

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15630

研究課題名（和文）T型カルシウムチャネルパッチにおける神経変性分子基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of neurodegenerative disease in T-type Ca channelopathies

研究代表者

橋口 俊太（HASHIGUCHI, Shunta）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30884043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：T型電位依存性カルシウムチャネルのCav3.1バリエーションにより発症する脊髄小脳失調症42型を研究対象とし、既報告で表現型を良好に再現するノックインマウスモデルを確立した。病理学的、分子生物学的、電気生理学的な多面的側面から解析した。小脳組織を抽出しRNAシーケンス解析を行い発現変動遺伝子に着目し、バイオマーカーとなり得る分子候補を同定した。プルキンエ細胞の微細形態に着目し、スパイン密度を定量化し、ホモマウスでのスパイン密度減少を示した。深部小脳核のニューロンにおいてホモマウスで自発発火が有意に低下していた。これらの解析により、神経変性機序を明らかにし、病態に基づく根本治療開発へ繋げていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄小脳変性症（SCD）は運動失調症状を主徴とする神経変性疾患の総称で孤発性、遺伝性に大別される。疾患により症状の重症度は多様であるが、生涯にわたり運動失調症状の進行を認め、患者のQOLに多大な障害をきたすことは共通している。現在、SCD全般に対してタルチレリン水和物、プロチレリン酒石酸塩が認可されているが効果は非常に限定的であり、効果的な疾患修飾治療の開発が強く求められている。研究対象であるSCA42の病態基盤を生化学的、電気生理学的に多方面から解明し、行動解析、病理学的解析で得られた結果と合わせ、疾患修飾療法の開発へと発展させる。本研究は広くSCA治療に多大なインパクトを与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Spinocerebellar ataxia 42 (SCA42) is a neurodegenerative disorder caused by c.5144G>A(p.Arg1715His) mutation in CACNA1G, which encodes the T-type voltage-gated calcium channel Cav3.1. We previously established a knock-in mouse model of SCA42 by introducing a c.5168G>A (p.Arg1723His) mutation in Cacna1g corresponding to the mutation identified in the SCA42 patients, and reported that the mutation directly caused progressive ataxia, Purkinje cell degeneration, and the electrophysiological abnormalities. The aim of this study is to elucidate what depends on neurodegeneration. We performed , pathological, and electrophysiological analyses. Compared to wild type aged mice, knock-in aged mice showed significantly decrement of spine density. Comprehensive gene expression analysis by RNA sequencing in aged mice identified the genes and pathways involved in SCA42 pathogenesis.

研究分野：脊髄小脳変性症

キーワード：脊髄小脳変性症 チャネルパッチ パッチクランプ法 プルキンエ細胞 RNAシーケンス 深部小脳核 スパイン T型カルシウムチャネル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

近年、多くの疾患の原因がチャネル遺伝子の異常であることが明らかになり、“チャネルパチー”という概念が確立されてきている。Cav3.1を含むT型カルシウムチャネルバリエーションによるチャネル病として、先天性小脳失調症、脊髄小脳失調症、若年性ミオクロニーてんかん、欠伸てんかん、自閉症スペクトラム障害、原発性アルドステロン症などの疾患が報告されている。研究対象としてきた脊髄小脳失調症（SCA）家系において、単一家系ではあるもののエクソーム解析により *CACNA1G* 点変異 R1715H を世界に先駆けて同定し、変異 KI マウス（*Cacna1g*_R1723H_KI マウス）の作成と解析を行ってきた。同変異は2015年フランスの複数家系 SCA において先行報告され、現在では SCA42 と命名されている。常染色体顕性遺伝で、緩徐進行性の小脳性運動失調を主徴とし、一部の症例では振戦、抑うつ症状ならびに認知機能障害を認める。脳 MRI では小脳に局限した萎縮を呈し、病理学的には小脳プルキンエ細胞の変性を来することが示されている。SCA42 の変異部位 Arg1715 はチャネルの電位感受性センサーに相当し、点変異 R1715H によって電位センサー機能に障害を来し、電気生理学的性質に影響を及ぼす機序が推測されるが、実際に *Cacna1g*_R1723H_KI マウスの小脳急性スライスを用いて、プルキンエ細胞、下オリーブ核神経細胞において電気生理学的性質の変化が生じることを証明した。さらに、点変異の導入により、患者と同様の緩徐進行性の失調症状、プルキンエ細胞変性をきたすことを証明し、疾患モデルとしての有用性を明らかにした。しかし、プルキンエ細胞、下オリーブ核神経細胞でみられた電気生理学的異常と神経細胞内の分子発現変化の関係性さらに神経変性メカニズムについては未だ不明であり、根本治療開発に向けて病態解明が待たれる。

