

平成30年 5月31日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04254

研究課題名(和文) 運動記憶を形成する細胞内・核内シグナルの解明

研究課題名(英文) Elucidation of cellular and nuclear signals that regulate motor learning

研究代表者

平井 宏和 (Hirai, Hirokazu)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70291086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症1型(SCA1)モデルマウス小脳において発現低下している分子として、TRPC3、IP3受容体、Homer3が見つかって来た。その上流制御分子としてretinoid-related orphan receptor (ROR)を明らかにした。またSCA1マウスにバクロフェンを投与、続いて運動を行わせ、3時間後に小脳組織をマイクロアレイで解析したところ、エピゲノム修飾に関わる遺伝子Xが3倍以上増加していることがわかった。遺伝子Xのhaploinsufficiencyは精神発達遅滞を引き起こすことが知られている。遺伝子X発現上昇は小脳運動学習能に関連している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Decrease of several genes including transient receptor potential cation channel type 3 (TRPC3), inositol trisphosphate (IP3) receptor and Homer protein homolog 3 (HOMER3) were found in the cerebellum of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) knock-in mouse. We identified retinoid-related orphan receptor (ROR), which is a transcription factor that could regulate expression of those genes. Moreover, we found that a gene "X" is increased more than 3 times in SCA1 knock-in mice 3 h after treatment with baclofen and rotarod training. Since haploinsufficiency of the gene "X" is known to cause mental retardation, upregulation of the gene "X" may play a key role in baclofen-induced improvement of motor learning in SCA1 mice.

研究分野：神経生理学、神経科学

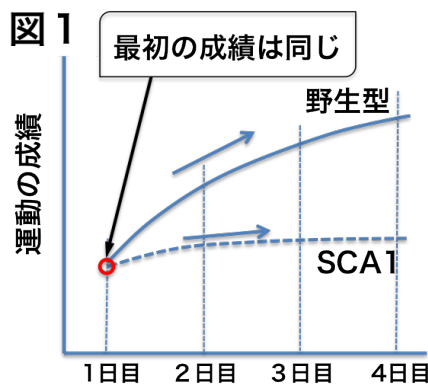
キーワード：小脳 プルキンエ細胞 mGluR1 運動学習 バクロフェン 脊髄小脳失調症

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は進行性の運動失調を示す難病で、根本的な治療法は見つかっていない。患者の3分の1は遺伝性(脊髄小脳失調症: Spinocerebellar ataxia, SCA)である。最初に遺伝子が同定された SCA type 1(SCA1)は、原因遺伝子 ATXN1 のエクソン領域内 CAG 反復の異常伸長が原因である。SCA1 患者の小脳ではプルキンエ細胞が最も障害を受ける。原因遺伝子を同定したミネソタ大学の Harry T. Orr らにより、プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーター制御下で異常伸長 CAG 反復をもつ ATXN1 を発現するモデルマウス(SCA1 マウス)が作出され(Burright et al. Cell 1995)、このマウスを解析することで SCA1 の病態解明が大きく進んだ。

(1) SCA1 マウスは運動記憶の形成に障害がある

2~3ヶ月齢の SCA1 マウスは、ケージ内では野生型とほとんど区別がつかない。回転棒(ロータロッド)に乗せる検査でも、検査初日は何度行っても野生型と成績に差は見られない(Clark et al. J. Neurosci. 1997)。しかし2日目以降、野生型は急速に回転棒の乗り方を学ぶのに対し、SCA1 マウスの習得スピードは有意に遅い(図1)。すなわち、運動記憶の形成障害がある。



SCA1 マウスは運動の習得速度が遅い。
すなわち**運動記憶の形成障害**。

(2) SCA1 マウスは代謝型グルタミン酸受容体シグナルが障害

我々は運動記憶の形成(運動学習)障害の原因を探るため、SCA1 マウスの小脳スライスパッチ解析を行った。その結果、AMPA 型グルタミン酸受容体を介するプルキンエ細胞への興奮性入力には顕著な差は見られなかったが、平行線維-プルキンエ細胞シナプスが頻回刺激されたときに活性化される代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1)を介する神経伝達及び可塑性発現に選択的な障害があることを明らかにした。

(3) SCA1 マウスの具体的な障害

mGluR1 は Gq タンパク質共役型受容体で、

ジアシルグリセロールとイノシトール3リン酸(IP3)が産生される。IP3 は小胞体膜上に存在する IP3 受容体に結合して、小胞体内の Ca^{2+} を細胞質内に放出する。SCA1 マウスでは、この小胞体からの Ca^{2+} 放出が顕著に減少し、その結果、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象(LTD)が誘導されないことを解明した。また mGluR1 下流の遅いシナプス伝達やエンドカンナビノイド産生を介する短期のシナプス伝達抑制も有意に障害されていた。

