

## 脊髄小脳変性症

### —— ミクログリア動態に対する運動効果の検討 ——

須藤 奈々,<sup>1</sup> 中村 和裕,<sup>1</sup> 平井 宏和<sup>1</sup>

#### 要旨

【目的】 アルツハイマー病では、運動が脳内ミクログリアの異常増殖を減少させ、神経変性を抑制することが報告されている。本研究では、アルツハイマー病と同様に神経変性疾患である脊髄小脳変性症のモデルマウスの小脳において、運動がミクログリアの動態へ及ぼす効果を調べることを目的とした。【対象と方法】 最初に通常飼育の野生型マウス、脊髄小脳変性症モデルマウス（I型（SCA1）、III型（SCA3））、ヘテロおよびホモ接合性の *Staggerer* マウス（+/sg, sg/sg）の中でミクログリアの増殖が顕著である系統のマウスを選んだ。選んだマウスを使用し、コントロール群は通常飼育のみ行い、運動群にはローターロッドテストを用いた運動負荷を与えた。両群マウスの小脳切片に対して、ミクログリアのマーカである抗 Iba1 抗体と、活性化ミクログリアのうち神経毒性ミクログリアの指標として使用される抗 CD68 抗体を使った蛍光免疫組織染色を行い、それぞれのマーカー陽性細胞数を定量化した。【結果】 通常飼育環境下では、神経変性の強い SCA3 マウスと sg/sg マウスで顕著なミクログリアの増殖が確認できた。運動によりミクログリアの総数が SCA3 マウスでは減少し、sg/sg マウスでは増加した。神経毒性のある CD68 陽性ミクログリアは SCA3 マウスでは検出されず、sg/sg マウスでは増加した。【結語】 脊髄小脳変性症モデルマウスにおいて、運動によってミクログリアの数は大きく変動し、その変動の仕方は、疾患モデルマウスの種類によって異なることがわかった。sg/sg マウスは日常の活動量が少ないにも関わらず、強制的に運動負荷を与えたため、神経毒性ミクログリアが増加したのではないかと推察される。したがって、ヒトにおいても運動が常によい効果を及ぼさない可能性もあり、運動療法を行うかどうかはさまざまな情報を統合して慎重に判断する必要があると考えられた。（Kitakanto Med J 2013 ; 63 : 209~215）

キーワード：脊髄小脳変性症, 運動療法, ミクログリア

#### はじめに

脊髄小脳変性症 (Spinocerebellar degeneration ; SCD) とは小脳を含む脳神経系に病変を有する疾患である。小脳とその求心性および遠心性ニューロンの変性により運動失調を呈することを特徴とする。<sup>1</sup> 日本での有病率は、1万人に約2人であり、そのうち約1/3が遺伝性脊髄小脳変性症 (Spinocerebellar ataxia ; SCA) である。遺伝性脊髄小脳変性症は、常染色体優性遺伝のものが大部分を占めている。臨床症候は、平衡障害、構音障害、眼振、錐体路障害、自律神経障害などさまざまである。主要な病型で

の遺伝子異常の本態は、それぞれの型の原因遺伝子内 CAG リピートの異常な伸長によるものであり、それが蛋白質に翻訳されてポリグルタミン伸長鎖となる。

遺伝性脊髄小脳変性症には複数のモデルマウスが存在する。遺伝性脊髄小脳変性症 1 型 (SCA1) ノックインマウス Ataxin-1[Q154] は、SCA1 原因遺伝子である ataxin-1 のポリグルタミン配列 (CAG リピート) が異常伸長している。このマウスは、5 週齢以降から小脳を中心に神経細胞の変性を生じ、運動障害が起こる。加齢とともに小脳失調が顕著になり、約 40 週で死亡する。遺伝性脊髄小脳変性症 3 型 (SCA3) トランスジェニックマウス

1 群馬県前橋市昭和町3-39-22 群馬大学大学院医学系研究科神経生理学  
平成25年3月8日 受付

論文別刷請求先 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22 群馬大学大学院医学系研究科神経生理学 平井宏和

