

「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

$1A$ Ca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多彩な神経疾患とリンクしていることが明らかにされてきた。脊髄小脳失調症6型(SCA6)はその一つであり、本邦の遺伝性脊髄小脳変性症においてSCA3について多く社会的ニーズの高い難治疾患である。本研究においては、SCA6の病態とチャンネル遺伝子変異との関係を明らかにするとともに、変異 $1A$ チャンネルおよび共存する他のタイプのCaチャンネル機能の調節、制御機構の活用により神経細胞の変性脱落の阻止をはかる。そしてCa依存性の神経細胞死を最終局面とする多くの神経変性疾患の治療法開発の基盤確立を目指す。現在、2種のチャンネルノックアウトマウスの作製を終了し、これらマウスの機能解析を行っている。一方SCA6の病態とチャンネル遺伝子変異との関係を変異 $1A$ チャンネルの発現制御、電流特性、活性制御などの側面から明らかにしつつある。今後、種々ノックアウトマウスの解析から得られた結果、さらに現在計画している変異Caチャンネル遺伝子をシングルコピー導入したノックインマウスの解析から $1A$ チャンネル遺伝子疾患の治療法を模索する。本研究成果は「イオンチャンネル疾患」全般の原因究明と治療法開発に格好のモデルを提供することになると期待される。

2. 研究実施内容

(1) 疾患変異を導入したCaチャンネルの機能解析

純粋ヒト由来チャンネル(ポリQの長さが13個、24個、28個の3種)を作製しHEK293細胞に発現させその電気生理学的特性を解析した。チャンネルの活性化、不活性化キネティクス、定常状態の活性化曲線に関しては、ウサギ/ヒトのキメラチャンネルの場合と同様差異は見られなかったが、定常状態の不活性化曲線においてポリQの長さが長くなるに従って曲線が左側にシフトすることがわかった。すなわち、ポリQの長さが長くなるに従ってチャンネルは不活性化しやすくなり、このチャンネルを通して流入するCa量が減少し、これがSCA6の疾患症状の原因であることが示唆された。

(2) $\alpha 1A$ チャンネルの翻訳産物であるP型チャンネルとQ型チャンネルのポリQ伸長による機能的差異

$\alpha 1A$ チャンネルのリピートIVのS3とS4の間の領域にアスパラギン・プロリン(NP)の挿入されるものとされないものの2種類のスプライスバリエントが存在しNPのあるものはQ型チャンネルの薬剤感受性を、ないものはP型チャンネルの薬剤感受性を示すことが明らかにされている。SCA6において障害を受けるプルキンエ細胞にはP型チャンネルのみが特異的に発現している。そこで "+NP"で、ポリQの長さが13個、28個の2種のヒト $\alpha 1A$ チャンネルをHEK293細胞に発現させその電気生理学的特性を解析した。チャンネルの活性化、不活性化キネティクス、定常状態の活性化曲線に関しては "-NP"のものと同様であった。しかし定常状態の不活性化曲線においてポリQの長さが28個のものは13個のものに比べ曲線が右側 ("-NP"の場合とは逆方向)にシフトすることがわかった。この結果はポリQの長さが長いものはチャンネルが不活性化しにくいことを意味する。この事実はNPのある $\alpha 1A$ チャンネルを発現する神経細胞はチャンネルを通して流入するCa量が減少せずに生き残り、NPのない $\alpha 1A$ チャンネルをもっぱら発現するプルキンエ細胞はチャンネルを通して流入するCa量が減少しそれが引き金となって死ぬという考えと矛盾しない。

