

19980852

厚生省特定疾患
神経・筋疾患調査研究分科会

運動失調症調査研究分科会
平成10年度研究報告書

ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH COMMITTEE OF ATAXIC DISEASES,
THE MINISTRY HEALTH AND WELFARE OF JAPAN

平成11年3月

分科会長 金澤一郎

厚生省特定疾患
神経・筋疾患調査研究班

運動失調症調査研究分科会
平成10年度研究報告書

ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH COMMITTEE OF ATAXIC DISEASES,
THE MINISTRY HEALTH AND WELFARE OF JAPAN

平成11年3月

分科会長 金澤一郎

目 次

班長総括研究報告	1
班長 金澤 一郎	
班長総合研究報告	3
班長 金澤 一郎	
1. バキュロウイルスを用いた組換え MJD 蛋白発現系と構造解析	9
東京大学大学院医学系研究科 神経内科 金澤 一郎, 中村浩一郎, 羽関 典子, 後藤 順	
2. SCA6 における acetazolamide の治療経験	12
北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻 神経病態学講座 神経内科学分野 ¹⁾ , 北祐会神経内科病院 ²⁾ 佐々木秀直 ¹⁾ , 矢部 一郎 ¹⁾ , 山下 功 ¹⁾ , 武井 麻子 ²⁾ , 濱田 毅 ²⁾ , 田代 邦雄 ¹⁾	
3. 運動失調症における音刺激の効果	15
北海道大学医学部 リハビリテーション医学講座 ¹⁾ , 同 電子科学研究所感覚情報研究分野 ²⁾ 丸石 正治 ¹⁾ , 眞野 行生 ¹⁾ , 上見 憲弘 ²⁾ , 伊福部 達 ²⁾	
4. 分化型 PC12 細胞における歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症蛋白の発現と核内封入体	18
新潟大学脳研究所 神経内科 小野寺 理, 佐藤 晶, 下畑 享良, 小出 玲爾, 高野 弘基, 佐藤 俊哉, 小宅 睦郎, 五十嵐修一, 田中 恵子, 犬塚 貴, 辻 省次	
5. 多系統萎縮症における排尿系および心・循環系自律神経機能の比較検討	20
千葉大学医学部 神経内科 服部 孝道, 榊原 隆次, 内山 智之, 北 耕平, 朝比奈正人	
6. 長潜時反射による筋トーンの計測法の検討	23
国立中部病院 長寿医療研究センター ¹⁾ , 信州大学医療技術短期大学部 ²⁾ 柳澤 信夫 ¹⁾ , 林 良一 ²⁾	

7. 脊髄小脳失調症 6 型における病変分布と病因遺伝子発現との関連	26
東京医科歯科大学医学部 神経内科 ¹⁾ , 筑波大学臨床医学系 神経内科 ²⁾ 水澤 英洋 ¹⁾ , 石川 欽也 ¹⁾ , 庄司 進一 ²⁾	
8. 反応選択と時間制御の神経機構(fMRI による研究)	29
東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経内科学 ¹⁾ , 順天堂大学 第一生理学 ²⁾ , 通信総合研究所 ³⁾ 坂井 克之 ¹⁾ , 宇川 義一 ¹⁾ , 彦坂 興秀 ²⁾ , 宮内 哲 ³⁾	
9. 遺伝子解析により SCA6 と診断した剖検 1 例を含む 3 例の臨床像および 眼球運動障害に対する検討—孤発性 CCA との対比—	32
北里大学東病院 神経内科 ¹⁾ , 神奈川県総合リハビリテーションセンター 病理 ²⁾ 楠 淳一 ¹⁾ , 長谷川一子 ¹⁾ , 三富 哲郎 ¹⁾ , 梁 正淵 ¹⁾ , 坂井 文彦 ¹⁾ , 柳下 三郎 ²⁾	
10. 頭痛と失調性歩行を繰り返す 1 例—発作性失調症の考察—	35
国立精神・神経センター国府台病院 神経内科 湯浅 龍彦, 西宮 仁, 吉野 英	
11. 多系統萎縮症における声帯外転麻痺 —気管切開術の施行時期について—	37
東京都立神経病院 神経内科 ¹⁾ , 同 神経耳科 ²⁾ 磯崎 英治 ¹⁾ , 高島 秀夫 ¹⁾ , 林田 哲郎 ²⁾ , 神田 武政 ¹⁾ , 平井 俊策 ¹⁾	
12. 運動失調を呈する各種病態での小脳 SPECT 所見の比較検討 —ヒトにおける小脳求心路の走行ならびに運動失調の責任病巣に関する考察—	40
東京女子医科大学脳神経センター 神経内科 岩田 誠, 柴垣 泰郎	
13. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)遺伝子の解析—CAG リピート伸長による 神経細胞死の機構と, 神経細胞死を生じる部位の特異性の解析を目指して—	43
国立小児病院小児医療研究センター 先天異常研究部 山田 正夫, 宮下 俊之, 於保 祐子, 禹 麻美, 大葉龍太郎, 奥山 虎之, 田所 恵子, 永淵 成夫	
14. 脊髄小脳変性症における視覚性事象関連電位—小脳病変の認知機能に与える影響—	46
横浜市立大学医学部 神経内科 黒岩 義之, 神谷 俊明, 王 麗紅, 李 梅, 高橋 竜哉, 鈴木 ゆめ, 長谷川 修	

15. CAG repeat diseases にみる神経病理学 — 数的萎縮, 単純萎縮, 核内封入体を指標に —	49
神奈川県総合リハビリテーションセンター 精神神経科 ¹⁾ , 東京都神経研神経病理 ²⁾ 岩淵 潔 ¹⁾ , 児矢野 繁 ¹⁾ , 内原 俊記 ²⁾	
16. Machado-Joseph 病の脳局所糖代謝所見	52
名古屋大学医学部 神経内科 永松 正明, 阿部 祐土, 新畑 豊, 田中 章景, 加知 輝彦, 加藤 隆司, 伊藤 健吾, 祖父江 元	
17. 脊髄小脳変性症に対する methylphenidate の効果 — 上肢機能評価システムによる検討 —	55
奈良県立奈良病院 神経内科 ¹⁾ , 奈良県立医科大学 神経内科 ²⁾ 柳本 真市 ¹⁾ , 杉江 美穂 ¹⁾ , 錫村 明生 ²⁾ , 高柳 哲也 ²⁾	
18. 脊髄小脳変性症におけるアミノ酸療法	57
鳥取大学医学部 脳神経内科 ¹⁾ , 同 薬剤部 ²⁾ 中島 健二 ¹⁾ , 森 望美 ¹⁾ , 竹島多賀夫 ¹⁾ , 足立 芳樹 ¹⁾ , 柏谷 義宏 ¹⁾ , 岡田 昭嗣 ¹⁾ , 村上 淑子 ²⁾ , 林原 正和 ²⁾	
19. テトラヒドロビオプテリンは Machado-Joseph 病以外の脊髄小脳変性症にも 有用であろう	60
国立療養所筑後病院 神経内科 ¹⁾ , 久留米大学医学部 小児科 ²⁾ , 同 脳疾患研究所 ³⁾ 酒井 徹雄 ¹⁾ , 安德 恭演 ¹⁾ , 松石豊次郎 ²⁾ , 山田 茂人 ³⁾	
20. 南九州・沖縄地方における SCD の分子疫学	62
鹿児島大学医学部 第三内科 ¹⁾ , 国立療養所沖縄病院 ²⁾ , 県立宮崎病院 ³⁾ , 大分県立病院 ⁴⁾ 有村 公良 ¹⁾ , 池田 賢一 ¹⁾ , 中川 正法 ¹⁾ , 中江めぐみ ¹⁾ , 納 光弘 ¹⁾ , 平田 圭子 ²⁾ , 末原 雅人 ²⁾ , 中原 啓一 ³⁾ , 法化図陽一 ⁴⁾	
21. 遺伝性てんかんラット (Ihara epileptic rat : IER) 海馬に認められる 微小神経形成異常並びにてんかん発作関連遺伝子の染色体マッピング	64
滋賀医科大学 第二病理 ¹⁾ , 同 脳神経外科 ²⁾ , シミズ病院 脳外科 ³⁾ , 滋賀医科大学 動物実験施設 ⁴⁾ , 京都大学大学院 動物実験施設 ⁵⁾ 天野 殖 ¹⁾ , 辻 篤司 ²⁾ , 横山 正男 ¹⁾³⁾ , 鳥居 隆三 ⁴⁾ , 芹川 忠夫 ⁵⁾	
22. ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析	67
大阪バイオサイエンス研究所 第四研究部 垣塚 彰	

