

考 察

今回我々は脊髄小脳変性症にBCAAを投与しその運動機能改善効果を検討した。さらにラット小脳神経初代培養系を用いてBCAAの神経栄養効果を評価した。

BCAAは分枝側鎖を有するアミノ酸の総称でバリン、ロイシン、イソロイシンの三種類がある⁹⁾。脳でのアミノ酸の取り込みはヒト、ラットのいずれにおいてもBCAA、特にバリンが顕著で、またラットにおけるBCAAの酸化能は肝臓や筋肉に比べ脳が4倍高いことも知られており、脳はBCAA利用の重要な場と考えられている³⁰⁾。さらに、BCAAが中枢神経系においてグルタミン酸代謝及びエネルギー源として最適な理由として、以下の三点が挙げられる⁷⁾。すなわち、(1)血液脳関門を速やかに通過する、(2)BCAAそれ自体には神経活性作用がなく、中枢神経内を安全に輸送される、(3)容易に α -ケトグルタル酸へ変換されることである。さらに、ロイシンを例に挙げると、脳血管関門において血液中から星状細胞に取り込まれたロイシンは α -ketoisocaproic acidとして脳細胞外液に放出され、神経細胞がこれを取り込み再びロイシンに変換して細胞内のグルタミン酸産生に利用するが、その際同モル数のグルタミン酸を消費することで、細胞外液中のグルタミン酸を緩衝する作用があると考えられている⁷⁾。これらの理由より、エネルギー源であるアミノ酸は細胞外液のグルタミン酸濃度を低下させ、穏やかな効果ではあるが神経変性疾患に対し何らかの効果があるものと期待される。細胞外液中のグルタミン酸を緩衝するという理由で、筋萎縮性側索硬化症等の神経変性疾患へ応用が試みられいくつかの臨床的検討がされているが^{8,10)}、脊髄小脳変性症への応用は我々の検索した限りみられなかった。

二重盲検交差試験によるBCAAの経口投与では、対照に比べ有意な改善は認められなかったが、BCAA合剤投与8週でICARSに開始前と有意差が認められた。項目別検定では全体的に有効な項目の傾向は認められなかった。また、錐体外路症状が主体でL-dopaの効果期待できる症例では、BCAAの効果は認められなかった。BCAAはlarge neutral amino acid (LNAA)に含まれるが、これらのアミノ酸は消化管からの吸収や血液脳関門の通過に際し、L-dopaと競合してその吸収や血液脳関門の通過を阻害することが知られている¹²⁾。従ってL-dopa投与中の症例で、BCAA投与はL-dopaの効果を増弱させる為症状の変化をきたすものと考えられ、推奨できない。

今回のtrialは運動機能改善を標的とした比較的短期間の投与であり、神経変性抑制効果に関しては不明である。しかし前述の作用機序仮説に基づくと、SCD進行抑制にも何らかの影響があると予想される。今後この点を考慮してより長期間にわたる経口投与を行い、運動機能改善効果にあわせ進行抑制効果についても検討を加える必要がある。

結 論

SCDに対するBCAA投与がその症状改善に有効である可能性が示唆された。マイクロアイランド培養法を用いて、グリア細胞や他の神経細胞の混入が少なく、各種薬剤の定量的検討に耐えるラット小脳Purkinje細胞培養系を確立した。BCAAの神経栄養効果の検討では、培養7日目において、対照、1.5倍液に対し2.0

