

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830046

研究課題名(和文) 脊髄小脳変性症1型モデルの投薬治療の試みと神経変性症の共通メカニズムの解明

研究課題名(英文) Long-term oral administration of the NMDA receptor antagonist memantine extends life span in spinocerebellar ataxia type 1 knock-in mice.

研究代表者

飯塚 朗 (Iizuka, Akira)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10466683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳変性症1型は進行性の遺伝性神経変性疾患であり、その変性メカニズムはいまだわかっていない。我々は脊髄小脳変性症のモデルマウスにシナプス外NMDA受容体の阻害剤であるメマンチンを4週齢から経口投与したところ、メマンチンを投与したモデルマウスでは、延命効果や体重の正常な増加が認められた。さらに、小脳のプルキンエ細胞死や延髄における迷走神経背側核の運動神経細胞死が抑制されていた。これらのことから、脊髄小脳変性症1型モデルマウスにおいてシナプス外NMDA受容体の活性化は神経細胞死に関わっていることが示唆された。また、メマンチンが人の脊髄小脳変性症1型の治療薬として使える可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) is a progressive neurodegenerative disease caused by abnormal Sca1 gene. Although the mechanisms underlying the symptoms of SCA1 have not been determined, aberrant neuronal activation contributes to the neurodegenerative disorder. Here we examined the potential involvement of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) activation in the pathogenesis of SCA1 by administering memantine, NMDAR antagonist, in SCA1 knock-in (KI) mice. Memantine was administered orally to the SCA1 KI mice from 4 weeks of age until death. The treatment significantly prolonged the life span of SCA1 KI mice. Furthermore, memantine significantly suppressed the loss of Purkinje cells in the cerebellum and motor neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus. These findings support the contribution of aberrant activation of extrasynaptic NMDARs to neuronal cell death in SCA1 KI mice and suggest that memantine may also have therapeutic benefits in human SCA1 patients.

研究分野：神経生理学

キーワード：脊髄小脳変性症1型 メマンチン NMDA受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経変性疾患と非シナプス性 NMDA 受容体

近年、神経変性疾患においては疾患初期のシナプス病態が注目されており、Raymondらはアルツハイマー病 (ALZ) とハンチントン病 (HTT) において、シナプス前部から放出されたグルタミン酸がシナプス外に存在する NMDA 受容体の活性化することで、細胞変性を引き起こす可能性を指摘している。(review: Gladding and Raymond., 2011, Milnerwood and Raymond., 2010)。彼らは、変性症の初期からシナプス外に存在する非シナプス性 NMDAR (extrasynaptic NMDAR: ^{EX}NEDAR) からの Ca²⁺ の流入が、シナプス性 NMDAR (synaptic NMDAR; sNMDAR) の Ca²⁺ の流入を介した生存促進性のシグナルを阻害することで、後の細胞の変性死を引き起こすと考察しており (Paradia et al., 2008, Ivanov et al., 2006, Hardingham et al., 2002) ^{EX}NEDAR 活性化の阻害は細胞死を抑制すると提唱している。実際、^{EX}NEDAR を標的とする「低親和性 NMDAR 阻害薬メマンチン」の神経細胞保護作用が明らかとなっており、アルツハイマー病の臨床薬として認可されている。また、HTT モデルマウスにおいても神経細胞死抑制効果と発症の遅延が報告されている (Milnerwood et al., 2010., Okamoto et al., 2009)。これらことから、^{EX}NEDAR の活性化は神経変性疾患に共通する神経細胞死誘導のメカニズムの一端であるという仮説が考えられる。その仮説を検証するため、本研究では脊髄症変性症 1 型 (SCA1) に着目した。

(2) 脊髄症変性症 1 型 (SCA1) とグルタミン酸性興奮毒性

SCA1 は、遺伝性脊髄小脳変性症の一つで、中高年から発症する進行性の運動失調などを主症状とする。ポリグルタミン鎖の異常伸長した原因タンパク質 ataxin-1 に惹起される細胞の機能変性により、主にプルキンエ細胞の形態異常や脱落を引き起こし、小脳が委縮していくが、直接的なプルキンエ細胞の late-onset な変性理由はいまだわかっていない (Hourez et al., 2011, Serra et al., 2006, Serra et al., 2004.)。これまでの研究でグルタミン酸トランスポーター EAAT4 の発現低下やバグマングリア細胞の発生不良に伴う GLAST 量の低下など、グルタミン酸による興奮毒性が起こっている可能性を示唆する報告がある (Shiwaku et al., 2010, Serra et al., 2004, Burright., 1995, Watase et al., 2002)。しかし、2007 年の報告までプルキンエ細胞における機能的な NMDAR の存在は否定されてきたため、SCA1 における NMDAR を介した興奮毒性は、検証されていない。面白いことにプルキンエ細胞の NMDAR 応答は小脳発達後の P21 以降から

