

「脳を守る」  
平成9年度採択研究代表者

田邊 勉

(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授)

## 「Caチャンネル遺伝子の変異と神経疾患」

### 1. 研究実施の概要

$\alpha_{1A}$ Caチャンネルは脳全体に広く発現しており、中枢および末梢神経系の伝達物質放出機構において中心的役割を果たしている。近年、本遺伝子の種々の変異が多彩な神経疾患とリンクしていることが明らかにされてきた。脊髄小脳失調症6型(SCA6)はその一つであり、本邦の遺伝性脊髄小脳変性症においてSCA3について多く社会的ニーズの高い難治疾患である。本研究においては、SCA6の病態とチャンネル遺伝子変異との関係を明らかにするとともに、変異 $\alpha_{1A}$ チャンネルおよび共存する他のタイプのCaチャンネル機能の調節、制御機構の活用により神経細胞の変性脱落の阻止をはかる。そしてCa依存性の神経細胞死を最終局面とする多くの神経変性疾患の治療法開発の基盤確立を目指す。現在、 $\alpha_{1B}$ および $\alpha_{1E}$ の2種のチャンネルノックアウトマウスの作製を終了し、これらマウスの機能解析を行っている。一方SCA6の病態とチャンネル遺伝子変異との関係を変異 $\alpha_{1A}$ チャンネルの発現制御、電流特性、活性制御などの側面から明らかにしつつある。今後、種々ノックアウトマウスの解析から得られた結果、さらに現在作製中のSCA6変異Caチャンネル遺伝子をシングルコピー導入したノックインマウスの解析から $\alpha_{1A}$ チャンネル遺伝子疾患の治療法を模索する。本研究成果は「イオンチャンネル疾患」全般の原因究明と治療法開発に格好のモデルを提供することになると期待される。

### 2. 研究実施内容

#### (1) チャンネル遺伝子ノックアウトマウスの作製と種々Caチャンネル変異マウスの機能解析

当初から計画していた $\alpha_{1B}$ および $\alpha_{1E}$ Caチャンネルのノックアウトマウスの作製を終了した。現在、これに加えて $tg^{la}$ マウス( $\alpha_{1A}$ Caチャンネルの遺伝子変異マウスの一種であり、小脳プルキンエ細胞の $\alpha_{1A}$ Caチャンネル電流が20%以下になっており、 $\alpha_{1A}$ Caチャンネルノックアウトマウスと類似の臨床症状を示す。)の3種の神経特異的Caチャンネル変異マウスを用いて、種々の神経機能における各タイプCaチャンネルの特異性と共同性の解析を続けている。

(1) - 1  $\alpha_{1A}$ Caチャンネル

本チャンネルに関しては $tg^{la}$ マウスを用いた解析から、生体の防御反応にとって重要である急性の痛覚伝達において重要な働きをしていることが明らかとなった。現在、摘出脊髄標本を用いた電気生理学的解析からそのメカニズムの解明を行っている。

(1) - 2  $\alpha_{1B}$ Caチャンネル

本チャンネルは $\alpha_{1A}$ Caチャンネルとともに中枢及び末梢神経系における種々伝達物質の放出機構において重要な働きをしているCaチャンネルである。 $\alpha_{1A}$ Caチャンネルをノックアウトすると小脳プルキンエ細胞において本チャンネルが発現誘導されることが最近明らかにされた。 $\alpha_{1B}$ Caチャンネルに関しては、(1)炎症性疼痛において痛み伝達に関与すること、(2)下降性疼痛抑制系伝達に関与すること、(3)神経因性疼痛機構において痛み伝達に関与することが明らかとなった。

(1) - 3  $\alpha_{1E}$ Caチャンネル

本チャンネルはSCA6において特異的に変性脱落する小脳プルキンエ細胞において $\alpha_{1A}$ Caチャンネルと共存するCaチャンネルである。 $\alpha_{1E}$ Caチャンネルに関しては(1)炎症性疼痛において痛み伝達に関与すること、(2)下降性疼痛抑制系伝達に関与すること、(3)海馬におけるシナプス可塑性(LTP)及び恐怖条件付け学習に関しては正常であるが、空間学習能力が劣っていること、(3)虚血性神経細胞死において防御的に働いていることなどが明らかとなった。現在、小脳における本チャンネルの機能を解析中である。