は、異常伸長した CAG 繰り返し配列をもつ ataxin-3 遺伝子配列の一部を小脳プルキンエ細胞特異的に発現する。このマウスは生後 20 日以降、小脳失調の症状を示し始め、小脳は著しく萎縮し、プルキンエ細胞の配列の多層化、樹状突起の発達不良が見られる。<sup>2</sup> *Staggerer* マウスは、1960 年代から研究材料として使用されている自然発生の運動失調マウスである。<sup>3</sup> 形態的には強い小脳萎縮が見られ、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、余剰登上线維シナプスの除去障害が見られ、運動失調を示す。<sup>4</sup> また、*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 つのエキソンが欠損している。これらのモデルマウスを使って病因解析が盛んに行われてきたが、上記遺伝子異常がどのような機序で最終的な神経細胞死を引き起こすのかについて完全には解明されていない。

したがって、脊髄小脳変性症の治療法は、現在までに有効な治療法は確立されていない。動物を使った遺伝子治療の研究が盛んに行われているが、高力価のウイルスを使用した遺伝子治療は侵襲性が高いという問題がある。そこで、侵襲性が小さく、もともと生体が持つ機能を生かせるという利点がある運動を治療として取り入れることを考えた。

運動にはさまざまな効果が知られている。従来から肥満などの生活習慣病予防や治療に効果があることが報告されている。<sup>5</sup> しかし、運動はもっと広範な疾患について効果があることが分かってきた。たとえば、老齡アルツハイマー型認知症モデルマウスの学習、記憶能力は運動により改善し、また、成体認知症モデルマウスは、不安が軽減し、探索的行動が改善するということが明らかになった。<sup>6</sup> 自発的な長期の運動によって、老人斑が減少したとの報告もある。<sup>7</sup> 同様にパーキンソン病患者は、運動によって運動機能や生活が改善されることが報告されている。<sup>8</sup>

運動による神経変性に対する治療効果は、脳の免疫担当細胞であるミクログリアの動態と密接に関連している。アルツハイマー型認知症では、トレッドミル運動を週に 5 日、4 週間行ったところ、海馬の活性化ミクログリアの数がコントロール群よりも大きく減少したという報告がある。パーキンソン病では、黒質緻密部において活性化ミクログリアの増加がみられるが、ドーパミン作動性ニューロンの損傷に伴い、活性化ミクログリアを抑制することで、炎症による損傷からニューロンを保護したとの報告がある。<sup>9-11</sup> このように、ミクログリアは、異常に活性化するとサイトカインを産生して神経毒性を誘発するという負の側面を有する。したがってミクログリアによる神経障害的な側面を抑制することが肝要である。運

動には、抗炎症作用に加えて、ミクログリアの活性化を抑制する働きがある。<sup>12</sup>

本研究では、脊髄小脳変性症モデルマウス脳内のミクログリアの増減、および、それに対する運動の効果を調べることを目的とした。

## 方 法

### マウス

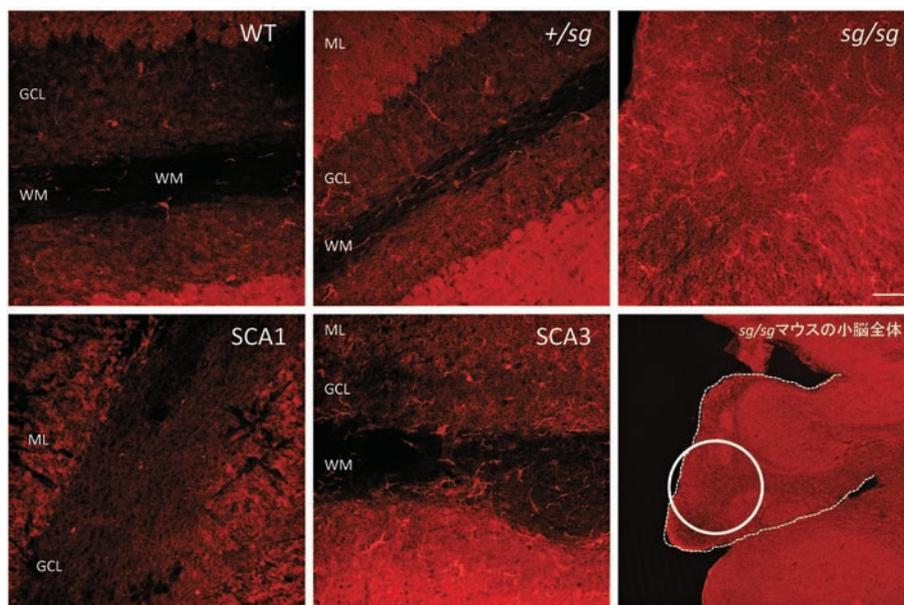
野生型マウス、遺伝性脊髄小脳変性症 1 型 (SCA1) Ataxin-1 [Q154] ノックインマウス、遺伝性脊髄小脳変性症 3 型 (SCA3) トランスジェニックマウス、*Staggerer* ヘテロ (+/sg)、ホモ (sg/sg) マウスを使用した。