増え始める。

そこで申請者は、SCA1 における細胞変性は、登上線維から放出されたグルタミン酸が回収されず、^{EX}NEDAR を活性化させているために引き起こされるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

アルツハイマー病 (ALH) とハンチントン病 (HTT) の初期において、シナプス伝達のためのグルタミン放出が、シナプス外の NMDA 受容体 (非シナプス性 NMDAR) まで活性化させ、グルタミン酸毒性により細胞変性が始まる可能性が指摘されている。脊髄小脳変性症 1 型 (SCA1) は、中高年から発症し、主に小脳プルキンエ細胞の変性脱落による小脳の委縮と運動失調を引き起こすが、その late-onset な変性理由はいまだよくわかっていない。本研究は、この ALH と HTT にて提唱されている「非シナプス性 NMDA 受容体活性化」という仮説をもとに投薬治療によって SCA1 モデルを改善することで、臨床応用に向けた基礎的データを得え、さらに神経変性症における変性発症の共通メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SCA1 モデルマウス

本研究においては、グルタミン (Q) が 154 個伸長している変異 ataxin-1 が挿入されている SCA1 ノックインマウス (SCA1154Q/2Q : SCA1-KI) を使用した。SCA1-KI は、5 週齢から運動失調を示し、40 週前後で死にいたることが知られている (Watase et al., 2002)。また、小脳バグマングリア細胞や海馬などプルキンエ細胞 (PC) 以外の組織の異常も反映するため、SCA1-KI は最も人の SCA1 に近いモデルと考えられる。

(2) SCA1-KI へのメマンチン経口投与

生後 4 週齢の未発症 SCA1-KI に対し、経口でメマンチンを投与を開始した。メマンチンの濃度は、Raymond らグループの論文を参考にし、体重あたり、それぞれ 1 μg/g/day 程度になるように調整し、飲水にメマンチンを添加した (Milnerwood et al., 2010)。

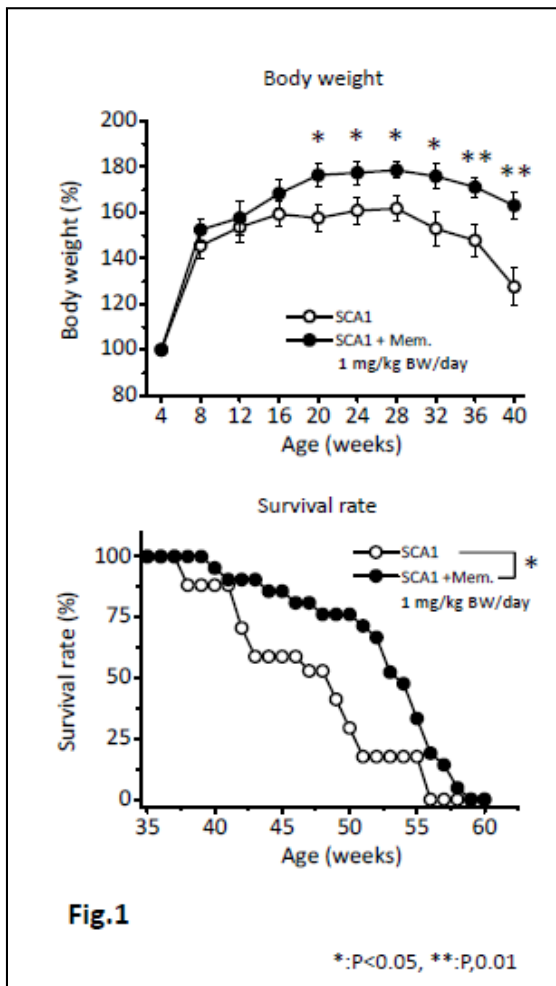
(3) メマンチン投与 SCA1-KI マウスの観察

生後四週齢からメマンチンを経口投与された SCA1-KI マウスと飲ませていないマウスについて、体重変化及び寿命について観察した。また、SCA1-KI マウスにおいて認められる小脳プルキンエ細胞および延髄、迷走神経背側核運動神経細胞の細胞変性についても蛍光免疫染色法を用いて観察、比較した。

