

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25282241

研究課題名(和文) リソソーム蓄積を標的としたSCA6の治療法開発

研究課題名(英文) Lysosomal PolyQ accumulation as a target for treatment of SCA6

研究代表者

渡瀬 啓 (Watase, Kei)

東京医科歯科大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：30376800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症6型は本邦に多い神経変性疾患で小脳の神経細胞が徐々に脱落し運動機能が低下します。SCA6患者ではアミノ酸の1種であるグルタミンの繰り返し配列(ポリグルタミン)が異常に伸長した分子が産生され、次第に細胞内のリソソームに蓄積することが知られていましたが、神経細胞変性に至るメカニズムは不明でした。本研究では脊髄小脳失調症6型の病態に、神経炎症が関与することを初めて示すとともにミクログリア細胞の活性を抑えることで脊髄小脳失調症6型モデルマウスの初期病態を軽減させることに成功しました。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) is a neurodegenerative disease characterized by a slowly progressive loss of cerebellar Purkinje cell and motor impairments. In SCA6, a protein containing an expanded polyglutamine stretch gradually accumulates in the cerebellar Purkinje cells but the molecular mechanisms leading to neurodegeneration remains largely elusive. In this study, we have shown that neuroinflammation is involved in the pathogenesis of SCA6. More importantly, by modulating the activation of microglial cells in the cerebellum of a faithful mouse model of SCA6, we succeeded in ameliorating their neurodegenerative phenotypes in the early disease phase.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：脊髄小脳変性症6型 ポリグルタミン プルキンエ細胞 神経炎症 リソソーム カルシウムチャンネル ミクログリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SCA6 は本邦の優性遺伝性 SCA の約 30% を占め、頻度が高く、社会的ニーズが高い疾患である。変異アレルでは $Ca_v2.1$ チャンネル遺伝子のエクソン 47 に存在する CAG リピートが伸長し、(細胞質内)カルボキシル末端領域のポリグルタミン (PolyQ) 鎖が伸長する。 $Ca_v2.1$ は P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネルの主要サブユニットでプルキンエ細胞 (PC) の活動電位の生成や神経伝達物質の放出に重要な役割を果たす。SCA6 についての研究は $Ca_v2.1$ 自体が過剰発現により強い毒性を示すため困難であったが、我々は、モデル動物として3種のノックイン (KI) マウスの作製に成功した (Watase et al, PNAS, 2008)。84CAG リピートを有する 84Q KI マウスは、ヒトの表現型を部分的に再現し、その解析から、SCA6 変異による $Ca_v2.1$ の構造変化それ自体は、直接的にはチャンネルの基本的チャンネル機能に影響せず、むしろ何らかの toxic gain of function の機構を介して病態が惹起されることを示した。また最近、伸長 PolyQ 鎖を有する $Ca_v2.1$ を軽度 ($\times 2$ 以下) 過剰発現する新たなモデルマウスとして Sca6-MPI-118Q KI マウスを作製した。ホモ MPI-118Q KI (MPI^{118Q/118Q}) マウスは生後 5 週より小脳失調を発症し、SCA6 に特徴的な選択的 PC 変性を再現した。MPI-118Q KI マウスにおいて変異 $Ca_v2.1$ はオートファジーの亢進を伴わずに PC リソソームに蓄積していた。またリソソームの主要なシステインプロテアーゼ、カテプシン B の発現低下により MPI-118Q KI マウスの変異 $Ca_v2.1$ の蓄積が亢進し、PC 変性が悪化した (左図)。変異 $Ca_v2.1$ のリソソーム蓄積が SCA6 の病態に関与することが明らかとなった (Unno, et al, PNAS, 2012)。 $Ca_v2.1$ が細胞膜からエンドサイトーシスにて取り込まれ、エンドリソソームで分解される過程で、変異 $Ca_v2.1$ は分解を受けにくく、次第に蓄積してリソソーム

ームストレスを惹起すると考えられる。最近、各種リソソーム蓄積病 (Lysosomal Storage Diseases; LSDs) の神経変性の病態として、リソソームストレスとそれに対する反応としての酸化ストレス経路の活性化 (Hum Mol Genet 17:469-477, 2008)、ミクログリアの活性化などが病態の初期から共通して認められることが明らかとなってきた。これまで我々は MPI^{118Q/118Q} マウス小脳において、PC 脱落の開始に先立って、早期から、ミクログリオシス及び酸化ストレス経路遺伝子発現の活性化を認めた。これらの変化は、同じく PC 変性を発症する Sca1 や Sca7 KI マウスの発症初期には認められない変化であり、変異 $Ca_v2.1$ チャンネルのリソソームへの蓄積は、少なくとも部分的には、各種リソソーム蓄積病の病態と共通の経路を介して SCA6 病態発症に導く可能性が高い。本研究では、これらの成果を踏まえて、伸長ポリグルタミンのリソソーム蓄積とその下流で惹起されると考えられるミクログリオシスをターゲットとした治療戦略を確立する。