### 免疫染色

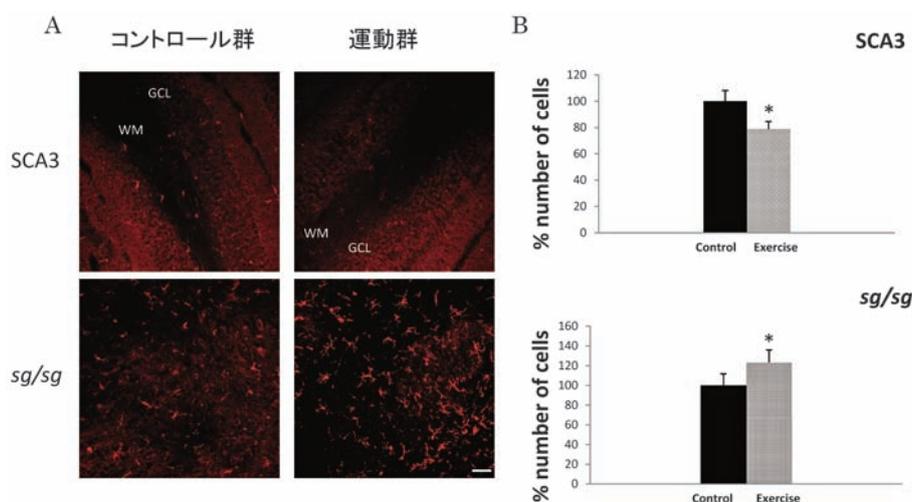
4%paraformaldehyde (PFA) を用いてマウスを灌流固定し、脳を取り出した。脳は 4%PFA で 4°C 一晩後固定を行い、ビプラトームを使用してマウスの小脳スライス (50 $\mu$ m) を作成した。使用した一次抗体は、抗 Iba1 抗体 (Anti-Iba1 antibody, Wako)、抗 CD68 抗体 (Anti-CD68 antibody [ED1], Abcam) である。小脳切片を一次抗体と 4°C で一晩反応させたのち、Phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄、Alexa Fluor 568、あるいはビオチンラベル二次抗体 (Invitrogen) と室温で 1 時間反応させた。二重染色の場合は、さらに PBS で 3 回洗浄し、streptavidin-HRP と室温で 1 時間反応させ、PBS で 3 回洗浄し、Alexa Fluor 488 tyramide 溶液と室温で 10 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、Fluoromount で封入した。共焦点蛍光顕微鏡 (LSM5 PASCAL) で小脳全体を観察した。神経毒性ミクログリアは抗 Iba1 抗体、抗 CD68 抗体の両方で染色される。したがって、全ミクログリア中の神経毒性ミクログリアの割合は、Iba1 陽性細胞に対する Iba1/CD68 両抗原陽性細胞の割合を求めることで得た。統計学的検定は t テストにより、0.05 未満を有意とみなした。

