

「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

α_{1A} 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脊髄小脳失調症6型(SCA6)、家族性片麻痺性偏頭痛(FHM)、反復発作性失調症2型(EA2)の原因遺伝子として、さらには欠神発作のモデル動物として知られている tg^a マウスおよびそのアレルでより重篤な tg^a マウスの原因遺伝子として同定された。単一イオンチャンネル遺伝子内部の種々の変異がこのように多彩な神経疾患とそれぞれ独立にリンクしているということは驚きであるとともに大きなチャンスでもある。すなわちこれら疾患を包括的に考えることにより、個々の疾患症状の原因究明、治療法開発が加速度的に早まることが期待される。本年度は、SCA6、FHM、EA2の疾患モデルマウスの作製、そして tg^a マウスの機能解析を計画した。そして現在までに、SCA6、EA2モデルマウスの作製を終了しており、FHMに関しては現在キメラマウスまで得られている。機能解析に関しては、SCA6においては行動学的解析を最近スタートさせた。また tg^a マウスに関しては、痛覚伝達機構における本チャンネルの特異性を明らかにした。

一方、種々神経細胞において α_{1A} チャンネルは α_{1B} チャンネルや α_{1E} チャンネルと共存していることが多く、これら他のタイプのCaチャンネルの活性調節により、 α_{1A} チャンネルの機能異常により引き起こされる疾患を治療する道が開かれることが期待される。そこでこれら3種の神経特異的Caチャンネルの機能的特異性と共同性を明らかにすることを目的に α_{1B} および α_{1E} の2種のチャンネルノックアウトマウスを用い、種々の神経機能におけるこれらチャンネルの特異性と共同性の解析を前年度に引き続き行っている。

今後は種々モデルマウスの解析を中心に行い、個々の疾患症状の原因究明、治療法開発を目指したい。

2. 研究実施内容(研究目的、方法、結論などを記述)

(1) SCA6、EA2、FHMモデルマウスの作製と機能解析

1. SCA6モデルマウスの作製に成功した。現在、モデルマウスの行動学的解析をスタートしたところである。今後、免疫組織化学的、電気生理学的解析を開始する予定である。
2. EA2モデルマウスの作製に成功した。現在マウスの数を増やしている段階である。

3. FHMモデルマウスに関しては2系列(チャンネル活性の上昇する変異、チャンネル活性の低下する変異)を計画しており、そのうちのひとつは現在キメラマウスが得られた段階であり、もう一系列は変異ES細胞をブラストシスト内注入の段階である。

(2) 種々神経特異的Caチャンネル遺伝子変異マウスの機能解析

α_{1B} および α_{1E} チャンネル欠損マウス、 α_{1A} チャンネルに関しては、 tg^a マウスを用いて様々な疼痛刺激に対する反応を検討した。その結果、これらのCaチャンネルは痛覚情報伝達制御に関しておのおの特徴的な関与をしているという興味深い事実が明らかとなった。 tg^a マウスマウスにおいては、 α_{1B} および α_{1E} チャンネル欠損マウスと異なり、機械および熱刺激による急性侵害受容性疼痛感受性に異常が見られるという思いがけない知見が得られ α_{1A} チャンネルが急性の疼痛伝達において特異的な働きをすることが明らかとなった。 α_{1B} チャンネルに関しては、警告系として重要な急性侵害受容性疼痛はほぼ正常であるが、神経因性疼痛がほぼ完全に消失していることが判明し、このチャンネルの制御が神経因性疼痛制御に極めて重要であることが示された。

(3) SCA6の遺伝子治療の可能性の検討1(細胞レベルでの検討)

SCA6、EA2モデルマウス作製の際に取得したノックインES細胞を神経細胞に分化させ、分化した神経細胞を用いた遺伝子修復の検討を行う。現在、神経細胞への分化の条件検討をほぼ終了している。この条件検討の過程において、 α_{1B} チャンネルが分化した神経細胞の初期過程より発現し始めるのに対し、SCA6、EA2のターゲットである α_{1A} チャンネルは神経発達の後期にならないと発現しないことが明らかになってきた。現在、ES由来の神経細胞を成熟させる条件をさらに検討している。

(4) SCA6の遺伝子治療の可能性の検討2(動物個体レベルでの検討)

現在 tg^a マウスを用いて、小脳へのRNA-DNAオリゴヌクレオチド、チャンネル発現ベクター、そして神経細胞注入の条件検討を行っている。そして現在まだ少数ではあるが治療効果の認められるマウスを認めている。今後、SCA6、EA2、FHMモデルマウスを用いて検討する。