倍液で有意な生細胞率の上昇が認められた。臨床的検討では、更に症例数を増やし、BCAA合剤の用量試験、長期投与試験を行う必要があると考える。

文 献

- 1) Trouillas P et al: International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *J Neurol Sci* 145: 205-11, 1997
- 2) Takeshima T et al: Mesencephalic type 1 astrocytes rescue dopaminergic neurons from death induced by serum deprivation. *J Neurosci* 14: 4769-4779, 1994
- 3) Brewer GJ et al: Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35: 567-576, 1993
- 4) Rodwell VW (1990). Catabolism of protein and of amino acid nitrogen. In: RK Murray et al (eds). *Harper's Biochemistry*, Prentice-Hall International Inc. London, pp, 273-283.
- 5) Felig P et al: Uptake of individual amino acids by the human brain. *Proc Soc Exp Biol Med* 142: 230-231, 1973
- 6) Odessey R et al: Oxidation of leucine by rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 223: 1376-1383, 1972
- 7) Yudkoff M: Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia* 21: 92-98, 1997
- 8) Plaitakis A et al: Pilot trial of branched-chain amino acids in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 1: 1015-1018, 1988
- 9) Testa D et al: Branched-chain amino acids in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 236: 445-447, 1989
- 10) The Italian ALS Study Group: Branched-chain amino acids and amyotrophic lateral sclerosis: A treatment failure? *Neurology* 43: 2466-2470, 1993
- 11) Tandan R et al: A controlled trial of amino acid therapy in amyotrophic lateral sclerosis: I. Clinical, functional, and maximum isometric torque data. *Neurology* 47: 1220-1226, 1996
- 12) Pincus JH et al: Plasma levels of amino acids correlate with motor fluctuations in parkinsonism. *Arch Neurol* 44: 1006-1009, 1987

テトラヒドロピオプテリンは Machado-Joseph 病以外の脊髄小脳変性症にも有用であろう。

酒井徹雄、安德恭演、松石豊次郎¹、山田茂人²

目的

我々は、平成8、9年度の本班会議にてテトラヒドロピオプテリンが Machado-Joseph 病の神経症候を改善させる旨の報告を、それぞれ二重盲検交叉試験¹、オープン試験方法²を用いて行ってきた。Machado-Joseph 病に対する有用性については現在、全国的な臨床試験が進行中であり近い将来その結果が出るものと思われる。

ところで、Machado-Joseph 病以外の脊髄小脳変性症にはテトラヒドロピオプテリンは有効でないのだろうか？この疑問に少しでも応えるために、今回我々は遺伝しない脊髄小脳変性症のなかで最も頻度が高い多系統萎縮症の患者さんの脳脊髄液中のピオプテリンを測定してみた。

対象

当院入院中で N. Quinn の診断基準³にある probable MSA に該当する4名の多系統萎縮症 multiple system atrophy(MSA)患者さんが選ばれた(M:F=1:3; 62~70歳)。疾患対照群(Other Diseased Controls:OND)として、4名の Becker 型筋ジストロフィー、Duchenne 型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、脳梗塞、本態性振戦、家族性痲痺性対麻痺の各1例、合計10名。多系統萎縮症の患者さんのプロフィールは表1に記載。

方法

biopterin 測定法は Nixon & Fukushima⁴, amine metabolites 測定法は Yokoo et al.⁵ に依った。統計解析は F-test, t-test に依った。

国立療養所筑後病院 神経内科

久留米大学 ¹小児科、²脳疾患研究所

表1.MSA 患者プロフィール

症例	1	2	3	4
年齢/性	62/M	64/F	66/F	70/F
罹病期間	5	1	2	12年
Ataxia	+	+	+++	+++
Parkin	+++	++	+	++
Pyramid.	-	-	-	+
Dysauto.	++	-	+	++
抗バ剤有無	+	+	-	+

結果

1.表2に示されているように、総 biopterin、還元型 biopterin 共に、10名の疾患対照群の平均値と比較して40~48%にまで低下していた。また、HVA, 5-HIAA も1/3に低下していた。しかし、これら疾患対照群の年齢は、MSA 群より有意に若かった為 年齢による影響を除外する為 年齢を match させて4名の疾患対照群と比較した結果を表3に示す。

表2.MSA 4例と疾患対照群10例の 髄液 biopterin 比較。

	MSA(n=4)	OND(n=10)	p
年齢	65.5±3.42	51.8±15.0	<.05
総 biopterin	2.23±0.67	4.60±1.22	<.005
還元型 biop.	0.98±0.25	2.43±0.62	<.001
HVA	14.2±7.27	41.1±11.8	<.005
HIAA	5.23±3.57	19.2±11.6	<.05

(ng/ml)

2.年齢を match させた4名の疾患対照群との比較でも同様の結果であった(表3.)。総 biopterin、還元型 biopterin 共に疾患対照群の平均値の38~44%にまで低下していた。HVA,5-HIAA も

40%台にまで低下していた。

表 3.MSA 4 例と年齢対応疾患対照群
4 例の髄液 biopterin 比較.

