

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15724

研究課題名(和文) STXBP1関連てんかん性脳症の軸索輸送障害に着目した新たな病態機序の解明

研究課題名(英文) Impaired membrane trafficking in STXBP1 encephalopathy

研究代表者

戸澤 雄紀 (Tozawa, Takenori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30804950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：STXBP1脳症の病態解明のために、Munc18-1の二つのisoformの蛋白複合体解析を行なった。PC12細胞を用いたAffinity purificationとLC-MS解析の結果、候補相互作用因子として中枢神経に発現するモータータンパク質Myosin-Vaが上がった。マウス脳の内在性のMunc18-1 short isoformとMyosin-Vaのinteractionをreciprocal IPで共沈降を確認し、初代培養海馬神経細胞でも両タンパク質の共局在を確認した。今後STXBP1脳症で予想される細胞内輸送障害にMyosin-Vaがどの様に関わるかをiN細胞を用いて検証していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STXBP1脳症は比較的頻度の多い発達性てんかん性脳症であるが、今回明らかになった新規相互作用因子Myosin-Vaに関連した細胞内輸送障害の病態を明らかにできれば、従来の抗てんかん薬のような対症療法のみならず、より病態に基づいた治療薬の開発につながると思われる。またSTXBP1脳症で起こると予想される細胞内輸送障害は、シナプス結合の異常や細胞死も引き起こす可能性があり、本疾患の病態解明はその他の発達性てんかん性脳症のみならず成人領域の神経変性疾患の分子病態の理解を深めることにもつながると思われる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathology of STXBP1 encephalopathy, we tried to identify novel protein complex partners of Munc18-1 expressed in brain. By way of affinity purification coupled to mass spectrometry using PC12 cells, Myosin-Va which has a role of trafficking proteins required synapse formation in brain was identified as a candidate novel complex partner of Munc18-1. We confirmed co-immunoprecipitation of Munc18-1 short isoforms, not Munc18-1 long isoforms, with Myosin-Va and colocalization of two proteins in primary culture of mouse hippocampal neurons. Now, we are going to validate how Myosin-Va correlate with impairment of membrane trafficking in STXBP1 encephalopathy using the patient derived iPS neurons.

研究分野：小児神経学

キーワード：STXBP1 encephalopathy 発達性てんかん性脳症 Munc18-1 Myosin-Va 軸索輸送障害 神経変性 細胞死

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

STXBP1 脳症は、乳児期早期に発症する難治性のでんかんに加え、重度の精神運動発達遅滞を呈する発達性てんかん性脳症の一つであり、2008年に Saitou らがその原因遺伝子 STXBP1 を同定した¹⁾。彼らは、その遺伝子産物 Munc18-1 がシナプスの開口放出に関わるタンパク質であることから、STXBP1 脳症の難治性てんかんの病態機序としてシナプスの開口放出障害の可能性を報告した¹⁾。しかしてんかんを合併しなくとも重度の精神運動発達遅滞を呈する症例の報告²⁾や、乳児期を過ぎるとジストニアなどの不随意運動やパーキンソン様症状を呈する患者の報告³⁾もあり、シナプス伝達の異常のみでは病態の理解が困難である。さらに治療においても、症状の一つであるてんかんに対する抗てんかん薬のみでは、発達遅滞の改善を期待できない現状がある。

