

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 分担研究報告

SCA1 ノックインマウスでは発症前からシナプス成熟が遅滞している

研究分担者 永井 義隆(国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部)
共同研究者 畑中 悠佑 (同上)
和田 圭司 (同上)

研究要旨

本研究では、ポリグルタミン病における神経機能障害のメカニズム解明を目的として、2光子レーザー顕微鏡を用いて脊髄小脳失調症1型(SCA1)ノックインマウスにおけるシナプス形態・動態異常の解析を行った。その結果、発症前のシナプス発達期では明らかなシナプスの形態異常は認めないが、シナプス足場タンパク質である Homer1b/c、Shank などの発現が有意に減少し、シナプスのターンオーバー率が有意に亢進していることが明らかになった。さらに、シナプスターンオーバー率の亢進は、シナプス成熟期でも持続することから、ポリグルタミン病などの晩発性神経変性疾患の神経機能障害の根底に発達期のシナプス成熟障害が寄与する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン (PolyQ) 病など多くの神経変性疾患において、様々なタンパク質のミスフォールディング・凝集がかかわる共通の神経変性メカニズムが考えられている。しかしながら、神経症状は最終的な神経細胞死に至る前の神経機能障害の段階で出現すること、そしてそれが可逆的であることが明らかにされたものの、タンパク質のミスフォールディング・凝集の下流で引き起こされる可逆性神経機能障害の実体、その詳細なメカニズムについてはこれまで未解明であった。発症後からの治療介入を考えた場合、可逆性神経機能障害の解明とそれによる新たな治療標的の特定は、きわめて重要

な課題である。私たちは、可逆性神経機能障害の分子メカニズム解明を目指して、これまで PolyQ 病モデルショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングを行い、複数のシナプス関連遺伝子が神経機能障害に関わることを明らかにしてきた。本研究では、神経変性疾患における可逆性神経機能障害の根底に存在するシナプス異常の詳細を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

B&C&D. 研究方法・結果および考察

様々なポリグルタミン病モデルの中から、ヒト患者での遺伝子異常を忠実に再現しているために組織特異的な神経ネットワーク障害が保存されている脊髄小脳失調症1型(SCA1)のノックインマウス

SCA1^{154Q/2Q} (Watase et al. Neuron 2002) を用いた。この SCA1^{154Q/2Q} マウスは、ヒト SCA1 患者と同様に小脳の神経変性に伴う運動失調を発症する一方で、それ以外にも神経変性を認めない大脳皮質・海馬などの機能障害に伴う記憶・学習能の障害を呈することから、神経変性非依存的な神経機能障害の実体解明に適していると考えた。

ニューロンの樹状突起スパインを可視化するために神経細胞特異的に YFP を発現する Thy1-YFP マウスを用いて、このマウスと SCA1^{154Q/2Q} マウスとの交配により得られた SCA1^{154Q/2Q}/Thy1-YFP マウスについて解析を行った。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳固定切片の *ex vivo* 解析

まず、SCA1^{154Q/2Q} マウスを経時的に灌流固定して脳切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてスパイン形態の解析を行った。その結果、海馬 CA1 錐体ニューロンの樹状突起スパインは、発症する 5 週齢時点では顕著な形態変化を認めなかったが、8 週齢、12 週齢と週齢を重ねるに連れてスパイン密度が徐々に減少し、スパイン頭部の大きさも狭小化していた。以上のことから SCA1 マウスにおけるシナプス変性は経時的に進行すると考えられた。

2 光子レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳の *in vivo* イメージング解析

次に、観察深度が深くレーザーによる組織・細胞障害が少ないため生体のタイムラプスイメージング解析に適した 2 光子レーザー顕微鏡を用いて、スパインの形態のみならず、その動態解析を行った。

SCA1^{154Q/2Q} マウスの頭蓋骨を薄く削り、非侵襲的な Thinned-skull 法にて大脳皮質ニューロンの樹状突起スパインの経時的な 2 光子レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、明らかなスパイン形態異常は認めない発症前の 4 週齢から、スパインの新生・消失を示すターンオーバー率が既に有意に亢進していることが明らかになった。さらに、通常は 6 週齢、8 週齢と成熟に伴って低下していくターンオーバー率が、亢進したまま持続することが明らかになった。以上のことから、SCA1 マウスでは発症前から発達期のシナプス成熟が遅延している可能性があると考えられた。

SCA1 マウス脳におけるシナプス関連分子の発現解析

SCA1^{154Q/2Q} マウスから経時的に脳サンプルを採取し、RT-PCR およびウェスタンブロットにより、シナプス関連分子の発現変動を解析した。その結果、発症前の 4 週齢から Homer1b/c、Shank などの発現が有意に減少していた。一方で、PSD95 などには有意な変化を認めなかった。以上のことから、SCA1 マウスでは発症前からシナプスの足場タンパク質の発現が減少していることが明らかになった。

(倫理面への配慮)