23. 神経変性疾患の基礎となるイオンチャネル機能異常の遺伝子欠損マウスを用いた解析	70
東京医科歯科大学医学部 薬理学	
田邊 勉	
24. マウスモデルを用いた運動失調症原因遺伝子の同定と機能解析	72
熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設	
阿部 訓也	
25. DRPLA 遺伝子内 CAG リピートの不安定化機構の解析 —レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いたヒト生殖細胞形成過程 における検討—	75
自治医科大学 神経内科 ¹⁾ , 新潟大学脳研究所 神経病理学部門 病理学分野 ²⁾	
滝山 嘉久 ¹⁾ , 迫江 公己 ¹⁾ , 天池 美帆 ¹⁾ , 井波 尚子 ¹⁾ , 中野 今治 ¹⁾ , 西澤 正豊 ¹⁾ , 高橋 均 ²⁾	
研究成果の刊行に関する一覧表	79
構成員名簿	95

I 總括研究報告
綜合研究報告

運動失調症調査研究班

班長 金澤一郎
東京大学医学部神経内科

I 研究目標

運動失調症調査研究班の対象疾患は昭和50年に前身の「脊髄小脳変性症調査研究班」が発足(班長:祖父江逸郎・名古屋大学教授)して以来、その後の6年間はその名の通り脊髄小脳変性症のみであったが、次の6年間(昭和56~61年)は班名も「運動失調症調査研究班」(班長:飯塚禮二・順天堂大学教授)と変更になり、それに合わせるように脊髄性運動失調はもとより、末梢神経障害に基づく運動失調、さらには変性のみならず炎症性など原因が明らかな二次性運動失調までも対象とすることになった。また次の5年間(昭和62年~平成3年)は基本的には同じく「運動失調症調査研究班」の名のまま(班長:平山恵造千葉大学教授)主たる対象疾患を脊髄小脳変性症に戻すとともに広義の脊髄小脳変性症に含められるシャイ・ドレーガー症候群もその対象疾患とすることにした。それに付随して自律神経症状をも広く積極的に本班での対象症候とした。続く平成4年からは厚生省による班構成システムの変更をはきんで7年間を金澤がお世話をさせて頂いたが、対象疾患については前の平山班と大きく変えなかったが、少し脊髄小脳変性症へのウエイトを大きくした。

班研究の目標の第一に遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝子同定とその病態解析を挙げた。第二には脊髄小脳変性症の治療について、現在では小脳性運動失調症状に対するTRH注射治療があるのみであることに鑑み、新しいアイデアや経験による治療法の開発・発見を目標とした。その他、本班の伝統である小脳を中心とした生物学的基礎研究あるいは小脳性運動失調にかかわる臨床生理学的研究を広く推進することを第三の目標とした。

II 平成10年度の研究成果

① 遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝子異常に関する研究

遺伝性脊髄小脳変性症の多くは、常染色体優性遺伝形式をとり、CAGリピートの異常伸長を原因とするものである。最近、こうしたCAGリピート病の多くに共通する病理学的所見として核内封入体あがあることが知られてきた。特に、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、マシャド・ジョセフ病(MJD)、脊髄小脳萎縮症6型(SCA-6)など我が国に多い病型を対象として研究が進められてきている。本年度の本班の研究の中で特筆すべきものは以下の通りである。

1) 脊髄小脳萎縮症6型(SCA-6)の原因遺伝子はカルシウムチャンネル $\alpha 1A$ でありその遺伝子内のCAGリピートがわずかではあるが異常に伸長することによって遺伝性皮質小脳性萎縮症(遺伝性CCA)が生じることが最近我が班の班員によって確認されたが、本症においてなぜ小脳プルキンエ細胞が選択的に変性脱落するか不明であった。それに対して、カルシウムチャンネル $\alpha 1A$ 遺伝子の発現がプルキンエ細胞で著しく高いことが明らかにした。この事実が細胞変性の選択性を決めている可能性を示唆している。今後のより詳細な検討が必要である。

2) DRPLAの分子病態学的解析が著しく進んだ。DRPLAは我が国に比較的多い脊髄小脳変性症として世界から注目されている。単一精子におけるCAGリピート数を計測することによって、DRPLA遺伝子のCAGリピートの異常な伸長が精子産生の段階で生じることが明らかになっているが、どの分化過程で実際に起こるかを確かめる方法が確立した。一方、

培養細胞にDRPLA遺伝子のほぼリピート部のみを強制発現させることにより、細胞核内に封入体が出現しアポトーシスによる神経細胞死が生じることが知られていたが細胞が異なると封入体が形成されても必ずしも神経細胞死が生じるものではないことも分かった。

②脊髄小脳変性症の薬物治療に関する研究

本班で脊髄小脳変性症に対する薬物として取り上げたのは4種類である。まずMJDに対するテトラヒドロピオプテリンについては、現在二重盲検群間比較試験が公式に行われているので、最終結論はそれにゆだねたい。次に、バリン、ロイシン、イソロイシンなどの分枝アミノ酸投与の効果については、緩やかな改善効果を認めた症例が多く期待できるものであった。さらに、ノルアドレナリン代謝促進効果をもつ抗うつ薬リタリン（一般名 methulphenidate）の効果については、多くの症例に何らかの自覚的效果を認めた。また、acetazolamide については、カルシウムチャンネル異常によるSCA6の小脳性運動失調に対して運動失調評価スケールを用いて検討したところ効果が期待できることを示した。

