

研究報告書

小脳失調症関連遺伝子の機能解明と
治療に向けた標的遺伝子の導入技術開発

研究者氏名: 平井 宏和

(研究期間: 平成 14 年 11 月 1 日 ~ 平成 18 年 3 月 31 日)

小脳失調関連遺伝子の機能解明と治療に向けた標的遺伝子の 導入技術開発

平井 宏和

研究のねらい

小脳は歩行などの複数の筋肉を使用する協調運動、スキーが上達するといった運動学習に重要な役割を果たしている。小脳に障害があるとスムーズな動作ができなくなり、平衡感覚も悪化するため日常生活にも大きな障害が生じる。小脳皮質には脳幹から2つの入力経路が存在し、最終的にプルキンエ細胞に情報が伝えられる。

プルキンエ細胞への入力経路の1つは、顆粒細胞の軸索である平行線維である。1個のプルキンエ細胞には、10万本以上の平行線維がシナプス入力する。もう一つの入力は脳幹の下オリブ核からで、登上線維と呼ばれている。1個のプルキンエ細胞には、1本の登上線維しかシナプスを形成していない。

プルキンエ細胞はこれらの入力情報を統合し、小脳皮質外へ出力する唯一の神経細胞であるため、プルキンエ細胞の生理学的、病理学的性質の分子レベルからの解明は、小脳研究において大変重要である。プルキンエ細胞の分子レベルからの研究には、細胞への遺伝子導入・発現が不可欠である。しかしプルキンエ細胞への選択的かつ効率的な遺伝子導入は極めて困難で、現在まで PubMed で調べても5本の論文しかない。しかも、そのいずれもがプルキンエ細胞特異的でなく、さらに遺伝子発現領域・効率とも十分とはいえない。このため海馬や線条体など、他の脳領域に比べ、小脳の分子レベルの研究は停滞している。

そこで本研究では、プルキンエ細胞に特異的かつ効率的に遺伝子導入する技術の確立を目的とした。さらにこの技術を利用し、小脳失調関連遺伝子の機能解明および遺伝性小脳疾患の遺伝子治療への応用を目指した。

研究成果

ウイルスベクターを用いた小脳神経細胞への遺伝子導入技術開発

近年、開発の進むアデノ随伴ウイルスベクターとHIV由来レンチウイルスベクターを用いて小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入を目的として実験を行った。遺伝子発現マーカーとしてGFPを用い、ウイルスは生後4週から10週までのマウスの小脳に接種した。7日後に灌流固定して、小脳

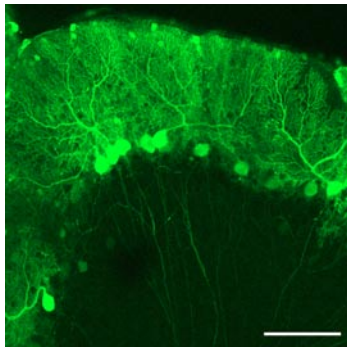


図1

の薄切切片を作製し GFP の局在を観察した。アデノ随伴ウイルスに関しては、高力価のウイルスを得ることが困難であり、最もよく遺伝子導入された小脳の小葉でも全プルキンエ細胞の 5~10%程度しか GFP 発現が見られなかった。これに対して、レンチウイルスベクターに関しては、 10^8 (TU/ml)から 10^{10} のオーダーの高力価のものが得られ、プルキンエ細胞への GFP 発現効率もアデノ随伴ウイルスよりはるかに高かった(図 1)。このようなことから、以後レンチウイルスを用いて研究を進めた。

(1) レンチウイルスベクターを小脳皮質に接種したときの遺伝子発現プロフィール

小脳には5種類の神経細胞、すなわち顆粒細胞、プルキンエ細胞と3種類の介在神経(星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞)が存在する。レンチウイルスベクターがどの細胞に親和性を持つかを検討した。GFP 遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを小脳皮質に接種し、1週間後に GFP の発現を観察したところ、プルキンエ細胞、3種類の介在神経とバークマングリアに顕著な GFP 蛍光を認めた。顆粒細胞には蛍光を認めず、レンチウイルスベクターは顆粒細胞には極めて感染しにくいと考えられた。

