慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒトのCBLN1遺伝子疾患におけるシナプス病の分子病態解明と治療法開発
Sub Title	Gene therapy for human ataxia induced by a novel CBLN1 mutation
Author	山崎, 世和(Yamasaki, Tokiwa)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2022
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	分泌型のシナプス形成分子Cbln1は小脳のシナプス形成・維持に必須であり、欠損マウスはシナプス消失を伴った小脳失調という典型的なシナプス病を示す。ごく最近、共同研究によってCBLN1遺伝子の変異がヒトで初めて見出され、患児が遺伝子欠損マウスと同じく歩行異常などの重篤な小脳失調を呈することが明らかとなった。申請者は、このCBLN1遺伝子疾患について、病態発症の分子メカニズムを解明し、さらにその治療法を実験動物のレベルで確立することを目的として、本研究を開始した。 まず培養細胞を用いた解析をおこなった。Cbln1を293T細胞に導入すると培養液に大量に分泌されるが、変異型では分泌が見られず、細胞内へ異常蓄積することが分かった。さらに細胞内輸送に伴う糖鎖修飾に異常が生じることを明らかにし、Cbln1の変異が、細胞内輸送の異常による分泌不全を引き起こすことを示した。 次にCBLN1変異モデルマウスを作出した。このマウスは期待通り、Cbln1欠損マウスやCBLN1変異患児と同じく重篤な小脳失調の症状を示した。このマウスを詳細に解析し、変異マウスではCbln1のシナプス局在がほぼ消失し、小脳においてシナプスが消失することが明らかとなった。これらの結果から、Cbln1の変異がCbln1の分泌を阻害することで、Cbln1の欠損と同じ機序で病態を引き起こすことが示唆された。 さらに本研究では、このCbln1変異モデルマウスの表現型の遺伝子療法の確立を行った。分泌されなくなったCbln1をウイルスによって補充する遺伝子療法を目指し、小脳の各種細胞に発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を作成した。これらのウイルスを用いることでCbln1を野生型と同じレベルで小脳に発現させることが可能となった。さらにCbln1欠損マウスを用いた予備実験では、小脳失調の症状とシナプス消失の表現型が回復することに成功している。今後は上記のCbln1変異モデルマウスにCbln1発現AAVを感染させ、遺伝子療法の効果を確認する予定である。 Cbln1 is a secreted-type synapse organizer, which is necessary for synapse formation and maintenance in cerebellum, whose deletion results in massive synapse loss and severe ataxia. Most recently, our collaborators found a novel CBLN1 mutation in human, and the patients have severe ataxia including gait dificit like Cbln1 deletion mouse. Our goal of this research project is to reveal how this novel CBLN1 human mutation induces cerebellar ataxia and establish a therapeutic method in the animal levels. We first tested how this mutation induce Cbln1 disfunction in vitro. Although Cbln1 WT is secreted into culture media when it is transfected into 293T cells, mutant Cbln1 was not and accumulated inside of the cells. Additionally, the maturation of Cbln1 Glycosylation was also impaired. These results indicate that this novel mutation of Cbln1 induces abnormal intracellular trafficking and inhibit Cbln1 secretion. Next, we made mouse line which has novel Cbln1 mutation using CRISPR/Cas9 knock-in system. Expectedly, this model mouse showed severe ataxia like Cbln1 deletion mouse and CBLN1 mutant patients. We further analyzed this model mouse, then we found that synaptic Cbln1 localization and synapse itself were severely reduced in cerebellum. These results suggest that inhibition of Cbln1-secretion by this mutation results in Cbln1 loss at synapses and the same effects of Cbln1-deletion. Additionally, we tried to establish a therapeutic method for this Cbln1 mutant model mouse. We hypothesized that supplement of WT Cbln1 by gene therapy could rescue synapse loss and cerebellar ataxia in Cbln1 mutant model mouse. We mde several adeno-associated viruses expressing WT CBLN1 under L7, Syn and GFAP promoter, which express Cbln1 in cells of cerebellum, Purkinje cells, Molecular layer interneurons, and Bergman glia cells respectively. We confirmed that expression levels of CBLN1 by these AAVs are comparable for that in WT animals. Pilot experiments using Cbln1 deficient mouse revealed that CBLN1-expressing AAV rescues synapse loss and severe ataxia. Now we are planning to test the rescue effects of these CBLN1-expressing AAVs in CBLN1 mutant mouse.
Notes	
Genre	Research Paper

URL https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210273

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2021年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

2022年4月10日

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	助教（有期・医学部）	補助額	300 （A） 千円
	氏名	山崎 世和	氏名（英語）	Tokiwa Yamasaki		

