

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07103

研究課題名（和文）脊髄小脳失調症の活動依存的な運動機能改善メカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of activity-dependent motor improvement in SCA

研究代表者

細井 延武（Hosoi, Nobutake）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90543570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小脳の機能異常により運動失調を生じる遺伝性の脊髄小脳失調症（SCA）に焦点を当て、低濃度baclofenを経口投与すると活動依存的に運動機能が改善するメカニズムを調べることを目的とした。そのために、マウスを用いて小脳の神経細胞を活動依存的にラベリングして実験を行う新しい手法を検討したが、ばらつきが多く、ラベリングの効率も低くて実験を行うことが困難であることが判明した。また、SCA3モデルマウスを用いて低濃度baclofenの小脳への作用を検討し、小脳以外での作用が運動機能の改善に關与する可能性を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄小脳失調症（SCA）は、治療法として対症療法しかない難病指定の希少疾患であるため、SCAの治療法に関する研究は大きな社会的意義がある。小脳神経細胞を活動依存的にラベリングする新しい手法の適用はうまくいかなかったものの、SCA3モデルマウスでは、低濃度バクロフェンの作用が小脳以外のところで作用して運動機能の改善に關与する可能性を得られたことは、学術的にも意義があると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I focused on congenital spinocerebellar ataxia (SCA) which is characterized by cerebellar dysfunction, and the purpose of the study was examining the mechanism by which oral administration of low-dose baclofen may improve motor performance of SCA model mice in an activity-dependent manner. To this end, I tried to develop a technique for activity-dependent labeling of cerebellar neurons, but it turned out to be difficult because of the unstableness and the low efficiency of activity-dependent labeling in the cerebellum. The effect of low-dose baclofen on cerebellar function was examined, and the results suggest that baclofen might act on the brain regions other than the cerebellum to improve motor performance of SCA3 model mice.

研究分野：神経科学

キーワード：小脳 baclofen

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症(SCA)は進行性の神経変性を引き起こし、小脳性の運動失調を症状とする遺伝性の希少疾患である。今までのところ、SCA に対しては、症状の進行を遅らせる程度の対症療法しかなく、効果的な治療法の開発が切望されている指定難病の一つである。当研究室では、筋弛緩剤としてすでに臨床利用されている baclofen(GABA_B 受容体の活性化薬)の低用量経口投与と運動トレーニング(リハビリ)を組み合わせると、SCA モデルマウスの運動機能が改善することを予備実験によって見出した。筋弛緩の効果が生じるよりも低い濃度の baclofen は、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の応答を増強することが知られているため(1,2)、baclofen の上記の効果は、小脳での mGluR の応答を増強しているためと予想していた(3)。

2. 研究の目的

本研究では、上記の低用量 baclofen の投与と運動トレーニング(リハビリ)を同時に組み合わせることで、小脳でどのような変化が生じて運動機能の改善につながるのか、そのメカニズムを検討することを目的とした。リハビリ中には、小脳の神経細胞すべてが常に活動するわけではないので、この研究目的を適切に進めるためには、運動トレーニング(リハビリ)によって活性化された小脳の神経細胞群を標識(ラベリング)して、そのラベリングされた細胞群のみを標的として電気生理学的・解剖学的・分子生物学的に調べる必要があると考えた。

3. 研究の方法

活動依存的に小脳の神経細胞群をラベリングするために、神経活動依存的に遺伝子発現を誘導する E-SARE プロモーターも用いて、蛍光タンパクである GFP を発現させる手法を用いた(4)。E-SARE プロモーターの下流に半減期の短い不安定型 GFP(dGFP)の遺伝子を連結し、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに搭載し、SCA モデルマウスの小脳に接種することによって、小脳の細胞群に活動依存的に dGFP を発現する遺伝子を導入した。

4. 研究成果

まずは、上記の AAV ベクターをマウス大脳の視覚野に感染させて、光刺激の有無によって活動依存的に dGFP が視覚野で発現するかどうかを検討したところ、光刺激を与えて視覚野が活動したときのみ dGFP の発現が増えることが確認できたため、E-SARE プロモーターが神経活動に応じて適切に機能することが確認できた。

次に、同じ AAV ベクターをマウス小脳に接種し、活動依存的に小脳の神経細胞群が dGFP でラベリングできるかどうかを検討した。ローターロッド課題で運動トレーニングを行った後に dGFP の発現を確認してみたところ、dGFP の発現はかなり少なく、切片や個体ごとによっても発現がばらつき、運動トレーニングの有無に対応して、dGFP の発現が明確に上昇することは確認できなかった。したがって、小脳の神経細胞群を活動依存的にラベリングして実験を行うことは困難であることが判明した。

