

受賞者

平井 宏和

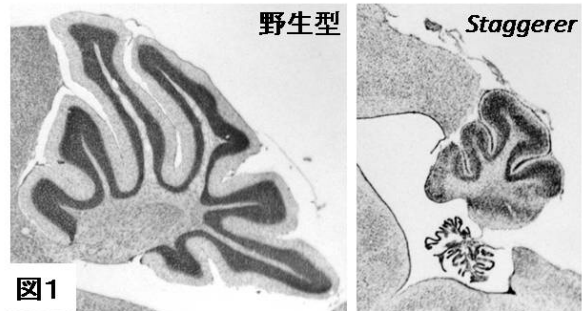
群馬大学大学院医学系研究科・神経生理学分野

研究テーマ

レンチウイルスベクターを用いたRORalpha欠損Staggererマウスの機能回復

1. はじめに

Staggererマウスは1960年代から研究されている自然発生の運動失調マウスである(Sidman et al., 1962)。顕著な小脳萎縮が見られ(図1)、プルキンエ細胞の樹状突起伸長が悪く棘突起も形成されない。平行線維シナプスの形成障害と、余剰登上線維シナプスの除去障害も見られる(Crepel et al., 1980)。Staggererマウスは、転写調節核内受容体RORalpha (retinoid-related orphan receptor alpha) 遺伝子の1つのExonが欠損しており、その結果、DNA結合ドメインは正常であるが、リガンド結合部位が欠損したRORalphaをもつ(Hamilton et al., 1996)。RORalphaはmGluR1、IP3受容体type1、Calbindin-D28K、脳特異的 β スペクトリンIIIなど多くの遺伝子の転写を制御している(Serra et al., 2006)。本研究では、レンチウイルスベクターを用いてStaggererマウスの小脳プルキンエ細胞に野生型RORalpha遺伝子を再発現させることで、標的遺伝子の転写が開始するのか、その結果、形態異常、シナプス機能異常、運動失調がレスキューされるのかを研究する。これにより脳の可塑性と、脳障害の回復の可能性に関する知見を得る。



2. 方法

Staggererマウスのプルキンエ細胞への野生型RORalphaの発現

Staggererマウスは以下に示すような形態的/機能的障害の結果、顕著な運動失調を示す。

- ・プルキンエ細胞の樹状突起伸長が悪く棘突起が形成されない
- ・平行線維-プルキンエ細胞シナプスの形成が障害されている
- ・プルキンエ細胞樹状突起上の余剰な登上線維シナプスが成熟後も残存する
- ・プルキンエ細胞のCa²⁺スパイクの消失
- ・神経栄養因子及びその受容体タンパク質の減少

生後6日のin vivo Staggererマウスのプルキンエ細胞にRORalphaを再発現させると、障害が回復するのかを検討する。10の9乗TU/ml以上の力価のレンチウイルスベクターをStaggererマウスの小脳皮質に接種し、20日後に運動失調の程度をロータロッドを用いて測定する。

形態学的検討

小脳切片を抗カルビンディン抗体を用いて免疫染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いてプルキンエ細胞の形態を観察する。RORalphaを発現しているGFP陽性プルキンエ細胞と、RORalphaを発現していないプルキンエ細胞で樹状突起の長さ、枝分かれ、棘突起の形成状況に有意な差が見られる

のかを調べる。

電気生理学的検討

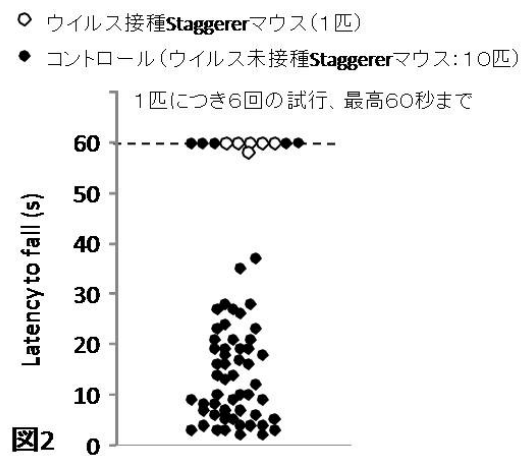
平行線維-プルキンエ細胞シナプスの形成が起こっているのか、プルキンエ細胞に何本の登上線維がシナプスを形成しているかはスライスパッチクランプ法を用いて調べる。

