

助成番号 27-2-10

アンジェルマン症候群におけるセロトニン作動性神経回路異常の解明

島根大学医学部 解剖学（神経科学）講座

大谷 嘉典

1. 緒言

アンジェルマン症候群（AS）は、15番染色体長腕領域（15q11-13領域）にコードされるユビキチンタンパク質分解系酵素の一つであるユビキチンタンパク質リガーゼ E3A（Ube3A）遺伝子の欠失などの機能異常によって発症し、容易に惹起される笑い発作、てんかん、記憶障害や重度の発達障害などを特徴とする難病である。また、このヒト染色体15q11-13領域の異常は最も頻繁にみられる染色体異常であり、ASだけではなく発達障害や自閉スペクトラム症（ASD）などを引き起こすリスクファクターとして知られているが、その詳細な病態や発症機序の解明は遅れている。

一方で、軸索起始部には様々なイオンチャネルが局在しており、その構造（長さや位置）を変化させることでイオンチャネルの種類や発現量を可塑的に変化させ、ニューロンの興奮性調節に関わることが明らかとなっている¹⁾。この軸索起始部についての研究から、疾病研究に直結することがわかっており、軸索起始部に特異的に発現するアンカータンパク質、Ankyrin-Gの責任遺伝子ANK-3の遺伝子変異により、ASDを発症すること²⁾や、ASモデルマウス海馬錐体細胞にも軸索起始部の異常が観察される³⁾ためである。

これまでに、Ube3A遺伝子を含む15q11-13領域重複ASDモデルマウスで、背側縫線核内セロトニン作動性神経細胞の活動性低下が明らかにされてきた^{4,5)}。同様に、ASモデルマウスにても、脳内セロトニン濃度に変化が報告されている⁶⁾。そこでまず、申請者らは、ASモデルマウスでもセロトニンの脳内の濃度異常が認められ、ASD様症状も引き起こすことから、ASの症状に関連する大脳皮質の錐体細胞の形態に着目し、軸索起始部の変化を解析した。

2. 研究方法

2-1. 実験動物

実験動物は島根大学総合科学研究支援センター動物実験指針に従い、動物実験専門部会の承認のもと実施した（IZ2-101）。実施には8週齢の雄のUBE3A KOマウスおよびリッターメイトの野生型マウスを用いた。動物は島根大学研究機構総合科学研究支援センター動

物実験部門にて飼育し、飼育条件は室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数は平均 10～13 回/時間、照明は 12 時間ごとの明暗切り替え条件（明期：7:00～19:00、暗期：19:00～7:00）に設定した。ポリカーボネートケージに木材チップを床敷として用い、飼料は市販の固形飼料（MF、オリエンタル酵母製）を使用し、飲料水は滅菌した水道水を自由に摂取させた。

2-2. 脳の回収

軸索起始部の確認では、生後 8 週間後のアンジェルマン症候群モデルマウスおよび野生型の C57BL/6J マウスを、3 種混合麻酔下（メドトミジン 0.3 mg/kg + ミダゾラム 4 mg/kg + ブトルファノール 5 mg/kg ）において仰臥位で固定した後に開胸した。その後、右心耳を切開し、26G の針を心尖部より左心室内に刺入後、最終濃度が 0.1% になるようにヘパリン（持田製薬）を加えた生理食塩水を体重と同量注入し、脱血による安楽死を行った。引き続き体重の 2 倍量の 4% パラホルムアルデヒド/リン酸還衡生理食塩水（PBS）を用いて経心灌流固定を行い、その後、脳を回収して 30% スクロース/PBS で置換し、ホワイトティッシュコート（ユーアイ化成）に包埋した。

2-3. 免疫染色

回収した脳サンプルを $50 \mu\text{m}$ の厚さで冠状断切片を作製し、0.4% TritonX-100、3% 正常ロバ血清/PBS にて室温で 60 分間ブロッキング処理を行った。その後抗 Ankyrin G 抗体と一晚反応させた。次に、PBS にて 5 分間 3 回洗浄後に NeuroTrace500/525（Thermo Fisher Scientific）と二次抗体を室温で 180 分間反応させ、軸索起始部と神経細胞の染色を行った。PBS にて 5 分間 3 回洗浄後に VectaShield（VECTOR）とマニキュアを用いてカバーガラスで封入した。観察は、オールインワン顕微鏡 BZ-X710（Keyence）または共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000D（オリンパス）にて行った。

3.研究結果

本研究では、まず、ASの症状に関連する大脳皮質の錐体細胞に焦点をあて、軸索起始部の長さを測定したところ、ある特定の大脳皮質の錐体細胞の軸索起始部に異常が認められた。これはすでに報告されているASモデルマウスの皮質の軸索起始部の結果とは異なることが明らかとなり、海馬の錐体細胞と同様に異常が認められる結果となった(図1)。

