

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790230

研究課題名(和文)変異型Kv3.3チャンネルが引き起こす、小脳失調症のメカニズム解明

研究課題名(英文)Kv3.3 channels harboring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar neurons

研究代表者

入江 智彦(Irie, Tomohiko)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・主任研究官

研究者番号：20546551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳変性症13型を引き起こす原因を以下の点で明らかにした。変異型Kv3.3を発現する培養小脳プルキンエ細胞が、細胞内Ca²⁺濃度の変化を示すか否かを、カルシウム感受性色素を用いて検討した。その結果、変異型を発現しているプルキンエ細胞では約4倍高い細胞内Ca²⁺濃度を示す事が分かった。プルキンエ細胞が主に発現するP/QタイプCaチャンネルの選択的阻害剤を遺伝子導入後に小脳初代培養に添加して培養を行った。その結果、発達不全を防ぐことが出来た。このことから、変異型Kv3.3の発現がプルキンエ細胞の発達不全を惹起する原因は、P/Q型Caチャンネルの過剰な活性化による事が分かった。

研究成果の概要(英文)：The cerebellum plays crucial roles in controlling sensorimotor functions, and patients of spinocerebellar ataxia type 13 exhibit cerebellar atrophy and cerebellar symptoms. The disease is an autosomal dominant disorder and caused by missense mutations in the voltage-gated K⁺ channels Kv3.3 expressed intensely in the cerebellar Purkinje cells, the sole output neurons from the cerebellar cortex. We examined how these mutations caused the cerebellar disease by lentiviral expression of the mutant Kv3.3 in mouse cultured Purkinje cells. Mutant Kv3.3 suppressed outward currents, broadened action potentials, and elevated basal intracellular calcium concentration in Purkinje cells. The mutant-expressing Purkinje cells showed impaired dendrites, which were significantly rescued by blockade of P/Q-type Ca²⁺ channels. These results suggest that Purkinje cells in the patients also exhibit similar abnormalities, which may account for the pathology of the disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：小脳 小脳失調症

1. 研究開始当初の背景

(1) 電位依存性 K チャネルの一種である Kv3.3 は、中枢神経系では小脳皮質神経細胞に強く発現する。このチャネルは出力細胞であるプルキンエ細胞の活動電位形成に重要であり、小脳が持つ協調運動機能に深く関与する。

(2) 近年、優性遺伝を示す小脳失調症の一種(脊髄小脳変性症 13 型、SCA13)で、患者の Kv3.3 遺伝子に変異が生じている事が報告された。この主徴は小脳萎縮と小脳性運動失調である。SCA13 は難治性疾患であり有効な治療法は無い。

(3) 変異型ヒト Kv3.3 (hKv3.3) は、変異によりチャネル活性を失っている。また変異型と野生型 hKv3.3 を共発現させると、ヘテロマー形成により野生型の電流が減少する、事が分かっている。しかし、SCA13 の発症メカニズムや変異型 hKv3.3 が小脳神経細胞の生理学的特性や形態に与える影響は全く不明である。

2. 研究の目的

変異型 Kv3.3 チャネルが小脳神経細胞に与える影響を解明する。

3. 研究の方法

(1) 変異型の Kv3.3 チャネルを作成するために、マウス Kv3.3 に SCA13 患者と同等の変異を PCR 法で 424 番目の Arg His に改変する。

(2) 作成した変異型がヒト Kv3.3 の変異型と同様の性質であることを、アフリカツメガエル卵母細胞発現系と 2 本差し電位固定法に

より確認する。

(3) 目的の遺伝子に GFP タグを付け、レンチウイルスベクタープラスミドにサブクローニングしてウイルスベクターコンストラクトを作成する。パッケージングプラスミドと同時に、HEK293T 細胞にトランスフェクションし、上清に放出されたウイルス粒子を超遠心により 200 倍に濃縮する。

(4) 幼若マウス(生後 0 日)から小脳を集め、パパイン処理とピペッティングで分散させた。ウイルス液と混和して 24 ウェルプレートに播いてウイルス感染による遺伝子導入を行う。

(5) この培養神経細胞から、電気生理学的記録や免疫染色による形態観察を行う。

4. 研究成果

(1) マウス Kv3.3 に Arg His の変異を PCR 法により置換した(R424H 変異体)サブユニットは hKv3.3 の変異型と同様の性質であることを、アフリカツメガエル卵母細胞発現系と 2 本差し電位固定法により確認した。

(2) 培養小脳神経細胞にレンチウイルスベクターを用いて変異型 Kv3.3 遺伝子を発現させて実験を行った所、培養日数依存的にプルキンエ細胞が細胞死を起こすことを発見した。

(3) 培養 8-10 日目にテトロドトキシン、カドミウム存在下で電位固定法により外向き電流を記録したところ、コントロール群と比較して、外向き電流密度が有意に減少していた事が分かった。これは、変異型 Kv3.3 は野生型 Kv3.3 に対してドミナントネガティブに作用する事が知られているので、変異型