(4) SCA1 マウスの運動記憶障害を回復させる

SCA1 マウスの mGluR1 シグナル障害を回復させることができれば、運動記憶も回復する可能性がある。野生型マウスを用いた先行研究で、mGluR1 は $GABA_B$ 受容体と共役しており、 $GABA_B$ 受容体アゴニストであるバクロフェンを投与することで mGluR1 シグナルを増強できることが報告されている(Hirono et al., Nat. Neurosci. 2001, Tabata et al., PNAS 2004)。

我々は、SCA1 マウスの小脳でもバクロフェン投与で mGluR1 シグナルが増強するのかをスライスパッチで調べた。その結果、バクロフェンを灌流液から投与すると、野生型レベルには及ばないが、mGluR1 シグナルが有意に増強することが明らかになった。増強効果はバクロフェンを灌流液から除去すると見られなくなった。そこでバクロフェンを生体 SCA1 マウスの小脳に注入、あるいは経口投与し、小脳に十分到達すると考えられる3時間後にロータロッド検査を行った。しかし、リン酸緩衝液(PBS)を投与したコントロールの SCA1 マウスと成績に差は見られなかった。ところが、翌日に同様のロータロッド検査を行ったところ、前日にバクロフェンを投与した SCA1 マウスの成績が有意に優れていることがわかった。バクロフェン投与群の好成績は1週間後も観察され、2週間後にはコントロール群と差が無くなった。

(5) mGluR1 シグナル増強時に運動することが運動記憶形成に不可欠

運動記憶の形成促進には、 $GABA_B$ 受容体を活性化するだけでよいのか、あるいは $GABA_B$ 受容体を活性化(すなわち mGluR1 シグナル増強)時に運動を行う必要があるのかを調べた。運動後にバクロフェンを投与した SCA1 マウスは、コントロールの SCA1 マウスと翌日以降のロータロッドの成績に差は見られなかった。またバクロフェンを投与し、完全に体内から消失した48時間後にロータロッドを行った SCA1 マウスもロータロッド成績に差は見られなかった。以上の結果より、mGluR1 シグナル増強時に運動することが、翌日以降の優れた運動記憶を得るために不可欠であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

日常の動作は普通に行うことができるが、スポーツの習得が劣っている人がいる。難病、脊髄小脳変性症の患者の動作も発症初期には、何ら健常人と変わりはないが、運動タスクを与えると明らかに習得に障害が見られる。本課題では、通常の運動には障害がほとんど見られないが、運動記憶の形成が顕著に障害されている脊髄小脳変性症マウス(図1参照)を用いて、運動記憶が形成される細胞内・核内シグナルを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

SCA1 マウスの運動記憶(ロータロッド課題)障害は、GABA_B 受容体アゴニスト、バクロフェン投与後に運動を行うことで翌日から1週間改善する。このときに惹起される細胞内・核内のシグナルを、小脳組織を用いたマイクロアレイ、定量 PCR 解析で明らかにする。

運動記憶に重要な分子の同定

これまでの研究で生後5週以降の SCA1 マウスにおいて、mGluR1 シグナルが選択的に減弱していることを明らかにした。GABA_B 受容体活性化を介して mGluR1 シグナルが増強している間に運動を行うことで、何らかのシグナルがプルキンエ細胞の核に伝えられ、mGluR1 下流シグナル分子のタンパク合成が進んでいると推測される。海馬の恐怖条件付け記憶の固定や瞬目反射条件付け学習の獲得・固定には、タスクを行った後3~6時間の間の mRNA 合成とこれに続くタンパク合成が不可欠であることが、阻害薬を用いた実験で明らかになっている (Igaz et al. J. Neurosci. 2002, Inda et al. J. Neurosci. 2005)。

そこで SCA1 マウスにバクロフェンを投与、続いて運動(ロータロッド)を行わせる。その24時間後に小脳組織をマイクロアレイおよび定量 PCR を用いて解析し、mGluR1 下流シグナル分子の mRNA 発現が上昇しているのかを検証する。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイの解析結果

SCA1 マウスにバクロフェンを投与、続いて運動を行わせ、3時間後に小脳組織をマイクロアレイで解析した。その結果、エピゲノム修飾に関わる遺伝子 X が3倍以上増加していることがわかった。遺伝子 X の haploinsufficiency は精神発達遅滞を引き起こすことが知られている。遺伝子 X 発現上昇は小脳運動学習能に関連している可能性が考えられた。その他にも、リアノジン受容体3が約2倍に増加していた。