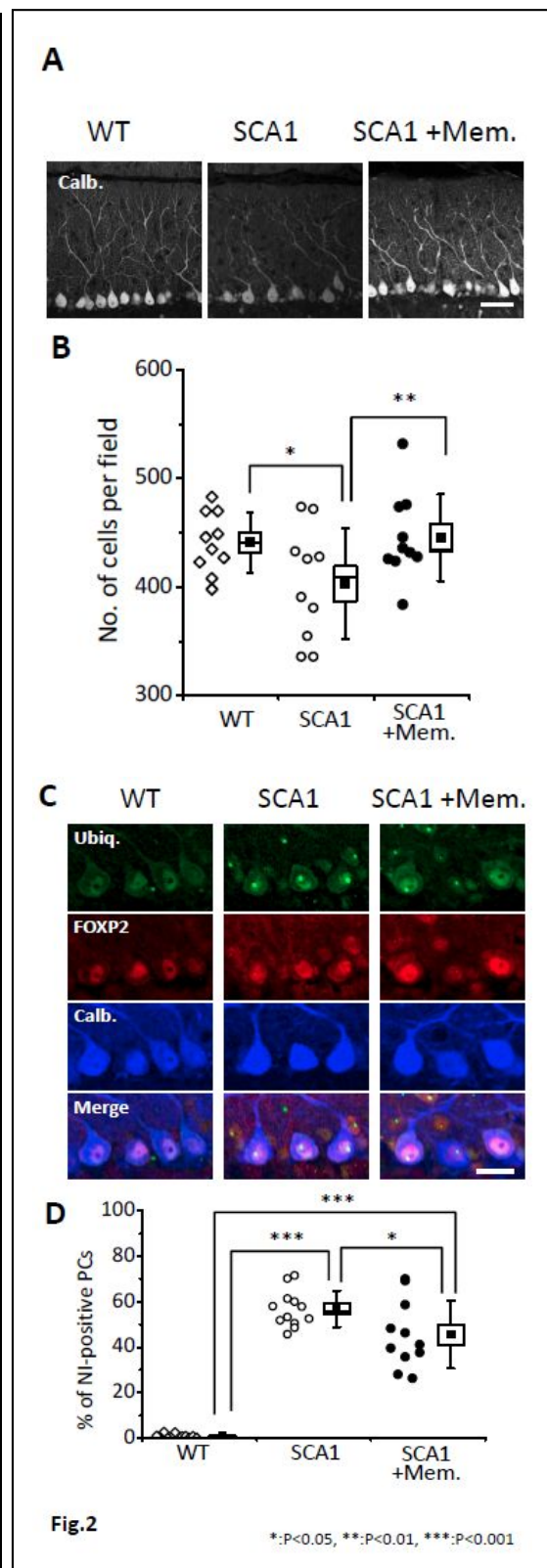
4. 研究成果

SCA1-KI マウスでは、野生型に比べ体重増加が小さいことが知られていたことから、メマンチンを長期間飲ませていた SCA1-KI の体重変化を観察したところ、対照群では 16

週齢で体重の増加が止まってしまったのに対し、メマンチン投与群では、28 週齢まで増加していた。また、対照群では 28 週齢から急激に体重が減少していきのに対し、メマンチン投与群では、緩やかな減少であった。各週齢における平均体重では、20 週齢から対照群に比べ、有意に体重増加が認められた（図 1 上）。さらに SCA-KI マウスの寿命に対するメマンチンの効果を検討したところ、対照群では平均 45 週齢前後で死んでしまうのに対し、メマンチン投与群では、52 週齢前後まで伸びていた（図 1 下）。これらの実験から、メマンチンが個体レベルで SCA1 KI マウスにおける SCA1 の進行を遅らせていることが示された。

