

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800008

研究課題名(和文) 遺伝性脊髄小脳変性症1型のシナプス病態の解明

研究課題名(英文) Analysis of synapse pathology underlying the spinocerebellar ataxia

研究代表者

Anton Nicolaevic (Shuvaev, Anton)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30633771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳変性症は根本的な治療法のない難病である。遺伝性の脊髄小脳失調症1型(SCA1)の原因遺伝子は最初に見つけられたこともあり、最も病態解明が進んでいるが、未だ治療に結びついてはいない。本研究で、SCA1モデルマウスの小脳病態を解析し、シナプス伝達の異常を見出した。さらに、薬剤で障害されているシナプス伝達を強めると、小脳の運動学習能力が向上した。本研究によりSCA1の薬物治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Staggerer mutant mice, which show severe cerebellar ataxia, are caused by functional loss of a nuclear transcription factor, retinoid-related orphan receptor alpha (RORalpha) and exhibit complete loss of metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1)-mediated signaling in Purkinje cells. It has been shown that model mice of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1 mice) express significantly lower levels of RORalpha in Purkinje cells and therefore, we hypothesized that mGluR signaling was impaired also in SCA1 mice. Our electrophysiology experiments revealed significant defects of mGluR signaling in SCA1 mice. Moreover, a pharmacological treatment that enhanced mGluR signaling improved cerebellar motor learning in SCA1 mice. These results suggest the potential therapeutic intervention for SCA1 patients through mGluR1.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：spinocerebellar ataxia cerebellum Purkinje cell glutamate receptor patch clamp

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症の患者(特定疾患医療受給者)は、25,000人あまりで、1980年の15倍以上に増加している。脊髄小脳失調症1型(SCA1) SCA1の原因遺伝子は1993年に同定された(Orr et al. Nat. Genet. 1993)。最初に見つけられたこともあり、最も病態解明が進んでいるが、未だ治療に結びついてはいない。

小脳皮質において、平行線維終末や登上線維終末から放出されたグルタミン酸の80%以上はすみやかにグリブ型グルタミン酸トランスポーター(GLAST)を介して取り除かれるが(Takayasu et al, Acta Physiol, 197, 1-12, 2009) GLAST(-/-)マウスにおいてプルキンエ細胞で記録される興奮性シナプス後電流(EPSC)のkineticsには有意な変化は見られない。しかしながら、AMPA受容体の脱感作を抑制するcyclothiazide (CTZ)存在下では、野生型よりGLAST(-/-)マウスにおいてEPSCの減衰キネティクスがより顕著に延長した(Takayasu et al, J Neurosci, 25, 8788-93, 2005)。

SCA1ノックインマウスは生後7週までは野生型マウスと見分けがつかないが、ロータロッドで詳しく調べると5週の時点ですでに野生型と運動能力に差が見られる(Watase et al, Neuron, 34: 905-19, 2002)。生後1週の時点で小脳皮質のバグマングリアの数は野生型の80%であり、バグマングリアに局在するGLASTの発現量も著しく低下している(Shiwaku et al, EMBO J, 29, 2446-60, 2010)。生後6-11週のSCA1ノックインマウス小脳スライスを用いたパッチクランプ実験において、平行線維-プルキンエ細胞及び、登上線維-プルキンエ細胞シナプスで記録されるEPSCのkineticsは野生型と有意な差は見られない(Watase et al, Neuron, 34: 905-19, 2002)。

このようにSCA1モデルマウスにおいて、プルキンエ細胞における通常のシナプス伝達には影響が見られないが、運動能力試験の結果が下がっていることから、詳しく解析するとシナプス伝達に異常が見られる可能性がある。

2. 研究の目的

SCA1モデルマウスの小脳プルキンエ細胞におけるシナプス病態を解明し、治療への手がかりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

プルキンエ細胞に変異ataxin-1を発現するSCA1トランスジェニック(Tg)マウスとSCA1ノックインマウスから小脳スライスを作成し、パッチクランプ法で平行線維-プルキンエ細胞シナプス伝達、登上線維-プルキンエ細胞シナプス伝達を解析した。運動障害が出現する以前の3週零、運動障害が出現する5週零、および運動障害が増強する12週

零のマウスを用いて解析した。

4. 研究成果

生後3週のSCA1Tgマウス(B05マウス)は野生型マウスと差は見られなかったが、生後5週以降のSCA1Tgマウスでは以下に示す3つのmGluRシグナル異常が観察された。

(1) 平行線維-プルキンエ細胞間の遅いシナプス伝達(Slow EPSC)の異常

平行線維を高頻度刺激すると、プルキンエ細胞のmGluR1が活性化され、TRPC3という陽イオンチャンネルが開く。このシナプス伝達は、グルタミン酸受容体を介するシナプス伝達により、かなり遅れて起こるので遅いシナプス伝達と呼ばれる。パッチクランプ法ではslow EPSCとして観察される。

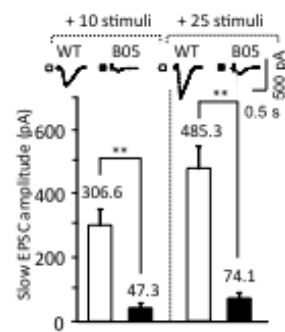


図1 生後5週のB05マウスは有意なslow EPSC振幅の減少を示した。

(2) 内因性カンナビノイドを介するシナプス前抑制(SSE)