③脊髄小脳変性症の病態把握のための臨床生理学的研究

本年度も様々な観点から臨床生理学的研究が行われたが、脊髄小脳変性症の病態に直接関係する重要課題の結果は以下の通りである。

1) 視覚的事象関連電位は認知機能の異常検出に有効であるとされている。脊髄小脳変性症には比較的大脳高次機能障害は少ないとされてきたがこの方法により得られるP300に注目して脊髄小脳変性症患者について検討したところ、P300の潜時延長、振幅低下、反応時間延長などの異常が高頻度に認められた。この結果は、大脳-小脳連関の障害によることが推定された。

2) 脊髄小脳変性症、特に多系統萎縮症(MSA)においては声帯麻痺を伴うことが多く、生命予後を決定する重要な症状として注目され

ている。まず、MSAにおいては声帯外転筋単独麻痺が多いことが突然死に結びつく可能性が高いことが分かったので、気管切開を決定するためのガイドラインを作成することを考えて検討した。その結果、MSA患者に「いびき」を認めた場合、喉頭ファイバースコープでその音が声帯から発することと確かめ、そうであれば終夜酸素分圧モニターを行いそれが90%以下となる時間が睡眠時間の約15%以上になった場合は気管切開を行う時期であることを提唱することができた。

3) リハビリテーションの立場からは、運動機能制御におけるフィードバックの入力として体性感覚、視覚、平衡感覚が知られている。これまであまり検討されていなかった音刺激が運動失調に与える効果を調べたところ、小脳性運動失調にはあまり大きな効果はなかったが、脊髄性運動失調症状に対しては運動軌跡のスムーズさと規則性が改善した。

4) 脊髄小脳変性症の中で最も多い、多系統萎縮症(MSA)についてその自律神経症状を系統的に検討し、MSAに最も多い自律神経症状は従来考えられてきたような起立性低血圧ではなく排尿症状であることを見いだした。また最も早期に出現するものも、起立性低血圧ではなく排尿症状であった。

III まとめ

本班のように、脊髄小脳変性症をほとんど唯一の対象疾患として、基礎と臨床の双方から研究者が一同に会して集まり、研究の方向性をお互いに検討しながら独自に研究を進めるという方式は、世界に類を見ないものである。その成果が、本班の班員の手によっていくつか脊髄小脳変性症の遺伝子同定の成功となって実を結んだ。さらにこれをインパクトとしてわが国全体での本症に対する臨床、病理学、生理学的研究が進んだ。その意味で、このような機会を与えられた厚生省各位に心からお礼申し上げたい。また、これからもこうした資金援助を続けて頂きますようお願いしたい。

II 分担研究報告

バキュロウイルスを用いた組換え MJD 蛋白発現系と構造解析

金澤一郎、中村浩一郎、羽関典子、後藤順

目的

Machado-Joseph 病 (以下 MJD) は、現在まで 8 つ知られているポリグルタミン病のひとつである。それらの疾患の神経細胞死のメカニズムとして、神経細胞核内および細胞質内凝集体の存在が重要と考えられている。現在まで凝集体内にはポリグルタミン蛋白のポリグルタミンドメインに加えて、分子シャペロン、ユビキチン、プロテアソーム等が存在することが判明しており、凝集体の形成機序に転写蛋白の折りたたみ機構および蛋白の分解機構が関わっていることが示唆されている。分子内の伸長したポリグルタミン鎖が、凝集の過程か、あるいは凝集の結果として神経細胞死を起こすのか、その分子メカニズムはまだ解明されていない。またポリグルタミン蛋白の凝集のメカニズムに関しても、Perutz らの提唱する自己凝集して水素結合によりアミロイド様の β シートを形成するという説と、transglutaminase のような酵素により共有結合を形成して凝集するというふたつの説が存在する。我々は、バキュロウイルス発現系を用いて、正常型および伸長したポリグルタミンを持つ異常型 MJD 蛋白を大量に作成し、この両者の生化学的性質および三次構造を比較検討することを目的として精製を試みている。

方法

バキュロウイルス発現系を用いて、組換え型 MJD 蛋白 (正常型 CAG15、異常型 CAG75) を作成する。昨年度、我々は組換え MJD 蛋白の発現を CBB 蛋白染色、抗 MJD 抗体および N 末に付加した His-Tag に対する抗体を用いた Western blot (WB) にて確認した。大規模精製の前に条件を検討するため小規模精製を行った。組換え蛋白を発現している 5×10^7 昆虫細胞を PBS で洗浄後、凍結解凍した。細胞を 10 ml AIEX buffer (0.025 M Tris-HCl, 0.05 M Bis-Tris, 0.05 M 1-methyl-piperazine, pH7.0) に再懸濁の後、超音波破碎した。これを 10000 x g、4°C、1 時間超遠心した上清をサンプルとし、陰イオン交換カラム (Resource 15Q PE 4.6/100) に apply した。5 mM~1 M NaCl 濃度勾配にて溶出した fraction を抗 His-Tag 抗体を用いた WB にて確認した。次に、その陽性 fraction を Native Binding Buffer (20 mM Sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.80) 中で Ni-Resin に吸着させバッチ法を用いて、溶出 buffer (1 M Imidazole, 20 mM Sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 5.5) にて溶出した。

東京大学大学院医学系研究科神経内科

この溶出 fraction を銀染色と抗 His-Tag 抗体を用いた

WB で確認した。

その陽性 fraction を 100 mM Na_2HPO_4 , 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 500 mM NaCl, pH 7.0 に対して透析し、各種疎水性カラム (Resource ETH, ISO, PHE) を用いて逆塩濃度勾配 (1.5 M \rightarrow 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) にて溶出した。その準備段階として、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ により組換え MJD 蛋白の塩析される濃度を決定するため、30%、40%、50%、60%、70%、80% 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度での沈殿を回収し、抗 His-Tag 抗体を用いた WB により決定した。

結果

①陰イオン交換クロマトグラフィー (Resource 15Q PE 4.6/100)

正常型および異常型 MJD 蛋白は陰イオン交換カラムに吸着し、約 350 mM NaCl 濃度で溶出された。正常型および異常型組換え MJD 蛋白の間に溶出パターンの違いは認めなかった (図 1 および図 2)。

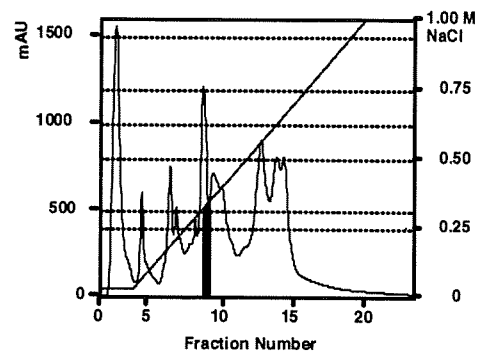


図 1. Resource15Q PE 4.6/100 による正常型組換え MJD 蛋白の溶出曲線

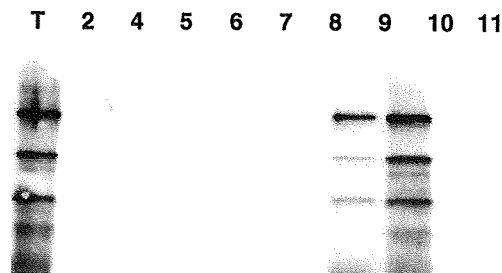


図 2. 陰イオン交換クロマトグラフィーの各溶出 fraction の抗 His-Tag 抗体による WB

上段 T: Total Hi-Five cell lysate, 番号は図 1 の Fraction Number と同じ

②バッチ法による Ni-Resin クロマトグラフィー

Resource15Q PE 4.6/100 から溶出された組換え蛋白の陽性 fraction (No. 8, 9, 10) を Ni-Resin に吸着させ、溶出バッファーにて 1 ml ずつ fraction を取って行くと Fraction 2 に溶出された (図 3)。

