

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07242

研究課題名(和文)小脳失調症を示すpcdマウスの細胞種特異的機能解析とその治療法の探索

研究課題名(英文)Analysis of Nna1's genetic changes and explore for optimal treatment methods

研究代表者

周麗(Zhou, Li)

新潟大学・研究推進機構・特任助教

研究者番号：80568410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：プルキンエ細胞(PC)Nna1cK0が生後4週まで細胞自律的に変性した。顆粒細胞(GC)Nna1cK0は軽度の運動学習障害が検出された。apoptosisはPC Nna1cK0とGC Nna1cK0マウスの両方の小脳GC層に存在し、細胞と非細胞自律的な死が共存することを示した。PC Nna1cK0マウスの脊髄で運動ニューロンの変性が検出されたため、PCの喪失が興奮毒性による運動ニューロンの喪失につながると示唆された。後肢の筋肉もPC Nna1 cK0マウスで萎縮とHSPB5の上昇を発現し、PCの損失が脊髄運動ニューロンの変性や筋肉ストレスなどの二次的影響につながると示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、臨床研究では、人のNna1/CCP1の変異はpcdマウスの神経変性と類似していることが示された(EMBO J, 2018)。我々が作成したPCとGC cK0マウスは細胞自律的と非細胞自律的な観点より細胞死を解明した。プルキンエ細胞が失ったらそれを中心とした神経回路上の橋核と赤核においてはc-fosの発現上昇がみられた(投稿準備中)。グルタミン酸の過剰毒性もしくはGABAの不足と示唆されている。そのために脊髄小脳変性症に治療効果が報告されたGABAアゴニストのバクロフェンを用いて発症前の2週齢と発症後3-4週齢のNna1 nullマウスの脳内に注入し運動失調に与える効果を調べる。

研究成果の概要(英文)：Nna1 Purkinje cell(PC) or granule cell (GC) cK0 mice were generated, respectively. PC Nna1 cK0 mice were smaller compared with control ones and began to exhibit ataxia around 20 days after birth. Although most PCs degenerated cell-autonomously by 4 weeks of age, mild motor learning dysfunction was detected in GC Nna1 cK0 mice. Apoptotic cells were present in the cerebellar GC layer of both PC and GC Nna1cK0 mice, indicating that non-cell-autonomous and cell-autonomous mechanisms coexist in GC death in pcd mice. Furthermore, elevated c-fos expression in the deep cerebellar nucleus and red nucleus of PC Nna1 cK0 mice caused motor neuron degeneration in the spinal cord, suggesting that loss of PC leads to excitotoxic motor neuron loss. Hindlimb muscles also expressed atrophy and elevated HSPB5 in PC Nna1cK0 mice, providing evidence that PC loss leads to secondary effects such as spinal motor neuron degeneration and muscle stress.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：Nna1 顆粒細胞 自律的/非自律的な細胞死 脊髄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

pcd マウスの運動失調は生後 3 週齢から始まり、6 週齢になるとほぼすべてのプルキンエ細胞が脱落するが、顆粒細胞死は 5 週齢から 6 週齢の間に見られる。申請代表者が作製・解析した *Nna1* null マウスも同様の表現型を示している。しかも、プルキンエ細胞死が *Nna1* の欠失による自律的な死であることを明らかにしている。さらに、*Nna1* は脱グルタミン酸酵素としても注目され、その機能の欠失は骨格蛋白 tubulin の C-末端におけるグルタミン酸の蓄積を誘発し、プルキンエ細胞死を引き起こす。一方、*Nna1* は小脳の顆粒細胞にも高発現しているが、pcd マウス由来小脳顆粒細胞でも Tubulin のグルタミン酸の蓄積が報告されている。*Nna1* の欠失による顆粒細胞の死亡とメカニズム、さらに運動失調を引き起こすかどうかは明らかではない。臨床研究では、pcd マウスはヒトの *Nna1* 異常病気のモデルとして、病態の解明と治療法の探索に有用である。