本研究では直接ヒトを対象とした研究は行っていない。実験動物の取扱いにあたっては国の法律・指針および研究機関の動物実験倫理指針を遵守した。

E. 結論

本研究の結果から、SCA1 などの晩発性神経変性疾患の神経症状発症の根底に発

達期のシナプス成熟障害が寄与する可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi T, Popiel HA, Futaki S, Wada K, Nagai Y: Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr Med Chem* (in press)
- 2) Togashi K, Wakatsuki S, Furuno A, Tokunaga S, Nagai Y, Araki T: Na⁺/H⁺ exchangers induce autophagy in neurons and inhibit polyglutamine-induced aggregate formation *PLoS One* 2013; 8(11): e81313
- 3) Popiel HA, Takeuchi T, Burke JR, Strittmatter WJ, Toda T, Wada K, Nagai Y: Inhibition of protein misfolding/aggregation using polyglutamine binding peptide QBP1 as a therapy for the polyglutamine diseases. *Neurotherapeutics* 2013; 10(3): 440-446
- 4) Higashi S, Kabuta T, Nagai Y, Tsuchiya Y, Akiyama H, Wada K: TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. *J. Neurochem.* 2013; 126(2): 288-300
- 5) 永井義隆, 藤掛伸宏: コンフォメーション病としての神経変性疾患. *ファル*

マシア 2013; 49 (9): 849-853

- 6) 畑中悠佑, 和田圭司, 永井義隆: 認知症におけるシナプス病態. *Dementia Japan* 2013; 27 (2): 128-135
- 7) 永井義隆: ポリグルタミン鎖の伸長による SCA. <アクチュアル 脳・神経疾患の臨床 > 「小脳と運動失調」(西澤正豊編、中山書店) 172-181 (2013)

2. 学会発表

- 1) Nagai Y: Disruption of microtubule-dependent transport triggers accumulation and oligomerization of TDP-43 in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in ALS. *Niigata Neurosci Res Meeting* (Jun 3, 2013, Niigata, Japan)
- 2) Nagai Y: Toxic protein conformational transition and amyloid fibril formation in the polyglutamine diseases. *Int Symp on Amyloidosis* (Jan 24, 2013, Tokyo, Japan)
- 3) Fujikake N, et al: Impairment of microtubule-dependent transport of TDP-43 triggers its aggregation, leading to neurodegeneration in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies. *43rd SFN Meeting* (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA)
- 4) Ishiguro T, et al: Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes neurodegeneration in *Drosophila*. *43rd SFN* (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA)
- 5) Nagai Y, et al: Dietary restriction

- improves proteostasis and suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in *Drosophila*. 7th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders (Jun 23-28, 2013, Waterville Valley, NH)
- 6) Popiel HA, et al: Identification of a polyglutamine oligomerization inhibitor with high brain permeability and safety, which exerts therapeutic effects on multiple mouse models of the polyQ diseases. 7th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders (Jun 23-28, 2013, Waterville Valley, NH)
- 7) Fujikake N, et al: Aggregation of TDP-43 is triggered by insufficiency of microtubule-dependent transport in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in *Drosophila*. 11th Int Conf on Alzheimer's & Parkinson's Dis (Mar 6-10, 2013, Florence, Italy)
- 8) 永井義隆: Hsp40 はエクソソーム分泌により細胞非自律的なポリグルタミン病の治療効果を発揮する。第 32 回日本認知症学会学術集会 (H25.11.8-10、長野)
- 9) 永井義隆: 蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした神経変性疾患の治療戦略。第 13 回日本蛋白質科学会 (H25.6.12-14、鳥取)
- 10) 武内敏秀, 他: Hsp40 はエクソソーム依存的な細胞間伝播により個体レベルのタンパク質恒常性維持に寄与している。第 36 回日本分子生物学会 (H25.12.3-6、兵庫)
- 11) 鈴木マリ, 他: 過栄養食はインスリン様シグナルを介して神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性に影響する。第 36 回日本分子生物学会 (H25.12.3-6、兵庫)
- 12) 高橋理貴, 他: 野生型 -シヌクレイン過剰発現に対する遺伝子発現補正型 RNAi 誘導法の確立と有効性評価。第 36 回日本分子生物学会 (H25.12.3-6、兵庫)
- 13) 長谷川隆文, 他: RNAi-mediated knockdown of VPS35 impairs -synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D. 第 86 回日本生化学会 (H25.9.11-13、横浜)
- 14) 藤掛伸宏, 他: DCTN1 依存的輸送の障害により TDP-43 発現ショウジョウバエの神経変性は増悪する。第 54 回日本神経学会学術大会 (H25.5.29-6.1、東京)
- 15) 鈴木マリ, 他: GBA の機能喪失によりパーキンソン病モデルショウジョウバエの神経変性は増悪する。第 54 回日本神経学会学術大会 (H25.5.29-6.1、東京)
- 16) 石黒太郎, 他: SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで複眼変性を引き起こす。第 54 回日本神経学会学術大会 (H25.5.29-6.1、東京)
- 17) 今野昌俊, 他: ショウジョウバエモデルを用いた Vps35 遺伝子異常によるパーキンソン病発症機構の解析。第 54 回日本神経学会学術大会

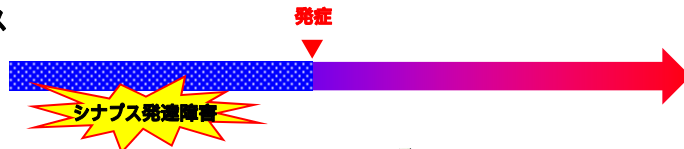
(H25.5.29-6.1、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

**ポリグルタミン病など晩発性神経変性疾患では
発達期のシナプス成熟障害が存在する可能性がある**

SCA1マウス



2光子レーザー顕微鏡 / 生体イメージング