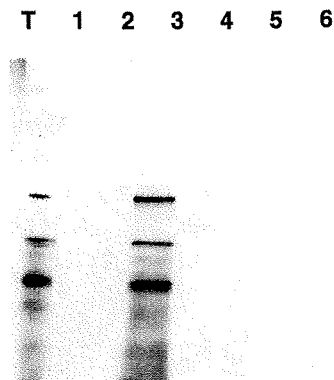


図 3. Ni-Resin クロマトグラフィーによる組換え正常型 MJD 蛋白の精製
T: Total Hi-Five cell lysate、番号は Fraction Number

③最適硫酸濃度の決定

ALEX buffer に懸濁した正常型および異常型組換え MJD 蛋白に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加え 30%、40%、50%、60%、70%、80% 飽和での沈殿を回収し、抗 His-Tag 抗体を用いた WB により決定した。正常型および異常型とも 50% 飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (約 2 M) で沈殿を形成した。この結果より、次の疎水性クロマトグラフィーの効果を最大にするため開始 buffer を 100 mM Na_2HPO_4 , 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 500 mM NaCl, pH 7.0 とした。

④疎水性クロマトグラフィー (Resource ISO)

正常型および異常型 MJD 蛋白は、Resource ISO 担体を用いたクロマトグラフィーにより最適の分離が得られ、逆塩濃度勾配にて約 650 mM の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度で溶出された (図 4)。正常型と異常型に溶出濃度の差は認められなかった。

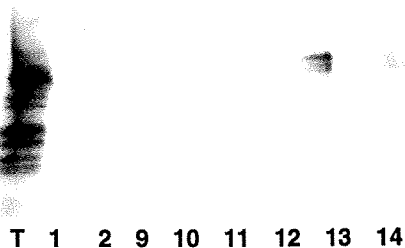


図 4. Resource ISO 疎水性クロマトグラフィーによる正常型組換え MJD 蛋白の精製
T: Total Hi-Five cell lysate、番号は Fraction Number

考 察

精製の過程で、正常型と異常型組換え MJD 蛋白に、陰イオン交換体、および疎水性リガンドとの結合強度に有意な差は見いだせなかった。過去の報告で、異常型のポリグルタミンドメインとその近傍の配列をもつ融合蛋白は、正常型に比較して凝集傾向が著明であるとされているが、我々の実験でも長期の 4°C 保存状態では、より異常型の組換え MJD 蛋白懸濁溶液の方が白濁する傾向がみられ凝集しやすいものと考えられた。また溶液の蛋白濃度が高い方がより白濁しやすい傾向が見られた。このことは、Pertz らが提唱したポリグルタミンドメインは互いに水素結合を介して、非共有結合的に自己凝集して逆平行βシートを形成するという説を支持すると思われた。今後この溶液の超遠心による沈殿物の偏光顕微鏡による観察や Congo Red 染色等による解析が必要と思われる。

ま と め

バキュロウイルスに発現させた正常型および異常型組換え MJD 蛋白の小規模部分精製をおこなった。今後、精製純度を向上させ大規模精製を行う予定である。さらにポリグルタミン病の発症機序を解明するために精製した MJD 遺伝子産物を X 線構造解析等により構造解析するとともに、シャペロン蛋白、プロテアーゼ等との相互作用を検討する。

文 献

- 1) Sisodia SS: Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell* 95:1-4, 1998
- 2) Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME: Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55-66, 1998
- 3) Kim TW, Tanzi RE: Neuronal intranuclear inclusions in polyglutamine diseases: nuclear weapons or nuclear fallout? *Neuron* 21:657-9, 1998
- 4) Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, DeFranco DB, Orr HT, Zoghbi HY: Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* 19:148-54, 1998
- 5) Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE: Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90:549-58, 1997
- 6) Paulson HL, Perez MK, Trottier Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH, Pittman RN: Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19:333-44, 1997

- 7) Wang G, Ide K, Nukina N, Goto J, Ichikawa Y, Uchida K, Sakamoto T, Kanazawa I: Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 233:476-9, 1997
- 8) Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A: Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genetics* 13:196-202, 1996
- 9) Stott K, Blackburn JM, Butler PJ, Perutz M: Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:6509-13, 1995
- 10) Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT: Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:5355-8, 1994

SCA6における acetazolamide の治療経験

佐々木秀直¹⁾、矢部一郎¹⁾、山下 功¹⁾、武井麻子²⁾、濱田 毅²⁾、
田代邦雄¹⁾

背景と目的

SCA6は常染色体19p13.1に位置する α_{1A} 電位依存性Caチャンネルサブユニット(旧CACNL1A4,CACNA1A; GDB No HSPQCCA1)遺伝子3'-側翻訳領域内のCAGリピートが軽度に異常伸長して発症する優性遺伝性小脳皮質萎縮症である[1]。そのCAGリピート伸長は他のCAGリピート病に比較して短く、正常では4~18回であるのに対して、21~33回に伸長している場合に発症する[1-10]。SCA6の正確な頻度は不明であるが、本邦の異なる地域からの報告を総合すると優性遺伝性小脳皮質萎縮症の40~60%がSCA6と推定される[2-6]。

我々は最近SCA6の約70%が初期に繰り返す“めまい”にて発症すること、注視眼振、頭位懸垂時の頭位眼振が高頻度に認められることを報告した[11]。この変動する初期症状はSCA6のallelic disorderである反復発作性運動失調症2型(episodic ataxia type 2; EA2)と重複している。EA2とSCA6は同一遺伝子の異なった異常により発症するallelic disorderである[12]。従来よりEA2ではacetazolamideが発作症状を改善させることが知られていた[13]。また最近ではSCA6においても有効との報告がJenらによりなされている[14]。そこで、我々はSCA6におけるacetazolamideの薬物効果について検討した。

対象と方法

1) SCA6患者

遺伝子解析によりSCA6と確定診断された9人を対象とした。男性7人、女性2人からなり、年齢は42~67歳で平均 56.8 ± 8.8 (SD)、発症年齢は35~57歳で平均 48.2 ± 7.9 、罹病期間は5~10年で平均 8.6 ± 1.9 である。疾患遺伝子のCAGリピート数は22~25回で平均 22.8 ± 1.1 であった。臨床的には3人が緩慢進行性の運動失調のみであり、6例が“めまい発作”を伴っていた。全例に注視眼振あり、7人に頭位眼振、1人に周期性方向交代性眼振を認めた。さらに2人ではパピンスキー徴候が陽性で、筋痙縮、腱反射亢進、深部感覚障害を各々1人に認めた。