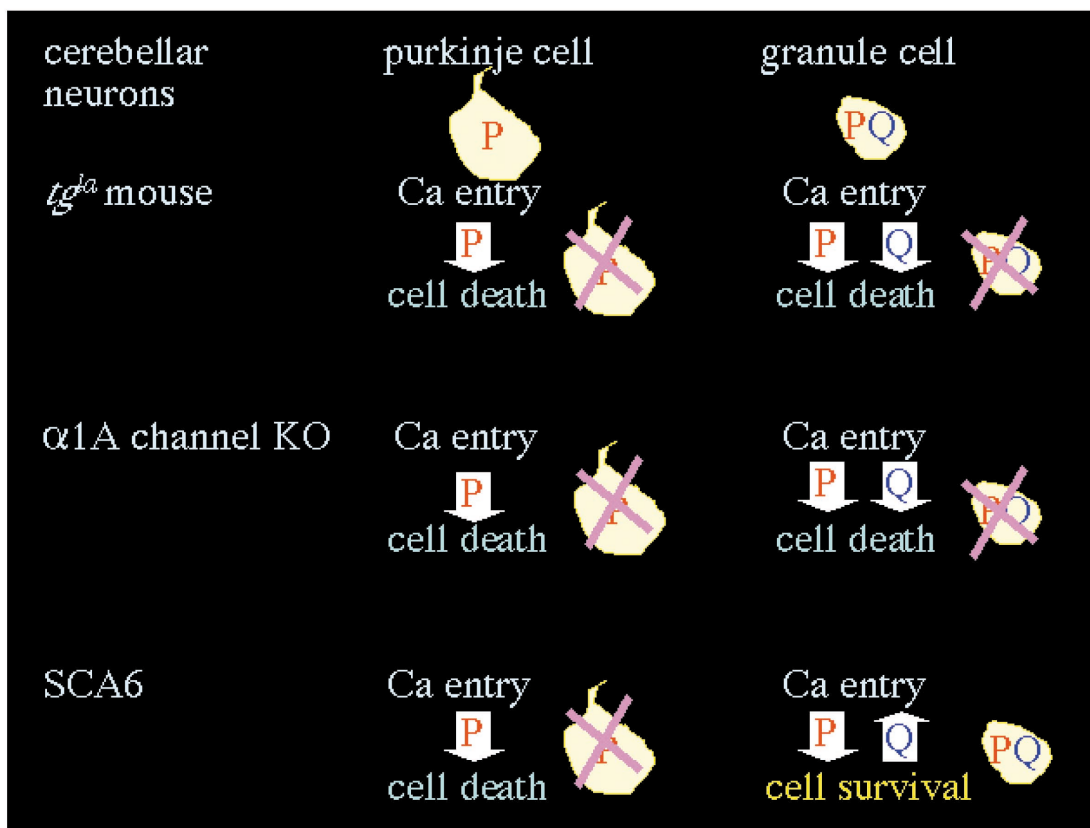


図1 SCA6におけるプルキンエ細胞選択的細胞死の機序のモデル

SCA6においてはプルキンエ細胞選択的神経細胞死が起こるのに対し、 tg^{la} マウス(ヒトの欠神発作のモデルとされ、あわせて運動失調を伴うマウスであり、 $1A$ チャンネル遺伝子に変異を有する)、 $1A$ チャンネルノックアウトマウスにおいては神経細胞死は起こるがプルキンエ細胞選択的ではない。

(3) モデルマウスの作製と機能解析

SCA6においては、原因遺伝子がCaチャンネルであるということから、もし疾患の原因がCaチャンネル活性の上昇/低下にある場合、発現量を生理的レベルに保つことができない通常のトランスジェニックマウスはモデルとなりえない。そこで $1A$ チャンネル遺伝子座のnativeプロモーターの下流に疾患Caチャンネル遺伝子をシングルコピー導入できるターゲットベクターを構築した。そしてこれをES細胞に導入し相同遺伝子組換えがおきた変異ES細胞クローンの単離に成功した。現在疾患 $1A$ チャンネル遺伝子を含む組み換え用ベクターの構築を終了したところである。今後これを上記変異ES細胞クローンに導入し最終的にノックインマウスを完成させる。

(4) チャンネル遺伝子ノックアウトマウスの作製と機能解析

現在、 $1B$ チャンネルノックアウトマウス、 $1E$ チャンネルノックアウトマウス、 $1A$ チャンネル遺伝子変異マウスであり小脳失調症状を示す tg^{la} マウスを用いて解析を行っている。現在、その中でもSCA6において変性脱落する小脳プルキンエ細胞において $1A$ チャンネルと共存する $1E$ チャンネルのノックアウトマウスに関する解