2016年に Chai らは、Munc18-1 は syntaxin1A のみならず α synuclein のシャペロン分子としての働きがあり、PC12 細胞において Munc18-1 の変異タンパク質は、 α synuclein の凝集を引き起こし、神経変性や神経毒性をきたすと報告した⁴⁾。STXBP1 脳症患者のジストニアやパーキンソン様症状などのでんかん以外の神経症状からも、STXBP1 変異はてんかんのみならず、その遺伝子産物のハプロ不全や機能異常により細胞死や神経変性が引き起こされ、重度知的障害や運動障害を引き起こすと推測される。そこで我々は、STXBP1 遺伝子産物である Munc18-1 がシナプス形成に必要なタンパク質の軸索輸送に関わり、その機能異常からミトコンドリア機能障害や細胞死を引き起こすと仮説を立てた。STXBP1 変異が引き起こす脳の機能異常のメカニズムを解明することは、抗てんかん薬などの対症療法以外の疾患特異的治療につながると思われる。その病態の解明のためには、その遺伝子産物であるタンパク質の脳における機能を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、STXBP1 遺伝子産物である Munc18-1 の中枢神経における新たな機能を見つけるために、脳に発現する Munc18-1 のタンパク複合体解析を行い、未だ解明されていない STXBP1 脳症の病態機序の解明を行うことである。STXBP1 変異による軸索輸送障害で異常なタンパク質の凝集が起り、ミトコンドリア機能障害や細胞死を引き起こすと仮説を立て、マウス初代培養神経細胞や患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞を用いてその病態解明を行い、抗てんかん薬以外の病態に基づいた新たな分子標的治療の開発につなげる。

3. 研究の方法

(1) BioID 法 (ビオチン標識法) や Affinity purification 法を LC-MS 解析を組み合わせ、軸索輸送に関わる新規相互作用因子候補タンパク質の検索を行う。

(2) マウス初代培養海馬神経細胞を用い、新規相互作用因子と Munc18-1 との共局在の確認を行う。また Munc18-1 発現抑制による神経細胞の形態の異常や、軸索輸送障害の評価を行う。

(3) 患者由来 iPS 細胞から分化誘導したグルタミン作動性神経細胞を用い、STXBP1 脳症の患者のヒトの細胞での病態解析基盤となるモデルを作成する。

4. 研究成果

(1) Munc18-1 の新規相互作用因子の検索

Munc18-1 は、C 末端の配列の異なる二つのアイソフォーム (Munc18-1 long isoform と short isoform) を持ち、short isoform は、他の臓器でも発現しているが、両方とも脳に豊富に発現していた。(図 1)

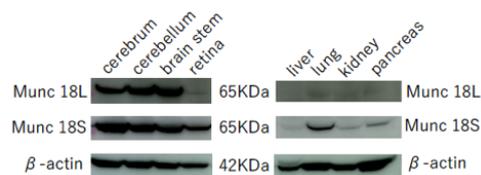


図 1 Munc18-1 isoforms の臓器別発現 (ICR マウス 8 週齢)

そこで、long isoformと short isoformのそれぞれを発現するコンストラクトを作成し、PC12細胞を宿主細胞としたビオチン標識法 (BioID 法) や affinity purification 法 (AP 法) で蛋白複合体を回収し LC-MS 解析を用いて新規相互作用因子解析を行なった。(図 2)

BioID 法では、アビジンビーズで回収したビオチン化蛋白質をウェスタンブロットで確認できたが、Munc18-1 のビオチン化が不十分であり、LC-MS 解析でも既知の相互作用因子 syntaxin1A がヒットせず、相互作用因子の同定は困難と判断した。

次に、Munc18-1 の C 末端に HA タグを付加したコンストラクトを作成し、PC12 細胞に恒常性発現させ、抗 HA 抗体ビーズでタンパク質複合体を回収し LC-MS 解析で新規相互作用因子の候補を検索した。その結果、Munc18-1 の新規候補相互作用因子として中枢神経に発現するモータータンパク質 Myosin-Va が候補に上がり、細胞 Lysate を用いたウェスタンブロットでも確認できた。(図 3 右) さらに、候補として挙げた新規相互作用因子 Myosin-Va がマウス脳の内在性 Munc18-1 と複合体を形成しているかを確認するために、Munc18-1 long と short isoform のそれぞれに特異的な抗体を用いて免疫沈降実験を行なった。その結果、Munc18-1 short isoform は、新規相互作用因子 Myosin-Va と親和性が高く、syntaxin1A と共に共沈降を認めた。しかし long isoform は、syntaxin1A と共沈降をしたが、Myosin-Va とは共沈降しなかった。(図 4 a, 図 4 b)