次に、レンチウイルスベクターを小脳皮質に接種したときに、小脳皮質以外の細胞に遺伝子発現が見られるかを検討した。小脳皮質は、橋核と下オリーブ核から投射を受ける(図 2)。また小脳

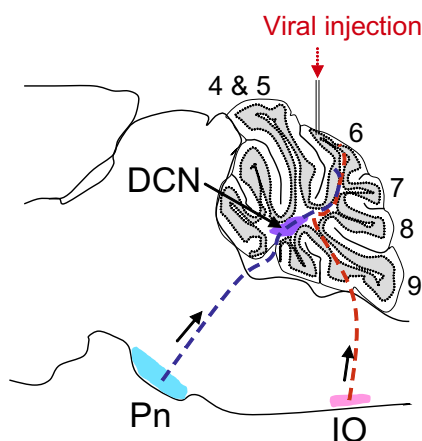


図2 Pn:橋核、IO:下オリーブ核、DCN:小脳核

皮質からの唯一の出力であるプルキンエ細胞は小脳核に投射する。

アデノウイルスを小脳皮質に接種した場合は、軸索終末にウイルスが感染し逆行性に輸送された結果、橋核と下オリーブ核の細胞体に遺伝子発現が見られることが報告されている。そこで、HIV 由来レンチウイルスベクターを小脳皮質に接種した場合の、小脳皮質外の遺伝子発現を調べた。GFP 発現は、GFP に対する抗体で染色することにより増幅して観察した。その結果、小

脳皮質では広範囲に遺伝子発現が観察されたのに対し、橋核、下オリーブ核、小脳核への発現は全く観察されなかった。このことから、小脳皮質に接種したによる遺伝子発現は、小脳皮質に局限することが明らかになった。この結果は、HIV 由来レンチウイルスベクターを小脳皮質に接種した場合、小脳皮質以外の遺伝子発現の影響や副作用を考慮する必要が無いことを示しており、

基礎研究と遺伝子治療の両方において、このウイルスベクターは非常に有用であると考えられた。

(2) レンチウイルスベクターのカ価と小脳皮質における遺伝子発現の関係

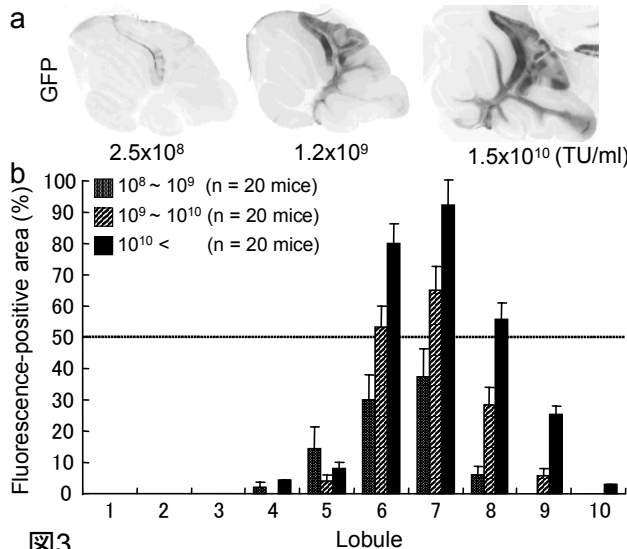


図3

独立した培養で得られた 31 バッチのウイルスベクターを $10^8 \sim 10^9$ 、 $10^9 \sim 10^{10}$ 、 10^{10} TU/ml 以上の3つのカテゴリー（それぞれ 10 バッチ、10 バッチ、11 バッチ）にわけ、それぞれ 20 匹のマウス（計 60 匹）の小脳第 6 小葉に接種した。7 日後に灌流固定し小脳虫部の矢状断切片を作製、小脳の各小葉において、GFP が発現している面積(%)を求めた。その結果、第 6、第 7 小葉を中心に GFP の発現が見られ、ウイルスカ価が高いほど広範囲に発現することがわかった(図3)。 10^{10} TU/ml 以

上のカ価を持つウイルスベクターの接種では、第 6、第 7 小葉の 80%以上の領域に GFP の発現が認められ、さらに尾側の第 8、第 9 小葉にかけてもそれぞれ、55%、25%程度の領域に GFP 発現が認められた。この結果に基づき、ウイルスベクターの接種部位を工夫して 3 箇所を増やしたところ、小脳虫部の約 80%にわたる広範囲で外来遺伝子を発現させることができた。

