

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590924

研究課題名（和文） カルシウムダイナミクス異常説に基づく脊髄小脳変性症6型の病態解明

研究課題名（英文） Elucidation of the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 6 using a novel knock-in mouse model that develops Purkinje cell degeneration.

研究代表者

渡瀬 啓 (WATASE KEI)

東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・准教授

研究者番号：30376800

研究成果の概要（和文）：小脳神経変性を再現する新たな脊髄小脳変性症6型(SCA6)モデルマウスを用いて、変異 Ca<sub>v</sub>2.1 チャンネルの神経細胞内への蓄積・封入体形成のメカニズム及びそれに伴うカルシウムの細胞質内流入の変化を解析した。その結果、変異チャンネルはリソソーム内に封入体を形成し、リソソーム酵素の欠損により細胞死・封入体形成が加速すること。発症期においても変異チャンネルは細胞膜には蓄積せず、チャンネル機能には変化を及ぼさないことが明らかとなった。SCA6の病態においてエンドリソソーム系が重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6), we analyzed a novel knock-in mouse model that faithfully recapitulated many features of SCA6, including Purkinje cell degeneration. Our analysis revealed the lysosomal localization of accumulated mutant Ca<sub>v</sub>2.1 channels. The polyQ expansion did not affect the basic properties of the channel even in the early stage of the disease. The lack of cathepsin B, a major lysosomal proteinase, exacerbated the loss of Purkinje cells and was accompanied by an acceleration of inclusion formation. Thus, the pathogenic mechanism of SCA6 involves the endolysosomal degradation pathway,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：神経分子病態学・神経変性

1. 研究開始当初の背景  
本邦で社会的ニーズの高い脊髄小脳変性症

6型(SCA6)の病態については依然不明な点が多い。特に(1)変異 Ca<sub>v</sub>2.1 チャンネルの蓄積

は膜表面機能発現の量的変化を介してプルキンエ細胞(PC)のカルシウムホメオスタシスの異常を招くのかどうか、(2) 変異 Cav2.1 チャンネルがユビキチン陰性の封入体を形成する機構やその意義、また(3) その分解機構については全く解明が不十分であった。そこで本研究では新たに開発した PC 変性を発症する SCA6 モデルマウス(MPI-118Q ノックインマウスなど)の解析を通じてこれらの課題の解決を目指した。

## 2. 研究の目的

(1) 変異 Cav2.1 チャンネルの蓄積と分解の機構、封入体形成と PC 変性の関連を解明する。

(2) 蛍光レポーターSCA6 ノックイン(KI)マウスの作製と解析

(3) 変異 Cav2.1 チャンネルの蓄積に伴うモデルマウス PC でのカルシウムチャンネル機能変化を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 若齢で PC 変性を発症する MPI-118Q KI マウス小脳の病理学的・生化学的解析から変異 Cav2.1 の分解に関わるプロセスを推定する。

(2) カテプシン B ノックアウトマウス(カテプシン B は小脳における主要なリソソーム酵素のひとつ)と SCA6 KI マウスとの 2 重変異マウス(DMT マウス)を作製し、その解析からリソソーム分解系の SCA6 病態への関与、とりわけ封入体の分解と神経変性における役割を解明する。

(3) 蛍光レポーターを有する変異 Cav2.1 チャンネルを発現する新たな KI マウスを作製し、経時的病理解析により変異 Cav2.1 チャンネルの蓄積過程・局在の変化を解析する。

(4) 変異 Cav2.1 チャンネル蓄積・封入体形成に伴ない電位依存性カルシウムチャンネルを介した PC 内カルシウム流入が変化するかどうかを MPI-118Q KI マウス由来 PC の電気生理学的性質の変化などを指標に解明する。

## 4. 研究成果

(1) MPI-118Q KI マウス PC 細胞質内封入体

は cathepsin B や LIMP2 などのリソソームマーカーと共局在した(図 1)。また免疫電顕解析で、封入体に相当すると考えられる PC 細胞質内高電子密度構造物は LIMP2 抗体でラベルされたことから、封入体はリソソームに局在することが示唆された。

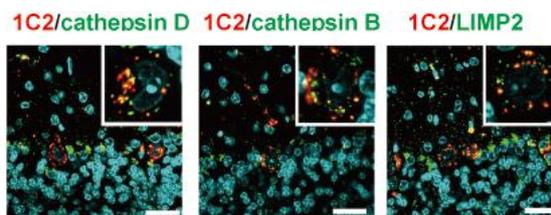


図 1 MPI-118Q KI マウス PC 内の抗ポリグルタミン抗体(1C2)陽性封入体(赤)とリソソームマーカー(カテプシン B, D, LIMP2 ; 緑)の局在

(2) DMT マウスでは、MPI-118Q KI マウスと比較して、小脳失調・PC 変性の発症が加速し(図 2)、リソソーム内の封入体形成も亢進していた(図 3)。これらの結果は、リソソーム機能が変異 Cav2.1 に重要な役割を果たすことを示唆する。

(3) 一方、PC 細胞質内でオートファゴソームの増加は認められず、オートファジーの活性化のマーカーである LC3-II 分子や小胞体ストレスマーカー CHOP の発現に変動は認められなかった。

