

平成21年4月1日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590974

研究課題名(和文)

遺伝性脊髄小脳変性症における病態機序の解明と新規生化学的指標の同定

研究課題名(英文)

The study for the pathogenesis and surrogate markers of spinocerebellar degeneration

研究代表者

矢部 一郎 (YABE ICHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60372273

研究成果の概要：

本研究では、小脳を含む中枢神経系全体におけるイノシトールリン脂質を介する情報伝達系の機能について明らかにすること、2 遺伝性 SCA の原因遺伝子の解明、ポリグルタミン病における新規生化学的指標として、筋エネルギー代謝異常を検討することの各々につき研究を行った。その結果、我々の発見した変異を導入したヒト PRKCG cDNA 変異型及び野生型を用いてノックインマウスのヘテロ接合体、ホモ接合体の作製に成功し、現在系統維持目的に繁殖中である。また、北海道においても 16q-ADCA が高頻度であることや、本邦では点変異に起因する SCA5, SCA13, SCA27 の各疾患が稀であることを明らかにした。CACNA1A 遺伝子 T666M 変異を伴う家系において、臨床症状は多彩であるが、頭位変換性下向き眼振が共通して認められる徴候であることを明らかにした。加えて、ポリグルタミン病である Machado-Joseph 病(MJD)にて筋エネルギー代謝測定を行い、筋エネルギー代謝 Vmax が MJD において生化学的指標になり得る可能性があることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脊髄小脳変性症、31P-MRS、筋エネルギー代謝、ノックインマウス、PRKCG、家族性片麻痺性片頭痛、CACNA1A

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症(SCA)は10万人あたりの有病率20人程度と比較的多い難治性神経変性疾

患である。しかしその発症病態は十分に解明されていない。我々はその中で、以前より遺伝性脊髄小脳変性症の診療と研究を精力的

に行ってきた。その過程で新しい SCA の遺伝子座を決定し、SCA14 として世界で初めて報告した。次いで、その原因遺伝子が protein kinase C gamma (*PRKCG*) 遺伝子であることを解明するに至った。その遺伝子変異は Ca^{2+} や diacylglycerol が結合する *PRKCG* の C1 domain に位置していた。その後の複数施設からの報告でも、この部位は遺伝子変異の集積部位であり、*PRKCG* において最も重要な役割を持っていることが推定されている。しかしながら、どのような機序で、SCA 発症に導くのかはまだ明らかにはされていない。protein kinase C (PKC) はイノシトールリン脂質を介する情報伝達系(図 1)において重要な役割を担っているが、加えて、その上流に位置する phospholipase C- β (PLCB) のアイソザイムで、小脳に発現する PLCB4 のノックアウトマウスにおいて小脳失調を呈することも知られている。これらの事実より、この情報伝達系は小脳機能を維持する重要な役割を担っていることは明らかであるが、SCA の発症病態においてのみならず、小脳機能におけるこの情報伝達系の機能は未解明である。

また、近年の分子生物学的研究の進歩により、着実にその成果は得られてはいるが、未だに原因不明の遺伝性 SCA は全体の 30%程度を占めているのが現状である。遺伝性 SCA のモデル動物においては、治療研究が進展しており、新規治療薬の開発も期待されている。しかしながら疾病の性質上、新規薬剤が開発されたとしても、症候と重症度による効果の判定には年単位の時間がかかることが予想される。そのため、短期間で効果を評価できる指標の開発が必要である。

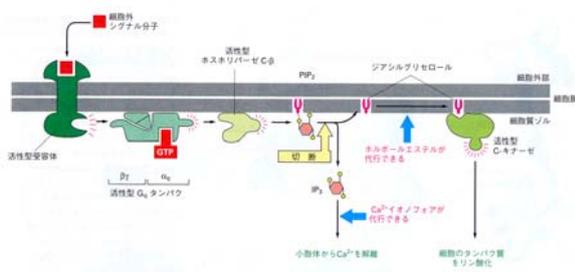


図 1

2. 研究の目的

(1) 小脳を含む中枢神経系全体におけるイ

ノシトールリン脂質を介する情報伝達系の機能について明らかにする。

- (2) 遺伝性 SCA の原因遺伝子の解明。
- (3) ポリグルタミン病における、新規生化学的指標としての筋エネルギー代謝異常の検討。

3. 研究の方法

(1) *PRKCG* のノックインマウスの開発

ノックインマウスは以下の手法により開発する。

- ① ターゲットのマウスゲノム領域 (protein kinase C gamma を含むゲノム領域) を long arm 及び short arm として pBS 「SK(+)-Vector」にクローニングする。
- ② このマウスゲノム DNA にヒト由来 protein kinase C gamma cDNA 及びオワンクラゲ由来 GFP を挿入する。マウス由来 protein kinase C gamma の開始コドンにフレームを合わせて挿入するのでマウス由来 protein kinase C gamma はノックアウトされる形になる。

③ ヒト由来 protein kinase C gamma cDNA には点変異を挿入している。さらに C 末側に GFP を融合している。さらに下流にセクションマーカーとして Neo 耐性遺伝子を挿入している。

④ Targeting Vector のコンストラクト : Short-Prkcg (mutation)-GFP-polyA-loxP-Neo-loxP-long

