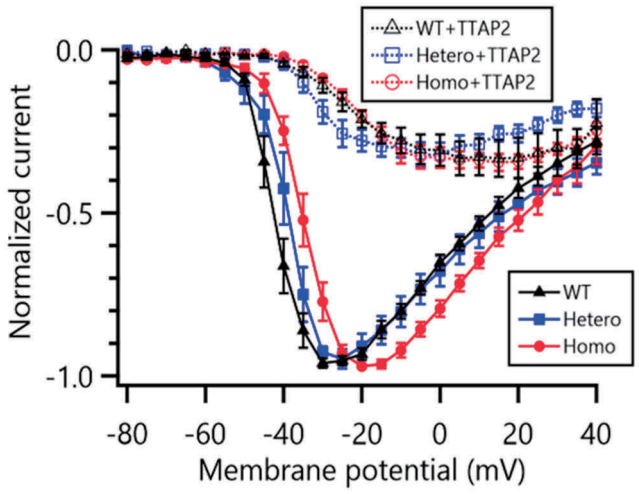
172　脊髄小脳失調症42型の分子病態解明と新規治療法開発	橋口　俊太

【目的】我々は、研究対象としてきた脊髄小脳失調症（SCA）家系において電位依存性 T 型カルシウムチャネルの一種である Cav3.1 をコードする CACNA1G のバリアント（c.5144G＞A p.Arg1715His）を責任遺伝子として独自に同定し、2015 年の海外からの報告を以て、この疾患は SCA42 と命名された。SCA42 は緩徐進行性の小脳性運動失調を主症状とし、小脳萎縮、プルキンエ細胞の脱落をきたす神経変性疾患である。我々は SCA42 の分子病態を解明するモデル動物を作製するため、ゲノム編集技術を用いて Cacna1g R1723H KI マウス（c.5168G＞A p.Arg1723His）を新規に作製・解析し、世界に先駆けて 2019 年に報告した。このモデルは、点変異の導入により、患者と同様の緩徐進行性の失調症状、小脳プルキンエ細胞変性をきたすことを証明し、疾患モデルとしての有用性を明らかにした。しかしながら、神経変性に至るメカニズムについては未解明であり、治療法開発へ向けた SCA42 の病態解明には解決すべき数多くの課題がある。本研究では、新規に確立した SCA42 モデルマウス（Cacna1g_R1723H_KI マウス）を、分子生物学的、病理学的および電気生理学的手法を駆使しさらに多面的に解析することで、カルシウムチャネロパチーとしての神経変性の病態を解明し、病態に基づく根本治療開発へ繋げることを目的とした。

【方法】具体的には、①50 週齢のモデルマウスの小脳から RNA を抽出し、RNA シークエンスによる発現変動遺伝子解析、②T 型 Ca チャネルが発現しているプルキンエ細胞をターゲットに *in vivo* 系での神経細胞ネットワークを温存した状態での電気生理学的解析、③T 型 Ca チャネル修飾薬（X）をモデルマウスに投与し、Rotarod test および foot print test による行動解析および小脳プルキンエ細胞変性過程についての病理学的解析、④CACNA1G バリアントを導入した培養細胞に対する（X）の電流電圧曲線に対する効果の検証を行うことで、SCA42 の病態解明・治療法開発を試みた。

【結果】①RNA シークエンスで網羅的に解析されたデータから発現変動遺伝子を検出し、バイオマーカーとなりうる分子を同定した。Pathway 解析ではヘテロ、ホモともに共通して低下している経路を見いだした。②*In vivo* 実験でのターゲットであるプルキンエ細胞の同定を確実にするために、L7 プロモーターを用いた Cre-LoxP システムを用いて、プルキンエ細胞特異的に光感受性イオンチャネルであるチャネルロドプシン 2（ChR2）を発現するトランスジェニックマウスとの交配を行った。③行動解析では 36 週以降では（X）の投与によりヘテロマウスで有意に Rotarod test での改善を認めた。病理学的解析では、50 週齢のマウス小脳切片において（X）投与群でヘテロマウスのプルキンエ細胞脱落が有意に抑制された。④培養細胞（HEK293T）にヒト SCA42 バリアント（R1715H）を transfection し、（X）投与を行ったが、電流電圧曲線のシフトの改善は認めなかった。