これらの結果から、野生型RORalpha遺伝子導入によるタンパク質の再発現、形態回復、神経機能回復、及び運動失調の関連を明らかにする。

3. 結果 研究成果

野生型RORalphaの発現Staggererマウスの運動失調の改善

マウスゲノムからRORalphaをクローニングし、レンチウイルスベクターのメインプラスミドに組み込んだ。このプラスミドはGFPもマーカーとして同時に発現するように作製した。RORalphaとGFPを発現するウイルスを産生、濃縮し、生後6日のStaggererマウスに接種した。接種20日後にロータロッドにて運動機能を評価した。Staggererマウスは何もしなくても生後25日前後までしか生存しない。これはRORalphaが生命維持に重要な様々な器官で重要な役割を担っているからと考えられる。したがってロータロッド評価ができる以前に多くは死亡した。生き残ったマウスは顕著な運動失調の改善が認められた (図2)。

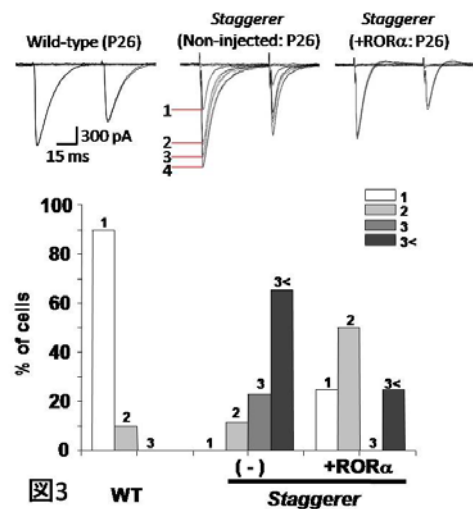


野生型RORalpha発現によるStaggererプルキンエ細胞樹状突起の伸長

Staggererプルキンエ細胞の樹状突起は著しい発達障害があり、ブラシ状ほどにしか發育しない。一方、野生型RORalphaを生後6日でレスキューしたStaggererプルキンエ細胞では、樹状突起の著しい伸長が見られた。

野生型RORalpha発現によるStaggererプルキンエ細胞の登上線維多重支配の回復

幼弱期の野生型プルキンエ細胞では、5~6本以上の登上線維が1つのプルキンエ細胞にシナプスを形成している。これが生後21日までに1本を残して除去される。Staggererプルキンエ細胞では、発達期に除去されるはずの登上線維シナプスが成熟後も残存することが知られている。そこで生後6日のStaggererプルキンエ細胞に野生型RORalphaを発現させたところ、完全ではないものの明らかな余剰登上線維シナプスの除去が観察された (図3)。



4. 考察 まとめ

幼弱期のStaggererマウスのプルキンエ細胞に野生型RORalphaをレスキューすることで、運動失調をはじめプルキンエ細胞の発達やシナプス形成など多くの障害が完全ではないものの回復させることに成功した。障害が顕著な成熟後のStaggererマウスプルキンエ細胞へのRORalphaのレスキューで、障害が回復するのかが知りたいところであるが、残念ながらStaggererマウスは生後25日前後で死亡する。

Orrらが脊髄小脳変性症1型(SCA1)モデルマウスの解析から、正常ではSCA1原因遺伝子産物とRORalphaが複合体を形成することでRORalpha標的遺伝子の転写を活性化するのに対し、ポリグルタミン鎖が異常伸長したSCA1原因遺伝子産物はRORalphaと複合体が形成できず、RORalphaの分解が促進すること、RORalphaの発現量が減少した結果、プルキンエ細胞の発育障害が起こることを報告した(Serra et al., 2006)。SCA1患者のプルキンエ細胞にRORalphaを供給することでRORalpha標的遺伝子の転写が再び活性化され、プルキンエ細胞の障害がレスキューされるのかは、SCA1患者の治療を考える上で大変重要な情報であり、その意味からもRORalpha欠損Staggererマウスの障害がRORalpha再発現で回復することを明らかにした今回の研究成果は大きな意味をもつと考えられる。

5. 参考文献

- Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Guastavino JM, Sampaio I (1980) Multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres in staggerer mutant mouse. *Nature* 283:483-484.
- Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, Russell LB, Mueller KL, van Berkel V, Birren BW, Kruglyak L, Lander ES (1996) Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* 379:736-739.
- Serra HG, Duvick L, Zu T, Carlson K, Stevens S, Jorgensen N, Lysholm A, Burright E, Zoghbi HY, Clark HB, Andresen JM, Orr HT (2006) RORalpha-mediated Purkinje cell development determines disease severity in adult SCA1 mice. *Cell* 127:697-708.
- Sidman RL, Lane PW, Dickie MM (1962) Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 137:610-612.