⑤ 上記 Targeting Vector を ES 細胞へエレクトロポレーションし、相同組み換え ES 細胞を作製する。

⑥ 相同組み換えの確認は PCR 及びサザンブロットングで行う。

⑦ 相同組み換え ES 細胞をマウス胚にインジェクションしキメラマウスを作製する。

⑧ キメラマウスと Wild-type マウスを交配させ、germline transmission を確認する。

⑨ ノックインマウス完成

(2) 遺伝子解析研究

- (3) 測定は磁気共鳴装置 (MRI シーメンス社製、1.5T) を用い ³¹P-MRS にて行った。測定は仰臥位で右腓腹筋を対象とした。測定は安静時と足関節屈曲運動時および運動後に行った。まず安静時に 64 スキャン行った。次に体重の 10% 程度の重り負荷を足底加えて、足関節屈曲運動を動的に約 5 分間行い、その運動中に 16 スキャンと運動終了間際に 8 スキャン測定

した。運動終了後、8 スキャンを 4 回、16 スキャンを 4 回、32 スキャンを 3 回、64 スキャンを 2 回行った。測定データとして inorganic phosphate (Pi), phosphodiesterases, phospho - creatin (PCr), ATP, α ATP + NAD(H) と NADP(H), β ATP を得た後、安静時の PCr/(PCr+Pi) 比や、ミトコンドリアにおける最大 ATP 産生能を示す Vmax を指標として評価した。Vmax の算出にはソフト IGOR pro®(HULINKS)にて推定される時定数を用いた。患者データと対照データについて、統計学的手法を用いて比較検討した。今回は、健常男性 8 名 (32~67 歳)、MJD 男性患者 8 名 (32~71 歳) を対象に測定した。

4. 研究成果

- (1) 我々の発見した変異を導入したヒト PRKCG cDNA 変異型及び野生型を用いてノックインマウスへのヘテロ接合体、ホモ接合体の作製に成功し、現在系統維持目的に繁殖中である。
- (2) 北海道においても 16q-ADCA が高頻度であることや、本邦では点変異に起因する SCA5, SCA13, SCA27 の各疾患が稀であることを明らかにした。CACNA1A 遺伝子 T666M 変異を伴う家系において、臨床症状は多彩であるが、頭位変換性下向き眼振が共通して認められる徴候であることを明らかにした。
- (3) PCr/(Pi+PCr) および Vmax については健常群で低値であったが、統計学的有意差は得られなかった { PCr/(Pi + PCr); MJD 群 0.88 ± 0.02 S. D., 健常者群 0.89 ± 0.02 S. D.; $p = 0.38$, Vmax; MJD 群 20.53 ± 8.39 S. D., 健常者群 28.00 ± 21.78 S. D.; $p = 0.38$ }。

一年間の Vmax 値変化については、患者群において健常群と比較して有意に減少していたが ($n = 5$, $p = 0.021$) (図 2)、二年間の変化では、患者群で減少傾向ではあるが、統計学的有意差は認めなかった ($n = 4$, $p = 0.051$)。

また、Vmax 値は SARA 総点数と有意に逆相関していた ($n = 13$, $r = -0.58$, $p = 0.042$) (図 3)。

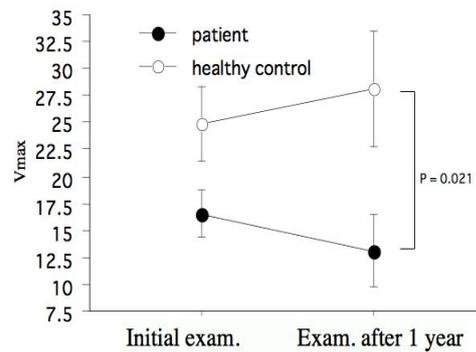


図 2 Vmax の一年間の推移 (MJD 5 名, control 5 名)

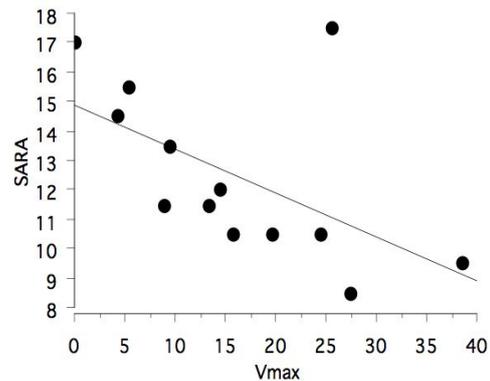


図 3 Vmax と SARA の相関

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 2 件)

- (1) Yabe I, Kitagawa M, Suzuki Y, Fujiwara K, Wada T, Tsubuku T, Takeichi N, Sakushima K, Soma H, Tsuji S, Niino M, Saitoh S, Sasaki H: Downbeat positioning nystagmus is a common clinical feature despite variable phenotypes in an FHM1 family. J Neurol, 査読有, 255, 1541-1544, 2008
- (2) Yabe I, Basri R, Soma H, Sasaki H: Spectrum and prevalence of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in

Hokkaido, the northern island of Japan : a study of 113 Japanese families. J Hum Genet, 査読有, 52, 848-855, 2007

[学会発表] (計 2件)

- (1) Yabe I, Tha K K, Terae S, Okita K, Sasaki H : Skeletal muscle energy metabolism in Machado-Joseph disease, 12th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Hilton Chicago, Chicago, IL, USA, 6/22-6/26 2008
- (2) 矢部一郎, Tha Khin Khin, 寺江 聡, 沖田孝一, 佐々木秀直: ポリグルタミン病における筋エネルギー代謝測定-第2報, 第49回日本神経学会総会, 横浜, 2008年5月16日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部 一郎 (YABE ICHIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60372273

(2) 研究分担者

2007年度

佐々木 秀直 (SASAKI HIDENAO)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80281806

辻 幸子 (TSUJI SACHIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 60374328

(3) 連携研究者

2008年度

佐々木 秀直 (SASAKI HIDENAO)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80281806

辻 幸子 (TSUJI SACHIKO)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号: 60374328