

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700374

研究課題名（和文）小脳失調マウスの遺伝子治療における開始時期に伴う治療効果と神経可塑性の検討

研究課題名（英文）

Investigation of curative effect and the neuroplasticity with the start time in the gene therapy of the cerebellar ataxic mouse

研究代表者

飯塚 朗 (IIZUKA AKIRA)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10466683

研究成果の概要（和文）：

小脳脊髄変性症1型（SCA1）と関連が指摘されている ROR $\alpha$  の突然変異ミュータントである小脳失調マウス、staggerer マウスを用いて、遺伝子治療の開始時期に伴う治療効果の検討を行った。生後1、2、3週齢の staggerer マウスに野生型の ROR $\alpha$  をレンチウイルスを用いて発現させたところ、生後2週齢以降では、形態、行動レベルのいずれも回復は見ることができなかったものの、1週齢では、行動レベルまで大きな回復効果を示した。

研究成果の概要（英文）：

Lentiviral vectors expressing ROR $\alpha$  were injected into the cerebellar cortex of P6, P13 or P20 staggerer mice, and the effects were studied 3 weeks after the injection. Staggerer mice lentivirally treated at P6 showed marked dendritic differentiation of PCs and removal CF synapses from PCs, whereas those lentivirally treated at P13 displayed only a partial rescue of dendritic differentiation and failure of removal of CF synapses from PCs. No rescue was observed in staggerer mice lentivirally treated at P20. Together with evidence that protein expression in the brain starts about 5 days after lentiviral vector injection, these results suggest that staggerer mutant cerebellum maintains potential to respond to ROR $\alpha$  at 2nd postnatal week, but loses almost completely at 4th postnatal week.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：遺伝子治療

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：遺伝子治療、プルキンエ細胞、レンチウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 小脳失調ミュータントである staggerer マウスは、小脳プルキンエ細胞の発達異常を原因とした平行線維シナプス形成障害などの小脳の回路形成不全を呈し、結果、運動機能の重篤な障害を生じさせる。staggerer の原因遺伝子 ROR $\alpha$  と脊髄小脳変性症 1 型 (SCA1) の原因遺伝子 Ataxin1 の関連が指摘され、また、staggerer と SCA1 のモデルマウスの小脳における遺伝子発現障害パターンも極めて酷似しているため、staggerer と SCA1 の異常の原因は分子レベルで共通している。このことから、staggerer マウスは、SCA1 の遺伝子治療の知見を得るためのモデルマウスとして使用できると考えた。

(2) 小脳、特にプルキンエ細胞は、生後もその樹状突起を発達させ、多くの細胞とシナプスを形成、または除去を行って運動制御の神経回路を完成させていく。しかし、回路形成が、いつまでに形成されなければならないか、その臨界期はよくわかっていない。また、小脳発達の形成の臨界期が明らかになれば、小脳失調の回復可能期間が同定され、SCA1 だけでなく多くの小脳失調が、どの時期までに遺伝子導入を行えば効率的に回復するかを明らかにできる。

## 2. 研究の目的

(1) staggerer マウスに野生型の ROR $\alpha$  を発現させることで小脳失調を回復させ、SCA1 の遺伝子治療のための知見を得ることを目的とした。

(2) ROR $\alpha$  を発現させる時期を発達期から性成熟期まで遅らせ、小脳回路の形成可能な期間を同定することで、運動制御に関わる小脳の回路形成の臨界期をも明らかにする

## 3. 研究の方法

### 生後 1 週齢 staggerer 小脳への ROR $\alpha$ 発現レンチウイルスベクターの接種

小脳プルキンエ細胞に効率的に ROR $\alpha$  を発現させるため、MSCV プロモーター制御下で働く GFP と共発現する ROR $\alpha$  を組み込んだコンストラクトを作成し、そのコンストラクトを用いてレンチウイルスベクターを作成した。吸入麻酔剤イソフルラン麻酔下で、小脳の第 6 小葉直上のクモ膜下腔にハミルトンシリッジの先端を置き、ウルトラマイクロポンプでウイルスを 1 週齢には 5 $\mu$ l を 15 分、2, 3 週齢には 10  $\mu$ l を 30 分かけて接種した。

### staggerer プルキンエ細胞への野生型 ROR $\alpha$ レスキューによる運動失調回復の検討

ウイルスベクター接種 3 週間後、運動失調の程度を評価するためロータロッドテストを行った。ロッドの回転速度は、3 分間で 40 回転になる加速で協調運動を、1~5 回転/分の定速で運動学習能力を評価した。また、ロータロッドテスト後に、Footprint も試行した。プルキンエ細胞における ROR $\alpha$  の発現は、電気生理の蛍光顕微鏡下で確認し、発現していない個体のデータは、非発現群としてインターナルコントロールとして対照群とした。