以上我々は種々の神経特異的Caチャンネル遺伝子変異マウスの解析から、外部からの侵害性刺激や体内の病変に対する生体防御機構として働き、生命維持に重要な警告反応である急性の生理的な侵害受容性疼痛には $\alpha_{1A}$ チャンネルが、そして病的な疼痛であり、治療を必要とする慢性の侵害受容性疼痛には $\alpha_{1B}$ および $\alpha_{1E}$ チャンネルが、さらに神経因性疼痛には $\alpha_{1B}$ チャンネルが重要な働きをしていることを明らかにした。このように痛覚伝達一つをとっても個々のCaチャンネルは、ある種の痛み伝達においては特異的に、別の種類の痛み伝達においては共同的に働いていることが明らかになり、これらチャンネルの機能的差違をうまく利用することにより神経細胞のCaホメオスタシスを正常状態に維持できる可能性が示唆された。一方 $\alpha_{1B}$ Caチャンネルと $\alpha_{1E}$ Caチャンネルノックアウトマウスは情動に関与する行動学的解析においてまったく反対の性質(恐怖心欠落傾向VS怖がり傾向)を示した。両チャンネルの脳内における分布は非常にオーバーラップしており今後これらチャンネル欠損による情動異常の分子的基盤を明らかにすることをめざし研究を続ける予定である。

(2) P型Caチャンネル遺伝子の単離と機能解析

$\alpha_{1A}$ チャンネル遺伝子はP型およびQ型Caチャンネルをコードしている。これまでの研究結果からP型およびQ型の差異は $\alpha_{1A}$ チャンネルmRNAのオルタナティブスプライシングに由来する可能性が強く示唆されており、SCA6において特異的に変性脱落するプルキンエ細胞においてはP型のみが発現している。我々はマウス小脳プルキンエ細胞よりmRNAを単離しこれを鋳型として $\alpha_{1A}$ チャンネルcDNAの全長を取得し、全塩基配列を決定した。その結果、プルキンエ細胞のP型チャンネルには種々のスプライスバリエーションが存在することが明らかとなった。さらにあるスプライスバリエーションはRNA editingによる修飾も受けていることが明らかになった。現在、これら $\alpha_{1A}$ チャンネルcDNAを $\alpha_2/\delta$ および $\beta_1$ サブユニットとともにHEK293細胞に発現させ、その電気生理学的特性を解析するとともにRNA editingの特異性の検討を行っている。

(3) モデルマウスの作製と機能解析

SCA6においては、原因遺伝子がCaチャンネルであるということから、もし疾患の原因がCaチャンネル活性の上昇/低下にある場合、発現量を生理学的レベルに保つことができない通常のトランスジェニックマウスはモデルとなりえない。そこで $\alpha_{1A}$ チャンネル遺伝子座のnativeプロモーターの下流にヒト疾患Caチャンネル遺伝子をシングルコピー導入できるターゲットベクターを構築した。そしてこれをES細胞に導入し相同遺伝子組換えが起きた変異ES細胞クローンの単離に成功した。続いて疾患 $\alpha_{1A}$ チャンネル遺伝子を含む組み換え用ベクターを構築し、これを上記ES細胞に導入しSCA6変異を有するヒト型 $\alpha_{1A}$ チャンネルを有する変異ES細胞クローンの単離に成功した。そしてこのES細胞をプラストシスト内インジェクションすることによりキメラマウスを作製した。現在このキメラマウスをB6マウスとかけあわせジャームライントランスミッションしたマウス(ノックインマウス)の取得を試みている段階である。

(4) チャンネルの細胞内局在性と細胞死の検討

現在SCA6の患者において見いだされる変異を導入した $\alpha_{1A}$ チャンネルを種々の培養細胞にstableに発現させ、細胞内における発現部位、環境変化に対する細胞の生存、細胞死(apoptosis, necrosis)等を検討している。そしてHEK293細胞を用いた系においてこれらのCAGリピートが異常伸長した変異遺伝子を導入した細胞は、正常な遺伝子を入れた対照に比べアポトーシスによる細胞死をきたしやすいことを定量的に検討し明らかにした。

(5) SCA 6 の遺伝子治療の可能性の検討

現在GFPマーカートをアミノ末端に、FLAGマーカートをカルボキシル末端に付けたヒト変異 $\alpha_{1A}$ チャンネル(CAG28個)のコンストラクトを発現する培養細胞株を

樹立している。今後これを用いて細胞レベルでの遺伝子治療法を模索する。当面はRNA-DNAオリゴヌクレオチドを用いた標的遺伝子修正法 (targeted gene correction) を用いて行う予定である。

(6) 疾患患者および患者脳組織の解析

SCA6患者ではほぼ純粋な小脳失調症を呈するが、中には末梢神経障害など小脳失調症状以外の症状を呈するとの報告もある。SCA6における症候と病変の広がりを明らかにするためにSCA6患者について電気生理学的検査や自律神経機能検査を含む検索を継続して行っている。

