

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07121

研究課題名(和文) 低分子量G蛋白質を標的とした新規自閉症治療薬の探索

研究課題名(英文) Search for novel therapeutic agents for autism targeting a low-molecular-weight G protein

研究代表者

安田 新 (YASUDA, Shin)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：20392368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：結節性硬化症(tuberous sclerosis complex:TSC)は、原因遺伝子TSC1、TSC2の産生タンパクであるHamartin、Tuberinの複合体の機能不全により、てんかんや精神発達遅滞、自閉症などの行動異常を生じる遺伝性疾患である。研究代表者はTsc2ヘテロマウスに観察される海馬ニューロンの樹状突起スパイン形態異常および恐怖記憶障害がTsc2の標的分子として知られている低分子量Gタンパク質Rhebの機能を抑制することにより正常化することを見出した。結節性硬化症患者にみられる知的及び社会行動異常に対して、低分子量G蛋白質が新しい治療標的となり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結節性硬化症はmTORを介してスパイン形成不全が生じると考えられてきたが、ラパマイシンはそれを改善しない。一方、低分子量G蛋白質Rhebを不活性化させるとスパイン形成不全が顕著に改善することから、結節性硬化症にみられるスパイン形成不全にはRheb活性上昇が関与している。Tsc1/2-Rhebシグナルの異常は脆弱X症候群に併発する自閉スペクトラム症の発症とも関係すると報告されている。すなわちTsc1/2-Rhebシグナルの異常は自閉スペクトラム症において共通に存在する可能性がある。以上より、低分子量G蛋白質Rhebの活性を制御する新たな自閉スペクトラム症の治療法の解明につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Tuberous sclerosis complex (TSC) is a genetic disorder that causes behavioural abnormalities such as epilepsy, intellectual disability, and autism. TSC is due to dysfunction of the complex of the causative genes TSC1 and TSC2, which produce the Hamartin and Tuberin proteins. Tsc2 heterozygosity induced both dendritic spine abnormalities in hippocampal neurons and aberrant fear memories in mice. The morphological and behavioural dysfunctions were normalized by the attenuation of the small G protein Rheb, which is a downstream target of Tsc2. The results suggested that a low-molecular-weight G protein could be a new therapeutic target for the intellectual and social behavioural abnormalities observed in TSC patients.

研究分野：神経化学

キーワード：結節性硬化症 自閉スペクトラム症 低分子量Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症や知的能力症などの発達障害患者において、スパイン(後シナプス樹状突起棘)の形や密度の異常がみられる (Brain Res Rev. 39:29-54, 2002、図1)。自閉スペクトラム症の発症に関連する遺伝子産物(蛋白質)として、neuroligin-3/4 や neurexin-1 (神経接着分子とそのリガンド、シナプス形成に関与、Nat Genet 34:27-9, 2003; Am J Hum Genet. 82:199-207, 2008) shank3 (グルタミン酸受容体のスパインへの局在を制御、Nat Genet. 39:25-7, 2007) FMRP (RNA 結合蛋白質、Trends Neurosci. 27:370-7, 2004) Ube3A (ユビキチン化に関与し、蛋白分解系を制御、Mol Psychiat. 4:64-7, 1999) などのスパイン形成に関わる蛋白質が報告されており、これらの遺伝子の変異によってスパイン形態異常が生じる (Proc Natl Acad Sci U S A. 94:5401-4, 1997; Hum Mol Genet. 13:1471-7, 2004; Nat Genet. 39:25-7, 2007; Hum Mol Genet. 17:111-8, 2008)。これらの事実は、スパイン形成に関与する蛋白質の異常が自閉症や精神遅滞などの発症要因となり得ることを示している。研究代表者は、脳の発達とともに発現が増加し、神経活動依存的に発現制御される遺伝子産物の解析を行ってきた。その一つであるプロトカドヘリン arcadlin/PCDH8 が、てんかん発作の後、シナプス構築に必須な N-cadherin の細胞内移行を促進することによって樹状突起のスパインを減らすことを明らかにした (Neuron, 2007; Neuroscientist, 2009; UCSD-Nature Molecule Pages, 2009; Cell Adh & Mig, 2011)。樹状突起スパインは、興奮性のポストシナプスを形成し、学習・記憶を担う構造体と考えられることから、arcadlin の誘導がてんかん発作による知能低下を引き起こすと考えられる。