2. 研究の目的

(1) 転写因子 TFEB はリソソーム生合成経路を活性化するマスター遺伝子で、リソソームのエクソサイトーシスの誘導を介して、LSD 病態を改善する可能性が報告されている。遺伝的手法を用いた TFEB の PC 内過剰発現により、MPI^{118Q/118Q} マウスの病態を改善できるか否かを明らかにする。

(2) mTOR 依存性にオートファジーを誘導する薬剤を用いて、PC でオートファジーを活性化することにより、SCA6 KI マウスの病態が改善するかどうかを解明する。

(3) 分子シャペロン iHsp70 は、リソソーム膜を安定化することにより、リソソームストレスを軽減し Niemann-Pick 病 type C (PC 変性を特徴とする LSDs の 1 種) の病態を改善するこ

とが報告されている (Nature 463:549-554)。

iHsp70 過剰発現の MPI^{118Q/118Q} マウス PC 変性への効果を明らかにし、効果が認められればさらに **iHsp70** 誘導薬の治療効果を明らかにする。

(4) マイクロアレイ及び qPCR 解析から MPI^{118Q/118Q} マウス小脳では若齢から、炎症性サイトカイン の1つ TNF-alpha や innate immunity を司るパターン認識レセプターのうち toll-like receptor (TLR) 2 及び TLR7 や Clec7a の発現が有意に増加していることを見出しており、これらの経路が non-cell autonomous に病態への関与することが示唆される。ミクログリアが関与する neuroinflammation 経路のうち、TLR 経路を遮断することにより、MPI^{118Q/118Q} マウスの病態の進行を修飾しうるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 小脳 PC 特異的なリソソーム生合成経路の活性化により SCA6 の病態が改善できるかどうかを検討するためテトラサイクリン依存的に TFEB を PC 特異的に過剰発現する Pcp2-tTA/TRE-3xFLAG-hTFEB トランスジェニックマウスを作成し、MPI-118Q KI マウスと交配した。また CRISPR/Cas9 法を用いて恒常的活性化変異を Tfeb 遺伝子に有する mTfebS269A KI マウスを作成し、同様に MPI-118Q KI マウスとの交配により多重変異マウスをそのして、解析を行った。

(2) mTOR 依存性にオートファジーを誘導する rapamycin を MPI-118Q KI マウスに継続的に投与してその効果を検討した。

(3) iHsp70 過剰発現マウス (Cummings, et al, 2001) と MPI-118Q KI マウスの二重変異マウスを作製し、リソソーム膜安定化を介

して SCA6 KI マウスの病態が改善するかどうかを検討した。

(4) 多くの TLR 分子のシグナル伝達に必要なアダプター分子 MyD88 のノックアウトマウスと MPI-118Q KI との 2 重変異マウス (MPI^{118/118}/MyD88^{-/-} マウス) を作成してその解析を行った。

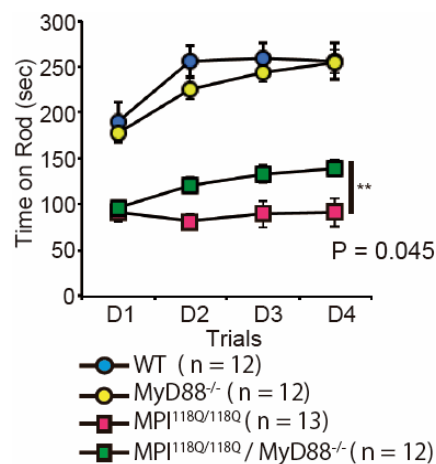
4. 研究成果

(1) (Tet-off) TFEB PC 過剰発現 SCA6 KI マウスの作成に成功し、PC 内 TFEB の過剰発現を免疫組織科学及び生化学的に確認できた。しかしながら、このマウスでは明らかな運動症状や PC 変性の改善は認められなかった。

(2) Rapamycin 投与により、MPI-118Q KI マウスで LC3 などのオートファジーマーカーの小脳での発現変化が確認でき、オートファジーが活性化したと考えられた。ロータロッド解析で投与群において軽度の運動失調の改善が認められたが、病理学的には明らかな PC 変性の改善は認められなかった。

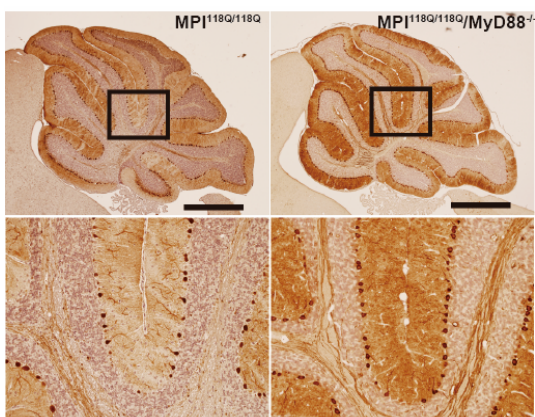
(3) iHsp70 過剰発現 MPI-118Q KI マウスでは、明らかな運動症状や PC 変性の改善は認められなかった。