その一方、SCA3 モデルマウスの小脳プルキンエ細胞からパッチクランプ記録を行い、低濃度バクロフェン(50 nM)を急性還流投与した時に短期シナプス可塑性にどう影響するかを検討した。正常なマウスでは、平行線維(PF)を高頻度刺激(100 Hz で 50 回電気刺激)すると、mGluR 依存性の短期シナプス可塑性が誘導され、PF 由来のシナプス応答(PF EPSC)が高頻度刺激後の数十秒間小さくなるシナプス抑圧の現象が観察される。しかしながら、SCA3 マウスでのプルキンエ細胞では、mGluR の応答性が非常に減弱しており、PF の高頻度刺激後、mGluR の活性化によるシナプス抑圧がみられず、結果としてシナプス増強の現象がみられることが明らかにされている(5)。もし、低濃度バクロフェンが SCA3 のプルキンエ細胞に残存している mGluR の活性化を増強するならば、バクロフェンの投与によって、SCA3 での短期シナプス増強の様子が変化すると考えられるが、実際、バクロフェンは SCA3 マウスの短期シナプス増強に影響を与えなかった(図1)。したがって、低濃度バクロフェンは SCA3 のプルキンエ細胞の mGluR の活性化を増強してはいないことが示唆され、低濃度バクロフェンは小脳に影響を与えるというよりも、小脳以外の脳部位で何らかの影響を

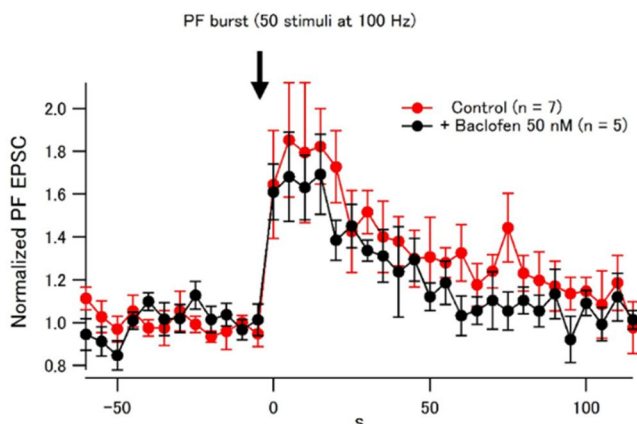


図1 SCA3マウスのプルキンエ細胞から記録したPF EPSCの短期シナプス可塑性に対する低濃度バクロフェンの影響

与え、リハビリと組み合わせられると運動機能改善につながる可能性が出てきた。

また、本研究では活動依存的に小脳の神経細胞がラベリングできたときに行う実験として、一つのプルキンエ細胞からパッチ電極を介して細胞内の mRNA を採取し、単一細胞での発現解析を行う手法の習得にも取り組んだ。実際この手法を活動依存的にラベルされたプルキンエ細胞に適用することは叶わなかったものの、他の研究者との共同研究の際にこの技術を生かすことができ、共同研究を促進するとても重要なデータを得る原動力ともなった。

<References>

- 1) GABA(B) receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses.
Hirono M, Yoshioka T, Konishi S.
Nat Neurosci. 2001 Dec;4(12):1207-16. doi: 10.1038/nn764.
- 2) Ca²⁺ activity at GABAB receptors constitutively promotes metabotropic glutamate signaling in the absence of GABA.
Tabata T, Araishi K, Hashimoto K, Hashimotodani Y, van der Putten H, Bettler B, Kano M.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 30;101(48):16952-7. doi: 10.1073/pnas.0405387101. Epub 2004 Nov 18.
- 3) Progressive impairment of cerebellar mGluR signalling and its therapeutic potential for cerebellar ataxia in spinocerebellar ataxia type 1 model mice.
Shuvaev AN, Hosoi N, Sato Y, Yanagihara D, Hirai H.
J Physiol. 2017 Jan 1;595(1):141-164. doi: 10.1113/JP272950. Epub 2016 Sep 15.
- 4) Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE.
Kawashima T, Kitamura K, Suzuki K, Nonaka M, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Okuno H, Ohki K, Bito H.
Nat Methods. 2013 Sep;10(9):889-95. doi: 10.1038/nmeth.2559. Epub 2013 Jul 14. PMID: 23852453
- 5) Mutant ataxin-3 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar Purkinje cells.
Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H.
Cerebellum. 2014 Feb;13(1):29-41. doi: 10.1007/s12311-013-0516-5. PMID: 23955261