SCA6患者脳を用いてさらに詳細な分析を行い、長い異常ポリグルタミンのみを認識する抗体1C2を用いた免疫組織化学にて、多くのプルキンエ細胞の細胞質内に顆粒状の小封入体の多発を初めて見いだした。核内にも存在する可能性があり、原因遺伝子産物からなる封入体が細胞質のみにみられるのと少し異なった分布をしている可能性が高く、逆に核内封入体が主体の他のCGAリピート病と共通する所見でもあり重要な意義を有すると期待される。

$\alpha_{1A}$ チャネル遺伝子の他の変異で反復発作性失調症2型や片麻痺性片頭痛が生じるが、我が国ではこの遺伝子変異に関してまだ十分に検索されていない。まずこのような症候を呈する患者およびその遺伝子の集積を行った。さらに遺伝子解析を行いその変異を明らかにすべく準備を進めた。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Toru, S., Murakoshi, T., Ishikawa, K., Saegusa, H., Fujigasaki, H., Uchida, T., Nagayama, S., Osanai, M., Mizusawa H. and Tanabe, T. (2000) Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function. *Journal of Biological Chemistry* 275 : 10893-10898.

Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Minowa, O., Kazuno, A., Han, W., Matsuda, Y., Yamanaka, H., Osanai, M., Noda, T. & Tanabe, T. (2000) Altered pain responses in mice lacking  $\alpha_{1E}$  subunit of the voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6132-6137.

Masumura, M., Satake, S., Saegusa, H., and Mizoguchi, A. (2000) Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118 : 393-399.

Yang Q, Hashizume Y, Yoshida M, Goto Y, Mitsuma N, Ishikawa K, Mizusawa H (2000) Morphological purkinje cell changes in spinocerebellar type6. *Acta Neuropathol* 100 : 371-376.

Fujigasaki, H., Uchihara, T., Koyano, S., Iwabuchi, K., Yagishita, S., Makifuchi, T., Nakamura, A., Ishida, K., Toru, S., Hirai, S., Ishikawa, K., Tanabe, T. & Mizusawa,

- H. (2000) Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. *Experimental Neurology* 165 : 248-256.
- Tateyama, M., Zong, S. Tanabe, T. & Ochi, R. (2001) Properties of  $\alpha_{1E}$   $Ca^{2+}$  channel currents expressed in cultured adult rabbit ventricular myocytes. *American J. Physiol., Cell Physiol.* 280 : C175-C182.
- Kubota, M., Murakoshi, T., Saegusa, H., Kazuno, A., Zong, S., Hu, Q., Noda, T. & Tanabe, T. (2001) Intact LTP and fear memory but impaired spatial memory in mice lacking  $Ca_v2.3$  ( $\alpha_{1E}$ ) channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 : 242-248.
- Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H. & Tanabe, T. (2001) Suppression of neuropathic pain symptoms in mice lacking N-type  $Ca^{2+}$  channel. *The EMBO J.* 20 : 2349-2356.
- 小山内実、田邊勉 (2000) 電位依存性カルシウムチャネルの分子薬理学、*Clinical Calcium*, 10 (3) 268-274.
- Eric A. Ertel, Kevin P. Campbell, Michael M. Harpold, Franz Hofmann, Yasuo Mori, Edward Perez-Reyes, Arnold, Schwartz, Terry P. Snutch, Tsutomu Tanabe, Lutz Birnbaumer, Richard W. Tsien, and William A. Catterall (2000) Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* 25 : 533-535.
- 栗原崇、田邊勉 (2000) 痛みと $Ca^{2+}$ チャネル 東京都歯科医師会雑誌 48 : 473-481.
- 田邊勉 (2000) 種々のCaチャネル 生体の科学 (ノックアウトマウスリスト) 51 : 411-412.
- 石川欽也、融衆太、水澤英洋 (2000) 脊髄小脳失調症 6 型. *Clinical Neuroscience* 18(3) : 50-53.
- 水澤英洋 (2000) イオンチャンネル病と発作性神経疾患 発作性神経筋疾患を見たらイオンチャンネル病を疑う. *医学のあゆみ* 193(6) : 575-580.
- 水澤英洋 (2000) 脊髄小脳変性症. *Bio Clinica* 15(12) : 33-37.
- 水澤英洋 (2000) 遺伝性運動失調症の臨床. *神経研究の進歩* 44(6) : 999-1007.
- 石川欽也、水澤英洋 (2000) 運動失調性歩行、田代邦雄、廣瀬源二郎、山本悌司 (編集) 誤診しやすい神経疾患、南江堂、p163-165.