	MSA(n=4)	OND(n=4)	p
年齢	65.5±3.42	62.5±11.6	NS
総 biopterin	2.23±0.67	5.05±1.64	<.02
還元型 biop	0.98±0.25	2.58±0.62	<.005
HVA	14.2±7.27	33.5±3.42	<.005
5-HIAA	5.23±3.57	12.7±2.61	<.02

(ng/ml)

考察

我々は 1995 年 Machado-Joseph 病 7 名の脳脊髄液の biopterin, amine metabolites を測定し、総 biopterin が疾患対照群(n=8)に比較して平均値で約 45%、HVA の平均値が 46%に低下しているが、HIAA には有意の差がないことを報告している。今回の研究では、MSA においても MJD と同程度にまで総 biopterin、還元型 biopterin が低下していることが判明した。従って、MSA でもテトラヒドロピオプテリン治療が奏功する可能性を示唆したものと思われる。

今後このような MJD 以外の脊髄小脳変性症でのテトラヒドロピオプテリン治療の試行が望まれる。

文献

1. 酒井徹雄、松石豊次郎、山田茂人、他:Machado-Joseph 病に対するテトラヒドロピオプテリン治療. I.その理論的根拠と二重盲検交叉試験、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 8 年度研究報告書、1996, pp55-57.
2. 酒井徹雄、安徳恭演、小池文彦、他:Machado-Joseph 病に対するテトラヒドロピオプテリン治療. II.オープン試験.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 9 年度研究報告書、1997, pp51-53.

3. Quinn N.: Multiple system atrophy. In: Marsden CD, Fahn S (ed) Movement Disorders

3, Cambridge, Butterworth-Heinemann Ltd., 1994, pp262-281.

4. Fukushima T, Nixon J: Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. Anal. Biochem. 1980. 102:176-188.

5. Yokoo H, Kojima H, Yamada S, et al: Simultaneous determination of dopamine, serotonin, 3,4-dihydroxy-phenyl-acetic acid, homovanillic acid, 3-methoxytyramine and 5-hydroxyindole-3-acetic acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Kurume Med.J. 1990. 32:75-80.

6. Sakai T, Matsuishi T, Yamada S, et al: Sulfamethoxazole-trimethoprim double-blind, placebo-controlled, crossover trial in Machado-Joseph disease: sulfamethoxazole-trimethoprim increases cerebrospinal fluid level of biopterin. J.Neural Transm.(Gen.Sect.) 1995. 102:159-172.

南九州・沖縄地方における SCD の分子疫学

有村 公良 池田 賢一 中川 正法 中江めぐみ 納 光弘
平田 圭子¹⁾ 末原 雅人²⁾ 中原 啓一³⁾ 法化図陽一³⁾

目 的

個々の遺伝性 SCD の頻度には民族間のみならず、本邦においても SCA1 などでは地域間で相当の違いが有ることが報告されているが^{1), 2)}、本邦の各地域における遺伝性 SCD の頻度の比較についてはまだ十分に検討されてはいない。そこで本年度は南九州・沖縄地方における SCD の遺伝子学的特徴を明らかにし、多地方と比較検討を行った。また末梢神経障害を伴う SCD の遺伝子学的異常についても検討を行った。さらに最近遺伝的背景として変性疾患など遺伝性疾患の発症との関わりが示唆されているミトコンドリアの NADH 脱水素酵素のサブユニット 2 遺伝子の 5179C/A 多型 (Mt5178 多型) について、鹿児島県における SCD 患者で検討した。

対象と方法

1992 年 11 月より 1998 年 11 月までの間に臨床的に SCD が疑われ、当科に SCD 遺伝子検索の依頼のあった 92 家系 104 例 (男性 51 例, 女性 53 例) を対象とした。方法としては、末梢血より抽出した genomic DNA を用い、SCA1, SCA2, SCA3/MJD, DRPLA, SCA6, SCA7, Friedreich 病 (FD) について PCR 法を用いて検索を行った。Mt5178 多型は年齢をマッチさせた鹿児島県健康住民 162 名と SCD 患者 17 例の末梢血より Alu1 を用いた PCR-RFLP 法にて検討した。

