

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860661

研究課題名(和文) 脊髄小脳変性症6型におけるミクログリアを介する神経炎症と病態の関係

研究課題名(英文) The relationship between spinocerebellar ataxia type 6 and microglial neuroinflammation

研究代表者

相川 知徳 (Aikawa, Tomonori)

東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・助教

研究者番号：10597149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症6型(SCA6)は優性遺伝性の神経変性疾患で、Cav2.1カルシウムチャネル内CAGリピートの伸長が原因であり、小脳内プルキンエ細胞変性を特徴とする。その分子メカニズムは不明であったが、SCA6モデルマウスの小脳遺伝子発現解析により、ミクログリア関連遺伝子の亢進を確認したため、ミクログリアが病気の進行を補うと予想した。さらに、ミクログリアはToll様受容体を発現していた。そこでアダプター分子であるMyD88欠損によりその影響を検証したところ、症状を改善することができた。よって、神経炎症が病気の進行に重要な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) is dominantly inherited neurodegenerative disease, caused by CAG repeat expansion in the Cav2.1 calcium channel. Its key pathological features include selective cerebellar Purkinje cell (PC) loss. However, its molecular basis remains elusive. Here, we studied the cerebellar gene expression patterns of young Sca6-MPI118Q/118Q knockin mice, which recapitulated many phenotypic features of human SCA6. Temporal expression profiles of the candidate genes revealed that the up-regulation of microglial related genes was initiated before PC loss and was augmented as the disease progressed. Histological analysis of the MPI118Q/118Q cerebellum showed the activation of microglia and elevation of Toll-like receptor (TLR) 2, 7 expressions. Genetic ablation of MyD88, TLR-adaptor protein, ameliorated PC loss and partially rescued motor impairments. These results suggest that early neuroinflammatory response may play an important role in the pathogenesis of SCA6.

研究分野：神経内科

キーワード：脊髄小脳失調症6型 Cav2.1 ポリグルタミン病 プルキンエ細胞変性 ミクログリア Toll like receptor MyD88 neuroinflammation

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) は早期発症モデルマウス Sca6-MPI-118QKI を中心として小脳遺伝子発現解析を行い、その発症の分子メカニズムの解明を試みている。解析の結果、神経炎症、特にミクログリアが発現する遺伝子群 (Clec7a, Trem2, Fcgr3 など) が発症早期から有意に上昇している事を確認した。ミクログリアの活性化は脊髄小脳変性症 6 型の原因であるプルキンエ細胞変性より先んじて生じており、またそのミクログリアは、特定の Toll like receptor (Tlr2, Tlr7) を発現していた。さらに小脳内サイトカイン (IL-6, TNF  $\alpha$ ) が上昇しており、それらサイトカインはミクログリアから発現していることを確認した。神経炎症、特にミクログリア活性化が脊髄小脳失調症 6 型の進行に影響を及ぼしている可能性が予想された。

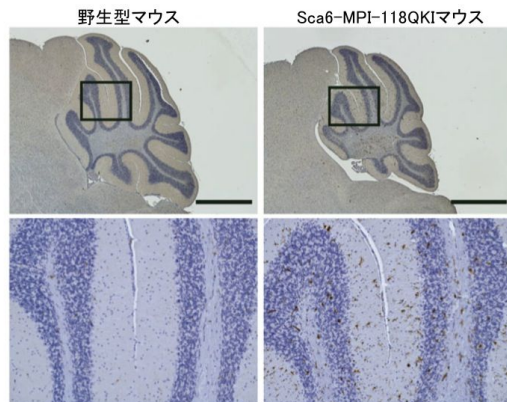


図 1 ミクログリアの活性化

2. 研究の目的

ミクログリア活性化がプルキンエ細胞変性より先んじて確認されていることから、ミクログリア活性化がプルキンエ細胞変性もしくは脊髄小脳失調症 6 型の病態に何らかの影響を与えている可能性がある。そこで、ミクログリア活性化に関連する Toll like receptor (Tlr) や damaged associated molecule pattern (DAMP) 等のリガンドの認識に関わる C 型レクチン Clec7a と、プルキンエ細胞変性との関係を検証する。各ノックアウトマウスと MPI-118QKI との掛け合わせにより二重変異マウスを作製し、神経炎症と SCA6 の関係性を確かめる。またリガンドとなり得る DAMP 特定を再構成系の作成により可能とし、SCA6 の治療標的となる分子の特定を目指す。