(3) レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞への親和性に影響を与える因子

レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞に対する親和性は、ウイルス産生時の培養液の pH に依存することを発見した。pH7.2 の培養液から得られたウイルスを接種した小脳では、全 GFP 発現細胞のうち、約半分がプルキンエ細胞であった。これに対し、pH6.7-7.0 の培養液から得られたウイルスを用いた場合、全 GFP 発現細胞のうちプルキンエ細胞は 15%しか無く、80%近くがバグマングリア細胞であった。このようにウイルス産生時の培養液 pH のわずかな変化が、レンチウイルスベクターのプルキンエ細胞への親和性を大きく変化させることが明らかとなった。

(4) レンチウイルスベクターを用いた小脳星状細胞、籠細胞特異的遺伝子発現

前述のごとく、小脳には 5 種類の神経細胞が存在する。顆粒細胞、プルキンエ細胞と 3 種類の介在神経(星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞)である。介在神経は抑制性の神経で顆粒細胞とプルキンエ細胞の活動を抑制することから、小脳の活動を微調整していると考えられている。しかし、

顆粒細胞やプルキンエ細胞と比較し、介在神経の機能はあまり解明されていない。介在神経を遺伝子レベルから理解するには、介在神経特異的に外来遺伝子を発現させる技術が必要であるが、これまで介在神経特異的なプロモーターは知られていなかった。本研究課題で、レンチウイルスベクターに組み込んだ場合も神経細胞に特異性を持つプロモーターを探索していたが、その過程で偶然、星状細胞と籠細胞に高い選択性を持つプロモーターを同定した(2005年に特許出願)。このプロモーターを組み込んだレンチウイルスベクターを用いることにより、星状細胞と籠細胞の研究が進むことが期待される。

小脳失調関連遺伝子の機能解明

(1) 小脳顆粒細胞で産生される糖タンパク質、Cbln1 の機能解明

Cbln1 は小脳顆粒細胞で作られ、顆粒細胞軸索(平行線維)終末より活動依存的に放出される。Cbln1 は10年以上前に発見されていたが、その機能は不明であった。そこでCbln1のノックアウトマウスを作出したところ、顕著な運動失調が観察された。電気生理学的には、① 平行線維-プルキンエ細胞シナプスの伝達障害、② 平行線維-プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象(LTD)の誘導障害、③ プルキンエ細胞上の余剰な登上線維シナプスの排除障害、が観察された。電顕では、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの数が野生型の2割程度しか形成されていないことが明らかになった。これらの所見は平行線維-プルキンエ細胞シナプスのプルキンエ細胞側(ポスト)に発現する $\delta 2$ グルタミン酸受容体のノックアウトマウスと極めて類似の表現型であった。Cbln1 ノックアウトマウスと $\delta 2$ グルタミン酸受容体ノックアウトマウスをかけ合わせ、Cbln1 と $\delta 2$ グルタミン酸受容体のダブルノックアウトマウスを作出し解析したところ、障害が加算されるのではなく、より軽い $\delta 2$ グルタミン酸受容体ノックアウトマウスとほぼ同じであった。

以上より、顆粒細胞で合成され平行線維終末より放出されるCbln1は、プルキンエ細胞に作用し、 $\delta 2$ グルタミン酸受容体と最終的には重なるシグナル伝達経路をトリガーし、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの形成と可塑性、さらに登上線維シナプスの排除を制御していることがわかった。

今後の展開

これまでの一連の研究で、in vivo マウスの小脳プルキンエ細胞への選択的かつ効率的な遺伝子導入が可能となったため、現在、この方法を用いて $\delta 2$ グルタミン酸受容体などの小脳失調関連遺伝子の機能を解明する研究を行っている。これと平行して、本遺伝子発現技術を応用した、脊髄小脳変性症をはじめとする小脳疾患の遺伝子治療法の開発も進めている。

