

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590407

研究課題名(和文) 脊髄小脳変性症各型共通メカニズムの同定

研究課題名(英文) Determination of common mechanisms shared by multiple types of spinocerebellar ataxia

研究代表者

中村 和裕 (NAKAMURA, KAZUHIRO)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10327835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：複数のポリグルタミン病に共通する伸長したポリグルタミン鎖そのものによる小脳変性への寄与を調べることを目的とした。69個のポリグルタミン鎖を小脳プルキンエ細胞、網膜特異的に発現するトランスジェニックマウス(polyQマウス)では生後2週の段階でポリグルタミン凝集体がプルキンエ細胞に見られ、生後3か月の段階でプルキンエ細胞および網膜神経細胞の広範な脱落がみられた。また、微小管を安定化する薬剤をpolyQマウスに投与することにより、小脳の一部でプルキンエ細胞死の割合が減少したことから、polyQマウスにおけるプルキンエ細胞死の機序の一部に微小管に対する作用が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Among various types of the spinocerebellar ataxia, autosomal-dominantly inherited polyglutamine diseases are the most frequent types and are caused by the expansion of a CAG trinucleotide repeat in the coding region of causative genes. Because expanded polyglutamine tract is shared by multiple types of polyglutamine diseases, I tried to look for the contribution of expanded polyglutamine itself to neurodegeneration. I produced transgenic (Tg) mice that overexpress 69 repeated glutamine in cerebellar purkinje cells (PCs). The polyglutamine aggregates were seen as early as 2 weeks old, and extensive PC loss was observed at 3 months old in the Tg mice. An observation that injection of a drug that stabilizes microtubule into the Tg mice reduced the number of PC death in some lobules in the cerebellum might suggest involvement of microtubule in PC death seen in polyglutamine diseases.

研究分野：神経生理学

キーワード：ポリグルタミン病

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は主に常染色体優性遺伝形式を示し、1-2万人に1人の割合で発症する。これまでに原因遺伝子の染色体上の位置により1型から31型までに分類されている。脊髄小脳変性症を含むポリグルタミン病それぞれの原因蛋白はいずれもポリグルタミン伸長鎖を有する。一般的に脊髄小脳変性症を含む神経変性疾患の病態にはloss of normal function (正常機能の喪失)とtoxic gains of function (有害機能の獲得)の両方が寄与するが、ポリグルタミン病においてはtoxic gains of functionがloss of normal functionよりもより優位に病態に寄与していると言われている。

私はポリグルタミン病の型共通のtoxic gains of functionが存在し、それは伸長したポリグルタミン鎖そのものであると考えている。その仮説を私が持つに至った根拠は、第1にin vitroの実験で、原因遺伝子の配列を持たない純粋なポリグルタミン鎖を培養細胞に発現させたところポリグルタミン鎖の長さ依存性に封入体の形成が観察されたという事。第2に69個のポリグルタミン鎖のN末側に4個、C末側に42個のataxin3 (脊髄小脳変性症3型の原因遺伝子)由来のアミノ酸しか持たず、ポリグルタミン鎖よりN末側286個のataxin3のアミノ酸を欠損するトランスジーンを強制発現させたトランスジェニックマウスは、早期より小脳変性、失調をきたす事。このマウスの表現型は機能ドメインを欠損するataxin3分子に由来するものと考えるよりは69個のポリグルタミン鎖そのものによってもたらされていると考えるほうが自然であるからである。

### 2. 研究の目的

本研究においては、小脳プルキンエ細胞および網膜特異的に、原因遺伝子を持たない純粋な伸長ポリグルタミン反復配列を発現するマウス(polyQ-Tg)を作成し、両細胞における神経細胞死を観察すること、また、その神経細胞死のメカニズムを解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) (polyQ-Tg)を作成するにあたって、トランスジーンは小脳プルキンエ細胞および網膜特異的な発現を示すL7プロモーターを使い、P2Aで連結することにより、EGFPと69個のグルタミン反復配列(69Q)を同時に発現させるコンストラクトとした(図1A)。

(2)L7プロモーター支配下に27個あるいは69個のグルタミン反復配列を持つアデノ随伴ウイルスコンストラクトを正常マウス小脳にインジェクションし、プルキンエ細胞死を調べた。

(3) 生後1か月の正常マウスとpolyQトラン

スジェニックマウス小脳からtotal RNAを抽出し、マイクロアレイ解析を東レで行った。

(4) epothilone D(EpoD)(30 nM)またはその溶媒を生後3週から11週まで週1回polyQトランスジェニックマウスに腹腔内投与し、生後11週に解析を行った。