未発表データのため論文発表後に公開します

4.考察

近年、軸索起始部は可塑性の場として、その構造(長さや位置)を変化させることで、神経細胞の興奮性調節に関わることが明らかとなっている¹⁾。一般的に、軸索起始部の長さと神経興奮は関連するとされ、軸索起始部の長さが短くなる疾患として脱髄疾患や脳卒中などが知られており^{7,8)}、逆に重篤な発達障害を引き起こすUBE3Aを欠損するASのマウスモデルでは、海馬の錐体細胞の軸索起始部の長さが伸長することが報告されている³⁾。他にも、15q11-13領域重複マウスでは社会性の低下など自閉スペクトラム症様の症状も報告され、さらに興奮性シナプスと抑制系シナプスのバランスが崩れていることも報告されている^{9,10)}。

今回、ある特定の皮質のニューロンの軸索起始部に異常が認められたことから、報告されているASモデルマウスの皮質の軸索起始部の結果とは異なることが明らかとなった。これは、海馬の錐体細胞と同様にある特定のニューロンの軸索起始部で異常が認められることを示唆しており、異常な神経回路を特定する上で非常に重要な知見を得ることができたと思われる。

5.結語

これまでにASモデルマウスでは、海馬錐体ニューロンの興奮性が増加することやシナプス可塑性の消失および認識障害など多数の異常が報告されている^{3,11,12)}。しかし、これまでのASモデルマウスを用いた研究では、関連する海馬のニューロンの異常は報告されているが、病態に関連する神経回路の研究は十分に検証されていない。本研究では申請者が明らかにしたようにニューロンの軸索起始部に異常認められることから、そこから投射

されるニューロンとの神経回路の解析によって神経回路異常を明らかにすることで、ASの根本的な発症機序を解析でき、治療法への一步を見いだせる。

6.文献

- 1) Huang CYM, Rasband MN. Axon initial segments: structure, function, and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2018; 1420(1): 46-61.
- 2) Bi, Cheng, Jinyu Wu, Tao Jiang, Qi Liu, Wanshi Cai, Ping Yu, Tao Cai, et al. Mutations Ofank3identified by Exome Sequencing Are Associated with Autism Susceptibility. *Human Mutation* 2012; 33(12): 1635-38.
- 3) Kaphzan H, Buffington SA, Jung JI, Rasband MN, Klann E. Alterations in intrinsic membrane properties and the axon initial segment in a mouse model of Angelman syndrome. *J Neurosci.* 2011; 31(48): 17637-17648.
- 4) Tamada K, S. Tomonaga, F. Hatanaka, N. Nakai, K. Takao, T. Miyakawa, et al. Decreased Exploratory Activity in a Mouse Model of 15q Duplication Syndrome; Implications for Disturbance of Serotonin Signaling. *PLoS ONE* 2010; 5 (12): e15126.
- 5) Nakai N, M. Nagano, F. Saitow, Y. Watanabe, Y. Kawamura, A. Kawamoto, et al. Serotonin Rebalances Cortical Tuning and Behavior Linked to Autism Symptoms in 15q11-13 Cnv Mice. *Science Advances.* 2017; 3 (6): e1603001.
- 6) Farook. M. F, M. Decuyper, K. Hyland, T. Takumi, et al. Altered Serotonin, Dopamine and Norepinephrine Levels in 15q Duplication and Angelman Syndrome Mouse Models. *PLoS ONE.* 2012; 7 (8): e430307.
- 7) Harty RC, Kim TH, Thomas EA, et al. Axon initial segment structural plasticity in animal models of genetic and acquired epilepsy. *Epilepsy Res.* 2013; 105(3): 272-279.
- 8) Hamada, M. S., and M. H. P. Kole. Myelin Loss and Axonal Ion Channel Adaptations Associated with Gray Matter Neuronal Hyperexcitability. *Journal of Neuroscience* 2015; 35(18):7272-7286.
- 9) Nakatani J, Tamada K, Hatanaka F, et al. Abnormal Behavior in a Chromosome- Engineered Mouse Model for Human 15q11-13 Duplication Seen in Autism. *Cell.* 2009; 137(7): 1235-1246.
- 10) Saitow F, Takumi T, Suzuki H. Change in serotonergic modulation contributes to the synaptic imbalance of neuronal circuit at the prefrontal cortex in the 15q11-13 duplication mouse model of autism. *Neuropharmacology.* 2020; 165: 107931.
- 11) Jiang Y hui, Armstrong D, Albrecht U, et al. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron.* 1998; 21(4): 799-811.

12) Van Woerden GM, Harris KD, Hojjati MR, et al. Rescue of neurological deficits in a mouse model for Angelman syndrome by reduction of α CaMKII inhibitory phosphorylation. *Nat Neurosci.* 2007; 10(3): 280-282.

7.成果発表

なし