Kv3.3 が培養プルキンエ細胞に発現する内在性 Kv3.3 のチャンネル活性を阻害することで外向き電流の減少が生じたと考えられる。

(4) 外向き電流の減少がプルキンエ細胞の活動電位の発生と発火特性に与える影響を明らかにするために、電流固定下で通電刺激により活動電位を誘発した。変異型 Kv3.3 を発現するプルキンエ細胞では、コントロールと比較して活動電位の持続時間が延長していた。更に、持続的に発火する場合の発火頻度も減少していた。これは、変異型 Kv3.3 による外向き電流の減少により、活動電位の下相が緩やかになると同時に、持続発火時の再分極が遅くなることによる Na チャンネル不活性化の蓄積が原因であると推測される。

(5) 活動電位の持続時間延長が細胞内 Ca²⁺濃度に影響を与えるか否かを、カルシウム感受性色素 Fura2 を用いて検討した。その結果、コントロールと比較して変異型を発現しているプルキンエ細胞では約 4 倍(平均 100nM)という高い細胞内 Ca²⁺濃度を示す事が分かった。

(6) 最後に、この高い細胞内 Ca²⁺濃度を是正する事で、変異型発現プルキンエ細胞で生じる樹状突起の発達不全などの変化を抑制出来るか否かを薬理実験により検討した。

プルキンエ細胞が主に発現する P/Q タイプ Ca チャンネルに対する選択的阻害剤 (omega-agatoxinIVA) を培養 2 日目の遺伝子導入後小脳初代培養に終濃度 200nM になるように添加して、培養を行った。その結果、阻害剤により 14 日において、樹状突起の発達が顕著に回復することを見いだした。これと同時にその他の変異体誘導による変化も回復した。

この事から、変異型 Kv3.3 の発現がプルキンエ細胞の発達不全等を引き起こす原因は、P/Q 型 Ca チャンネルの過剰な活性化により細胞内 Ca²⁺濃度が異常亢進する事による事が分かった。

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3件)

- Irie T, Matsuzaki Y, Sekino Y, and Hirai H. The Journal of Physiology. 2014 Jan 1;592(Pt 1):229-247. Kv3.3 channels harbouring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells. 査読有り, DOI:
- Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Miyajima A, Doi, O. The Journal of Toxicological Sciences. 2014 vol 39, 285-292. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos. 査読有り, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/39/2/39_285/_article
- Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Nakajima M. Congenital Anomalies. 2014 Feb;54(1):67-68. doi:

10.1111/cga.12036. Various definitions of reproductive indices: a proposal for combined use of brief definitions. 査読有り, DOI: 10.1111/cga.12036.

〔学会発表〕(計7件)

- 高橋華奈子、入江智彦、関野祐子、佐藤薫、グルタミン酸トランスポーター EAAT2 機能調節機構の解析ツールとしてのエピトープ標識 EAAT2 の開発、第 14 回応用薬理研究会 (2012. 9, 甲府市)
- 入江 智彦、松崎 泰教、関野 祐子、平井 宏和: Missense mutation in Kv3.3 channel causes cell death and impairs neuronal excitability of cultured cerebellar Purkinje cells, 第 35 回日本神経科学大会 (名古屋, 2012. 9)
- 入江 智彦、松崎 泰教、関野 祐子、平井 宏和: 脊髄小脳変性症 13 型における変異型 Kv3.3 チャネルは、培養小脳プルキンエ細胞において細胞死と興奮性変化を引き起こす, 第 90 回日本生理学会大会 (東京, 2013. 3)
- 入江 智彦、松崎 泰教、関野 祐子、平井 宏和: 脊髄小脳変性症にみられる変異型 Kv3.3 チャネルは、培養小脳プルキンエ細胞において細胞死

と興奮性変化を引き起こす, Neuro2013 (京都, 2013. 6)

- 原 宏士朗, 藤枝 智美, 入江 智彦, 三輪 秀樹, 岡 淳一郎, 白尾 智明, 花尻(木倉)瑠理, 合田 幸広, 栗原 正明, 関野 祐子: 光学測定法によるマウス扁桃体外側核の神経応答に対するカンナビノイド類の作用の解析, Neuro2013 (京都, 2013. 6)
- 高橋 華奈子, 入江 智彦, 関野 祐子, 佐藤 薫: ドコサヘキサエン酸によるアストロサイトグルタミン酸トランスポーター EAAT2 機能増強, Neuro2013 (京都, 2013. 6)
- 宇佐見 誠, 満長 克祥, 入江 智彦, 宮島 敦子, 土井 守: 発生毒性物質がラット神経堤細胞の遊走に及ぼす影響に関する研究, 第 53 回日本先天異常学会学術集会 (大阪, 2013. 7)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 智彦 (Irie tomohiko)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・主任研究官

研究者番号： 24790230