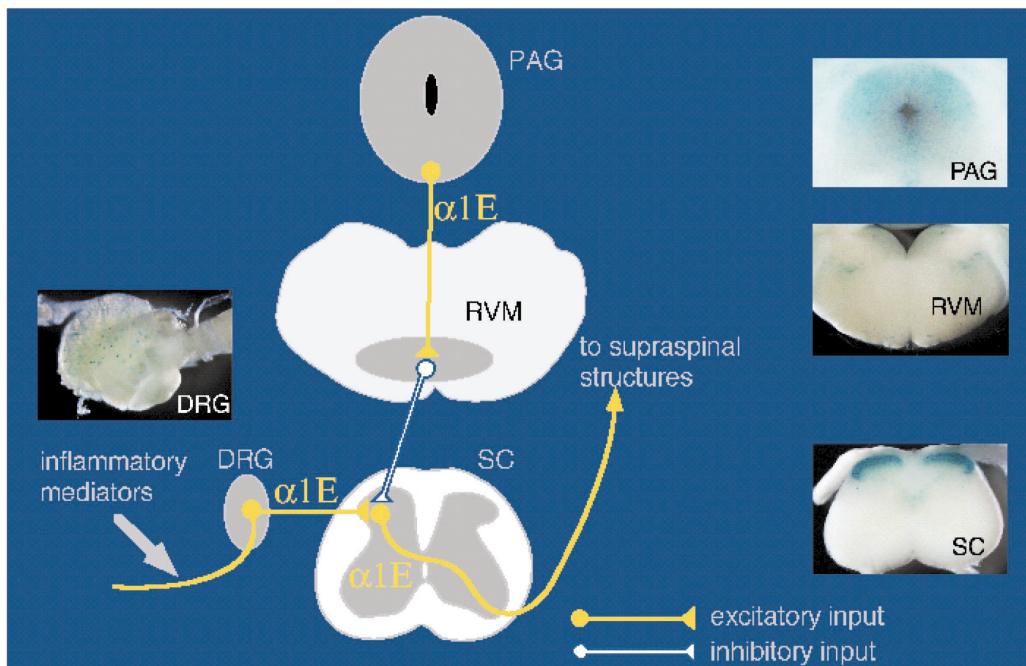


図2 $1E$ チャンネルは、脊髄レベルで、さらには脊髄よりも上位のレベルで痛みをコントロールしている。

析が最も進んでいる。そして α_1E チャンネルが脊髄レベルにおける痛み伝達において興奮性に働いていること、さらに内因性疼痛抑制機構の一つである脊髄上位から脊髄後角に下行する疼痛抑制系の興奮性に寄与する（痛みを抑える）ことが明らかになった。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

Ishikawa, K., Watanabe, M., Yoshizawa, K., Fujita, T., Iwamoto, H., Yoshizawa, T., Harada, K., Nakamagoe, K., Komatsuzaki, Y., Satoh, A., Doi, M., Ogata, T., Kanazawa, I., Shoji, S. and Mizusawa, H. (1999) Clinical, neuropathological, and molecular study in two families with spinocerebellar ataxia type 6(SCA6). *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 67(1):86-89.

Ishikawa, K., Fujigasaki, H., Saegusa, H., Ohwada, K., Fujita, T., Iwamoto, H., Komatsuzaki, Y., Toru, S., Toriyama, H., Watanabe, M., Ohkoshi, N., Shoji, S., Kanazawa, I., Tanabe, T. & Mizusawa, H. (1999). Abundant expression and cytoplasmic aggregations of α_1A -voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *Hum. Molec. Genet.*, 8:1185-1193.

Toru, S., Murakoshi, T., Ishikawa, K., Saegusa, H., Fujigasaki, H., Uchida, T., Nagayama, S., Osanai, M., Mizusawa, H. and Tanabe, T. (2000). Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function. *Journal of Biological Chemistry* 275:10893-10898.

小山内実、田邊勉（2000）電位依存性カルシウムチャンネルの分子薬理学、*Clinical Calcium*, 10 (3) 268-274.

Eric A. Ertel, Kevin P. Campbell, Michael M. Harpold, Franz Hofmann, Yasuo Mori, Edward Perez-Reyes, Arnold, Schwartz, Terry P. Snutch, Tsutomu Tanabe, Lutz Birnbaumer, Richard W. Tsien, and William A. Catterall (2000) Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* 25: 533-535.

水澤英洋、山田正仁（1999）脊髄小脳変性症の定義と歴史、*全国脊髄小脳変性症友の会ニュース*. 117:5-8.

村越隆之（1999）縦糸と横糸の織り成す綾。細胞、31（8）302-303.

村越隆之（1999）スライス標本を用いた皮質局所回路の解析。細胞、31（8）309-313.

高島実、水澤英洋（1999）遺伝性脊髄小脳変性症SCA5。 *Clinical Neuroscience* 17:39.

高島実、石川欽也、水澤英洋（1999）遺伝性脊髄小脳変性症SCA6。 *Clinical Neuroscience* 17:40-42.

水澤英洋（1999）イオンチャンネル異常と神経疾患。 *現代医療* 31：1025-1030、

1999.

水澤英洋 (1999) 神経変性疾患. 内科学書改訂第5版 (島田馨、編)、中山書店 pp2100-2109.

水澤英洋 (1999) 中枢変性疾患. 21世紀耳鼻咽喉科領域の臨床8、めまい・平衡障害(野村恭也、小松崎篤、本庄巖、編)、中山書店 pp443-453.

水澤英洋 (1999) 脊髄小脳変性症. 別冊.医学のあゆみ、神経疾患-state of arts (中村重信、編)、医歯薬出版 pp500-503.

水澤英洋 (1999) Holmes型皮質性小脳萎縮症. 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ27、神経症候群 . pp231-234.

水澤英洋 (1999) Spinocerebellar ataxia type 6(SCA6). 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ27、神経症候群 . pp235-238.

水澤英洋 (1999) 小脳オリブ核萎縮症. 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ27、神経症候群 . pp239-242.

長岡詩子、水澤英洋 (1999) ヒトの反復発作性失調症2型、家族性片麻痺性片頭痛1型、脊髄小脳失調症6型、"進行性小脳失調症". 脳の科学1999増刊号、pp95-99.

長岡詩子、水澤英洋 (1999) カルシウムチャンネル サブユニットの変異. 脳の科学1999 増刊号、pp195-199.