2) acetazolamide 投与方法

口頭及び文書にて同意を得た後、最初の1週間はacetazolamide 250mg/日を朝夕2回に分け経口投与した。副作用がないことを確認した上で、以後は500mg/日に増量した。

3) 臨床症状の評価及び有効性の解析方法

投与2週間前及び投与開始前日、投与1週間後、2週間後、4週間後、8週間後、16週間後、24週間後、32週間

1)北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻 神経病態学講座 神経内科学分野、2)北祐会神経内科病院

後に、Ataxia Rating Scale (ARS)によって神経徴候を点数化し、重心動揺計(アニマ社、G5500)を用いて運動失調の定量的評価を行った。ARSは小脳失調の薬物効果判定の指標として、世界的な基準となるものとして世界神経学会のAtaxia Neuropharmacology Committeeより提唱されているものである[15]。評価項目はgait & posture、kinetics、dysarthria、oculomotor movementの4つに分かれており、各々が34点、52点、8点、6点で評価され、総計100点が最も障害度が高い。重心動揺計検査は両踵をつけ、つま先を30度開扇し直立した状態で60秒間2回測定し、2回目を測定値として採用した。20msec毎の足底圧中心の位置を座標軸に取り込み、開眼及び閉眼時の単位移動時間あたりの移動距離(LNG/TIME)と実効値面積(RMS area)により姿勢動揺を評価した。

投与2週間前と投与開始日と比較し、その両者間の各項目における平均値にt検定にて有意差を認めないことを確認した後、投与開始日と各評価時点での平均値をt検定で比較し、有意差($p < 0.05$)を検討した。

4) 副作用チェック

服用1週間後、以後は4週間毎に問診、診察及び血液検査を行い副作用の有無を評価した。

結果

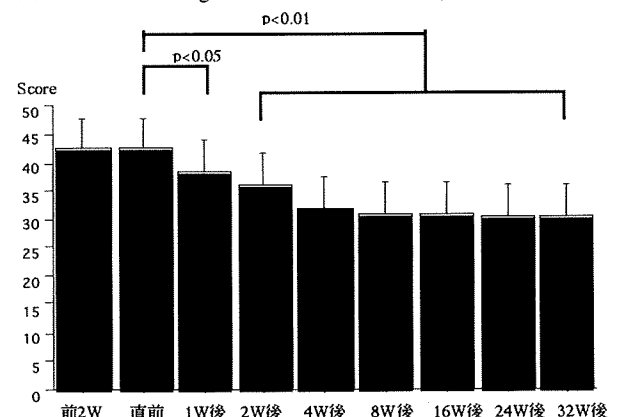
1) Ataxia rating scale (表)

投与2週間前及び開始直前の中で、いずれの項目においても有意差を認めなかった。また、以下の諸項目においても、投与前より悪化したものは1人も認められなかった。

① ARS 総評点 (表、図1)

投与1週間後には有意に減少し($P < 0.05$)、2週目を以降は更に減少した($P < 0.01$)。32週目まで増加傾向を認めず。

図1. Ataxia Rating Scale 総評点の変化 (M±SD, n=9).



② Gait & Posture 評点

投与2週後より有意に減少し(P<0.05)、4週目を以降は更に減少した(P<0.01)。32週目まで増加傾向を認めず。

③ Kinetics 評点

投与4週目より有意に減少した(P<0.05)。32週目まで増加傾向を認めず。

④ Dysarthria 評点

投与1週後より有意に減少し(P<0.05)、16週目を以降は更に減少した(P<0.01)。32週目まで増加傾向を認めず。

⑤ Oculomotor movement 評点

投与2週後と4週後で、有意に減少した(P<0.05)。しかし、8週目を以降では有意な変動を認めず。

2) 重心動揺計(表、図2)

開眼時移動距離(cm/sec)、開眼時実効値面積(cm²)、閉眼時移動距離(cm/sec)の3項目については、16週目を以降で有意に減少した(P<0.05)。32週目まで増加傾向を認めず。閉眼時実効値面積(cm²)は4週目を以降で有意に減少し(P<0.05)、16週目を以降では更に減少した(P<0.01)。

3) 副作用

2人に一過性の上肢先端のしびれ感、3人に治療対象にならない程度の起立性低血圧を認めた。

図2. 重心動揺計による開眼時移動距離(M±SD, n=9).

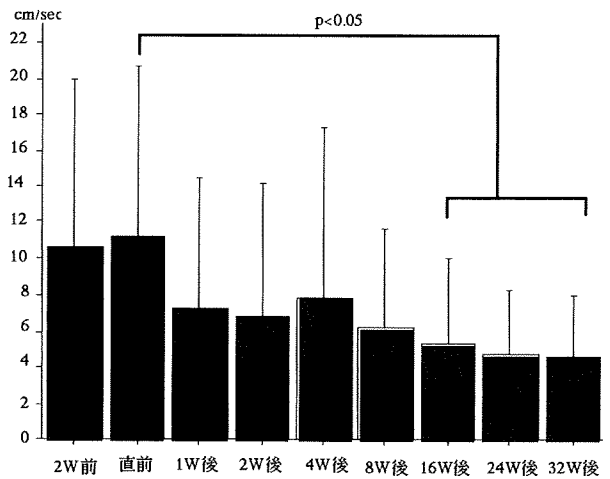


表. Ataxia Rating Scale と重心動揺計計測値(M±S.D.)

	直前	1 週後	2 週後	4 週後	8 週後	16 週後	24 週後	32 週後
Acetazolamide(mg/day)	0	250	500	500	500	500	500	500
ARS 総評点	42.7±16.2	38.6±16.5 ^a	36.0±17.5 ^b	32.0±17.1 ^b	30.9±17.2 ^b	30.7±17.7 ^b	30.2±17.6 ^b	30.2±17.6 ^b
Posture & Gait	12.1±7.1	11.1±7.7	9.8±8.2 ^a	9.1±7.9 ^b	8.6±8.1 ^b	8.3±8.2 ^b	8.3±8.2 ^b	8.4±8.2 ^b
Kinetic	23.2±8.9	21.1±8.7	20.2±10.0	17.9±9.7 ^a	16.9±10.2 ^a	17.1±10.5 ^a	17.0±10.2 ^a	17.0±10.2 ^a
Dysarthria	3.6±1.3	3.0±1.2 ^a	3.0±1.1 ^a	2.7±1.2 ^a	2.4±1.2 ^a	2.4±1.0 ^b	2.4±1.0 ^b	2.3±1.1 ^b
Oculomotor movement	3.7±1.3	3.3±1.2	3.0±1.0 ^a	2.8±1.5 ^a	3.0±1.7	2.8±1.6	2.7±1.5	2.7±1.5
重心動揺計								
開眼移動距離(cm/s)	12.7±11.4	10.4±7.6	8.9±7.8	6.7±4.0	7.8±6.0	5.5±4.3 ^a	4.6±3.7 ^a	4.0±3.7 ^a
開眼実効値面積(cm ²)	11.1±9.6	7.3±7.1	6.9±7.2	7.8±9.5	6.1±5.6	5.3±4.7 ^a	4.6±3.6 ^a	4.5±3.4 ^a
閉眼移動距離(cm/s)	16.3±11.6	9.6±6.9	8.9±5.5	10.2±8.0	9.1±7.1	8.8±7.0 ^a	8.0±6.9 ^a	8.4±6.7 ^a
閉眼実効値面積(cm ²)	21.0±16.2	11.4±7.0	11.7±8.2	10.0±7.2 ^a	8.5±4.8 ^a	6.9±5.1 ^b	5.7±4.7 ^b	6.3±4.4 ^b