(4) 週齢の異なる MPI-118Q KI マウスより PC 分離培養を調整して、電気生理学的に PC 内へのカルシウム流入の程度を検討した。その結果、突起変性が始まる 6 週齢 PC においても、カルシウム流入の程度は野生型と同程度で、また変異 Cav2.1 チャンネルの細胞膜への局在にも変化を認めなかったことから、SCA6 の病態発症期に、変異 Cav2.1 の PC 細胞膜への過剰蓄積及びそれによる異常カルシウム流入はおこっていないと考えられた。

(5) 蛍光物質 Venus を伸長ポリグルタミン鎖を有する Cav2.1 のカルボキシル末端に融合させた 118Q-Venus チャンネルを発現する 118Q-Venus KI マウスの作製に成功した。118Q-Venus KI マウスは MPI-118Q KI マウスと異なり、Cav2.1 遺伝子エクソン 47 の開始部にスプライシング変異を有さないため変異チャンネルの発現量は野生型マウスの MPI 型アイソフォームとほぼ同程度であった。

118Q-Venus KI マウスは変異チャンネル分子を *in vivo* で可視化するためには有用ではなかったが、MPI-118Q KI マウスと比較して、スプライスアクセプター変異を有さず、緩徐進行性の PC 変性を再現するという点でより忠実に SCA6 病態を再現していると考えられる。また、118Q-Venus KI マウスでは封入体形成の検出が既存のモデルより容易であった。

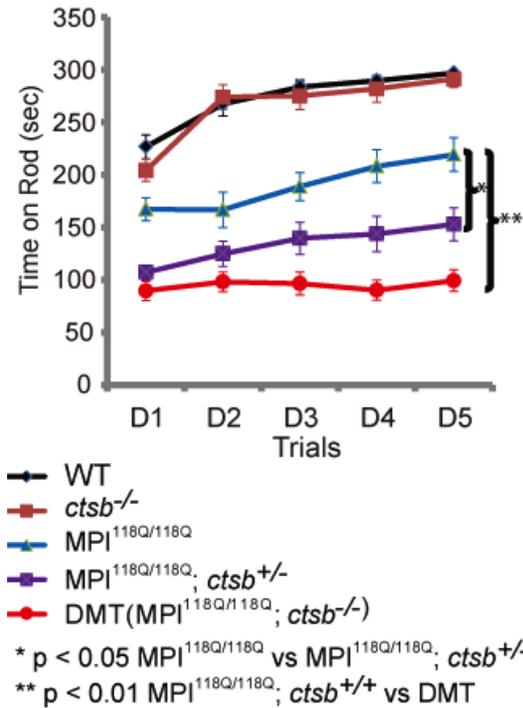


図2 DMT マウスのロータロッド解析

5週齢, 抗Cav2.1抗体染色

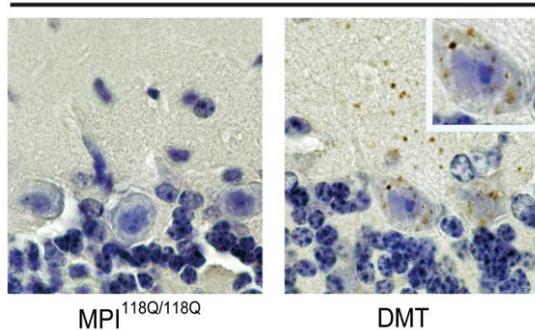


図3 DMT マウスの PC 内封入体形成

(6) オートファジーの活性化により病態が改善するかどうか検討するために、ラパマイシンを MPI-118Q KI マウスに4週間腹腔内投

与して、その効果を検討した。ラパマイシン投与群では協調運動障害に改善が認められたが、病理学的には神経変性に対して、有効な効果は認められなかった。

#### 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2件)

① Unno, T., Wakamori, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Ishikawa, K., Kubota, H., Yoshida, T., Sasakawa, H., Peters, C., Mizusawa, H. and Watase K. Development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. 2012. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109(43):17693-17698, doi:10.1073/pnas.1212786109.

② 渡瀬 啓, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 6型 (SCA6). 2012. *最新医学* 67(5): 1082-1088.

[学会発表] (計2件)

① Unno T, Mizusawa H, Watase K. A novel mouse model of spinocerebellar ataxia type 6 develops distinct Purkinje cell degeneration. 12<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics / 61<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. Montreal, Quebec, Canada. October, 12th 2011.

② 海野敏紀、水澤英洋、渡瀬 啓. Cathepsin B 欠損による脊髄小脳変性症 6型モデルマウス小脳変性の促進. 第52回日本神経学会学術大会.名古屋. 2011.5.18.

[図書] (計1件)

① 渡瀬 啓、水澤英洋 脊髄小脳変性症 6型 (SCA6) モデルマウス 脳・神経疾患-疾患モデルの作製と利用 三品昌美 編、p61-68. エル・アイ・シー 2011. 11. 22.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/cbir/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡瀬 啓 (WATASE KEI)

東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・准教授

研究者番号：30376800

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：