(5) P型Caチャンネル遺伝子の単離と機能解析

臨床的にSCA6は純粋小脳失調を特徴とし、病理学的にはP型Caチャンネルが主に発現しているプルキンエ細胞が大きく消失するのに対し、P型、Q型Caチャンネルが共に発現している小脳顆粒細胞が比較的保たれている特徴がある。我々は最近CAGリピート伸長がP型のスプライスバリエントにおよぼす影響がQ型スプライスバリエントにおよぼす影響と全く異なることを明らかにした。しかしP/Q型Caチャンネルの機能変化とSCA6の病理学的特徴についての関連は解明されていない。そこでこの関連性を明らかにするためにマウス小脳プルキンエ細胞より、P型Caチャンネルをクローン化した。その結果本チャンネルには種々のスプライスバリエントが存在すること、一部のチャンネルでRNAエディティングによる修飾が起こっていることが明らかとなりプルキンエ細胞内におけるP型Caチャンネル機能の多様性が示唆された。一方、P型およびQ型の差異は α_{1A} チャンネルmRNAのオルタナティブスプライシングばかりでなくさらにP型特性を決定する因子が別に存在することが示唆された。

(6) 虚血性神経細胞障害における神経特異的Caチャンネルの役割

虚血性神経細胞障害においては細胞内Ca濃度の上昇が非常に重要な役割を果たしており、細

胞内へのCa流入経路の1つである電位依存性Caチャンネルは、虚血性神経細胞障害に強く関与すると考えられる。我々は、 α_{1E} チャンネル欠損マウスを用いて、局所脳虚血モデル及び海馬スライスでのCaイメージング法を適用して、虚血性神経細胞障害における α_{1E} チャンネルの機能を検討した。その結果、 α_{1E} チャンネルは虚血性神経細胞障害において保護的な役割を果たしている可能性が示唆され本チャンネルは虚血性神経細胞障害の将来的な治療ターゲットになりうると考えられた。

(7) SCA6患者および患者脳組織の解析

SCA6患者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患者について詳細な臨床症候の解析と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。例えば、めまいのみを訴え、明らかな小脳萎縮があるにも関わらず失調症状はほとんどないSCA6症例の存在なども明らかになった。

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。この新しい封入体と既に報告している変異チャンネル蛋白からなる封入体との相互関係を検討し、一部は共存しているが多くは別々に存在していることを明らかにした。

α_{1A} チャン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、この遺伝子変異に関してまだ十分に検索されておらずその発症メカニズムも不明のままである。全国から依頼された症例の検索行ったところ、片麻痺性片頭痛が1家系認められたものの反復発作性失調症2型が疑われる家系ではこの遺伝子変異は認められなかった。このことから α_{1A} チャンネル遺伝子ではない新規遺伝子が本邦の“反復発作性失調症2型”の原因である可能性が示唆された。

(8) 培養細胞を用いた細胞死の検討

SCA6変異を導入した α_{1A} チャンネルをstableに発現させた培養細胞系を作製した。このようにして得られたHEK293細胞系にて、CAGリポートが異常伸長した変異遺伝子(SCA6遺伝子)を導入した細胞は、正常な培養環境では異常を示さないものの、ストレスフルな条件下で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くなることを初めて明らかにした。さらにこの細胞死は時間経過とともに増加し、カスパーゼ阻害剤により用量依存性に抑制されることからカスパーゼ依存性であることが判明した。この系はSCA6に対する治療法の開発にとっても有用であると期待される。

3. 研究実施体制

遺伝子変異マウス解析グループ

① 研究分担グループ長名

田邊 勉(東京医科歯科大学高次機能薬理学、教授)

② 研究項目

変異ヒトP型Caチャンネルがシングルコピー発現するトランスジェニックマウス(ノックインマウス)の作製。種々Caチャンネルノックアウト/ノックインマウスの行動学的解析。遺伝子治療法の開発。

変異導入チャンネル解析グループ

① 研究分担グループ長名

村越 隆之(東京医科歯科大学高次機能薬理学、助教授)

② 研究項目

変異ヒトP型Caチャンネルを発現する小脳スライスのCa電流の解析、細胞内における発現部位、細胞内Ca濃度変化、細胞の生存、細胞死等の検討。種々Caチャンネルノックアウト/ノックインマウスの行動生理学的解析。

疾患遺伝子解析グループ

① 研究分担グループ長名

水澤 英洋(東京医科歯科大学脳神経機能病態学、教授)

② 研究項目

マウス小脳プルキンエ細胞より単離したP型チャンネルの解析。種々Caチャンネルノックアウト/ノックインマウスの神経病理学的解析。SCA6患者脳各部位のmRNA、蛋白レベルでの解析。種々変異ヒトP型Caチャンネルをstableに発現させた培養細胞におけるチャンネル発現部位、環境変化に対する細胞の生存、細胞死等の検討。

遺伝子変異マウス作製グループ

① 研究分担グループ長名

竹島 浩(東北大学医化学分野、教授)

② 研究項目

種々Caチャンネル疾患モデルマウスの作製と機能解析。

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

[原著]

- Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T. & Tanabe, T. (2002) $Ca_v2.3$ (α_{1E}) Ca^{2+} channel participates in the control of sperm function. *FEBS Letters* **516**: 229-233.
- Tsunemi, T., Saegusa, H., Ishikawa, K., Nagayama, S., Murakoshi, T., Mizusawa, H. & Tanabe, T. (2002). Novel $Cav2.1$ splice variants isolated from Purkinje cells do not generate P-type Ca^{2+} current. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 7214-7221.
- Toriyama, H., Wang, L., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Noda, T., Ohno, K. & Tanabe, T. (2002) Protective function of $Ca_v2.3$ (α_{1E}) Ca^{2+} channel in ischemic neuronal injury. *NeuroReport* **13**: 261-265.
- Matsuda, Y., Saegusa, H., Zong, S., Noda, T. and Tanabe, T. (2001) Mice lacking $Ca_v2.3$ (α_{1E}) calcium channel exhibit hyperglycemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**:791-795.