(2) 定量 RT-PCR による解析

定量 RT-PCR を用いて SCA1 ノックインマウスの小脳で発現が変化している分子の解析を行ったところ、TRPC3、IP3 受容体、Homer3

の発現量の減少が観察された。特に IP3 受容体の発現減少が顕著であった。その上流制御分子として retinoid-related orphan receptor (ROR) を明らかにした。さらに SCA1 ノックインマウスの障害が ROR の減少によるのか検証した。成熟後の野生型マウスの小脳プルキンエ細胞選択的に、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて ROR のノックダウンを行った。その結果、マウスは運動失調を示し、さらに TRPC3 や IP3 受容体の発現が減弱することが明らかになった。

(3) PKC の関与

バクロフェンで GABA_B 受容体を活性化すると mGluR1 シグナルが増強する。mGluR1 で活性化される重要な分子は PKC であるため、mGluR1 活性化による運動成績の向上に PKC を介したリン酸化が重要ではないかと考えた。プルキンエ細胞には PKC と PKC が発現しているが、プルキンエ細胞の PKC が運動学習に果たす役割は知られていない。そこで PKC が運動学習に関与しているのか、PKC ノックアウト(KO)マウスを用いて調べた。その結果、野生型マウスに比べて、KO マウスの運動学習能力が有意に劣っていた。さらに AAV ベクターで PKC をプルキンエ細胞特異的にレスキューすることで運動学習能力が回復した。以上より、mGluR1-PKC によるリン酸化が運動機能上昇に重要である可能性が示された。

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13件)

Hirokazu Hirai, Masanobu Kano, Type 1 metabotropic glutamate receptor and its signaling molecules as therapeutic targets for the treatment of cerebellar disorders, *Current Opinion in Pharmacology*, 査読有, 38巻, 2018, 51-58

DOI : 10.1016/j.coph.2018.02.002

Hirokazu Hirai, Protein Kinase C in the Cerebellum: Its Significance and Remaining Conundrums, *Cerebellum*, 査読有, 17巻, 2018, 23-27

DOI : 10.1007/s12311-017-0898-x

Yasunori Matsuzaki, Ayumu Konno, Ryuta Mochizuki, Yoichiro Shinohara, Keisuke Nitta, Yukihiro Okada, Hirokazu Hirai, Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain, *Neuroscience Letters*, 査読有, 665巻, 2018, 182-188

DOI : 10.1016/j.neulet.2017.11.049

Tsuyoshi Hattori, Minoru Kaji,

Hiroshi Ishii, Roboon Jureepon, Mika Takarada Iemata, Hieu Minh Ta, Thuong Manh Le, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Yoshitake Shiraishi, Noriyuki Ozaki, Yasuhiko Yamamoto, Hiroshi Okamoto, Shigeru Yokoyama, Haruhiro Higashida, Yasuko Kitao, Osamu Hori, CD38 positively regulates postnatal development of astrocytes cell autonomously and oligodendrocytes non cell autonomously, *Glia*, 査読有, 65 巻, 2017, 974-989

DOI : 10.1002/glia.23139

Kazuki Harada, Motoki Ito, Xiaowen Wang, Mika Tanaka, Devina Wongso, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Hajime Hirase, Takashi Tsuboi, Tetsuya Kitaguchi, Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging, *Scientific Reports*, 査読有, 7 巻, 2017, 7351

DOI : 10.1038/s41598-017-07820-6

Keisuke Nitta, Yasunori Matsuzaki, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Minimal Purkinje cell-specific PCP2/L7 promoter virally available for rodents and non-human primates, *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 査読有, 6 巻, 2017, 159-170

DOI : 10.1016/j.omtm.2017.07.006

Nana Suto, Tokue Mieda, Akira Iizuka, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Hirai, Morphological and Functional Attenuation of Degeneration of Peripheral Neurons by Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Knock in Mice, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 査読有, 22 巻, 2016, 670-676

DOI : 10.1111/cns.12560

Jason Arsenault, Shervin Gholizadeh, Yosuke Niibori, Laura K. Pacey, Sebok K. Halder, Enea Koxhioni, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, and David R. Hampson, FMRP expression levels in mouse CNS neurons determine behavioral phenotype, *Human Gene Therapy*, 査読有, 27 巻, 2016, 982-996