若齢マウス小脳スライスのパッチクランプ法による電流電圧曲線



172. 脊髄小脳失調症 42 型の分子病態解明と新規治療法開発

橋口　俊太

横浜市立大学 医学部 脳神経内科・脳卒中科

Key words：脊髄小脳失調症 42 型，T 型カルシウムチャネル，プルキンエ細胞，パッチクランプ法

緒　言

脊髄小脳失調症（SCA）は代表的な遺伝性神経変性疾患のひとつであり、近年の DNA シークエンス技術の進歩により種々の遺伝子変異が次々と発見され、現在までに SCA1 から SCA50 までの病型が報告されている。一方で、全病型において根本治療は存在せず、治療に結びつく病態機序は未だ十分に解明されていない。我々が研究対象としてきた脊髄小脳失調症（SCA）家系において、単一家系ではあるもののエクソーム解析により新規原因遺伝子として Cav3.1 をコードする CACNA1G のバリアント（c.5144G＞A p.Arg1715His）を同定した。同バリアントは 2015 年にフランスの複数 SCA 家系において報告され［1］、この疾患は SCA42 と命名された。SCA42 は緩徐進行性の小脳性運動失調を主徴とし、一部の症例では振戦、抑うつ症状ならびに認知機能障害を呈することが知られている。脳 MRI では小脳萎縮を呈し、病理学的には小脳プルキンエ細胞の変性を来す。Cav3.1 をコードする *CACNA1G* 遺伝子は、中枢神経系では視床、扁桃体、小脳、下オリーブ核などに多く発現している。野生型 Cacna1g を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、視床―大脳皮質ネットワークの機能亢進により、spike-and-wave discharge が生じ、欠神発作を呈することが報告されている［2］。一方、Cacna1g ノックアウトマウスでは、電気生理学的に rebound firing が欠如し、バクロフェン誘導性の SWDs が見られないことより、欠神発作の原因となる SWDs 産生に Cav3.1 が関与することが示されている。このノックアウトマウスでは運動機能、生存には影響を与えず、SCA 様の表現型は呈さないことが報告されている［3］。

我々は、SCA42 の責任遺伝子同定直後からバリアントを導入したノックインマウス（Cacna1g_R1723H_KI マウス）の作製と解析を行ってきた。SCA42 のバリアント部位（Arg1715）はチャネルの電位感受性センサーに相当するため、R1715H バリアントにより電位センサー機能に何らかの障害を来し、電気生理学的性質に影響することが推測される。実際に、SCA42 マウスの小脳急性スライスを用いて、プルキンエ細胞、下オリーブ核神経細胞を主なターゲットとしたパッチクランプ法により、電気生理学的性質の変化が生じることを証明した。さらに、バリアントの導入により、患者と同様の緩徐進行性の失調症状、小脳プルキンエ細胞変性をきたすことを証明し、疾患モデルとしての有用性を明らかにした［4］。しかしながら、プルキンエ細胞、下オリーブ核神経細胞でみられた電気生理学的異常と神経細胞内の分子発現変化の関係性、さらに神経変性に至るメカニズムについては未解明であり、治療法開発へ向けた SCA42 の病態解明には解決すべき数多くの課題がある。本研究では、新規に確立した SCA42 モデルマウス（Cacna1g_R1723H_KI マウス）を、分子生物学的、病理学的および電気生理学的手法を駆使しさらに多面的に解析することで、カルシウムチャネル異常による神経変性の病態を解明し、病態に基づく根本治療開発へ繋げることを目的とする。プルキンエ細胞のより詳細な形態変化の観察に加えて、*in vivo* で神経細胞ネットワークを温存した状態で電気生理学的検討を行うことで、バリアントが小脳ネットワークに与える影響を統合的に解析する。T 型カルシウムチャネルのバリアントによる影響が loss of function あるいは toxic gain of function の機序で病態を形成しているとの仮説に立脚し、モデル動物に対して、T 型カルシウムチャネル修飾薬を投与し、行動解析および病理学的側面から治療効果判定を試みる。すなわち、本研究は、これまで全く治療法のなかった脊髄小脳失調症の病態修飾治療を実現するための基盤を構築し、さらにカルシウムチャネル異常という新たな視点から神経変性機序を明らかにするものである。

方　法

1. SCA42 マウスの分子生物学的解析

野生型マウス及び変異 KI マウスの小脳組織から RNA を抽出し、RNA シークエンスを行い、遺伝子発現を網羅的に解析した。

2. SCA42 マウスの電気生理学的解析

記録電極を頭蓋外より直接穿刺し、プルキンエ細胞をターゲットにした解析を行い、*CACNA1G* 遺伝子異常が神経細胞ネットワークに与える影響を解析した。対象は表現型がみられる高齢マウスとし、確実かつ迅速にプルキンエ細胞に穿刺を行うために、プルキンエ細胞特異的なプロモーターL7 で CRE を発現する系統と CRE 依存的にチャネルロドプシン 2 を発現する系統を SCA42 マウスと交配し作製した個体を用いた。これにより、光遺伝学的手法を用いてプルキンエ細胞を簡易的にかつ確実に同定することが可能となり、自発発火および誘発発火について主に simple spike および complex spike に着目し電気生理学的解析を行った。