- Ogasawara, M., Kurihara, T., Hu, Q. & Tanabe, T. (2001). Characterization of acute somatosensory pain transmission in P/Q-type Ca²⁺ channel mutant mice, *leaner*. ***FEBS Letters* 508**: 181–186.
- Sakata, Y., Saegusa, H., Zong, S., Osanai, M., Murakoshi, T., Shimizu, Y., Noda, T., Aso, T. & Tanabe, T. (2001) Analysis of Ca²⁺ currents in spermatocytes from mice lacking Ca_v2.3 (α_{1E}) Ca²⁺ channel. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288**: 1032–1036.
- Murakoshi, T., Song, S., Konishi, S. & Tanabe, T. (2001) Multiple G-protein-coupled receptors mediate presynaptic inhibition at single excitatory synapses in the rat visual cortex. ***Neuroscience Letters* 309**: 117–120.
- Ishikawa, K., Owada, K., Ishida, K., Fujigasaki, H., Li, M., Tsunemi, T., Ohkoshi, N., Toru, S., Mizutani, T., Hayashi, M., Arai, N., Hasegawa, K., Kawanami, T., Kato, T., Makifuchi, T., Shoji, S., Tanabe, T. & Mizusawa, H. (2001). Cytoplasmic and nuclear polyglutamine-aggregates in SCA6 Purkinje cells. ***Neurology* 56**: 1753–1756.
- Saegusa, H., Kurihara, T., Zong, S., Kazuno, A., Matsuda, Y., Nonaka, T., Han, W., Toriyama, H. & Tanabe, T. (2001). Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking N-type Ca²⁺ channel. ***The EMBO J.* 20**: 2349–2356.
- 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 Cav2.3 (α_{1E}) channel. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282**: 242–248.
- Tateyama, M., Zong, S. Tanabe, T. & Ochi, R. (2001). Properties of α_{1E} Ca²⁺ channel currents expressed in cultured adult rabbit ventricular myocytes. ***American J. Physiol., Cell Physiol.* 280**: C175–C182.
- Takenoshita H, Shizuka IM, Mitoma H, Song S, Harigaya Y, Igeta Y, Yaguchi M, Ishida K, Shoji M, Tanaka M, Mizusawa H, Okamoto K (2001). Presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission by glutamate decarboxylase autoantibodies in progressive cerebellar ataxia. ***J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70**: 386–389.
- Fujigasaki H, Uchihara T, Takahashi J, Matsushita H, Nakamura A, Koyano S, Iwabuchi K, Hirai S, Mizusawa H (2001). Preferential recruitment of ataxin-3 independent of expanded polyglutamine: an immunohistochemical study on Marinesco bodies. ***J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71**: 518–520.
- Sakashita, Y., Kurihara, T., Uchida, D., Tatsuo, I. & Yamamoto, T. (2001). Involvement of PACAP receptor in primary afferent fiber-evoked responses of ventral roots in the neonatal rat spinal cord. ***Br. J. Pharmacol.* 132**: 1769–1776.

[総説]

- 松田嘉弘、田邊勉 神経変性とイオンチャンネル 2002年 *Clinical Neuroscience* **20**: 233.
- 松田嘉弘、田邊勉 カルシウムチャンネルの機能 2001年 *Clinical Calcium*, **11** (11)

1440-1444.

- 三枝弘尚、田邊勉 カルシウムチャネルの分子構造と機能 2001年 医薬ジャーナル社“カルシウム拮抗薬”p50-59.
 - 栗原崇、横山和明、田邊勉 脊髄の伝達物質 2001年 Clinical Neuroscience **19**: 761-763.
 - 水澤英洋: 遺伝性脊髄小脳変性症. (杉田秀夫、福内靖男、柴崎 浩、平井俊策、山口武典、金澤一郎、田代邦雄、糸山泰人、小林祥泰、祖父江 元 編集) 先端医療シリーズ14. 神経・筋疾患神経・筋疾患の最新医療、先端医療技術研究所 2001年 169-174.
 - 石川欽也, 水澤英洋 : 脊髄小脳失調症6型. 2001年 Clinical Calcium **11**: 59-63.
 - 富満弘之, 水澤英洋 : 反復発作性失調症2型. 2001年 Clinical Calcium **11**: 64-67.
 - 水澤英洋 : 脊髄小脳変性症: Spinocerebellar ataxia type 6. 2001年 内科 **87**: 678-681.
 - 水澤英洋 : 《神経・筋》脊髄小脳変性症. 2001年 内科 **87**(6): 1488-1492.
 - 水澤英洋 : 脊髄小脳変性症Ⅱ -SCA6、その他-. 2001年 最新医学 **56**: 67-71.
- (2) 特許出願
国内1件、外国0件