結節性硬化症は、てんかん、精神遅滞、血管線維腫を三主徴とする常染色体優性の母斑症で、自閉スペクトラム症の合併も多い。研究代表者は、低分子量 G 蛋白質 Rheb 活性の異常が結節性硬化症における樹状突起スパインの形成不全に関わることを明らかにした (図2)。結節性硬化症の原因遺伝子は Tsc1 あるいは Tsc2 であり、TSC1 と TSC2 の複合体が Rheb の機能を抑制している (Nat Cell Biol. 5:578-81, 2003)。結節性硬化症では TSC の変異によって Rheb が活性化されるため、その下流の mTOR (ラパマイシンの標的分子) が活性化され、発症すると考えられてきた。しかし、mTOR 阻害薬のラパマイシンが結節性硬化症のスパイン形成不全に全く無効であり、Rheb 活性を低下させたところ改善がみられた (図2、Yasuda et al., Sci Rep, 4, 5155, 2014)。また、Rheb と結合する PDZ 蛋白 syntenin の神経細胞における増加がスパイン形成異常を引き起こすことを見出した (図2、Sugiura, Yasuda, Katsurabayashi et al. Nat Commun, 6, 6842, 2015)。そこで、自閉スペクトラム症モデルとして、Tsc2 ヘテロマウスを用い、Rheb 阻害薬の効果、in vivo 条件下における樹状突起スパイン観察、文脈依存的恐怖弁別学習 (contextual fear discrimination) などの行動実験、神経活動依存的にニューロンに発現する蛋白質 Arc の発現を指標として明らかにし、自閉スペクトラム症の新しい創薬ターゲットとしての可能性を探っていく。

2. 研究の目的

結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex, TSC) は自閉スペクトラム症やを高率に併存する。研究代表者は、Tsc2 ヘテロマウスを用いて、変異による樹状突起スパイン形成異常が mTOR ではなく、上流に存在する低分子量 G 蛋白質 Rheb の活性上昇により起こることを見出した (Yasuda et al, Sci Rep, 4 5155, 2014)。本研究課題においては、Tsc2 ヘテロマウスに Rheb 阻害薬を投与することにより、行動異常、スパイン

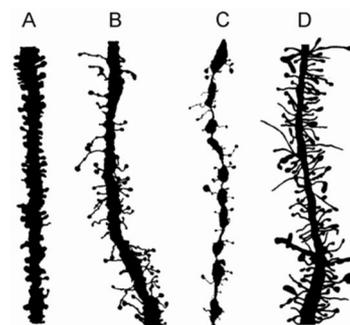


図1 発達障害患者にみられるスパイン形態変化  
A: 正常発達  
B: 精神遅滞患者  
C: 精神遅滞患者 (重度)  
D: 脆弱 X 症候群患者  
(Brain Res Rev, 2002)

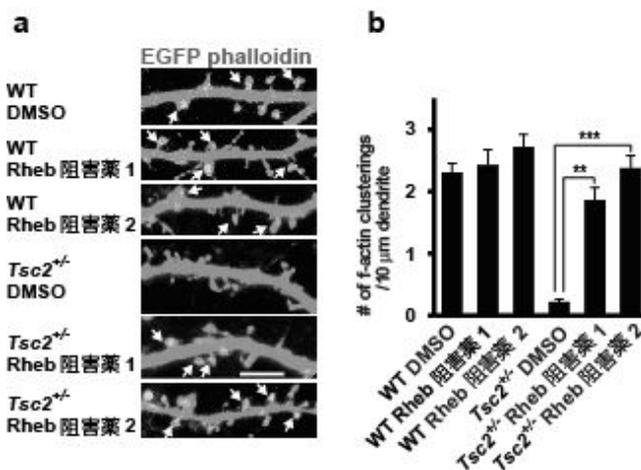


図2. Tsc2<sup>+/-</sup>海馬初代培養ニューロンに対する Rheb 阻害薬の効果。矢印: 樹状突起スパイン。スパイン頭部にアクチン重合がみられる。