3. SCA42 の治療法開発

T 型 Ca チャネル修飾薬（X）を野生型および SCA42 マウスへ 10 週齢から 50 週齢まで自由飲水に混合の上、経口投与し、Rotarod test および foot print test による行動解析および小脳プルキンエ細胞変性過程についての病理学的解析を実施した。

4. 培養細胞での（X）薬効検証

HEK293Tcell に CACNA1G 野生型および R1715H バリアントを transfection し、パッチクランプ法にて電流電圧曲線を作成した。0.1 mM および 1 mM の（X）を添加し、前後での電位依存性変化の有無を解析した。

結果および考察

1. SCA42 マウスの分子生物学的解析

50 週齢のマウス（野生型、ヘテロ、ホモ）各 3 匹ずつの小脳から RNA を抽出し、RNA シークエンスを行った。網羅的に解析されたデータから発現変動遺伝子を検出し、さらに機能解析を行った。網羅的に解析した 50,000 以上の遺伝子から、Log Fold Change と Log P. value をもとに、発現変動遺伝子を検索し Volcano plot と Heatmap で可視化を行った。野生型と比して低下している発現遺伝子は、ヘテロで 19 個、ホモでは 33 個認められ、野生型と比して上昇しているものはヘテロで 13 個、ホモでは 26 個認められた。また、ヘテロとホモで共通していた遺伝子は低下群で 15 個、上昇群で 8 個であり、多くの遺伝子が共通して変動していることが分かった（図 1）。発現変動遺伝子自体は少ないものの、これらは分子マーカーの候補となりうると考えられた。ヘテロ、ホモともに共通して発現変動する遺伝子が見つかったことにより、今後、これらを qPCR や WB で検証することでバイオマーカーとなりうる分子を同定する方針である。さらに（X）による治療介入群の RNA シークエンス解析を行うことで、候補となったバイオマーカーの有用性を検討していく。

2. *In vivo* レベルにおける SCA42 病態基盤の電気生理学的解析

電位依存性 T 型カルシウムチャネル CaV3.1 の異常が運動失調をもたらす機序を解明するために、*in vivo* のニューロン活動をモデルマウスで記録して、バリアントの影響を解析する必要がある。Cav3.1 を発現している小脳プルキンエ細胞をターゲットとするが、この神経細胞の特徴として単純スパイク（SS）と複雑スパイク（CS）を発することが挙げられ、これらの発火をもって、プルキンエ細胞のユニットとして同定される（図 2）。しかし、SCA42 マウスの場合には、必ずしもこのような発火が見られるとは限らないため、他の方法を使ってプルキンエ細胞を同定する必要が生

じる。L7 プロモーターを用いた Cre-LoxP システムを用いて、プルキンエ細胞特異的に光感受性イオンチャネルであるチャネルロドプシン 2（ChR2）を発現するトランスジェニックマウスを用いて、光照射により発火頻度が著明に増加することをもってプルキンエ細胞と同定する方法を採用する。このマウスをベースとして、SCA42 の遺伝子バリアントがホモ、ヘテロ、野生型であるマウスを作製して比較を行う。既に SCA42 との交配を終了し、上記方法を用いてデータ取得中である。今後、例数を増やして統計的検討を行っていく予定である。

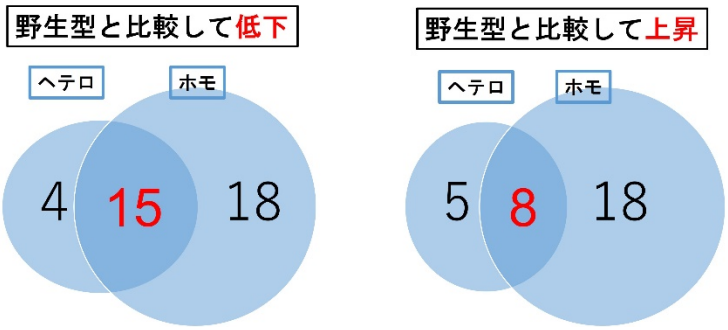


図 1. 高齢マウス小脳から抽出した RNA シークエンスによる発現遺伝子の差異
野生型と比して低下している発現遺伝子は、ヘテロで 19 個、ホモでは 33 個認められ、野生型と比して上昇しているものはヘテロで 13 個、ホモでは 26 個認められた。また、ヘテロとホモで共通していた遺伝子は低下群で 15 個、上昇群で 8 個であり、多くの遺伝子が共通して変動していた。