### 運動負荷

運動負荷を与えないコントロール群は 6 匹とし、通常飼育のみ行った。運動負荷をかけた運動群も 6 匹を使用した。SCA3 マウスについては、生後 4~8 週で運動を開始した。運動プログラムは、ローターロッドテスト装置 (室町機械) を用い、回転棒に定速 5 回転/分で 120 秒のせ、これを 1 セットとして、1 日 4 セット行った。セット間のインターバルは 5 分とした。このプログラムを週 3 日、計 8 週間実施した。途中、マウスがロッドから落下した場合、再びローターに乗せて、運動を再開した。落下までの時間に、運動再開した後の時間を加算していき、運動している時間を合計で 120 秒になるようにした。sg/sg



**Fig. 1** ミクログリアのマーカである Iba I に対する抗体を用いたマウス小脳皮質の免疫染色写真. WT; 成体野生型マウス, +/sg; *Staggerer* ヘテロマウス, *sg/sg*; *Staggerer* ホモマウス, SCA1; SCA1 マウス, SCA3; SCA3 マウス. 右上 (*sg/sg*) 以外は対物レンズ 20 倍で 4 & 5 葉を撮影. 右上 (*sg/sg*) は右下 (点線で示した *sg/sg* マウス小脳全体を含む写真を, 対物レンズ 5 倍で撮影) の丸で囲んだ部分を撮影. GCL; 顆粒細胞層, WM; 小脳白質. ML; 分子層. Scale bar; 50 $\mu$ m.



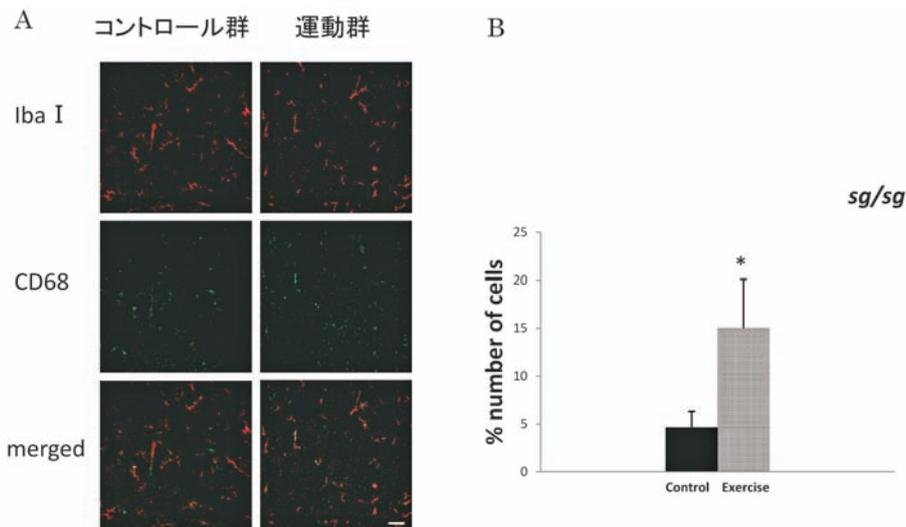
**Fig. 2** 運動が小脳に局在するミクログリアに及ぼす影響. ミクログリアは抗 Iba I 抗体を用いて染色した. SCA3 マウスと *sg/sg* マウスにおける, コントロール群と運動群の小脳皮質の蛍光免疫染色 (A) と定量データ (B) (各群それぞれ 6 匹のマウスを使用). 平均値 $\pm$ 標準誤差, *t*-test, \* $p$ <0.05. SCA3 マウスの写真は 4 & 5 葉を撮影. *sg/sg* マウスの写真は Fig. 1 右下 (小脳全体写真) の丸で囲んだ部分を撮影. GCL; 顆粒細胞層, WM; 小脳白質. Scale bar; 50 $\mu$ m.

マウスについては, 生後 2~3 週で運動を開始した. 運動プログラムは, SCA3 マウスと同様で週 5 日, 4 週間実施した. *sg/sg* マウスは, ロッドの上に乗せただけでは自発的な運動は見られず, すぐに落下してしまうため, マウスの尾を持つことで強制的に運動負荷を与えた. このとき, マウスは前あしと後ろあしをゆっくりと動かす様子が見られたため, この方法で運動を継続することにした.

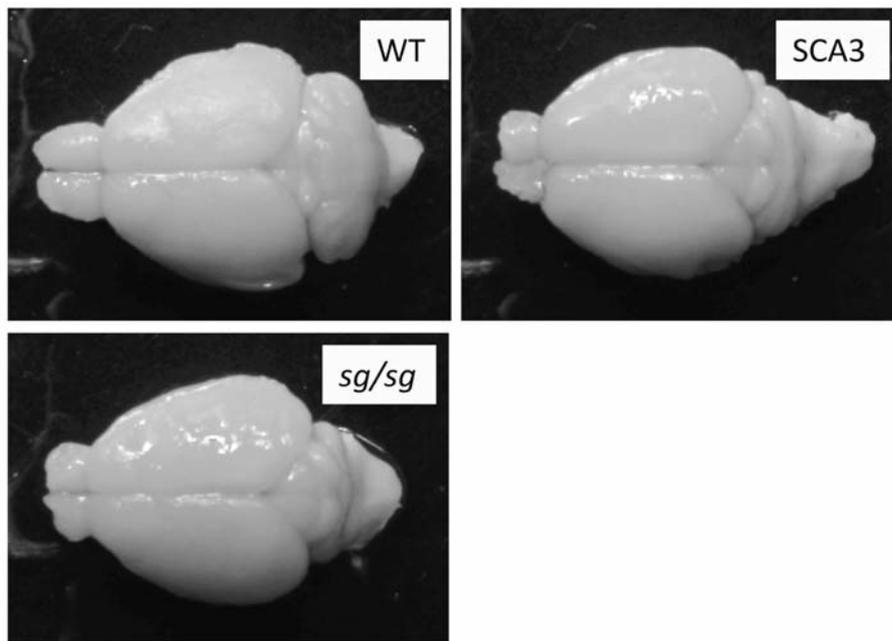
## 結 果

### 通常飼育環境下でミクログリア増殖の見られる運動失調マウスの選出

小脳失調を示す変異マウスにおいてもアルツハイマー病と同様に, 運動によってミクログリアの数が減少しているのかどうかを調べた. SCA1-KI マウス, SCA3 マウス, +/sg マウスと *sg/sg* マウスを使用し, 小脳皮質のミクログリアの数を計測した. 比較対象として野生型マウ



**Fig. 3** *sg/sg* マウスでは、運動により神経毒性ミクログリアが顕著に増加する。コントロール群と運動群の *sg/sg* マウスの小脳を、抗 Iba I 抗体と抗 CD68 抗体を用いて二重染色した (A)。各群 6 匹のマウスを用いて、Iba I 陽性全ミクログリア中の Iba I/CD68 共陽性神経毒性ミクログリアの割合を定量した (B)。 *sg/sg* マウスでは運動により、神経毒性ミクログリアの密度が約 3 倍に増加していた。平均値±標準誤差, *t*-test, \**p*<0.05. 写真はすべて Fig. 1 右下 (小脳全体写真) の丸で囲んだ部分を撮影。Scale bar; 50 $\mu$ m.



**Fig. 4** 野生型マウス, SCA3 マウス, *sg/sg* マウスの脳写真.

スを用意し、それぞれの成体マウス 1 匹ずつを使い、任意の 4 視野を選んでミクログリアの数を測定した。免疫染色の結果、SCA3, *sg/sg* マウスにおいて顕著に Iba I 陽性ミクログリアの増殖が認められた (Fig. 1)。しかし、他の 2 系統では増加は顕著ではなかった。したがって、SCA3, *sg/sg* マウスを使い、運動がミクログリア動態に及ぼす効果を検討した。

#### 運動による活性化ミクログリア数の増減

SCA3 マウスと *sg/sg* マウスの 2 系統のマウスについ

て、運動群には協調運動・平衡感覚・運動学習のテストであるローターロッドテストを用いた運動負荷を行い、ミクログリアの数の定量化を行った。SCA3 マウスでは、コントロール群に比べて、運動群で約 2 割程度ミクログリア数が減少していた。反対に、*sg/sg* マウスでは、ミクログリア数が 2 割以上増加していた (Fig. 2)。