2．研究の目的

SCA は遺伝性神経変性疾患の一種であり DNA シークエンス技術の進歩により種々の遺伝子変異が次々と発見され、現在までに SCA1 から SCA50 までの病型が報告されている。一方で、いずれの病型についても根本治療は未だ存在しない。本研究では、*Cacna1g*_R1723H_KI マウスを用いて、SCA42 の神経変性機序の解明を目指し、ひいては脊髄小脳失調症全般の病態解明に寄与する知見を見いだすことを目的としている。

3．研究の方法

野生型マウス及び変異 KI マウスから、小脳組織を抽出し、RNA シークエンスによる発現変動遺伝子に着目し、疾患バイオマーカーとなり得る候補分子の解析を行う。さらに、プルキンエ細胞のより詳細な形態変化の観察に加え、Cav3.1 発現神経細胞を有する深部小脳核の神経活動を電気生理学的に解析することで、解析済みのプルキンエ細胞、下オリーブ核神経細胞における変化と併せ、T型カルシウムチャネルの点変異が神経細胞ネットワーク全体に与える影響を統合的に解析し、プルキンエ細胞脱落に至る神経変性機序を明らかにし、根治治療基盤を構築する目的である。

4．研究成果

(1) *Cacna1g*_R1723H_KI マウスの病理学的解析

プルキンエ細胞のより微細な形態に着目するため、マウス小脳浮遊切片について抗Calbindin抗体を用いて免疫染色を行い、高解像度顕微鏡を用いて樹状突起のspine数の定量化を行った。50週齢マウスにおいては、野生型と比較してホモノックインマウスで有意にスパイン密度が低下しており、Cav3.1バリエーションによるシナプス形成障害を示唆する結果であった。

(2) 小脳組織の RNA シークエンス解析

50 週齢マウスの各遺伝子型の小脳から RNA を抽出し、RNA シークエンスによる網羅的な解析を実施した。発現変動遺伝子に着目すると、野生型と比較して、ノックインマウスで有意に低下していた分子が 37 種、野生型と比較して有意に上昇していた分子が 31 種候補に挙げた。これらのうち、ホモノックインマウスおよびヘテロノックインマウスで共通して変動している分子に絞ると、各々 15 種、8 種が該当した。また、共通で発現が低下している分子の pathway に着目してみると、その中でも PI3K-Akt-mTOR シグナルが共通して低下している結果であった。網羅的解析で得られた候補分子に着目し、引き続きバイオマーカーを探索していく。

(3) *Cacna1g*_R1723H_KI マウスの電気生理学的解析

急性小脳スライスをを用い、これまで解析を行ったプルキンエ細胞および下オリーブ核に加えて、Cav3.1 が多く発現する深部小脳核でのニューロンの電気活動を解析した。若齢マウスにおいて、深部小脳核での自発発火は野生型に比べて、ホモノックインマウスで有意に低下をしていた。この結果は先行研究で示されていた深部小脳核でのコンピュータモデルにおいて、活動電位のスパイクが有意に減少するシミュレーション実験結果と合致するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 橋口俊太，土井宏，大久保正紀，國井美紗子，高橋慶太，多田美紀子，田中健一，竹内英之，石川太郎，田中章景 |
| 2. 発表標題 Ethosuximide improves clinical and pathological phenotypes of SCA42 mouse model |
| 3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大久保正紀，土井宏，橋口俊太，國井美紗子，高橋慶太，多田美紀子，田中健一，竹内英之，石川太郎，田中章景 |
| 2. 発表標題 Ethosuximide improves clinical and pathological phenotypes of SCA42 mouse model |
| 3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大久保正紀，土井宏，橋口俊太，高橋慶太，田中健一，竹内英之，石川太郎，田中章景 |
| 2. 発表標題 SCA42モデルマウスに対するエトサクシミドの治療効果 |
| 3. 学会等名 第40回日本神経治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田中章景，橋口俊太 |
| 2. 発表標題 Pathophysiology and therapeutic strategies for spinocerebellar ataxia type 42 |
| 3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|