t 検定: a; P<0.05, b; P<0.01

考 察

Giggs らの報告以来、EA の発作症状が acetazolamide により抑制されることが知られている[16]。その有効性は電位依存性 K チャンネル遺伝子の点変異で発症する EA1 においても認められているが、特に EA2 において有効とされている[13,17]。acetazolamide は良く知られた炭酸脱水素酵素阻害剤である。EA2 に対して臨床的に効果があるが、その作用機序に関しては明らかでない部分が多い。EA2 は数時間から数日持続するめまいと運動失調を発作的に繰り返す、間歇期にも眼振を呈する疾患である。過去、acetazolamide-responsive ataxia もしくは EA として報告されたものの中には、発作を繰り返す過程で、間歇期にも小脳性運動失調症が顕在化し、画像診断でも小脳萎縮を呈した例がある[18,19]。このような例が本来の EA2 にも認められるのか、あるいは SCA6 であったのか、については慎重に検討する必要がある。EA2 に酷似した発作

症状は、SCA6 の初期においても頻度の高い症状の1つであり、我々のみならず[11]、Geshwind らにより報告されている[7]。最近、Jen らは acetazolamide を SCA6 患者7人に投与し、繰り返すめまい発作に対して効果的であったと報告している[14]。今回の我々の結果では、acetazolamide 投与により、変動性もしくは発作性症状のみならず、運動失調もまた軽度ではあるが改善することが示唆された。特に小脳性運動失調と構音障害に効果が認められた。一方、眼振に関しては、ARS 4項目の中で最も有効性が低かった。その理由として SCA6 では眼球運動自体は障害されないため、ARS の oculomotor movement に関する評価項目は実質的には眼振、特に注視眼振の程度を反映することによるものと考えられる。Jen ら[14]、Baloh ら[19]の報告においても acetazolamide 投与により、めまい発作の頻度は減少したが、眼振には有意な変化がなかったことは、我々の結果と合致している。また、頭

位眼振は SCA6 に特徴的な眼振であるが[11]、ARS 評点項目には含まれていないので、今回の結果には反映されていない。

今回の治療効果の検討は盲検ではないので、プラセボ効果の存在を否定できず、解釈に制約がある。しかし、32 週以上にわたり効果が持続すること、重心動揺計においても改善傾向にあることなどは、プラセボ効果の可能性が低いことを示唆している。文献的及び自験例の検討結果から見る限り、acetazolamide が EA2 と同じく、SCA6 においても症状の改善にある程度有効である可能性を示唆している。

まとめ

SCA6 患者 9 人に acetazolamide の経口投与を行い、32 週間にわたり ARS と重心動揺計を指標に、その効果を検討した。その結果、運動失調の軽度改善を認めた。

文 献

- 1) Zhuchenko O, et al: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15:62-69, 1997
- 2) Yabe I, et al : SCA6 mutation analysis in a large cohort of the Japanese patients with late-onset pure cerebellar ataxia. *J Neurol Sci* 156: 89-95, 1998
- 3) Ishikawa K, 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* 61:336-346, 1997
- 4) Matsumura R, et al : Spinocerebellar ataxia type 6. Molecular and clinical features of 35 Japanese patients including one homozygous for the CAG repeat expansion. *Neurology* 49: 1238-1243, 1997
- 5) Matsuyama Z, et al : Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Hum Mol Genet* 6:1283-1287, 1997
- 6) Ikeuchi T, et al : Spinocerebellar ataxia type 6: CAG repeat expansion in α_{1A} -voltage-dependent calcium channel gene and clinical variations in Japanese population. *Ann Neurol* 42: 879-884, 1997
- 7) Geschwind DH, et al: Spinocerebellar ataxia type 6. Frequency of the mutation and genotype-phenotype correlations. *Neurology* 49:1247-1251, 1997
- 8) Stevanin G, et al : Clinical and molecular features of spinocerebellar ataxia type 6. *Neurology* 49: 1243- 1246, 1997
- 9) Riess O, et al : SCA6 is caused by moderate CAG expansion in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel gene. *Hum Mol Genet*6:1289-1293, 1997
- 10) Gomez CM, et al : Spinocerebellar ataxia type 6: gaze-evoked and vertical nystagmus, Purkinje cell degeneration, and variable age of onset. *Ann Neurol* 42:

933-950, 1997

11) 矢部一郎、他: Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) の初期症状ならびに神経症候の推移に関する検討. *臨床神経* 38: 489-494, 1998

12) Ophoff RA, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543-52, 1996

13) Baloh RW, et al: Familial episodic ataxia: clinical heterogeneity in four families linked to chromosome 19p. *Ann Neurol*. 41:8-16, 1997

14) Jen JC, et al : Spinocerebellar ataxia type 6 with positional vertigo and acetazolamide responsive episodic ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 565-568, 1998

15) Trouillas P, et al : International cooperative ataxia rating scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. *J Neurol Sci* 145: 205-211, 1997

16) Giggs RC, et al: Hereditary paroxysmal ataxia: response to acetazolamide. *Neurology* 28: 1259-1264, 1978

17) Browne DL, et al : Episodic ataxia/myokimia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet.* 8 : 136-140, 1994

18) Gancher ST, et al: Autosomal dominant episodic ataxia: a heterogeneous syndrome. *Mov Disord* 1: 239-253, 1986

19) Baloh RW, et al: Acetazolamide-responsive vestibulocerebellar syndrome: clinical and oculographic features. *Neurology* 41: 429-433, 1991

運動失調症における音刺激の効果

丸石正治* 眞野行生* 上見憲弘** 伊福部達**

目的

運動機能制御におけるフィードバックの入力として体性感覚、視覚、平衡感覚が知られている。一方音は位置情報や速度などの情報を与えることが知られているが、kinetic な運動機能への音の影響はこれまで全く検討されていない。今回我々は、運動失調症の患者に対して音源を用いて刺激し、運動制御機能への影響を検討したので報告する。

対象と方法

対象は運動失調症 6 名（深部感覚障害 4 名、小脳障害 2 名）で、このうち 1 名は橋出血のために複視を有していた。また健常人 2 名をコントロールとして用いた（表 1）。

グラスウールにて音の反響等のアーチファクトを除去した実験室を作成し、その内部で検査を施行した。被検者の第 2 指先端に音源を取り付け、SOUND MODULATOR を用いて音を発生させた。被検者の耳で聞こえる音を 2 台のマイクロフォンを用いて両耳からモニターし、被検者の上肢の動きを 2 次元動作解析装置と表面筋電図を用いて解析した。今回は 2 次元動作解析の結果を検討した。失調の程度の判定には、失調側の人差し指で指鼻試験を行い、この結果について比較検討した。図 1 のように被検者を固定し、手台をスタート地点、鼻を終了地点とした。このときの指の到達位置と鼻までの距離のずれ・軌跡長・全施行時間の中間 1/3 の平均速度について分析した。