研究課題（日本語）

ヒトの CBLN1 遺伝子疾患におけるシナプス病の分子病態解明と治療法開発

研究課題（英訳）

Gene therapy for human ataxia induced by a novel CBLN1 mutation

１．研究成果実績の概要

分泌型のシナプス形成分子 Cbln1 は小脳のシナプス形成・維持に必須であり、欠損マウスはシナプス消失を伴った小脳失調という典型的なシナプス病を示す。ごく最近、共同研究によって CBLN1 遺伝子の変異がヒトで初めて見出され、患児が遺伝子欠損マウスと同じく歩行異常などの重篤な小脳失調を呈することが明らかとなった。申請者は、この CBLN1 遺伝子疾患について、病態発症の分子メカニズムを解明し、さらにその治療法を実験動物のレベルで確立することを目的として、本研究を開始した。

まず培養細胞を用いた解析をおこなった。Cbln1 を 293T 細胞に導入すると培養液に大量に分泌されるが、変異型では分泌が見られず、細胞内へ異常蓄積することが分かった。さらに細胞内輸送に伴う糖鎖修飾に異常が生じることを明らかにし、Cbln1 の変異が、細胞内輸送の異常による分泌不全を引き起こすことを示した。

次に CBLN1 変異モデルマウスを作出した。このマウスは期待通り、Cbln1 欠損マウスや CBLN1 変異患児と同じく重篤な小脳失調の症状を示した。このマウスを詳細に解析し、変異マウスでは Cbln1 のシナプス局在がほぼ消失し、小脳においてシナプスが消失することが明らかとなった。これらの結果から、Cbln1 の変異が Cbln1 の分泌を阻害することで、Cbln1 の欠損と同じ機序で病態を引き起こすことが示唆された。

さらに本研究では、この Cbln1 変異モデルマウスの表現型の遺伝子療法の確立を行った。分泌されなくなった Cbln1 をウイルスによって補充する遺伝子療法を目指し、小脳の各種細胞に発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)を作成した。これらのウイルスを用いることで Cbln1 を野生型と同じレベルで小脳に発現させることが可能となった。さらに Cbln1 欠損マウスを用いた予備実験では、小脳失調の症状とシナプス消失の表現型が回復することに成功している。今後は上記の Cbln1 変異モデルマウスに Cbln1 発現 AAV を感染させ、遺伝子療法の効果を確認する予定である。

２．研究成果実績の概要（英訳）

Cbln1 is a secreted-type synapse organizer, which is necessary for synapse formation and maintenance in cerebellum, whose deletion results in massive synapse loss and severe ataxia. Most recently, our collaborators found a novel CBLN1 mutation in human, and the patients have severe ataxia including gait dificit like Cbln1 deletion mouse. Our goal of this research project is to reveal how this novel CBLN1 human mutation induces cerebellar ataxia and establish a therapeutic method in the animal levels.

We first tested how this mutation induce Cbln1 disfunction in vitro. Although Cbln1 WT is secreted into culture media when it is transfected into 293T cells, mutant Cbln1 was not and accumulated inside of the cells. Additionally, the maturation of Cbln1 Glycosylation was also impaired. These results indicate that this novel mutation of Cbln1 induces abnormal intracellular trafficking and inhibit Cbln1 secretion.

Next, we made mouse line which has novel Cbln1 mutation using CRISPR/Cas9 knock-in system. Expectedly, this model mouse showed severe ataxia like Cbln1 deletion mouse and CBLN1 mutant patients. We further analyzed this model mouse, then we found that synaptic Cbln1 localization and synapse itself were severely reduced in cerebellum. These results suggest that inhibition of Cbln1-secretion by this mutation results in Cbln1 loss at synapses and the same effects of Cbln1-deletion.

Additionally, we tried to establish a therapeutic method for this Cbln1 mutant model mouse. We hypothesized that supplement of WT Cbln1 by gene therapy could rescue synapse loss and cerebellar ataxia in Cbln1 mutant model mouse. We mde several adeno-associated viruses expressing WT CBLN1 under L7, Syn and GFAP promoter, which express Cbln1 in cells of cerebellum, Purkinje cells, Molecular layer interneurons, and Bergman glia cells respectively. We confirmed that expression levels of CBLN1 by these AAVs are comparable for that in WT animals. Pilot experiments using Cbln1 deficient mouse revealed that CBLN1-expressing AAV rescues synapse loss and severe ataxia. Now we are planning to test the rescue effects of these CBLN1-expressing AAVs in CBLN1 mutant mouse.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題名 （著書名・演題）	発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）