

SCA6—原因の同定から治療法の開発に向けて—

渡瀬 啓¹⁾ 石川 欽也²⁾ 水澤 英洋¹⁾²⁾

(臨床神経 2010;50:858-860)

Key words : 脊髄小脳変性症6型, ポリグルタミン病, プルキンエ細胞, ノックインマウス, Ca_v2.1チャネル

はじめに

脊髄小脳変性症 6 型 (SCA6) は, 本邦において優性遺伝性 SCA の約 30% を占め, 頻度が高く, 社会的ニーズが高い疾患である. ここでは疾患遺伝子の連鎖解析から遺伝子の同定にいたる経緯, 病理学的・臨床遺伝学的な疾患の特徴を概説し, さらに疾患の病態生理の解明を目指して現在われわれがすすめているマウスモデルをもちいた研究について紹介する.

1. 変異遺伝子の同定と臨床的・病理学的特徴

従来より本邦における優性遺伝性の脊髄小脳変性症に関して, 中年期に発症し, 臨床的に小脳症状以外にめだつた症状がなく, いわゆる純粋小脳型の特徴を示す家系が多数存在することが知られていたが, その責任遺伝子の同定を目指して, 1992 年頃より, 石川・水澤らにより家系の集積, マイクロサテライトマーカーをもちいた連鎖解析が開始された. 約 4 年にわたる解析の結果, 1997 年, 9 家系についてその候補領域を 19 番染色体短腕の 13.3cM の領域にまで狭めることに成功した¹⁾. 一方同年, Cheng Chi Lee のグループから, CACNA1A 遺伝子の最終エクソンに存在する CAG リピートが異常に伸長している脊髄小脳変性症が報告され, 脊髄小脳変性症 6 型 (spinocerebellar ataxia type6 : SCA6) と命名されたが²⁾, 最終的に石川らが集積した家系のうち 8 家系の患者は同様の変異を有していることが判明した. 同部位の CAG リピート数は正常アレルでは 4~19 であるが, SCA6 変異アレルでは 19~33 に伸長している^{1)~4)}. CACNA1A 遺伝子は P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルのメインサブユニット Ca_v2.1 をコードし, CAG リピートはチャネル C 末端部細胞質内ドメインに存在するポリグルタミンに翻訳される. CAG リピート数と発症年齢の間には逆相関の関係がみとめられ, リピート数の長い患者は若年で発症する傾向がある¹⁾. 神経病理学的には小脳プルキンエ細胞 (PC) にはほぼ限局した選択的な神経脱落が特徴的であり, 残存する PC には神経突起の変性や torpedo の形成などの非特異的変性所見がみとめられた⁵⁾. Ca_v2.1 C 末端部に対する抗体を作製して免疫組織染色をおこ

なつたところ, 患者 PC で細胞質内優位に局在する封入体の形成がみとめられた⁶⁾.

2. Sca6 ノックインマウスの作製

Ca_v2.1 はシナプス終末からの神経伝達物質の放出や活動電位の生成に重要な役割を果たすことが知られており⁷⁾, 様々な神経細胞でその発現がみとめられるが, とくに PC に強く発現している. SCA6 の発症機序に関しては, 他のポリグルタミン病と同様に, 変異による新たな毒性の獲得すなわち toxic gain of function の機構が想定される一方で変異によるチャネル機能の直接の変化すなわちチャネル病である可能性も示唆された⁸⁾. そこでこの点を *in vivo* で明らかにするため, われわれは, マウス Ca_v2.1 遺伝子エクソン 47 の 1 部をヒト由来遺伝子で置換し, 部分的にヒト化したチャネルが発現するようなノックイン (KI) マウスモデルの作製をおこなつた. CAG リピートの長さは, 正常サイズ, 患者サイズ, そして過伸長サイズとして 14, 30, 84 リピートの 3 種を用意し, 3 種類の KI マウス (*Sca6*^{14Q}, *Sca6*^{30Q}, *Sca6*^{84Q}) を作製した⁹⁾.

3. Sca6^{84Q} マウスの運動機能障害

Sca6 KI マウスの協調運動障害の有無を検討する目的で経時的にロータロッド解析をおこなつた. *Sca6*^{14Q} マウス, *Sca6*^{30Q} マウスではいずれの週齢においても明らかな運動機能低下はみとめられなかったが, ホモ *Sca6*^{84Q} (*Sca6*^{84Q/84Q}) マウスで生後 6 カ月齢以降, またヘテロ *Sca6*^{84Q} (*Sca6*^{84Q/+}) マウスでは生後 17 カ月齢以降でロータロッド解析で運動機能障害がみとめられた.