(4)



MPI^{118/118}/MyD88^{-/-} マウスでの運動失調改善

6週齢 MPI^{118/118}/MyD88^{-/-} マウスにおいて i) ロータロッド解析 (前ページ図) にて運動失調の有意な改善が認められ。ii) 病理学的には小脳ミクログリオシスの程度に変化は認められなかったが、神経保護的と考えられる M2 型ミクログリアの割合が有意に増加し、iii) 残存する PC の数が有意に増加しており、神経変性が改善したと考えられた (下図)。



MPI^{118/118}/MyD88^{-/-} マウスでの PC 変性改善

一方、SCA6 患者小脳でも病理解析の結果 TLR を発現する活性化ミクログリアが浸潤していることが明らかとなった。これらの結果は SCA6 の少なくとも初期病態に神経炎症が関与し、自然免疫系、特に TLR シグナル伝達経路を修飾することにより SCA6 の治療法が開発できる可能性を示唆する。

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 6 件)

1. Aikawa, T., Mogushi, K., Iijima-Tsutui, K., Ishikawa, K., Sakurai, M., Tanaka H., Mizusawa, H. and Watase, K. Loss of MyD88 alters neuroinflammatory response and attenuates early Purkinje cell loss in a spinocerebellar ataxia type 6 mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24: 4780-4791. doi: 10.1093/hmg/ddv202. PMID: 26034136

2. Hatanaka, Y., Watase, K., Wada, K. and *Nagai, Y. Abnormalities in synaptic dynamics during development in a mouse model of late-onset neurodegenerative disease. *Sci. Rep.* 2015; 5:16102. doi: 10.1038/srep16102. PMID: 26531852

3. Taniguchi, J. B., Kondo, K., Fujita, K., Chen, X., Homma, H., Sudo, T., Mao, Y., Watase, K., Tanaka, T., Tagawa, K., Tamura, T., Muramatsu, S. I. and *Okazawa, H. Rpl1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair. *Hum. Mol. Genet.* 2016; 25: 4432-4447. doi: 10.1093/hmg/ddw272. PMID: 28173122

4. Aikawa, T., Watanabe, T., Miyazaki, T., Mikuni, T., Wakamori, M., Sakurai, M., Aizawa, H., Ishizu, N., Watanabe, M., Kano, M., Mizusawa, H. and Watase K. Alternative splicing in the C-terminal tail of Cav2.1 is essential for preventing a neurological disease in mice. *Hum. Mol. Genet.* 2017; doi: 10.1093/hmg/ddx193. [Epub ahead of print]

5. Klionsky, D. J., et al. (著者2346名中2149番目) Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12: 1-222. PMID: 26799652

6. Watase, K. SCA6: lessons from faithful knock-in mouse models. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2015; 3: 14-17.

[学会発表] (計 5 件)

1. ホットトピックス 11
SCA6病態におけるミクログリア炎症性応答
渡瀬 啓. 第57回日本神経学会総会, 2016.
(シンポジウム)

2. 脊髄小脳変性症モデルにおける神経炎症の解析. 渡瀬 啓. AMED 研究費難治性疾患

実用化事業 筋萎縮性側索硬化症(ALS)新規治療法開発を目指した病態解明 平成28年度 ワークショップ. 都市センターホテル(東京) 2016. 9. 30.

(招待講演)

3. M1-dominant microglial response precedes Purkinje cell loss in the cerebellum of SCA6-knockin mouse models.

Watase K, Aikawa T, Mogushi K, Iijima-Tsutsui K, Sakurai M, Ishikawa K, Tanaka H and Mizusawa H.

25th Biennial Meeting, International Society for Neurochemistry. 2015 (一般演題).

4. Early neuroinflammatory response precedes Purkinje cell loss in the cerebellum of SCA6-knockin mouse models.

Watase K, Aikawa T, Mogushi K, Iijima-Tsutsui K, Sakurai M, Ishikawa K, Tanaka H and Mizusawa H.

CAG Triplet Repeat Disorders, Gordon Research Conference. 2015 (一般演題).

5. Functional role of the cytoplasmic terminal tail of Cav2.1 channel.

Aikawa T, Miyazaki, T, Mikuni, T, Shigemoto R, Wakamori M, Kano M, Watanabe M, Mizusawa H and Watase K.

International Symposium “New Frontier of Molecular Neuropathology 2014”. 2014 (一般演題).

[図書] (計 1 件)

1. 渡瀬 啓 マウスモデルの解析を中心とした脊髄小脳変性症 6 型の病態解明. 廣川信隆編 ブレインサイエンス・レビュー 2015 クバプロ 233-252. 2015.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡瀬 啓 (WATASE KEI)

東京医科歯科大学脳統合機能研究センター 准教授

研究者番号：30376800

(2) 研究分担者

水澤 英洋 (MIZUSAWA HIDEHIRO)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・病院 病院長

研究者番号：30144091