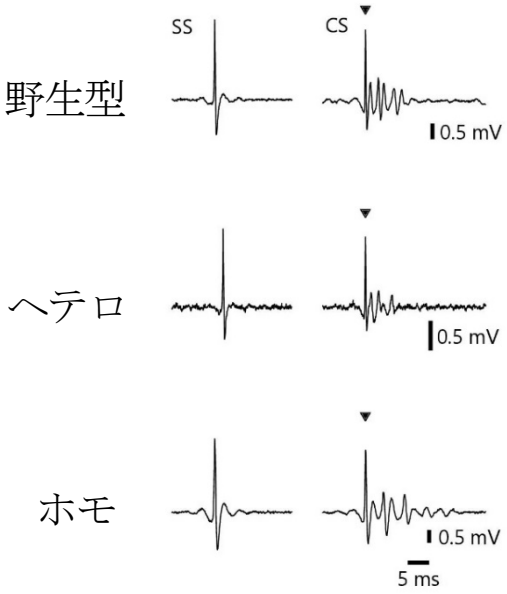


図 2. *In vivo* で記録したマウス小脳プルキンエ細胞におけるスパイク
野生型、ヘテロ、ホモの遺伝子群で観察された単純スパイク（SS）と複雑スパイク（CS）の一例。プルキンエ細胞の特徴として、これらのスパイクが観察されることでプルキンエ細胞のユニットとして同定される。

3. SCA42 モデル動物を用いた T 型 Ca チャネル修飾薬（X）の薬効評価の確立

Arg1715 は T 型 Ca チャネルの電位センサー領域に相当し、同部位のバリアントにより、電位センサー機能に異常を来す可能性が示唆される。治療薬候補として、T 型 Ca チャネル修飾薬の一種で中枢移行性の良い（X）を選択した。

投与量の検討結果から 0.2 g/kg/day を至適容量と設定し、自由飲水により 10 週齢から 50 週齢までの期間投与した。行動解析では 36 週以降において（X）投与によりヘテロ KI マウスで改善を認めた。病理学的解析では、50 週齢のマウス小脳切片において（X）投与群でヘテロ KI マウスのプルキンエ細胞脱落が抑制された。以上より、（X）投与による運動失調の改善、およびプルキンエ細胞脱落抑制効果が証明されつつある。一方で、培養細胞（HEK293T）にヒト SCA42 バリアント（R1715H）をトランスフェクションし、（X）投与を行った。現在までのところ、電流電圧曲線のシフトの改善は得られていないが、（X）の治療効果メカニズムとしては、T 型 Ca^{2+}電流の制御に加え、それ以外の作用なども想定される。次年度への展開として、表現型が出現した 40 週齢以降のマウスへの（X）投与実験を開始しており、また SCA42 成体マウスの急性脳スライスを用いた（X）の効果の検証を行っていく。これらを通じて、ヒト SCA42 患者への応用へ向けてさらなる治療効果のメカニズム解明を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学神経内科学・脳卒中医学教室の土井宏、大久保正紀、國井美紗子、竹内英之、田中章景、東京慈恵会医科大学薬理学教室の石川太郎、中村行宏である。

文　献

1） Coutelier M, Blesneac I, Monteil A, Monin ML, Ando K, Mundwiller E, et al. A Recurrent Mutation in CACNA1G Alters Cav3.1 T-Type Calcium-Channel Conduction and Causes Autosomal-Dominant Cerebellar Ataxia. Am J Hum Genet. 2015;97(5):726-37.

2） Ernst WL, Zhang Y, Yoo JW, Ernst SJ, Noebels JL. Genetic enhancement of thalamocortical network activity by elevating alpha 1g-mediated low-voltage-activated calcium current induces pure absence epilepsy. J Neurosci. 2009;29(6):1615-25.

3） Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, et al. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. Neuron. 2001;31(1):35-45.

4） Hashiguchi S, Doi H, Kunii M, Nakamura Y, Shimuta M, Suzuki E, et al. Ataxic phenotype with altered Ca(V)3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42. Neurobiol Dis. 2019;130:104516.