4. Sca6 KI マウス PC の電気生理学的解析

SCA6 変異 Ca_v2.1 チャネルの機能を検討するため, P12~P14 *Sca6*^{84Q/84Q} マウスから PC の分離培養を調整し, whole-cell カルシウムチャネル電流の解析をおこなつた (Fig. 1). 薬理的にはこの内向き電流は *Sca6*^{84Q/84Q} PC, 野生型 PC のいずれにおいても P/Q 型カルシウムチャネル特異的のブロッカー

¹⁾ 東京医科歯科大学脳統合機能研究センター [〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45]

²⁾ 同 大学院脳神経病態学

(受付日 : 2010 年 5 月 21 日)

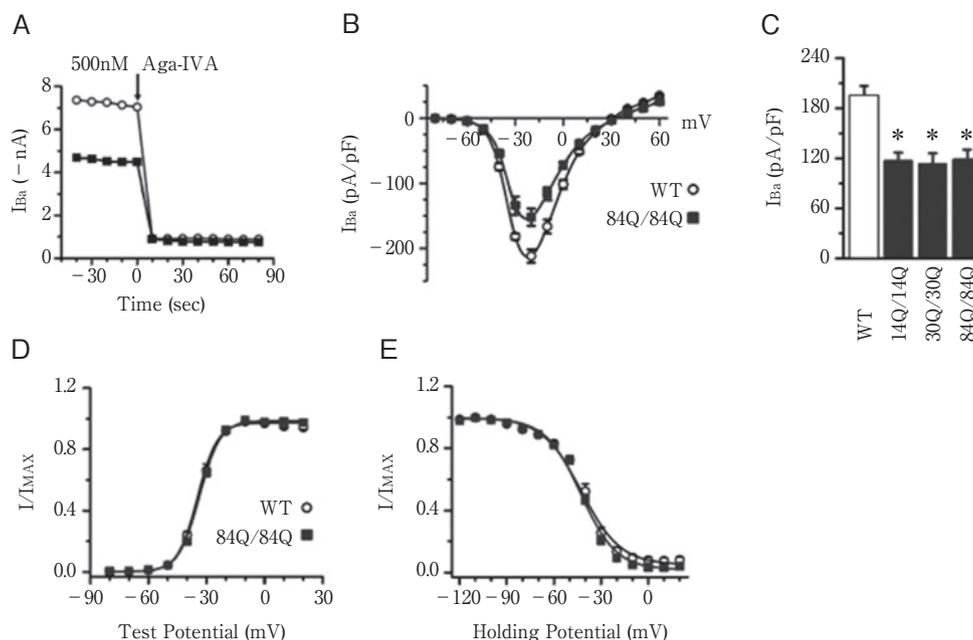


Fig. 1 Sca6 KI マウス PC の電気生理学的解析.

A *Sca6*^{84Q/84Q} (■) と野生型 (○) マウス由来 PC のピーク電流 (I_{Ba}) はいずれも P/Q 型チャネルの特異的阻害剤 Aga-IVA によりほぼ完全に阻害される. B 電流—電圧関係; *Sca6*^{84Q/84Q} PC (■) で電流密度の低下を認めた. C ピーク電流密度 (-15mV); リピート数の異なる3種類の KI マウス (14Q/14Q, 30Q/30Q, 84Q/84Q) は同程度のピーク電流密度を示した. D, E *Sca6*^{84Q/84Q} (■) と野生型 (○) マウス由来 PC の活性化 (D) 及び不活性化 (E) のキネティクスに有意差は認められなかった. (文献9より転載).

Aga-IVA にてほぼ完全にブロックされた. 電流—電圧関係を比較したところ, *Sca6*^{84Q/84Q} PC では広い範囲で野生型マウスと比較して, 電流密度が低下していたが, この変化はリピート長依存적ではなく *Sca6*^{30Q/30Q}, *Sca6*^{14Q/14Q} PC でも同程度の低下がみとめられた. またチャネルの活性化, 不活性化キネティクスに関して, *Sca6*^{84Q/84Q} PC と野生型 PC を比較して明らかな差異はみとめられなかった.