### 4. 研究成果

生後1か月のpolyQトランスジェニックマウス小脳切片においてプルキンエ細胞特異的なGFPおよびポリグルタミン(1C2)の発現を認めた(図1B)。

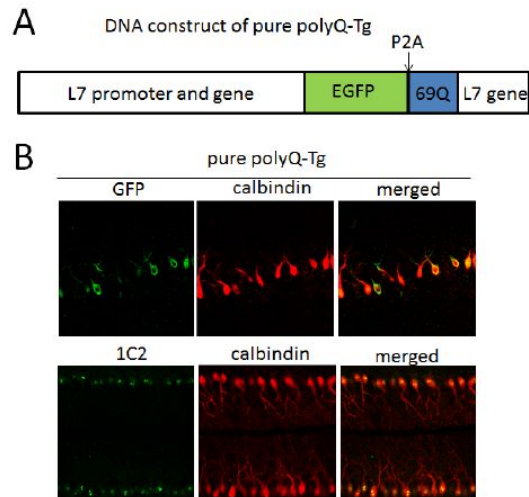


図1 polyQトランスジェニックマウスの作成 (A)トランスジーンのコストラクト。(B)生後1か月polyQトランスジェニックマウス小脳切片のGFP抗体およびカルビンジン抗体またはポリグルタミン(クローン1C2)抗体およびカルビンジン抗体を使った2重染色像。

生後1か月の段階においては小脳プルキンエ細胞の形態に大きな異常を認めなかったが、生後4か月のpolyQトランスジェニックマウスでは小脳の大きさが正常マウスに比べ極端に小さく(図2A左)Klüver-Barrera(KB)染色強拡大像において、広範なプルキンエ細胞の脱落を認めた(図2A右)。トランスジェニックマウス以外の系でポリグルタミンによるプルキンエ細胞死誘導を確かめるために、アデノ随伴ウイルスにより27個あるいは69個のグルタミン反復配列を小脳プルキンエ細胞に発現させた正常マウスをカルビンジン抗体により染色したところ、69個のグルタミン反復配列特異的なプルキンエ細胞死を観察した(図2B)。また、生後1年以上のpolyQトランスジェニックマウスでは網膜の厚さが正常マウスに比して薄くなっていた(図2C)。

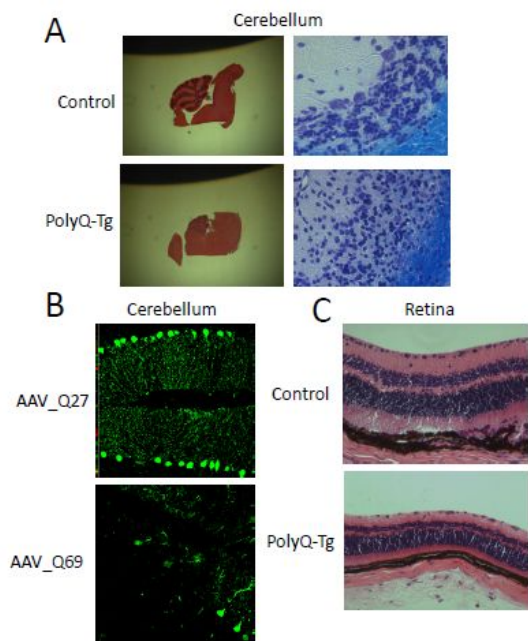


図2 伸長ポリグルタミンによるマウス神経細胞死

(A) 生後4か月の正常マウスとpolyQトランスジェニックマウス小脳のHE弱拡大像(左)とKB強拡大像。

(B) アデノ随伴ウイルスにより27個あるいは69個のグルタミン反復配列を小脳プルキンエ細胞に発現させた正常マウスのカルピンジン抗体染色像。

(C) 生後1年以上の正常マウスとpolyQトランスジェニックマウス網膜のHE染色像。

polyQトランスジェニックマウス神経細胞死の機序として、全般的な転写機能不全を考え、生後1か月のマウス小脳を用いてマイクロアレイ解析を行った。図3に示すように正常マウスに比べてpolyQトランスジェニックマウスにおいて発現量が高い遺伝子群と低い遺伝子群はほぼ同数あり、全般的な転写機能不全の可能性は高くないようだった。

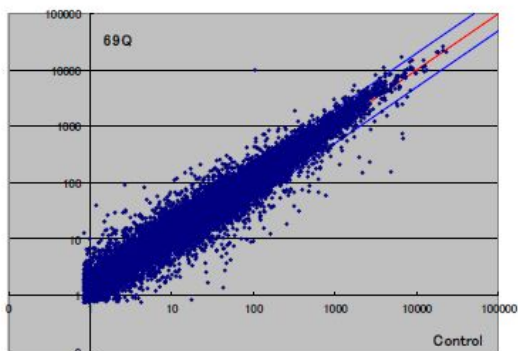


図3 生後1か月の正常マウスとpolyQトランスジェニックマウス小脳RNA間のマイクロアレイ比較図。赤線、青線はそれぞれ両者の発現量が1:1、1:2(2:1)を示す。