平行線維を高頻度で刺激すると、プルキンエ細胞のmGluR1が活性化される。mGluR1活性化によりプルキンエ細胞内にエンドカンナビノイドが産生される。エンドカンナビノイドは逆行性に平行線維に作用し、平行線維終末からのグルタミン酸の放出を抑える。これを逆行性のシナプス前抑制(Synaptically evoked suppression of excitation: SSE)という。

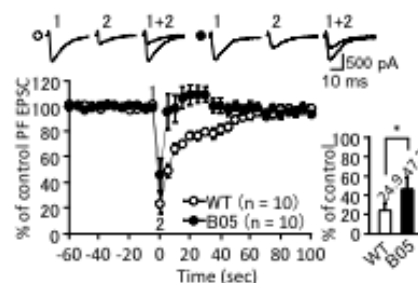


図2 生後5週のB05マウスは有意なSSEの障害を示した。

(3) 平行線維-プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象(LTD)誘導の障害

LTDは運動学習に重要な役割を果たす。

mGluR1 活性化を介するタンパク質リン酸化酵素 C (PKC) による AMPA 型グルタミン酸受容体のリン酸化と、それに続く AMPA 型グルタミン酸受容体のエンドサイトーシスが分子基盤である。mGluR1 の活性化が障害されると LTD が誘導されないことを示す論文が数多くある。

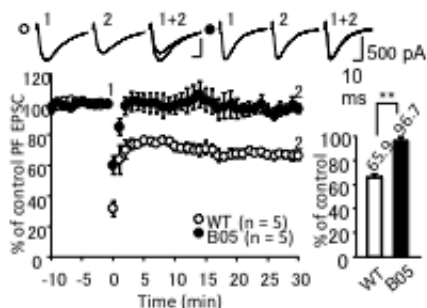


図3 生後5週のB05マウスはLTD誘導が障害されている。

そこでアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて生後5週のSCA1Tgマウスのプルキンエ細胞にmGluR1を発現させ、mGluRシグナルを補ったところ、生後12週の時点で有意に運動失調は軽く、slow EPSCとSSEについても障害が軽度であった。同様のmGluRシグナル障害はSCA1ノックインマウスにおいても観察された。さらにmGluRシグナルを増強させる薬剤を、SCA1Tgマウスに投与したところ、有意な運動学習能力の向上が認められた。

本結果は、SCA1の効果的な薬剤治療の可能性を示しており、国内外に大きなインパクトを与えると考えられる。今後、運動学習にどのように薬剤が関与しているのか、至適濃度はどの範囲なのかについて研究を行う。

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2件)

(査読有り)

Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H. Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells. *Cerebellum* 2014 Feb;13(1):29-41.

(査読有り)

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* 2013 Nov 17. [Epub ahead of print]

[学会発表](計8件)

Konno A, Shuvaev AN, Yanagi S, Hirai H. Perturbation of mGluR signaling in SCA3 model mice expressing mutant ataxin-3 and the rescue by intravascular administration of AAV9. 23rd Neuropharmacology Conference 11/7-8/2013 サンディエゴ

Konno A, Shuvaev AN, Yanagi S, Hirai H. Disruption of mGluR signaling in SCA3 model mice expressing mutant ataxin-3 and the partial restoration via intravenous administration of AAV9. Neuroscience 2013 11/9-13/2013 サンディエゴ

Shuvaev AN. Disruption of metabotropic glutamate receptor signaling in Purkinje cells expressing a lentivirally transduced mutant SCA1. 第19回日本遺伝子治療学会学術集会 7/4-6-2013 岡山(発表日7/5)

Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H. Disruption of metabotropic glutamate receptor signaling and rescue through intravascular administration of AAV9 in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. 第19回日本遺伝子治療学会学術集会 7/4-6-2013 岡山(発表日7/5)

Shuvaev AN, Sato Y, Goenawan H, Yanagihara D, Hirai H. Disruption of metabotropic glutamate receptor signaling in Purkinje cells expressing a lentivirally transduced mutant SCA1 gene. Neuro2013 6/20-23/2013 Kyoto (発表日6/21)

今野 歩, Shuvaev AN, 三宅 紀子, 三宅 弘一, 柳 茂, 島田 隆, 平井 宏和. 脊髄小脳変性症3型マウスモデルにおけるmGluR1の機能不全とAAV9を用いた遺伝子治療によるその機能回復. Neuro2013 6/20-23/2013 京都(発表日6/20)

今野歩, Shuvaev AN, 三宅紀子, 三宅弘一, 柳 茂, 島田隆, 平井 宏和. AAV9の

静脈注射による脊髄小脳変性症3型モデルマウスへの遺伝子治療の試み. 第35回日本神経科学大会 名古屋 9/18-21/2012 (発表日 9/19/2012)

Shuvaev AN, Yamato S, Hanna Goenovan, Yanagihara D, Hirai H. Impairment of metabotropic glutamate receptor signaling in mouse Purkinje cells expressing a mutant gene of spinocerebellar ataxia type1. 第35回日本神経科学大会 名古屋 9/18-21/2012 (発表日 9/18/2012)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

アントン ニコラビッチ (Anton Nicolaevic)

群馬大学・大学院医学系研究科・研究員
研究者番号: 30633771

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし