

最近 10 年間の研究

● ウイルスベクターを用いた中枢神経系への効率的な遺伝子導入法の開発

2003 年より、レンチウイルスベクターを用いた生体神経細胞への効率的な遺伝子導入法の開発を行っている。

これまでの主な研究成果

1. レンチウイルスベクターを利用して、小脳プルキンエ細胞に効率的かつ広範囲に遺伝子を導入する手法を開発した。

Brain Research Apr 12;1082(1):11-22, 2006

- レンチウイルスベクターを用いて生体マウス小脳へ極めて効率的に遺伝子導入できることを示した最初の論文

European Journal of Neuroscience Jul 24:371-380, 2006

- 神経細胞親和性のレンチウイルスベクターが、ウイルス溶液の pH を下げることでグリア細胞親和性に変化することを示した。

Protocol Exchange doi:10.1038/nprot.2007.89

- ニューロン親和性のレンチウイルスベクター作製法についての論文 : Nature Publishing Group の *protocol exchange* の Most Viewed paper

<http://www.nature.com/protocolexchange/>

Cerebellum 7(3):273-8, 2008

- ウイルスベクターを用いて、in vivo 動物の小脳プルキンエ細胞へ遺伝子を導入する研究についてのレビュー

Cerebellum Sep;9(3):291-302, 2010

- 幼弱動物（生後 0～1 日）の生体神経細胞へ遺伝子導入する方法を確立した。さらに、レンチウイルスベクターを用いて幼弱プルキンエ細胞に外来遺伝子を大量に発現させることで発達障害が起こることを示した。

Journal of NeuroVirology Dec;18(6):521-31, 2012

- レンチウイルスベクター産生時に、HEK293T 細胞から放出されるカテプシン K によって、ウイルス粒子がグリア細胞選択的に感染することを示した。

2. 開発した「レンチウイルスベクターを介する生体神経細胞への広範囲かつ効率的な遺伝子導入法」を用いて、多数の成果を上げている。

Nature 446(7131):41-5, 2007

- 自閉症の原因の一端を解明

Neurobiology of Disease 35(3):457-65, 2009

- 自然発生小脳失調マウスの運動失調をレスキュー

Nature 465(7297):497-501, 2010 (秋田大学佐々木教授との共同研究)

- 脱リン酸化酵素 (INPP4A) が興奮性神経細胞死を抑制していることを示した。

Journal of Neuroscience 32(6):2217-2226, 2012 (奈良医大坪井教授との共同研究)

- 嗅球において、5T4 糖タンパク質が活動依存性に樹状突起が発達し、機能的な神経回路を形成するのに重要であることを示した。

3. アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた研究。2011 年から AAV を用いた研究をスタートさせた。

Cerebellum 2013 Aug 20. [Epub ahead of print]

- AAV を静脈注射し、小脳プルキンエ細胞へ治療効果のある遺伝子を供給、その結果、神経機能を回復させることに成功した。

4. ウイルスベクターで使用可能な細胞種特異的プロモーターの開発

4-1 小脳プルキンエ細胞特異的かつ強力なプロモーターを同定した。

これまでの小脳プルキンエ細胞特異的プロモーターは 3kb と長く、活性も極めて弱いため、ウイルスベクターに組み込んで使用することができなかった。これらの欠点を克服し、約 1kb で従来よりはるかに高い活性をもつプロモーターを同定した。

開発したプロモーターを用いた主な成果は以下のとおりである。

Journal of Neuroscience 32(34):11657-70, 2012 (東京大学狩野教授との共同研究)

- 生後 9~10 日のマウス/ラットの延髄および小脳の共培養システムを開発した。生体の発達過程と同様、複数の登上線維がプルキンエ細胞と機能的シナプスを形成し、その後除去されて行くことを示した。

Neuron Jun 19;78(6):1024-35, 2013 (東京大学狩野教授との共同研究)

- 最初期遺伝子 Arc/Arg3.1 が発達期小脳の登上線維シナプス除去に重要であることを示す。

Journal of Neuroscience Nov 27;33(48):18755-63, 2013 (同志社大高橋教授との共同研究)

- 発達期に活動依存性に放出されるニューロトロフィンが、神経伝達物質放出をトリガーするカルシウムチャネルサブタイプの変化に関与することを示す。

4.2 神経細胞特異的プロモーターの開発

Journal of Neuroscience Methods 2014 (In press)

- シナプシン I プロモーターを改良して、神経細胞への選択性が高く強力なプロモーターを開発した。開発したプロモーターを用いてトランスジェニックマウスを作製したところ、中枢神経系に広く神経細胞特異的に導入遺伝子を発現していた。この論文では開発したプロモーター作製の方法をすべて公開している。

● 遺伝性脊髄小脳変性症の病態解明と治療法開発

脊髄小脳変性症の患者(特定疾患医療受給者)は 1980 年に 1,562 人であったが、その後の画像診断技術の向上、原因遺伝子の同定および、遺伝子診断技術の広まりの結果、2011 年現在では 25,047 人となり、1980 年の実に 15 倍以上にまで増加している。このうち遺伝性脊髄小脳変性症 (Spinocerebellar ataxia; SCA) は約 3 分の 1 を占める。未だ根本的な治療法は存在しない。本研究室では 2004 年から SCA の病態解明と治療法の研究を開始した。

これまでの主な研究成果

1. 変異遺伝子を小脳プルキンエ細胞に発現し、顕著な小脳失調を示すマシャド・ジョセフ病 (SCA3 型) のモデルマウスを作製した。レンチウイルスベクターを用いて、このモデルマウスのプルキンエ細胞に、ユビキチン・プロテアソーム系を賦活する分子、CRAG (東京薬科大学・柳教授が発見) を発現させることで、変異タンパク質凝集体が減少し、運動失調が大幅に改善されることを報告した。

EMBO Reports Apr;9(4):393-9. Epub 2008 Mar 14, 2008

JST からのプレスリリース

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20080314/>

2. 小脳プルキンエ細胞には、プロテインキナーゼ C γ (PKC γ) が豊富に発現している。SCA14 型は PKC γ 遺伝子 (PRKCG) のミスセンス変異が原因である。レンチウイルスベクターを用いて、マウスのプルキンエ細胞に変異 PKC γ (S119P) を発現させることで運動失調を示す SCA14 モデルマウスを作製した。このマウスを電気生理学的に解析し、変異 PKC γ によってシナプス可塑性が障害されることを明らかにした。

Journal of Neuroscience Oct 5;31(40):14324-34, 2011

群馬大学からのプレスリリース

<http://www.gunma-u.ac.jp/sb/sb.cgi?eid=281>

3. SCA13 型は、電位依存性カリウムチャネル遺伝子(Kv3.3)ののミスセンス変異が原因である。レンチウイルスベクターを用いて、マウスの培養プルキンエ細胞に変異 Kv3.3 を発現させ、電気生理学的に解析して SCA13 の病態を解明した。

Journal of Physiology 2013 Nov 11. [Epub ahead of print]

4. 間葉系幹細胞を用いて SCA1 型モデルマウスの進行性運動失調を顕著に抑制することに成功した。

Cerebellum 2013 Nov 17. [Epub ahead of print]

5. レンチウイルスベクターを用いて、SCA3 モデルマウスのプルキンエ細胞にオートファジー促進分子 (Beclin 1) を発現させることで、運動失調を顕著に改善することに成功した。[コインブラ大学 (ポルトガル) の Almeida 教授との共同研究]

Brain Jul;136(Pt 7):2173-88, 2013

● 小脳の神経生理学的研究

小脳シナプス形成、シナプス除去、シナプス可塑性研究を行っている。

これまでの主な研究成果

最近 10 年間の主な論文は以下のとおりである。

EMBO Reports 6:90-95, 2005

Nature Neuroscience 8:1534-1541, 2005

- Cbln1 がシナプス可塑性に重要であること、 $\delta 2$ グルタミン酸受容体とシグナルが occlusion していることを示した最初の論文。

European Journal of Neuroscience 30(3):355-65, 2009

Journal of Physiology 589(Pt 13):3191-209, 2011.

- *Staggerer* ミュータントマウスの小脳プルキンエ細胞には mGluR シグナルが欠損していることを示した。