においては、Tsc2 ヘテロマウスに Rheb 阻害薬を投与することにより、行動異常、スパイン

の形態異常に対する効果を明らかにする。Tsc1/2-Rheb シグナルの異常は、結節性硬化症のみならず、脆弱 X 症候群などの他の自閉スペクトラム症を合併する疾患にも存在するので、Rheb の活性制御による新たな自閉スペクトラム症の治療法の解明に繋げていく。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Tsc2* ヘテロマウスの樹状突起スパイン形成不全に対する Rheb 阻害薬の効果

既に Rheb 阻害薬を用いて、*Tsc2* ヘテロラット (Eker ラット) 初代培養ニューロンのスパイン形成異常が回復することを確認している (図 3)。そこで、*in vivo* 条件下における Rheb 阻害薬の効果を検討する。すなわち、*Tsc2* ヘテロマウスの脳室内に Rheb 阻害薬を浸透圧ミニポンプにより微量注入し、スパイン形成が促進されるかを検討する。スパインを観察する方法として、Dil をコートした 1.6  $\mu\text{m}$  の金粒子を遺伝子銃で脳切片へ撃ち込む (diolistic 法) ことにより、海馬の神経細胞を可視化する。標識された神経細胞の樹状突起を共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像し、三次元構築後、Metamorph を用いてスパイン計測を行う。樹状突起スパインの巾・長さ・密度などをコントロール群と Rheb 阻害薬投与群との間で比較する (図 3A, B)。

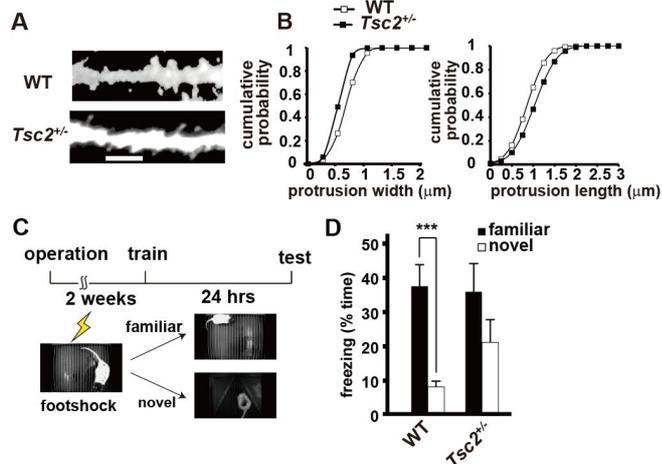


図 3 *Tsc2*<sup>+/-</sup>ラットにおける *in vivo* スパイン形態異常と文脈依存的恐怖弁別学習の異常

#### (2) *Tsc2* ヘテロマウスの行動異常に対する Rheb 阻害薬の効果

*Tsc2* ヘテロラットは、文脈依存的恐怖弁別学習に異常を示すことを明らかにしている。すなわち、野生型ラットは、フットショックの 24 時間後に同じケージに入れると恐怖 (フリーズ) を示すが、違うケージでは示さない。しかし、*Tsc2* ヘテロラットはどちらでも恐怖を示さない (図 3C, D)。(1)で効果のみられた Rheb 阻害薬を用いて *Tsc2* ヘテロマウスの文脈依存的恐怖弁別学習の異常に対する効果の有無を検討する。

#### (3) *Tsc2* ヘテロマウスの Arc 発現異常に対する Rheb 阻害薬の効果

Arc (activity-regulated cytoskeletal protein) は、神経活動依存的に神経細胞に発現する遺伝子として知られており (Neuron 14(2):433-45, 1995)、その遺伝子産物はグルタミン酸受容体のシナプス膜への発現を調節する (Neuron 52(3):445-59, 2006)。Arc は LTP (long-term potentiation、シナプス長期増強) や LTD (long-term depression、シナプス長期抑圧) また、空間学習課題や恐怖条件付けなどの刺激により興奮性ニューロンに誘導される (Neuron 52(3):437-44, 2006; J Neurosci 28(47): 12383-12395, 2008)。海馬初代培養ニューロンを Arc 抗体を用いて免疫染色し、樹状突起における Arc の染色輝度を比較したが、野生型、および、*Tsc2* ヘテロマウスにおいて有意な差は見出せなかった。そこで、野生型および *Tsc2* ヘテロマウスそれぞれの海馬初代培養ニューロンに対して、mGlu アゴニスト (DHPG) を投与した群、投与しなかった群に分け、Arc 染色輝度を比較する。また、Rheb 阻害薬を前処置して同様の実験を行い、野生型、*Tsc2* ヘテロマウスそれぞれの培養ニューロンに対する効果について検討する。野生型および *Tsc2* ヘテロマウスの脳組織を Arc 抗体により染色し、海馬領域における Arc 陽性細胞の単位面積当たりの細胞数を比較する。