興味深い事に pcd 変異マウスでは polyQ トランスジェニックマウスと同様に広範なプルキンエ細胞の脱落が見られる。pcd 変異マウスではチュープリンの翻訳後修飾の異常が見られるため、polyQ トランスジェニックにおいて微小管の異常がマウス神経細胞死の原因の一部である可能性を追求した。

生後3週から11週まで週1回微小管を安定化する薬剤 epothilone D (EpoD) またはその溶媒を腹腔内投与した polyQ トランスジェニックマウスの小脳切片をカルピンジン抗体により染色し(図4A)、lobule ごとにプルキンエ細胞の数を定量したところ、Lobule3,9においてEpoD投与群で有意に残存プルキンエ細胞数が多かった(図4B)。つまり polyQ マウスにおけるプルキンエ細胞死の機序の一部に微小管に対する作用が関与している可能性が示唆された。

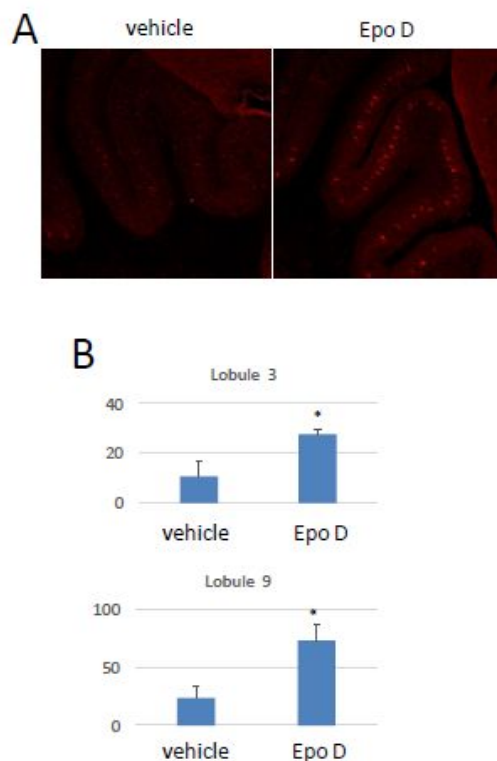


図4 polyQトランスジェニックマウスプルキンエ細胞死に対するepothilone D(EpoD)の効果。

生後3週から11週まで週1回EpoDまたはその溶媒を腹腔内投与したpolyQトランスジェニックマウスの小脳切片をカルピンジン抗体により染色し(A)、lobuleごとにプルキンエ細胞の数を定量した。Lobule3,9においてEpoD投与群で有意に残存プルキンエ細胞数が多かった(B)。\*P < 0.05。

## 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3件)

1 Okonogi N, Nakamura K, Suzuki Y, Suto

N, Suzue K, Kaminuma T, Nakano T, Hirai H. Cranial Irradiation Induces Bone Marrow-derived Microglia to the Adult Mouse Brain Tissue. *J. Radiat. Res.* 査読有、55, 2014, 713-719. DOI: 10.1093/jrr/rru015.

<sup>2</sup> Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H. Mesenchymal stem cells ameliorate cerebellar pathology in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum*, 査読有、13, 2014, 323-330. DOI: 10.1007/s12311-013-0536-1.

<sup>3</sup> Takechi Y, Mieda T, Iizuka A, Toya S, Suto N, Takagishi K, Nakazato Y, Nakamura K, Hirai H. Impairment of spinal motor neurons in spinocerebellar ataxia type 1-knock-in mice. *Neurosci. Lett.* 査読有、535, 2013, 67-72. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.057.

〔学会発表〕(計3件)

<sup>1</sup> 中村 和裕、平井 宏和 遺伝性脊髄小脳変性症1型ノックインマウスにおける末梢神経障害 第3回国際放射線神経生物学会 沖縄 2013年1月25 - 26日

<sup>2</sup> 小此木範之、中村和裕、鈴木義行、神沼拓也、須藤奈々、中野隆史、平井宏和 頭部への局所照射とBone Marrow Derived Microglia(BMDM)の誘導 第3回国際放射線神経生物学会 沖縄 2013年1月25 - 26日

<sup>3</sup> Okonogi N, Nakamura K, Suzuki Y, Suto N, Kaminuma T, Nakano T and Hirai H. (2012) Cranial Irradiation Induces Migration of Bone Marrow Derived Microglia (BMDM) to the Cerebellum in Adult C57BL/6 Mice. The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology 54th annual meeting. Boston, Oct 28-Nov 1.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

伊古田勇人 (Ikota, Hayato)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 90420116