2. 研究の目的

本研究は、コンディショナルターゲティング技術を用いてプルキンエ細胞・顆粒細胞の *Nna1* cKO マウスをそれぞれ作出し、これまで注目されなかった顆粒細胞に焦点を当てて *Nna1* との関係性を解明し、運動失調の新たな要因を探求するものである。また、プルキンエ細胞と顆粒細胞を区別して遺伝子治療を行い、薬理的なアプローチも併せて *Nna1* 欠失による運動失調の臨床治療法を探るものである。

3. 研究の方法

3-1 cKOマウスの作製と行動実験

Nna1^{flox/flox} メスマウスは *Grin2b-cre* マウス (プルキンエ細胞特異的 cre マウス)、*Grin2C-iCre* マウスオスマウスとそれぞれ交配し、F1 で得られた *Nna1*^{flox/+} ; *Grin2b*^{+/cre}、*Nna1*^{flox/+} ; *Grin2C*^{+/iCre} マウスはさらに *Nna1*^{flox/flox} と交配し、*Nna1*^{flox/flox} ; *Grin2b*^{+/cre} (*Nna1* プルキンエ細胞特異的 cKO、*Nna1* PC cKO) および *Nna1*^{flox/flox} ; *Grin2C*^{+/iCre} (*Nna1* 顆粒細胞特異的 cKO、*Nna1* GC cKO) は解析対象となる。

さらに、運動学習実験及び小脳組織解析を行い比較する。役割を果たしている可能性がある。

3-2 細胞死の免疫組織学的分析

a) 週齢ごとに cKO マウスを用いて細胞死と関連する経路を調べ、死亡した細胞数と時期を分析し、細胞自律的、非自律的なメカニズムを明らかにする。

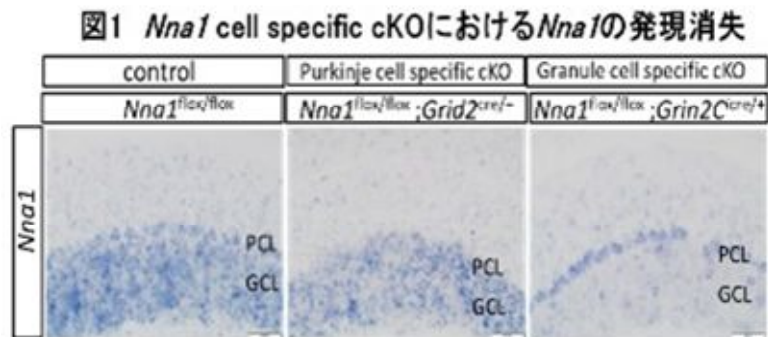
b) 神経回路の変化

プルキンエ細胞に入力する下橋核及びプルキンエ細胞から出力する小脳核、赤核の変化を *c-fos* の in situ hybridization で調べる。

4. 研究成果

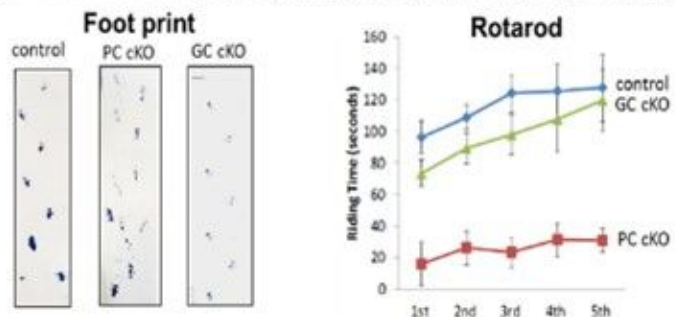
1) 図1は in situ hybridization 実験で検出した各 *Nna1* cKO マウスの小脳組織像であり、PC と GC 選択的に *Nna1* 欠失が確認できる。*Nna1* null マウスの表現型は *pcd* マウスと似ており、プルキン

エ細胞と顆粒細胞の特異的 cKO マウスにおいても協調運動と運動学習の障害が見られた。図2(左)で示すように、Purkinje cell specific cKO (PC cKO) マウスでは foot print から運動失調が見られた。図2(右)の Rotarod 実験では、GC cKO マウスでは協調運動に相違はみられなかったが、運動学習障害が見られた。すなわち、PC と GC は *Nna1* null マウスの運動失調において異なる役割を果たしている可能性がある。