検査 1

音刺激の影響を比較検討するために以下の手順で検査を施行した（図 2）。すなわち、はじめに閉眼状態で音源のない状態で 5 分間隔で 3 回指鼻試験を行い、15 分以上の休憩をとった後に音源に

表 1 対象者の臨床的特徴

症例	年齢	性	診断	失調の主な原因	利き手	失調側
1	55	男	視床・橋出血	深部感覚障害 (複視)	右	右
2	47	男	視床出血	深部感覚障害	右	右
3	33	女	ギラン・バレー症候群	深部感覚障害	右	左(右)
4	70	男	視床出血	深部感覚障害	右	右
5	62	女	小脳出血	小脳障害	右	左
6	61	男	小脳梗塞	小脳障害	右	右
7	23	女	健常人	-	右	-
8	25	男	健常人	-	右	-

よる刺激を付加した。同様に閉眼指鼻試験を中間に挟みながら、開眼状態、さらには開眼で音源刺激を行った状態を比較検討した。これは、被検者の学習効果や疲労の影響を除外し、各検査条件間の比較検討を行いやすくすることを目的としての工夫である。

検査 2

深部感覚障害患者 1 例に対し、音の構成要素がどのように影響しているか調べるために、検査 1 と同様の要領で検査を施行した。いずれも閉眼で時間間隔は検査 1 と同じにして施行した。被検者の耳に届く音量が変化しないように加工した雑音、音色の変化がない 2kHz 純音、音量・音色ともに変化する通常の雑音を用いた。さらに被検者の片耳を遮蔽して通常雑音による刺激を行うことにより、両耳効果について検討した。

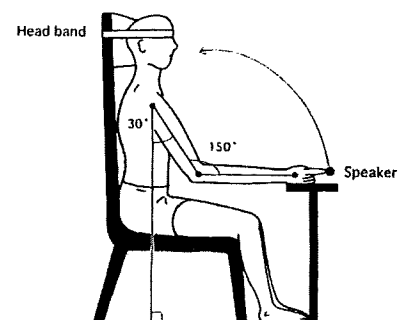


図 1 指鼻試験実施図

*北海道大学医学部リハビリテーション医学講座

** 同 電子科学研究所感覚情報研究分野

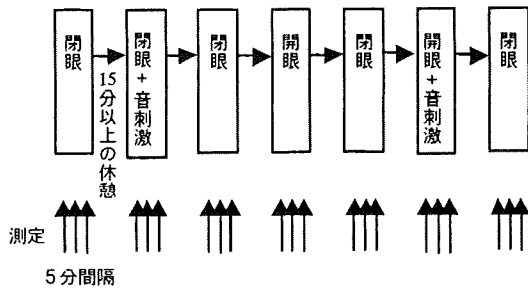


図2 検査1実施手順

結果

健常人では軌跡はスムーズな円弧を描き、スタート地点から加速し終了地点で減速する。一方、深部感覚障害では、軌跡が動揺し速度成分も加速と減速が調整できていない傾向を示し、小脳障害では、軌跡は動揺し後半に速度が緩やかな動揺を示す傾向が認められた。検査1の結果を図3に示す。到達位置のずれに関しては(図3a)、深部感覚障害・小脳障害ともに、閉眼状態に比較して開眼状態では著しい改善を示し、音刺激でも中等度の改善を示した。特に複視のあった1例では開眼ではずれがむしろ増大しているのに対して音を付加することによって改善を示した。軌跡長に関しては(図3b)、深部感覚障害では開眼によって減少を認めた。閉眼の音刺激では、軽度の軌跡長減少を認めた。さらに開眼での音刺激では、開眼のみよりもさらなる軌跡長の減少を認めた。一方、小脳障害では一定の傾向を認めなかった。速度に関しては(図3c)、深部感覚障害では開眼によって速度増大を認めた。閉眼音刺激では速度は低下し、この傾向は開眼でも認められた。検査2における到達位置のずれを図に示す。音源のない状態に比較して調節ノイズ・2kHz純音のいずれも改善効果を認めており、音の成分のうち音

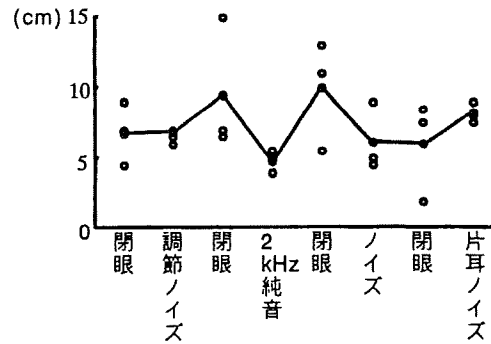


図4 検査2における到達位置のずれ

色と音量の両者が関与している可能性が示唆された。片耳の場合はむしろずれが増大しており、音刺激による失調改善には両耳効果が関与しているものと考えられた。

考察

検査1の音刺激によって、指の到達位置と鼻までの距離のずれは明らかに改善していることから、測定障害に対する改善効果を認めたと推測できる。また、軌跡長の短縮もわずかながら認められ、これは指鼻試験中の decomposition が改善したことを示していると考えられる。したがって、音刺激の影響は kinetic movement の際にも認められ、特に深部感覚障害による運動失調に対して改善効果があることが示唆された。姿勢制御、運動制御における音の影響について、これまで空間認知、平衡感覚への影響、pinna movement、さらに眼振への影響が報告されているが、今回我々の報告した kinetic movement に対する影響はこれまで報告されていない。この現象について我々は以下のようなメカニズムを推定した。一般的な影響として、音を発生させることによる注意の集中が考えられる。

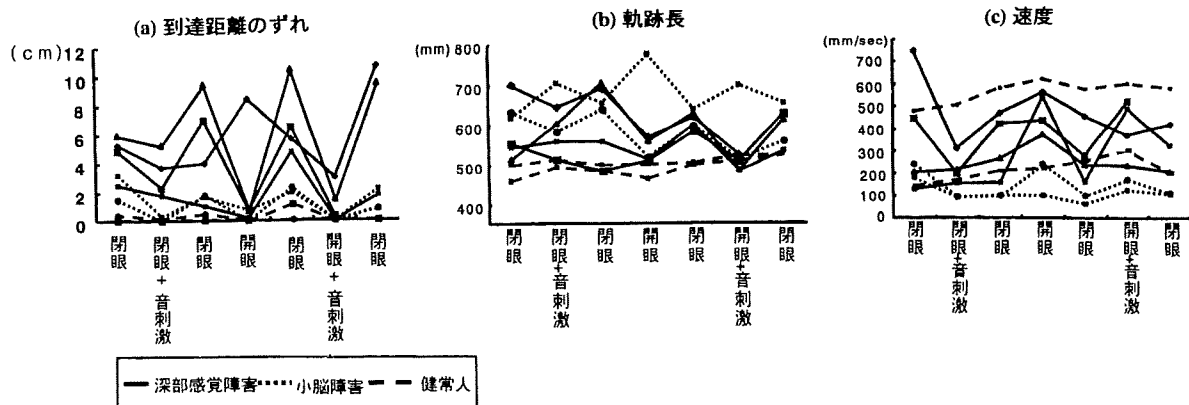


図3 失調の主な原因と到達位置のずれ(a), 移動距離(b), 速度(c)の関係

また感覚代償として、音像定位による位置情報の把握が可能になること。さらに視覚・体性感覚・聴覚が sensory integration によって脳内で統合賦活される可能性。最後に auditory pathway 独自の経路の存在も否定できない。検査2で両耳効果が認められたことより、少なくとも注意の集中以外のメカニズムが働いていることが推測される。検査2で音色・大きさなどの音成分が、この作用に関わっていることが示唆された。今後さらに音と運動機能制御に関して検討してゆきたい。