DOI : 10.1089/hum.2016.090

Anton N. Shuvaev, Nobutake Hosoi, Yamato Sato, Dai Yanagihara, Hirokazu Hirai, Progressive impairment of cerebellar mGluR signalling and its therapeutic potential for cerebellar ataxia in spinocerebellar ataxia type 1 model mice, *Journal of Physiology*, 査読有, 595 巻, 2017, 141-164

DOI : 10.1113/JP272950

Nélio Gonçalves, Ana T. Simões, Rui D. Prediger, Hirokazu Hirai, Rodrigo A. Cunha, Luís Pereira de Almeida, *Annals of Neurology*, 査読有, 81 巻, 2017, 407-418

DOI : 10.1002/ana.24867

Akira Iizuka, Yasunori Matsuzaki, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Plasticity of the developmentally arrested staggerer cerebellum in response to exogenous ROR, *Brain Structure and Function*, 査読有, 221 巻, 2016, 2879-2889

DOI : 10.1007/s00429-015-1077-9

Joana Duarte-Neves, Nélio Gonçalves, Janete Cunha-Santos, Ana Teresa Simões, Wilfred F.A. den Dunnen, Hirokazu Hirai, Sebastian Kügler, Cláudia Cavadas, Luís Pereira de Almeida, *Human Molecular Genetics*, 査読有, 24 巻, 2015, 5451-5463

Liliana S. Mendonça, Clévio Nóbrega, Hirokazu Hirai, Brian K. Kaspar, Luís Pereira de Almeida, Transplantation of cerebellar neural stem cells improves motor coordination and neuropathology in Machado-Joseph disease mice, *Brain*, 査読有, 138 巻, 2015, 320-335

[学会発表](計12件)

Nobutake Hosoi, Masayuki Shichida, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Pros and cons of an AAV double infection method combined with the Tet system :An experimental study, *Neuroscience 2017 (国際学会)*, 2017.11.11, ワシントン D.C. (アメリカ)

Hirokazu Hirai, Regulation of cerebellar function by protein kinase C, *International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias (招待講演)(国際学会)*, 2017.5.25, ウィニペグ(カナダ)

Hirai, In vivo evaluation of the shortened-WPRE in the cerebellum, 第40回日本神経科学大会, 2017.7.20, 神戸

Nobutake Hosoi, Shuvaev N Anton, Hirokazu Hirai, Low concentration of a GABA_B receptor agonist improves motor performance in spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) model mice, 第40回日本神経科学大会, 2017.7.20, 神戸

Chiaki Hoshino, Masashi Watanabe, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, AAV9 vector-mediated production of mouse model of spinocerebellar ataxia type

3 and electrophysiological analysis of that mouse, 第40回日本神経科学大会, 2017.7.20, 神戸

Masashi Watanabe, Nobutaka Takahashi, Ayumu Konno, Hirokazu Hirai, Regulation of the firing property in mature Purkinje cells by PKC contributes to the motor coordination, 第40回日本神経科学大会, 2017.7.20, 神戸

平井宏和, 小脳プルキンエ細胞における古典的Cキナーゼとの発現量と生理機能, 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会, 2017.9.28, 札幌

Nobutake Hosoi, Anton N Shuvaev, Hirokazu Hirai, Progressive impairment of metabotropic glutamate receptor(mGluR) mediated signaling and cerebellar synaptic plasticity in spinocerebellar ataxia type 1(SCA1) model mice, Neuroscience 2016 (国際学会), 2016.11.12, サンディエゴ(アメリカ)

Ayumu Konno, Yasunori Matsuzaki, Hirokazu Hirai, Generation of a marmoset model of spinocerebellar ataxia type 3 via AAV9 vector-mediated gene transfer, Neuroscience 2016 (国際学会), 2016.11.12, サンディエゴ(アメリカ)

細井延武, シュワエフ アントン, 平井宏和, Progressive abnormalities in short-and long term synaptic plasticity and dendritic Ca²⁺ signals in spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) model mice, 第93回日本生理学会大会, 2016.3.22, 札幌

Nobutake Hosoi, Hirokazu Hirai, Progressive impairment of cerebellar mGluR signaling in SCA1 model mice, 第38回日本神経科学大会, 2015.7.28, 神戸

平井宏和, Gene and stem cell therapies against polyglutamine disease, 第56回日本神経学会学術大会(招待講演), 2015.5.20, 新潟

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学大学院医学系研究科脳神経再生医学分野ホームページ

<http://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平井 宏和 (HIRAI, Hirokazu)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70291086

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

細井 延武 (HOSOI, Nobutake)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90543570

今野 歩 (KONNO, Ayumu)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40509048

(4)研究協力者

松崎 泰教 (MATSUZAKI, Yasunori)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50738200