工細胞と顆粒細胞の特異的 cKO マウスにおいても協調運動と運動学習の障害が見られた。図2(左)で示すように、Purkinje cell specific cKO (PC cKO) マウスでは foot print から運動失調が見られた。図2(右)の Rotarod 実験では、GC cKO マウスでは協調運動に相違はみられなかったが、運動学習障害が見られた。すなわち、PC と GC は *Nna1* null マウスの運動失調において異なる役割を果たしている可能性がある。

図2 *Nna1* cKOにおける運動失調と運動学習障害の発見



2) 細胞死の免疫組織学的分析

a) 週齢ごとに cKO マウス

を用いて細胞死と関連する経路を調べ、死亡した細胞数と時期を分析し、プルキンエ細胞死は細胞自律的、顆粒細胞死は自律と非自律的なメカニズムを共存していることが分かった(次のページ図3)。

b) 神経回路の変化

プルキンエ細胞に入力する下橋核及びプルキンエ細胞から出力する小脳核、赤核の変化を *c-fos* の in situ hybridization で調べた結果、3週齢の *Nna1* プルキンエ細胞 cKO マウスの方は高発現がみられた(次のページ図4)。

c) 脊髄におけるモーターニューロンの減少、大腿筋の萎縮がみられた(図5、6)。

図5 脊髄におけるモーターニューロンの減少

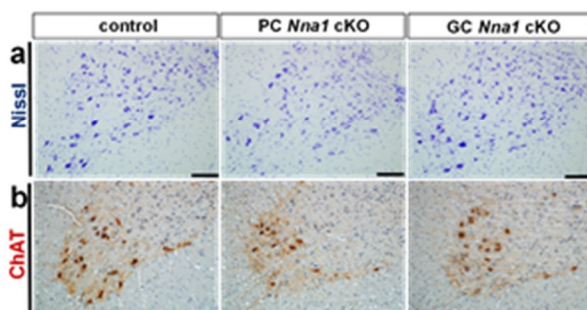


図6 筋肉の萎縮とHSP (Heat Shock Protein) の高発現

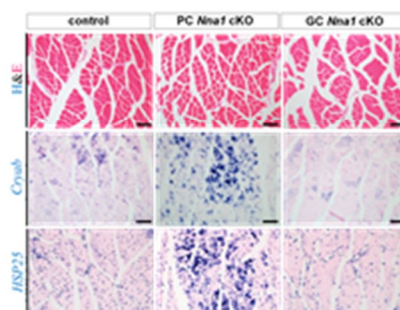


図3 顆粒細胞死はNna1 PC cKO およびGCcKOマウスに検出された

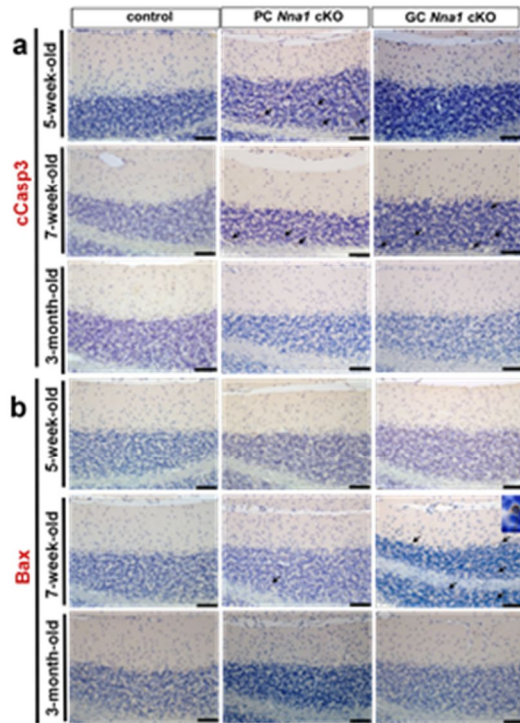
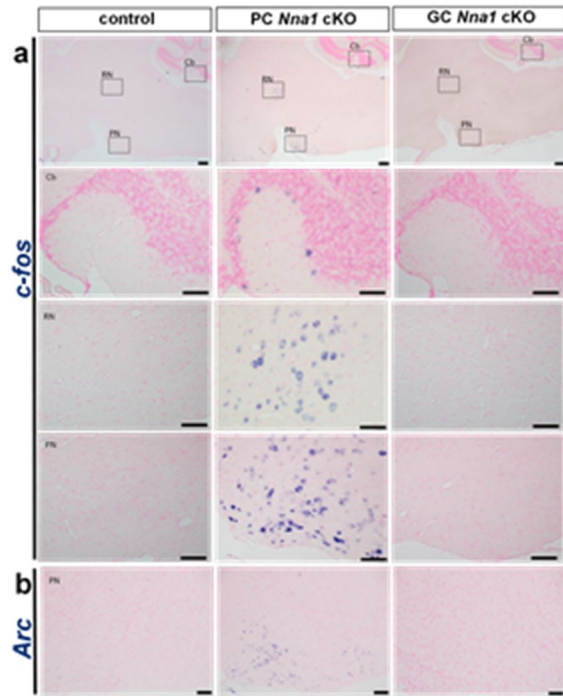