#### ミクログリアの性質

ミクログリアには神経保護的な性質を有するミクログリアと神経毒性を示すミクログリアの両方が存在する。

SCA3 マウスと *sg/sg* マウスにおいて両者の割合を調べた。CD68 陽性ミクログリアは、アルツハイマー病やパーキンソン病において神経変性部位に集積し、神経毒性をもたらすサイトカインを放出する。このサイトカイン放出にはミクログリア内の Caspase 3 の活性化が必要である。通常、Caspase 3 等の活性化はアポトーシスを引き起こすが、CD68 陽性ミクログリア内で Caspase 3 が活性化しても細胞死は誘導することなく、サイトカイン放出を惹起することが、Burguillos らにより報告されている。<sup>13</sup> したがって、神経毒性ミクログリアのマーカースとして抗 CD68 抗体を用いた。

通常飼育下で SCA3 および *sg/sg* マウスの小脳に CD68 陽性細胞が存在するのかわかると調べた。その結果、*sg/sg* マウスには CD68 陽性細胞が確認できたが、SCA3 マウスでは CD68 陽性細胞は全く認めることができなかった。そこで *sg/sg* マウスについてのみ、抗 Iba I 抗体と抗 CD68 抗体を用いた二重染色を行い、Iba I 陽性の全ミクログリア中の Iba I/CD68 共陽性神経毒性ミクログリアの割合を求めた。その結果、運動負荷によりミクログリアの総数が 1.2 倍に増加すること (Fig. 2) に加えて、神経毒性ミクログリアの割合が約 3 倍に増加することがわかった (Fig. 3)。

## 考 察

通常飼育の SCA1 マウス、SCA3 マウス、*+/sg* マウス、*sg/sg* マウスの小脳ミクログリア数を野生型マウスと比較したところ、*+/sg* マウス、SCA1 マウスは野生型マウスよりもミクログリアがやや多く見られたが、それよりも *sg/sg* マウスと SCA3 マウス、特に *sg/sg* マウスで顕著にミクログリアの数が多いという結果が得られた。野生型マウス、SCA3 マウス、*sg/sg* マウスの脳の大きさを比較すると、野生型マウスの小脳に比べ、SCA3 マウス小脳も小さいが、*sg/sg* マウスの小脳はさらに小さいことがわかった (Fig. 4)。このことから、*sg/sg* マウスでは神経変性が高度であることが考えられる。したがって、変性の強い疾患モデルマウスほどミクログリアの数が多い傾向にあると推測された。ミクログリアは脳内で損傷を受けた神経細胞の周辺に集積するので、以上の結果は当然の事と思われる。

運動負荷後、SCA3 マウスにおいて、抗 Iba I 抗体で染色したミクログリアの数を比較すると、コントロール群に比べ、運動群で減少していた。しかし、抗 CD68 抗体で染色した場合には、コントロール群、運動群、ともに神経毒性のあるミクログリアは見られなかった。今回の研究では、運動群で減少したミクログリアがどのような性質をもつものであるのか特定できなかった。SCA3 マウス小脳のミクログリアがすべて神経保護的ミクログリアで

あり、それが減少した、あるいは、抗 CD68 抗体で認識できない神経毒性ミクログリアが存在し、運動によってその分画が減少したなどが考えられる。今後の課題として、神経毒性のあるミクログリアを認識する他のマーカーを使用し、再度検討していく必要があると考えている。

*sg/sg* マウスについては、運動により Iba I でラベルされるミクログリアの総数および、神経毒性 CD68 陽性ミクログリアの両方が増加した。つまり、今回の運動プロトコルを適用すると神経毒性ミクログリアが増加するということになる。*sg/sg* マウスはケージ内での活動量が極端に少ないが、このようなマウスに対して強制的に運動を与えたため、マウスにとって大きなストレスとなったのではないかと推察される。したがって、過度のストレスを与えると神経毒性ミクログリアが増加するのかもしれない。今後は、運動によるストレスを感じないように、運動強度を軽くして再度運動効果の検討する必要があると考えている。<sup>14</sup>