参 考 文 献

1. Populin LC, Yin TCT: Pinna movements of the cat during sound localization. *J Neurosci* 1998, 18: 4223-4243
2. Valentine DE, Moss CF: Spatially selective auditory responses in the superior colliculus of the echolocating bat. *J Neurosci*, 1997, 17: 1720-1733
3. Populin LC, Yin TC: Behavioral studies of sound localization in the cat. *J Neurosci*, 1998, 18: 2147-2160
4. Griffin TD, Rees A, Witton C, Cross PM, Shakir RA, Green GGR. Spatial and temporal auditory processing deficits following right hemisphere infarction. A psychophysical study. *Brain* 1997, 120: 785-794
5. Kalveram KT. A neural-network model enabling sensorimotor learning: Application to the control of arm movements and some implications for speech-motor control and stuttering. *Psychol Res*, 1993, 55: 299-314

分化型PC12細胞における歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症蛋白の発現と核内封入体

小野寺理, 佐藤 晶, 下畑 享良, 小出玲爾, 高野弘基,

佐藤俊哉, 小宅睦郎, 五十嵐修一, 田中恵子, 犬塚 貴, 辻 省次

はじめに

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(以下DRPLA)は、常染色体優性遺伝形式の神経変性疾患で、spinocerebellar ataxia (SCA)¹⁾, SCA2²⁾, SCA6³⁾, SCA7⁴⁾, Machado-Joseph disease (MJD)⁵⁾, spinal and bulbar muscular atrophy⁶⁾, Huntington's disease (HD)⁷⁾と同様、翻訳領域内のCAGリピートの異常な伸長によって引き起こされるいわゆるCAGリピート病¹⁰⁾である。これらに共通の病態としてポリグルタミン鎖を有する蛋白の神経細胞に対するgain of toxic functionのメカニズムが想定されており、培養細胞におけるMJD, DRPLA, SCA1およびHDの蛋白発現実験からポリグルタミン鎖を含む蛋白断片の細胞障害がCAGリピート病の共通の病態であることが想定されている。

一方、伸長したCAGリピートを有するHDの原因遺伝子のエクソン1を導入したトランスジェニックマウスにおいて、神経細胞内に核内封入体(NII)が見出された¹²⁾のに続き、HD¹³⁾, MJD¹⁴⁾, DRPLA¹⁵⁾, SCA7¹⁶⁾, SBMA¹⁷⁾の剖検例においても中枢神経の病変部位にNIIが発見され、NIIがCAGリピート病の発症機構の重要な役割を担っている可能性がある。我々は、正常または伸長したポリグルタミン鎖を含む蛋白の断片または全長の神経細胞に対する作用を解析しCAGリピート病の神経細胞障害機構を明らかにすることを目的として、アデノウイルスベクターを用いて神経系培養細胞について発現実験を行った。

方法

COS-TPC (cosmid cassettes and adenovirus DNA terminal protein complex) 18)を用い、(CAG)15及び(CAG)78と、その上流33塩基対、下流の21塩基対を含むDRPLA cDNA断片を有するアデノウイルスベクターを作成し、塩化セシウムを用いた超遠心法により精製した。CAGリピートの上流にCAG CAA CAG CAAという配列があるため、それぞれ19, 82グルタミンとその両末端の7アミノ酸をコードしている。また、tagとして5'側にFLAGをコードする配列を付加した。ウイルス感染の対照として、lacZを含むアデノウイルス Adex1CALacZを用いた。アデノウイルスベクターを感染させるため、培地を除去したヒト線維芽細胞または分化型PC12細胞にウイルス溶液を加え、37°Cで1時間インキュベートした後、培地を加え培養した。

アデノウイルスベクターを分化型PC12細胞とヒト線維芽細胞にMOI 100で感染させた後3, 6, 9日間培養し、固定後に抗FLAG M5モノクローナル抗体を用いた免疫染色、Hoechst 33342による核染色を行った。また、

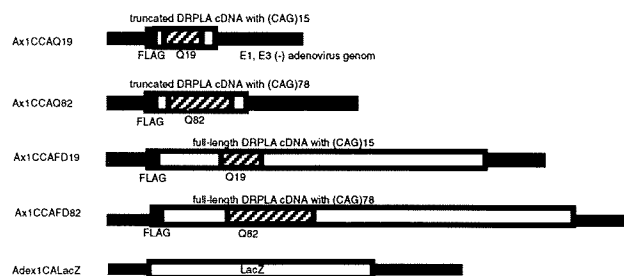


図1. アデノウイルスベクターのゲノム

In Situ 細胞死検出キット(Boehringer Mannheim)を用いてTdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)法によるアポトーシスの検出を行った。

結果

正常蛋白断片を発現させた分化型PC12細胞では細胞全体が均一に染色されたのに対し変異蛋白断片を発現させると3日後にはFLAG陽性細胞のうち97.7%の細胞の核内に多数の封入体形成を認めた。変異蛋白断片を発現させた分化型PC12細胞のTUNEL陽性率は感染3日後で4.7±3.1%, 6日後は39±16%, 9日後には70±11%と著明に増加した。これに対し、正常蛋白断片を発現させた細胞では3日後, 6日後, 9日後のTUNEL陽性率はそれぞれ5.7±6.4%, 14±8.1%, 20±8.6%であった。

線維芽細胞においては正常蛋白断片は細胞質に均一に存在したが、変異蛋白断片を発現させると細胞内に凝集体形成を認めた。凝集体が核内に存在した細胞は3日目には31±21%, 6日目には52±35%, 9日目には71±23%であった。変異蛋白断片を発現させた線維芽細胞のTUNEL陽性率は感染3日後で5.0±1.7%, 6日後で18±6.4%, 9日後で37±6.1%であったのに対し、正常蛋白断片を発現させた細胞ではそれぞれ2.3±3.0%, 3.7±5.2%, 4.7±4.0%であった。

正常蛋白全長を発現させた分化型PC12細胞では核が均一に染色され、封入体は認めなかったが、変異蛋白全長を発現させた細胞では核が均一に染色され、1-2個の核内封入体を認めた。線維芽細胞においては正常蛋白全長は核に均一に染色され、変異全長蛋白は細胞質および核に発現し細胞質に凝集体が認められた。全長蛋白を発現させた細胞においてはTUNEL陽性細胞の有意な増加は認められなかった。