図4 c-fosとArcの陽性細胞は赤核、橋核、一部のプルキンエ細胞に検出された



結論

1. プルキンエ細胞特異的 Nna1 cKO は、Nna1 KO または PCD マウスと同様の表現型を示した。
2. プルキンエ細胞特異的 Nna1 cKO マウスはプルキンエ細胞の細胞自律的変性を示しましたが、pcd 小脳の GC 死には細胞自律的機構と非細胞自律的機構の両方が関連している。
3. プルキンエ細胞の喪失は、興奮毒性による脊髄運動ニューロン変性などの二次的な影響をもたらす。

参考文献

- Wang, T., Morgan J.I., 2007. The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res.* 1140, 26–40. (Wang T *Brain Res.* 2007)
- Zhou, L., Hossain, M.I., Yamazaki, M., Abe, M., Natsume, R., Konno, K., Kageyama, S., Komatsu, M., Watanabe, M., Sakimura, K., Takebayashi, H., 2018. Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. *J. Neurochem.* 147, 557-572. (Zhou et al., *J Neurochem.*, 2018)
- Zhou, L., Araki, A., Nakano, A., Sezer, C., Harada. T., 2006. Different types of neural cell death in the cerebellum of the ataxia and male sterility (AMS) mutant mouse. *Pathol. Int.* 56, 173–180.
- Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M.M., Bosc, C., Deloulme, J.C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N.D., Lacroix, B., Bosch Grau, M., Bec, N., Larroque, C., Desagher, S., Holzer, M., Andrieux, A., Moutin, M.J. Janke, C., 2010. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564–578. (Zhou et al., *Patho. Int.*, 2006)
- Kalinina, E., Biswas, R., Berezniuk, I., Hermoso, A., Aviles, F.X., Fricker, L.D., 2007. A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J.* 21, 836–850.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Norihisa Bizen, Asim K Bepari, Li Zhou, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Katsuhiko Ono, Hirohide Takebayashi	4. 巻 Jan 1
2. 論文標題 Ddx20, an Olig2 binding factor, governs the survival of neural and oligodendrocyte progenitor cells via proper Mdm2 splicing and p53 suppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death Differentiation	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41418-021-00915-8.	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hirohide Takebayashi, Li Zhou, Bizen Norihisa, Nozomu Yoshioka, Maya Yamazaki, Rie Natsume, Manabu Abe, Kenji Sakimura
2. 発表標題 Nna1 deletion in Purkinje cells results in cerebellar ataxia and spinal motoneuron degeneration
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
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
研究分担者	吉岡 望 (Yoshioka Nozomu) (20708375)	新潟大学・研究推進機構・助教 (13101)	
研究分担者	竹林 浩秀 (Takebayashi Hirohide) (60353439)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	中務 胞 (Nakatukasa Ena) (60641579)	新潟大学・脳研究所・助教 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	崎村 建司 (Sakimura Kenji) (40162325)	新潟大学・脳研究所・フェロー (13101)	

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