研究成果リスト

論文(原著論文)発表

1. Torashima T, Okoyama S, Nishizaki T, Hirai H. In vivo transduction of murine cerebellar Purkinje cells by HIV-derived lentiviral vectors. **Brain Research** 2006 Mar 3; [Epub ahead of print]
2. Qin Q, Inatome R, Hotta A, Kojima M, Yamamura H, Hirai H, Yoshizawa T, Tanaka H, Fukami K, and Yanagi S. A novel GTPase, CRAG, mediates PML-associated nuclear body formation and degradation of expanded polyglutamine protein. **Journal of Cell Biology** 172:497–504, 2006
3. Hirai H, Zeng P, Bao D, Miyazaki T, Li L, Miura E, Parris J, Rong Y, Watanabe M, Yuzaki Y, Morgan JI.: Cbln1 is essential for synaptic integrity and information processing in the cerebellum. **Nature Neuroscience** 8:1534–1541, 2005
4. Hirai H, Miyazaki T, Kakegawa W, Matsuda S, Mishina M, Watanabe M, Yuzaki Y: Rescue of abnormal phenotypes of the delta2 glutamate receptor-null mice by mutant delta2 transgenes. **EMBO Reports** 6: 90–95, 2005
5. Hirai H, Launey T, Mikawa S, Torashima T, Yanagihara D, Kasaura T, Miyamoto A, Yuzaki M.: New role of delta2-glutamate receptors in AMPA receptor trafficking and cerebellar function. **Nature Neuroscience** 6: 869–876, 2003

特許出願: 4 件

1. 発明者: 平井宏和、寅嶋崇
発明の名称: プルキンエ細胞指向性ベクター
出願人: 金沢大学 TLO
出願日: 平成 18 年 3 月 8 日
出願番号: 特願 2006-062192

2. 発明者:平井宏和、寅嶋崇

発明の名称:小脳星状細胞及び籠細胞特異的な遺伝子発現方法

出願人:金沢大学 TLO

出願日:平成 17 年 8 月 10 日

出願番号:特願 2005-231514

3. 発明者:東田陽博, 横山茂, 金鐸, 大熊勝治, 清水宣明, 平井宏和, 松村慎一

発明の名称:パーキンソン病の治療のための医薬

出願人:金沢大学 TLO

出願日:平成 17 年 6 月 29 日

出願番号:特願 2005-189518

4. 発明者:平井宏和、寅嶋崇

発明の名称:プルキンエ細胞における遺伝子発現のための発現ベクター

出願人:独立行政法人科学技術振興機構

出願日:平成 16 年 8 月 11 日

出願番号:特願 2004-234912

学会発表

1. 平井宏和、渡辺雅彦、柚崎通介. 小脳顆粒細胞で合成される分泌タンパク質、Cbln1 は小脳のシナプス形成と可塑性に不可欠である. 第 83 回日本生理学会大会, 前橋, 2006
2. 寅嶋崇、山田伸明、平井宏和. HIV 由来レンチウイルスベクターを用いた In vivo マウス小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入. 第 83 回日本生理学会大会, 前橋, 2006
3. 平井宏和. 遺伝子治療モニタリングのための遺伝子発現イメージングの開発. 第 1 回学際科学実験センターシンポジウム, 金沢, 2005
4. 平井宏和. 遺伝子変異マウスとウイルスベクターを組み合わせた脳機能解析. 第 27 回日本神経科学第 47 回日本神経化学学会大会合同大会, 大阪, 2004(シンポジウム)
5. 平井宏和、寅嶋崇. ウイルスベクターを用いた培養小脳プルキンエ細胞への遺伝子導入、第 81 回日本生理学会大会、札幌、2004

総説

平井宏和. 遺伝子レスキューマウス作出による小脳の運動学習機構の解明. 実験医学, Vol.23, No.8(5月号), 1170-1175, 2005.

著書

1. 平井宏和, 狩野方伸. 第5章シナプス伝達と可塑性. 真鍋俊也編, 脳神経科学集中マスター, 第1版, 東京:羊土社, 2005 : 70-76.
2. 平井宏和. 第1章 小脳のグルタミン酸受容体と運動. 柳原大/内藤久士編, 運動とタンパク質・遺伝子, 第1版, 東京:ナツプ出版, 2004 : 2-16.
3. 柳原大, 餐場篤, 平井宏和. 第3章 運動制御・運動学習のメカニズムをタンパク質・遺伝子レベルで探る. 柳原大/内藤久士編, 運動とタンパク質・遺伝子, 第1版, 東京:ナツプ出版, 2004 : 27-49.