3. 研究の方法

Tlr2, -7 に共通する adaptor 分子である Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) ノックアウトマウスと Clec7a ノックアウトマウスを取得し、それぞれ Sca6-MPI-118QKI と掛け合わせを行い、

Sca6-MPI-118QKI の表現型が変化するか検証する。

(1) MyD88KO マウスと Sca6-MPI-118QKI マウスとの掛け合わせを行い、二重変異マウスを作製する。作製したマウスはロータロッドを用いて協調運動障害の程度を検討する。組織染色を行いプルキンエ細胞やミクログリアの数もしくは形態を比較し、活性化のレベルを比較検討する。さらに、TNF  $\alpha$  や IL-6 の mRNA 発現レベルを比較検討し、MyD88 欠損の影響を検証する。また、タンパク質を抽出し ELISA 法を用いて TNF  $\alpha$  や IL-6 をタンパクレベルで比較検討する。以上の事を総合的に判断することで、Tlr シグナリングと SCA6 病態発生との関連性を検証する。

(2) Clec7aKO マウスと MPI-118Q マウスとの掛け合わせを行い、MyD88KO マウスと同様に、二重変異マウスを作製する。二重変異マウス作成後、MyD88KO と同様のスケジュールで、ロータロッドによる行動学的解析、組織化学的解析、qPCR や ELISA を用いたサイトカインの発現亢進を検討し、Clec7a シグナリングと SCA6 病態発生との関連性を検証する。

4. 研究成果

初めに、Sca6-MPI-118QKI と MyD88KO 及び Clec7aKO の掛け合わせを行い、二重変異マウスを作製した。二重変異マウス Sca6-MPI-118QKI / Clec7aKO は遺伝子発現、行動解析、形態的解析 (プルキンエ細胞変性) を行ったが、いずれも Sca6-MPI-118QKI と比較して有意な差は無かった。よって、Clec7a に脊髄小脳失調症 6 型の発症に関与する可能性を見いだせなかった。