#### (4) *Tsc2* ヘテロ、*Tsc2Rheb* ダブルヘテロマウスにおけるスパイン形態および行動の比較

*Tsc2* ヘテロマウスを用いて、樹状突起スパイン形態異常および文脈依存的恐怖弁別学習異常に対して、Rheb 阻害薬が効果を示すことを証明した。そこで、より詳細な効果発現機序を解明するために、野生型、*Tsc2* ヘテロおよび *Tsc2, Rheb* ダブルヘテロマウスを用いてスパインの形態、および文脈依存的恐怖弁別学習の結果を比較する。

### 4. 研究成果

#### (1) *Tsc2* ヘテロマウスの樹状突起スパイン形成不全に対する Rheb 阻害薬の効果

樹状突起スパインの巾・長さ・密度などをコントロール群と Rheb 阻害薬投与群との間で比較したところ、*Tsc2* ヘテロマウスでは、培養ニューロン同様に野生型マウスのスパインと比較して、幅が有意に減少した。Rheb 阻害薬投与により、スパイン幅の現象を回復させた。*Tsc2* ヘテロマウスの樹状突起スパイン形態異常に対して効果のみられた Rheb 阻害薬を用いて *Tsc2* ヘテロマウスの文脈依存的恐怖弁別学習の異常に対する効果の有無を検討したところ、野生型マウスと同様の行動パターンを示した。

#### (2) *Tsc2* ヘテロマウスの Arc 発現異常に対する Rheb 阻害薬の効果

初代培養ニューロンを Arc 抗体で蛍光染色したところ、野生型においては、無刺激と比較し

て、DHPG 投与群において Arc の輝度が有意に増加した。Tsc2 ヘテロにおいては、輝度の差はみられなかった。また、Rheb 阻害薬を前処置した Tsc2 ヘテロでは、野生型と同様に DHPG 投与群の Arc 輝度が有意に上昇した。更に、野生型と比べて Tsc2 ヘテロマウスの海馬領域において、Arc 陽性細胞の単位面積当たりの細胞数に変化が見られた。恐怖文脈条件付けには海馬機能が必須とされていることから、Tsc2 の変異が海馬の神経活動に異常をきたし、社会行動異常が生じること、これらの異常は Rheb 依存的事であることが考えられた。

(3) **Tsc2 ヘテロ、Tsc2Rheb ダブルヘテロマウスにおけるスパイン形態および行動の比較**

Tsc2,Rheb ダブルヘテロマウスマウスのスパイン形態は Tsc2 ヘテロマウスと比べると、スパイン幅が大きく、樹状突起からの長さが短縮しており、野生型マウスのスパイン形態と類似していた。また、Tsc2 ヘテロマウスにおいて観察された文脈的恐怖分別学習の異常は、Tsc2Rheb ダブルヘテロマウスでは観察されず、野生型の行動パターンと類似していた。以上の結果から、Tsc2 ヘテロマウスにみられるスパイン形態異常、および文脈的恐怖分別学習の異常は Rheb の発現を抑制することにより正常に回復することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimada T , Yasuda S , Sugiura H , Yamagata K	4. 巻 20
2. 論文標題 Syntenin: PDZ Protein Regulating Signaling Pathways and Cellular Functions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 E4171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20174171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer, Cham	5. 総ページ数 11
3. 書名 Mek3. In: Choi S. (eds) Encyclopedia of Signaling Molecules.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap <a href="https://researchmap.jp/saba_shibaru/">https://researchmap.jp/saba_shibaru/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	島田 忠之  (SHIMADA Tadayuki)  (80379552)	公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員    (82609)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------