: Clinical features of pediatric acquired demyelinating syndromes in Japan. The 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. May 11-14, 2017, Fukuoka, Japan

〔図書〕(計 2 件)

1. 酒井康成、野村芳子：小児後天性中枢神経脱髄症候群の診断基準(案)厚生労働省「エビデンスに基づいた神経免疫疾患の早期診断基準・重症度分類・治療アルゴリズムの確立」研究班 平成 28 年度総括・分担研究報告書
2. 酒井康成、野村芳子：小児後天性脱髄症候群の臨床像に関する研究 厚生労働省「エビデンスに基づいた神経免疫疾患の早期診断基準・重症度分類・治療アルゴリズムの確立」研究班 平成 26-28 年度 総括・分担研究報告書

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002524/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 康成 (SAKAI, Yasunari)
九州大学医学研究院・成長発達医学分野・准教授

研究者番号：10380396

(2) 研究分担者

中別府雄作 (NAKABEPPU, Yusaku)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：30180350