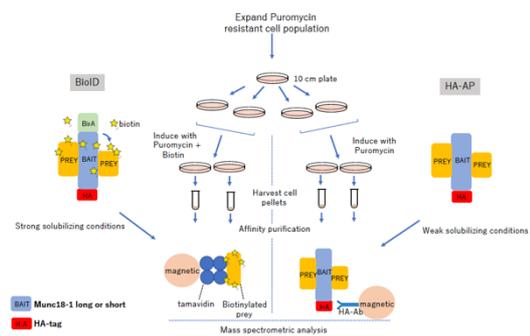


図 2 BioID法とAP法を用いた相互作用因子解析

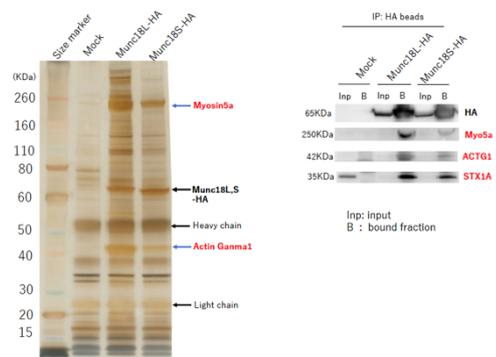


図 3 抗HA抗体ビーズによるAffinity purification
左: 銀染色 右: ウェスタンブロット

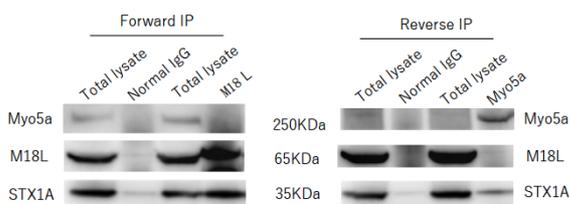


図 4 a Munc18L抗体による免疫沈降実験

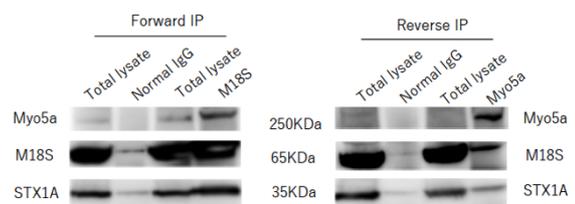


図 4 b Munc18S抗体による免疫沈降実験

(2) 海馬神経細胞における新規相互作用因子Myosin-VaとMunc18-1の局在の確認

次に、ICR系妊娠マウス E18の胎児脳を取り出し、海馬をパパインで消化後に培地に播種しDIV7で免疫染色を行い、Munc18-1とMyosin-Va、syntaxin1Aの局在を観察した。(図 5) 新規相互作用因子Myosin-Vaは、syntaxin1Aと同様に海馬神経細胞の主に細胞体周囲や軸索初節でMunc18-1と共局在を認めていた。現在、shRNAでMunc18-1を発現抑制させた神経細胞の形態の変化や、軸索輸送障害についての検討を行っている。

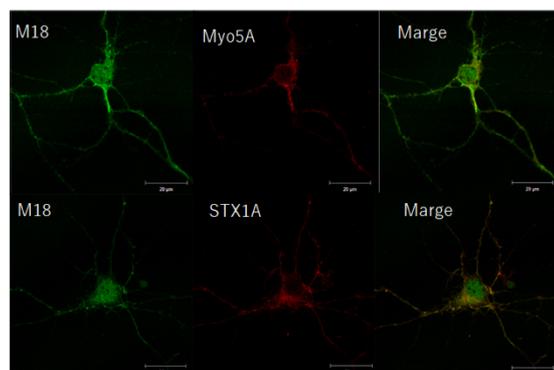


図 5 Primary hippocampal neuron DIV7

(3) 患者由来 iPS 細胞から分化誘導したグルタミン作動性神経細胞を用いた病態解析基盤の構築

健康父由来の iPS 細胞と STXBP1 ナンセンス変異を有する患児由来の iPS 細胞に加えて、患者由来 iPS 細胞を CRISPR/Cas9 で変異修復し、アイソジェニックコントロールを作成した。そして、各 iPS 細胞を選択的にグルタミン酸ニューロンに分化させるため、PiggyBac transposon system を用いて、Lipofection で各遺伝子を導入した。さらに、導入した遺伝子を Doxycycline により Tet-On することで、各神経へ選択的に分化させた。また、神経分化良好なクローンを選出するため、シングルセルクローニングを行なった。(図 6)