### ウイルス接種 staggerer プルキンエ細胞の電気生理学的解析

GFP 発現—野生型 ROR $\alpha$  遺伝子の発現細胞に対し、プルキンエ細胞の樹状突起の伸長がレスキューされているのかをスライスパッチクランプ法によりプルキンエ細胞の膜容量を測定して評価した。さらに、Staggerer のプルキンエ細胞の興奮性シナプスにおいては、平行線維シナプスの形成障害があり、また、多重登上線維シナプスの除去障害もあることから、これらの障害も回復するのかを平行線維—、登上線維—プルキンエ細胞後シナプス電流を計測し、確認した。

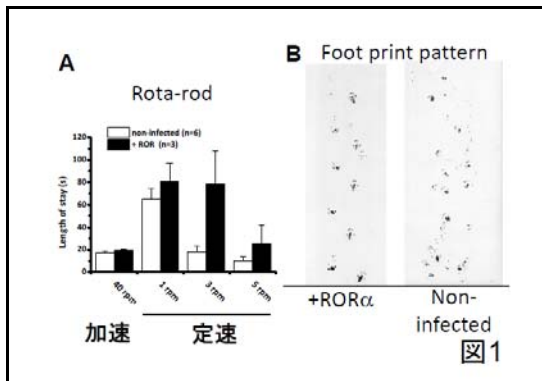
### ウイルス接種 staggerer プルキンエ細胞の樹状突起の形態解析

電気生理に使用した小脳スライスは、形態解析に利用するため 4% パラホルムアルデヒドで浸透固定し、免疫組織化学的解析に使用した。また、電気生理解析の際に、Biocytin ラベルされた細胞は、蛍光色素が標識されたストレプトアビジンにより可視化し、樹状突起の形態解析に使用した。これらの標本は、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

#### 4. 研究成果

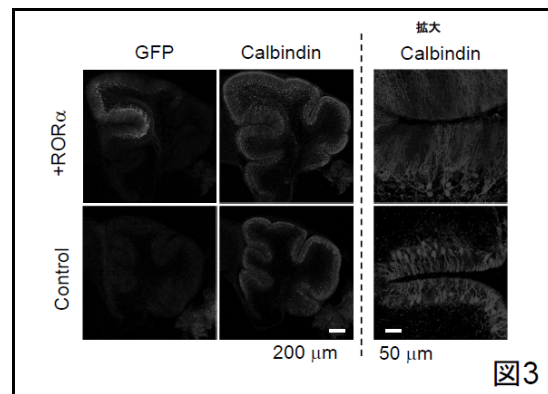
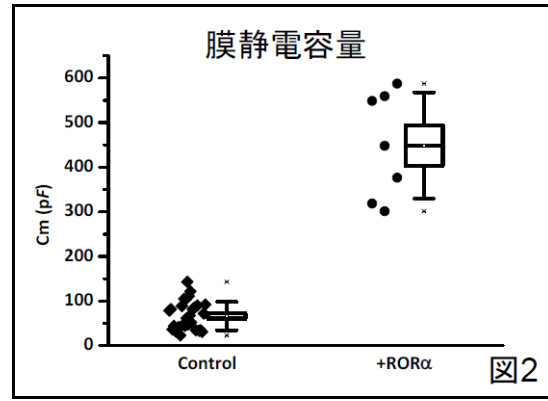
##### プルキンエ細胞ROR $\alpha$ 発現による運動失調の回復

生後一週齢のマウスにウイルス接種を行った3週間後にローターロッドテストを行ったところ、ROR $\alpha$ -GFP発現群と非発現群(対照群)の比較において、定速で運動能力の回復を示した(図1a)。また、フットプリントテストにおいても、対照群は蛇行していたのに対し、発現群では直線的な歩様が確認された(図1b)。



##### プルキンエ細胞の樹状突起発達の回復

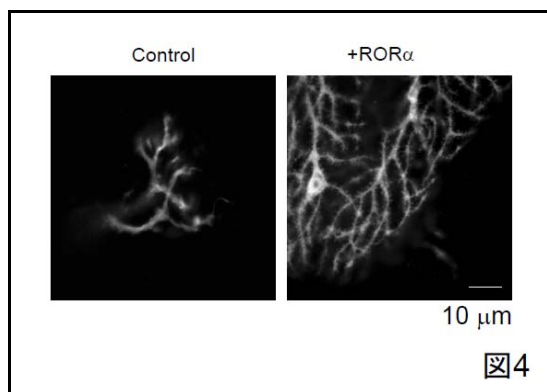
ホールセルパッチクランプ法を用いて、GFP発現プルキンエ細胞の膜静電容量を計測したところ、対照群のプルキンエ細胞に比べ、有意に増大していた(図2)。また、GFPを発現していた動物におけるGFP非発現細胞との比較についても、有意差が認められた(data not shown)。電気生理で使用した矢状断面スライスを観察したところ、対照群や非発現部位に比べ、GFP発現部位で分子層が顕著に増大していることが確認された(図3)。また、プルキンエ細胞マーカー、カルビンディンの抗体による免疫染色像は、未接種群のプルキンエ細胞の樹状突起は、未発達な短いものであるのに対し、接種群のGFP陽性細胞では、長く発達した樹状突起を示した(図3右列)。