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirai H, Fukai Y, Konno A, Hosoi N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Electrophysiological and Imaging Analysis of GFP-Tagged Protein Kinase C Translocation in Cerebellar Purkinje Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cerebellum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12311-022-01384-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe M, Takahashi N, Hosoi N, Konno A, Yamamoto H, Yasui H, Kawachi M, Horii T, Matsuzaki Y, Hatada I, Hirai H.	4. 巻 119(7)
2. 論文標題 Protein kinase C in cerebellar Purkinje cells regulates Ca ²⁺ -activated large-conductance K ⁺ channels and motor coordination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2113336119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ninomiya A, Mshaty A, Haijima A, Yajima H, Kokubo M, Khairinisa MA, Ariyani W, Fujiwara Y, Ishii S, Hosoi N, Hirai H, Amano I, Koibuchi N.	4. 巻 159:112751
2. 論文標題 The neurotoxic effect of lactational PFOS exposure on cerebellar functional development in male mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chem Toxicol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fct.2021.112751. Epub 2021 Dec 3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 細井 延武, 平井 宏和	4. 巻 72(1)
2. 論文標題 遺伝子改変疾患マウスと小脳異常	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 69-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoshino Chiaki, Konno Ayumu, Hosoi Nobutake, Kaneko Ryosuke, Mukai Ryo, Nakai Junichi, Hirai Hirokazu	4. 巻 14
2. 論文標題 GABAergic neuron-specific whole-brain transduction by AAV-PHP.B incorporated with a new GAD65 promoter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00746-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hosoi N, Shibasaki K, Hosono M, Konno A, Shinoda Y, Kiyonari H, Inoue K, Muramatsu SI, Ishizaki Y, Hirai H, Furuichi T, Sadakata T	4. 巻 39(32)
2. 論文標題 Deletion of Class II ADP-Ribosylation Factors in Mice Causes Tremor by the Nav1.6 Loss in Cerebellar Purkinje Cell Axon Initial Segments.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurosci	6. 最初と最後の頁 6339-6353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2002-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Nobutake Hosoi, Koji Shibasaki, Teiichi Furuichi, Hirokazu Hirai, Tetsushi Sadakata
2. 発表標題 Deletion of class II ARFs causes tremor by disruption of Nav1.6 localization to the axon initial segment of cerebellar Purkinje cells in mice
3. 学会等名 FENS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細井延武、柴崎眞志、古市貞一、平井宏和、定方哲史
2. 発表標題 Insufficiency of class II ARFs causes tremor by impairment of Nav1.6 localization to the axon initial segment of cerebellar Purkinje cells in mice
3. 学会等名 生理研研究会 2020 シナプス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細井延武、柴崎貢志、古市貞一、平井宏和、定方哲史
2. 発表標題 クラスIIARFはNav1.6を小脳プルキンエ細胞の軸索初節部に局在させる新規な役割を持つ
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会 Web開催（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 定方 哲史、細井 延武、柴崎 貢志、今野 歩、平井 宏和、石崎 泰樹、古市 貞一
2. 発表標題 クラスII ARFタンパク質の欠失はNav1.6の輸送不全により振戦を発症させる
3. 学会等名 第42回 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細井 延武、柴崎 貢志、古市 貞一、平井 宏和、定方 哲史
2. 発表標題 クラスIIARF不全で動作時振戦を示すマウスの小脳プルキンエ細胞における活動電位発火とNa電流：クラスIIARFがNav1.6を軸索起始部へ局在させる役割を持つ可能性
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 二ノ宮 彩音、細井 延武、小久保 倫文、天野 出月、靏島 旭、宮崎 航、平井 宏和、鯉淵 典之
2. 発表標題 甲状腺ホルモン受容体による小脳プルキンエ細胞におけるシナプス可塑性の調節機構
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Nobutake Hosoi and Hirokazu Hirai
2. 発表標題 The effect of orally-administered baclofen on spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) model mice
3. 学会等名 FAOPS 2019 (第96回日本生理学会大会・第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 合同大会) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 細井 延武、 アントン シュワエフ、 平井 宏和
2. 発表標題 低濃度GABA _B 受容体アゴニスト投与による遺伝性脊髄小脳変性症 1 型(SCA1)モデルマウスの運動機能の改善
3. 学会等名 第40回 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nobutake Hosoi, Masayuki Shichida, Ayumu Konno and Hirokazu Hirai
2. 発表標題 Pros and cons of an AAV double infection method combined with Tet system: an experimental study
3. 学会等名 Neuroscienc 2017 SfN annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細井 延武
2. 発表標題 遺伝性脊髄小脳変性症に対するGPCRクロストークを利用した治療戦略
3. 学会等名 第9回 光操作研究会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細井 延武、 アントン シュワエフ、 平井 宏和
2. 発表標題 GPCR(Gタンパク共役型受容体) クロストークを利用した脊髄小脳失調症(SCA1)に対する治療可能性
3. 学会等名 第95回 日本生理学会大会(国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【医学系研究科】体が震える原因を解明 (群馬大学 webページ 新着情報) https://www.gunma-u.ac.jp/information/54661 体が震える原因を解明 (群馬大学大学院医学系研究科 webページ ニュースリリース) https://www.med.gunma-u.ac.jp/newsrelease/6209.html</p>
--

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
連携研究者	今野 歩 (Konno Ayumu) (40509048)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	
連携研究者	平井 宏和 (Hirai Hirokazu) (70291086)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	

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
---------	---------