選択的に神経分化させた iPS ニューロンがハプロ不全のモデルとして適切か、STXBP1 の発現を mRNA で評価し(図 7)、また選択的神経分化を VGlut2 の発現で評価した。今後この iPS ニューロン細胞を用いて、STXBP1 脳症で予想される細胞内輸送障害に新規相互作用因子 Myosin-Va がどの様に関わるかを検証していく。

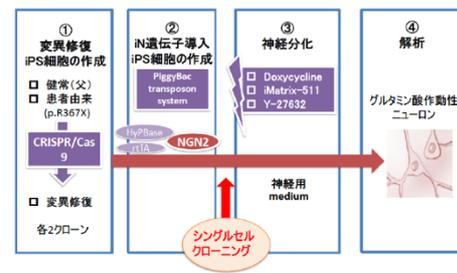
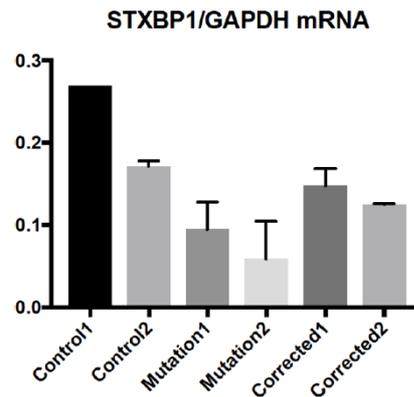


図 6 iPS ニューロンの作成方法

図 7



今回の研究で、Munc18-1 の脳に発現している 2 つの isoform のうち、short isoform が syntaxin1A と共に中枢神経で細胞内輸送や樹状突起の形成に関わる Myosin-Va と複合体を形成し、マウス神経細胞において共局在していることが明らかとなった。STXBP1 脳症における Munc18-1 のハプロ不全が引き起こす病態としては、シナプスの伝達障害以外にシナプスの形成や伝達に必要なタンパク質の膜への細胞内輸送障害を示唆する報告もあり、Myosin-Va がその病態に関与する可能性が高いと考えられる。現在 shRNA を用い Munc18-1 を発現抑制したマウス初代培養海馬神経細胞や患者由来 iPS 細胞を分化誘導したグルタミン作動性神経細胞を用い、Myosin-Va に関連した細胞内輸送障害に着目し病態解析を行なっている。本研究で、STXBP1 脳症の病態解析基盤の構築ができれば、疾患特異的な治療法のスクリーニングや開発につながると思われる。

(引用文献)

1. Saitsu H et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. Nat Genet 2008;40:782-788.
2. Hamdan F F et al. Intellectual disability without epilepsy associated with STXBP1 disruption. Eur J Hum Genet 2011;19(5):697-609.
3. Keogh M J et al. A novel de novo STXBP1 mutation is associated with mitochondrial complex I deficiency and late-onset juvenile-onset parkinsonism. Neurogenetics 2015;16(1):65-67.
4. Chai Y J et al. Munc18-1 is a molecular chaperone for alpha-synuclein, controlling its self-replicating aggregation. J Cell Biol 2016;214:705-718.

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 0件）

1. 著者名 Takada Rei, Tozawa Takenori, Kondo Hidehito, Kizaki Zenro, Kishita Yoshihito, Okazaki Yasushi, Murayama Kei, Ohtake Akira, Chiyonobu Tomohiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Early infantile-onset Leigh syndrome complicated with infantile spasms associated with the m.9185T>C variant in the MT-ATP6 gene: Expanding the clinical spectrum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 69 ~ 72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takada R, Tozawa T, Kondo H, Kizaki Z, Kishita Y, Okazaki Y, Murayama K, Ohtake A, Chiyonobu T.
2. 発表標題 A case of early infantile-onset Leigh syndrome with a m.9185T>C in the MT-ATP6 gene mutation complicated with infantile spasms.
3. 学会等名 The 20th Annual meeting of infantile seizure society (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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