以上のことから、本研究では、運動によってミクログリアの数は大きく変動し、その変動の仕方は脊髄小脳変性症モデルマウスの種類によって異なることが分かった。したがって、運動がヒトにおいても常により効果を及ぼさない可能性もあり、運動療法を行うかどうかはさまざまな情報を統合して慎重に判断する必要があると考えられた。

## 謝 辞

本研究を御支援いただきましたテルモ科学技術振興財団に感謝申し上げます。

## 文 献

- Orr HT. Cell biology of spinocerebellar ataxia. *J Cell Biol* 2012; 197: 167-177.
- Torashima T, Koyama C, Iizuka A, et al. Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep* 2008; 9: 393-399.
- Sidman RL, Lane PW, Dickie MM. Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* 1962; 137: 610-612.
- Crepel F, Delhay-Bouchaud N, Guastavino JM, et al. Multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres in staggerer mutant mouse. *Nature* 1980; 283: 483-484.
- Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev* 2010; 16: 105-118.

6. Ke HC, Huang HJ, Liang KC, et al. Selective improvement of cognitive function in adult and aged APP/PS1 transgenic mice by continuous non-shock treadmill exercise. *Brain Res* 2011; 1403: 1-11.
7. Adlard PA, Perreau VM, Pop V, et al. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005; 25: 4217-4221.
8. Kuroda K., Tatara K, Takatorige T, et al. Effect of physical exercise on mortality in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1992; 86: 55-59.
9. Liu B, Qin L, Yang SN, et al. Femtomolar concentrations of dynorphins protect rat mesencephalic dopaminergic neurons against inflammatory damage. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 1133-1141.
10. Liu Y, Qin L, Li G, et al. Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglia activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 212-218.
11. Castaño A, Herrera AJ, Cano J, et al. The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *J Neurochem* 2002; 81: 150-157.
12. Archer T, Fredriksson A, Schütz E, et al. Influence of physical exercise on neuroimmunological functioning and health: aging and stress. *Neurotox Res* 2011; 20: 69-83.
13. Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 2011; 472: 319-324.
14. Barrientos RM, Frank MG, Crysdale NY, et al. Little exercise, big effects: reversing aging and infection-induced memory deficits, and underlying processes. *J Neurosci* 2011; 31: 11578-11586.

# Exercise Differentially Affects Cerebellar Cytotoxic Microglia in Spinocerebellar Ataxia Model Mice

Nana Suto,<sup>1</sup> Kazuhiro Nakamura<sup>1</sup> and Hirokazu Hirai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurophysiology, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan

**Purpose :** It has been reported that exercise reduces activation of cytotoxic microglia, thereby, ameliorating neurodegeneration in Alzheimer's disease. We aimed at studying if that is also the case in spinocerebellar ataxia (SCA) model mice. **Method :** We quantified numbers of Iba1-positive microglia and/or CD68-positive cytotoxic microglia in the cerebellum of wild type (WT), SCA type1 knock in (SCA1-KI), SCA type3 transgenic (SCA3), heterozygous *Staggerer* (+/*sg*) and homozygous *Staggerer* (*sg/sg*) mice with or without exercise. Rotarod test was used for exercise. **Result :** Proliferation of Iba1-positive microglia was found in SCA3 and *sg/sg* mice without exercise. Exercise differentially changed the number of Iba1-positive microglia in SCA3 and *sg/sg*. The number was decreased in SCA3 mice, whereas, increased in *sg/sg* mice after exercise. CD68-positive cytotoxic microglia, which was selectively found in *sg/sg*, was also increased in *sg/sg* mice after exercise. **Conclusion :** Exercise differentially affected numbers of microglia in SCA model mice. Thus, exercise might not always suppress activation of cytotoxic microglia. It is advisable to search for an optimal type of exercise that fits well with a patient to accomplish suppression of cytotoxic microglia. (Kitakanto Med J 2013 ; 63 : 209~215)

**Key words :** spinocerebellar ataxia, exercise therapy, microglia