一方、Sca6-MPI-118QKI / MyD88KO は、強調運動障害 (図 2)、プルキンエ細胞変性 (図 3) が有意に改善されていた。

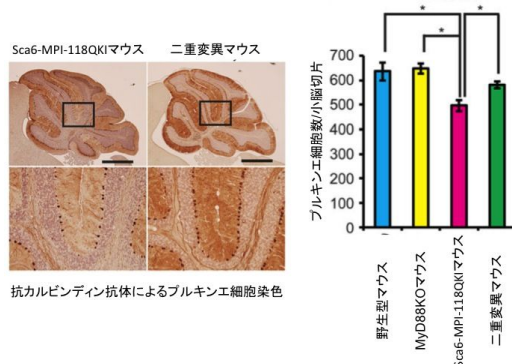


図 2 プルキンエ細胞変性の改善

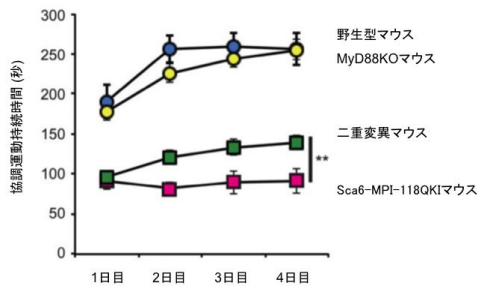
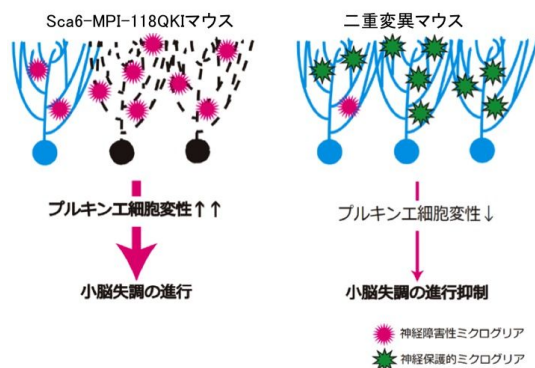


図3 協調運動障害の改善

そこで遺伝子発現解析を行ったところ、サイトカイン(IL-6, TNF alpha)の発現は抑制されていなかった為、サイトカイン発現抑制によるプルキンエ細胞変性の可能性は否定された。ところが、M1様ミクログリア遺伝子(Ccl3, Cd86)の発現が抑制され、M2様ミクログリア遺伝子(Arg1, Sphk1, Tgfb1)の発現が亢進されていた。最近の研究で細胞障害性のあるM1様ミクログリアと細胞保護性のあるM2様ミクログリア、主に2種類のミクログリアの報告がある。二重変異マウス Sca6-MPI-118QKI/MyD88KOでは、M2様ミクログリアが優位に活性化しており、その神経保護性により、神経変性が抑制され、症状が改善したものと推測される(図4)。

さらに SCA6 検体を用いた組織染色の結果、SCA6 患者の小脳でも TLR2 を発現したミクログリアが活性化していることを確認したことから、ヒト脊髄小脳失調症6型でもミクログリアの活性化がプルキンエ細胞変性もしくは病態の進行に関与する可能性がある。以上のことから、早期神経炎症が脊髄小脳失調症6型の病態の進行に影響を与えていることが示され、それを標的とした治療の可能性が示唆される。

図4 MyD88 遺伝子欠損による SCA6 モデル症状の改善メカニズム



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)

Loss of MyD88 alters neuroinflammatory response and attenuates early Purkinje cell loss in a spinocerebellar ataxia type 6 mouse model. Aikawa T, Mogushi K, Iijima-Tsutsui K, Ishikawa K, Sakurai M, Tanaka H, Mizusawa H, Watase K. *Hum Mol Genet.* 2015 Sep 1;24(17):4780-91, 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 2015/05/22

Genetical studies on knockin mice carrying a PARK17 mutation. Nobutaka Ishizu, Akira Hebisawa, Daishi Yui, Tomonori Aikawa, Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota, Kei Watase. 56th annual meeting of the Japanese Society of Neurology 2015, Pe-057-2. 朱雀メッセ(新潟県新潟市)

(2) 2015/02/21

Early neuroinflammatory response in SCA6 model mouse is involved in the pathogenesis of SCA6. Aikawa T, Mogushi K, Iijima-Tsutsui K, Ishikawa K, Sakurai M, Tanaka H, Mizusawa H, Watase K. 7<sup>th</sup> CBIR+ONSA young inspire symposium. 東京医科歯科大学(東京都文京区)

(3) 2014/05/23

Early neuroinflammatory response in SCA6 mouse models Aikawa T, Mogushi K, Iijima-Tsutsui K, Ishikawa K, Sakurai M, Tanaka H, Mizusawa H, Watase K. 55<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese Society of Neurology 2014, 0-39-4. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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  
<http://www.tmd.ac.jp/cbir/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 相川知徳  
(AIKAWA Tomonori)  
東京医科歯科大学・脳統合機能研究センター・特任助教 (-2015/8/31)  
国立がん研究センター・腫瘍生物学分野・特任研究員 (-2016/05/20)  
Mayo Clinic, Jacksonville Florida・Department of Neuroscience・Research Fellow (2016/6/6-)  
研究者番号：10597149