5. *Sca6*^{84Q/84Q} マウスの PC 内封入体形成

マウス小脳抽出物をもちいて, Ca_v2.1 抗体でイムノブロッキングをおこなった結果, 15 カ月齢 *Sca6*^{84Q/84Q} 小脳抽出物で凝集した変異チャネルに相当するバンドをスタッキングゲル部分にみとめた. 同月齢の *Sca6*^{84Q/+} マウスではシグナルは弱くみとめられ, また *Sca6*^{14Q/14Q} マウスや野生型マウスではみとめられなかった. ヒト Ca_v2.1C 末端部を特異的に認識する抗体による免疫染色をおこなうと, 老齢 *Sca6*^{84Q/84Q} マウスの小脳 PC において, この凝集物に相当すると考えられる細胞質内封入体のみとめられた.

6. 新たな KI マウスモデルの作製と治療法の開発に向けて

以上のわれわれの検討から 1) SCA6 変異によるポリグル

タミン鎖の伸長による Ca_v2.1 チャネルの構造変化は直接的に基本的チャネル機能に変化をおよぼすのではなく, 何らかの toxic gain-of-function の機構を介して病態を発症させること. 2) *Sca6*^{84Q} マウスでは年齢依存のかつ遺伝子量に依存的な運動機能障害・PC 内封入体形成がみとめられ, 運動機能障害は凝集体の形成に先立って発現することなどが明らかとなった.

このように *Sca6*^{84Q} マウスは多くの疾患の表現型をコピーできたが, 明らかな PC 変性はみとめられなかった. そこで最近われわれは PC 変性の機構をさらに詳細に解明するため, 神経変性を発症する新たなモデルマウス (*Sca6*-MPI-118Q KI) を作製した. *Sca6*-MPI-118Q KI マウス PC では過伸長ポリグルタミンを有する Ca_v2.1 が軽度で過剰発現しており, 比較的若齢から PC 脱落・神経突起の変性がみとめられた. 今後このマウスの分子病態の解析から, SCA6 の病態発症機構の解明とそれに基づく治療法の開発が期待できる.

文 献

- 1) Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, et al. Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am J Hum Genet* 1997;61:334-346.

- 2) Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 1997;15:62-69.
- 3) Yabe I, Sasaki H, Matsuura T, et al. SCA6 mutation analysis in a large cohort of the Japanese patients with late-onset pure cerebellar ataxia. *J Neurol Sci* 1998;156:89-95.
- 4) Mariotti C, Gellera C, Grisoli M, et al. Pathogenic effect of an intermediate-size SCA-6 allele (CAG)(19) in a homozygous patient. *Neurology* 2001;57:1502-1504.
- 5) Gomez CM, Thompson RM, Gammack JT, et al. Spinocerebellar ataxia type 6: Gaze-evoked and vertical nystagmus, Purkinje cell degeneration, and variable age of onset. *Ann Neurol* 1997;42:933-950.
- 6) Ishikawa K, Fujigasaki H, Saegusa H, et al. Abundant expression and cytoplasmic aggregations of $\alpha 1A$ voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. *Hum Mol Genet* 1999;8:1185-1193.
- 7) Catterall WA, Few AP. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 2008;59:882-901.
- 8) Frontali M. Spinocerebellar ataxia type 6: channelopathy or glutamine repeat disorder? *Brain Res Bull* 2001;56:227-231.
- 9) Watase K, Barrett CF, Miyazaki T, et al. Spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant $Ca_v2.1$ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:11987-11992.

Abstract

SCA6: From gene identification to recent progress on pathogenesis

Kei Watase, M.D.¹⁾, Kinya Ishikawa, M.D.²⁾ and Hidehiro Mizusawa, M.D.¹⁾²⁾

¹⁾Center for Brain Integration Research, Tokyo Medical and Dental University

²⁾Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) is one of the common dominantly inherited ataxias in Japan, featuring late-onset ataxia and selective Purkinje cell (PC) degeneration. Molecular pathogenesis of SCA6 has been attracting considerable attention since it is caused by small CAG repeat expansions within the $Ca_v2.1$ voltage-gated Ca^{++} channel gene (*CACNA1A*). During the past 9 years, efforts have been made to generate and analyze a precise SCA6 model in order to disclose its molecular pathogenesis *in vivo*. Evidence indicates that the SCA6 mutation does not directly change the basic properties of the channel but rather exerts neurotoxicity through a mechanism associated with age-dependent accumulation of the expanded polyglutamine protein. We envisage further analysis on a knockin model developing PC degeneration at their young age will lead to elucidation of the molecular pathways involved in SCA6 and thus be useful for developing therapeutic strategies against the disease.

(*Clin Neurol* 2010;50:858-860)

Key words: SCA6, Polyglutamine disease, Purkinje cell, knock-in mouse, $Ca_v2.1$ channel