##### 平行線維—プルキンエ細胞シナプス形成の回復

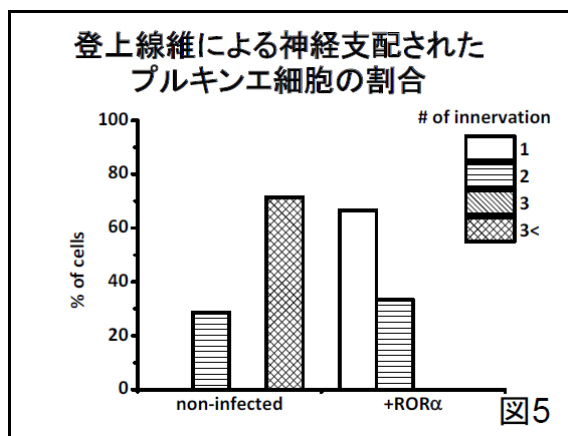
Staggererマウスのプルキンエ細胞では、平行線維とのシナプス形成が障害され、その興奮性後シナプス後電流(EPSC)がほとんど観察されないことが知られている。我々は、ホールセルパッチクランプ法を用いてGFP発現細胞の平行線維—プルキンエ細胞(PF-PC)EPSCを計測した。対照群では、PF-PC EPSCが確認されたのは7%であったのに対し、GFP発現細胞では86%の細胞で平行線維からの興奮性入力認められた。また、電気生理の際にBiocytinを注入した細胞を可視化し、観察したところ対照群の樹状突起の先端では、棘突起がほとんど認められなかったのに対し、GFP発現細胞では樹状突起上に多数の棘突起が認められた(図4)。さらに、PF-PCシナプスマーカーであるグルタミン酸受容体delta2で免疫染色をおこなったところ、GFP

発現部位特異的にそのシグナルが認められた。



### 多重登上線維によるプルキンエ細胞の神経支配からの回復

次に staggerer マウスで観察される多重登上線維によるプルキンエ細胞の神経支配の除去障害について、ホールセルパッチクランプ法を用いて ROR $\alpha$  発現細胞を観察した。通常、成体 staggerer マウスのプルキンエ細胞においては、ほとんどの細胞で2-6本の登上線維からの神経支配を受けているのに対し、GFP 発現細胞では7割の細胞で単独神経支配、残り3割についても2本からしか神経支配を受けていなかった。(図5)。



### 2, 3 週齢マウスのウイルス接種による小脳失調回復

2, 3 週齢の staggerer マウスにウイルス接種を行い、三週間後に Rota-rod テストを行い運動失調の回復を評価した。2 週齢接種で

は、定速の一部について若干の回復が見られるものの、3 週齢接種では、まったく回復が見られなかった。さらに、GFP 発現細胞の細胞膜静電容量をパッチクランプ法にて観察したところ、2 週齢接種では 1 週齢接種の半分程度しか回復しておらず、3 週齢接種では、未接種の同腹子と変わらない値を示していた。

### 2, 3 週齢マウスへのウイルス接種によるプルキンエ細胞 ROR $\alpha$ 発現

2 週齢接種、3 週齢接種の発現部位を確認したところ、少数のプルキンエ細胞も GFP が発現させているものの、そのほとんどが小脳の白質部位であった。この点を修正すべく、ウイルスベクターをレンチウイルスよりも力価が高い AAV に変え、また、プルキンエ細胞特異的なプロモーターである L7 プロモーターに載せ替え、再度同じ実験を試みたが発現が弱く 1 週齢においても行動の回復が見られなかった。

### 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 1 件)

①Shuvaev AN, Horiuchi H, Seki T, Goenawan H, Irie T, Iizuka A, Sakai N, Hirai H. 「Mutant PKC $\gamma$  in spinocerebellar ataxia type 14 disrupts synapse elimination and long-term depression in Purkinje cells in vivo.」 J Neurosci. 2011 Oct 5;31(40):14324-34. 査読有

[図書] (計 1 件)

①Hirokazu Hirai and Akira Iizuka InTech 「Gene Therapy Applications Chapter 22: (Recent Developments in Gene Therapy Research Targeted to Cerebellar Disorders)」. pp22/484. 2011

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://synapse.dept.med.gunma-u.ac.jp/index.html>

## 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・助教  
研究者番号：10466683

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：