

# 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

### 1. 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。小脳が障害される代表的な疾患として脊髄小脳変性症がある。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処理される。プルキンエ細胞は小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであり、プルキンエ細胞の活動が小脳の機能として反映される。したがって、小脳研究において、プルキンエ細胞の生理学的、病理学的性質を分子レベルから理解することは重要であり、そのためには外来遺伝子をプルキンエ細胞特異的に発現させる技術が必要である。ところが、*In vivo* のプルキンエ細胞への遺伝子導入・発現は極めて困難で、現在まで 5 本の論文しかなく(PubMed 検索による)、そのいずれもがプルキンエ細胞特異的でなく、遺伝子発現効率も十分とはいえない。そこで本研究では、ウイルスベクターを用いて、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、小脳失調関連遺伝子の機能解明および脊髄小脳変性症などの遺伝性小脳疾患に対する遺伝子治療として応用することを目指した。

### 2. 研究成果

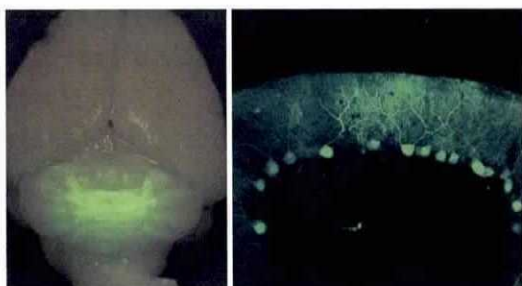


図1 レンチウイルスベクターを用いた小脳プルキンエ細胞への遺伝子発現

近年、開発の進む 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。GFP 遺伝子発現ウイルスベクターをマウスの小脳に接種した。7 日後に灌流固定して、小脳の薄切切片を作製し GFP の局在を観察した(図 1: 本課題の終盤で、確立したプロトコールで得られたデータ)。

#### 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を小脳皮質に接種し、1週間後にどの細胞に GFP が発現しているか観察した。その結果、プルキンエ細胞、3種類の介在神経とバグマンングリアに顕著な GFP 蛍光を認めた。これに対して、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親和性が低いと考えられた。

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。ウイルスベクターを小脳皮質に接種し、2週間後に小脳皮質外の GFP 発現を、GFP に対する抗体で染色し調べた。その結果、橋核、下オリーブ核、小脳核など小脳皮質外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 HIV 由来レンチウ

イルスベクターによる遺伝子発現は小脳皮質に限局することが明らかになった。この結果は、基礎研究と遺伝子治療の両方において、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、今後レンチウイルスベクターが頻用されていくと考えられた。

## 2) 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、ウイルスを産生する HEK293T 細胞の培養液の 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、そこから得られた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。

## 3) 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。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。

## 3. 今後の展開

In vivo マウスの小脳プルキンエ細胞への特異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 Cbln1、 $\delta 2$  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。

## 4. 研究成果リスト

### 論文

1. 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. Nat. Neurosci. 6: 869-876, 2003
2. 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 Rep. 6: 90-95, 2005

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. *Nat. Neurosci.* 8:1534-1541, 2005

#### 総説

4. 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, 2-16, 2004 5
5. 柳原大, 齋場篤, 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, 27-49, 2004
6. 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*, 23(8): 1170-1175, 2005
7. 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.

#### 学会発表(口頭発表)

1. 平井宏和, 山田伸明. 小脳プルキンエ細胞シナプス形成の分子メカニズム. 第1回 Neuroscience Frontier Research Conference (NEFRE), 宮崎, 2004.
2. 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回日本神経化学会大会合同大会, 大阪, 2004(シンポジウム).

#### 特許出願(3件)

- ・特願 2004-234912 「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」
- ・特願 2005-189518 「パーキンソン病の治療のための医薬」
- ・特願 2005-231514 「小脳星状細胞及び籠細胞特異的な遺伝子発現方法」