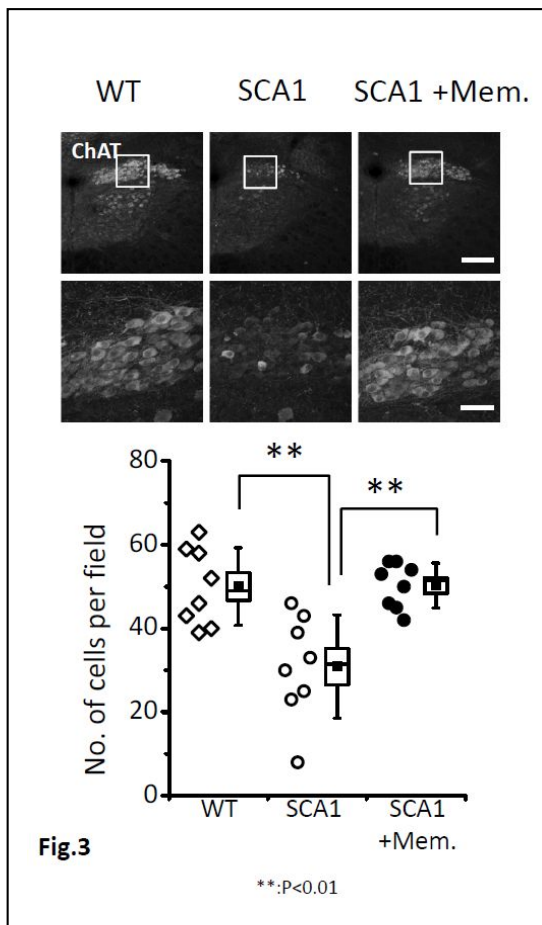


次に人や SCA1 KI マウスにおいて報告されている小脳プルキンエ細胞の脱落について観察したところ、対照群では野生型マウスに比べ細胞数が減少していたのに対し、メマンチンを長期間投与されていたマウスでは、野生型マウスと同程度のプルキンエ細胞が残っていることが確認された（図 2A, B）。さらに SCA1 - KI マウスで確認される核封入体を持つプルキンエ細胞の数もメマンチンを投与されていた SCA1 - KI マウスでは、核封入体をもつプルキンエ細胞の割合を減少させていた（図 2 C, D）。



最後に人の SCA1 患者において延髄迷走神経核における細胞死が確認されていたことから、SCA1 - KI マウスについても観察したところ、迷走神経背側核の運動ニューロンの減少が確認された。また、メマンチン長期投与群では、その減少は確認されなかった（図 3）。これら実験の結果からメマンチンの経口投与は、SCA1 KI マウスにおける症状の進行を遅らせることが明らかにされた。このこと

から、人 SCA1 においてもメマンチンが治療薬として使用できる可能性を明らかにした。この研究成果をまとめ、Neuroscience letters 誌に論文として投稿した。



引用文献

- Gladding, C. M., Raymond, L. A.
Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function
Molecular and cellular neurosciences, 2011, 48, 308-320
- Milnerwood, A. J., Raymond, L. A.
Early synaptic pathophysiology in neurodegeneration: insights from Huntington's disease
Trends in neurosciences, 2010, 33, 512-523
- Papadia, S. et al.,
Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses
Nature neuroscience, 2008, 11, 476-87
- Ivanov, A. et al.,
Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons

The Journal of physiology, 2006, 572, 789-798

Hardingham, G. E. et al.,
Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways
Nature neuroscience, 2002, 5, 405-414

Milnerwood, A. J. et al.,
Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice
Neuron, 2010, 65, 178-190

Okamoto et al.,
Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin
Nature medicine, 2009, 15, 1407-1413

Hourez, R. et al.,
Aminopyridines Correct Early Dysfunction and Delay Neurodegeneration in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 1
Journal of Neuroscience, 2011, 31, 11795-11807

Serra, H. G. et al.,
RORalpha-mediated Purkinje cell development determines disease severity in adult SCA1 mice
Cell, 2006, 127, 697-708

Serra, H. G. et al.,
Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice
Human molecular genetics, 2004, 13, 2535-2543

Shiwaku H. et al.,
Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity.
The EMBO journal, 2010, 29, 2446-2460

Burright, E. N. et al.,
SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat.
Cell. 1995.82, 937-948

Watase K. et al.,
A long CAG repeat in the mouse Sca1 locus replicates SCA1 features and reveals

the impact of protein solubility on selective neurodegeneration,
Neuron, 2002, 34, 905-919

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 1 件)

飯塚 朗、中村 和裕、平井宏和

Long-term oral administration of the NMDA receptor antagonist memantine extends life span in spinocerebellar ataxia type 1 knock-in mice.

Neuroscience letters 誌、 査読あり、592 巻 2015 年 37-41 ページ

doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.055.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 朗 (IIZUKA, Akira)

群馬大学・大学院医学系研究科・研究員

研究者番号：10466683

(2) 連携研究者

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

中村 和裕 (NAKAMURA, Kazuhiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10327835

今野 歩 (KONNO, Ayumu)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40509048