結 果

1. 既知の遺伝子異常の頻度

当課に依頼のあった臨床的 SCD が疑われる 104 例中、既知の遺伝子異常が見つかったものは 14.6% であり、特に南九州・沖縄地方では 8.0% と低頻度であった。(表 1) 家族歴が明らかな症例は 15 家系 18 例であったが、そのうち 3 家系 (5 例) のみで既知の遺伝子異常が認められた。各遺伝子異常の中で頻度に地域差があることが報告されている SCD1 のほか SCD2 の症例も見られなかつ

た。また病理学的および電気生理学的に末梢神経障害を認める SCD 症例においては、既知の遺伝子異常は認められなかった。

表 1. 既知の遺伝子異常の頻度

	全症例 104(92)	鹿児島・宮崎 62(51)	沖縄 26(20)	その他 16(14)
SCA1	0	0	0	0
SCA2	0	0	0	0
SCA3/MJD	5(5.4%)	2	0	3
DRPLA	3(3.3%)	1	1	1
SCA6	6(6.5%)	3	0	3
SCA7	0	0	0	0
Friedreich病	0	0	0	0
total	14.6% (15.2%)	9.7% (11.8%)	0.3% (5%)	43.8% (50%)

2. SCD における Mt5178 多型

Mt5178 多型の鹿児島県健康住民における頻度は Mt5178A が 92/162 (56.7%) と優位であり、一方鹿児島県の SCD 症例では Mt5178C が 16/17 (94.1%) と有意に頻度が高かった ($p < 0.0005$)。

3. 臨床症状、画像所見が明らかな家族性 SCD の 11 家系でその臨床的特徴を検討した。9/11 家系が常染色体優性遺伝形式をとり、家系 2 では家系内に明らかな anticipation を示し、slow eye movement を特徴とする以外、他の家系では特徴的な臨床症状は認められなかった。

(表 2)

考 察

個々の遺伝性 SCD の頻度には地域差があることが知られている²⁾。今回の南九州・沖縄地方における SCD の既知の遺伝子異常の頻度は、これまで報告された他の地域に比較して低頻度であった。この点については、今回の検討が遺伝子の検索依頼のあった症例を対象にしていることなど、検索対象の違いなどがあり、今後の臨床所見を含めた詳細な検討が必要である。しかし、今回の検討で SCA1, SCA2 の症例が見られなかったことは、これらの疾患で報告されている地域差を反映しているもの

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

と考えられる。この地域差の要因の1つとして、その地域住民の遺伝子学的背景の違いが考えられる。今回我々は変性疾患などの遺伝性疾患でその発症との関連が問題となっている Mt5178 多型について検討した。この Mt5178 多型のうち Mt5178A はアジア人に見られ、コーカシア人に少ないこと 3)、また長寿と関連している事などが報告されている 4)、この Mt5178A は本州在住の住民では 45%に見られることが報告されているが 4)、鹿児島県ではその比率が逆転しており、本州と鹿児島県では住民の遺伝的背景が異なる可能性を示唆している。SCD 症例では Mt5178C の頻度が有意に高かったことは、南九州・沖縄地方で SCD の頻度が低いことが、この地域における住民の遺伝的背景の相違による可能性を示唆される。今後、本邦における広範囲な SCD の分子遺伝疫学的検討とその遺伝的背景の検討が必要と考えられる。最後に既知の遺伝子異常を認めない家族性 SCD の臨床症状について検討したがとくに特徴的なものはないものの、ほとんどが常染色体優性遺伝であり、また明らかな anticipation が認められる家系もあり、未知の遺伝子異常に基づく症例が存在する可能性が示唆された。

まとめ

- 1)南九州・沖縄地方における SCD の症例では、既知の遺伝子異常の頻度は本邦の他の地域と比較して低頻度であった。
- 2)南九州・沖縄地方では SCA1, SCA2 の症例は見いだせなかった。
- 3)SCD 症例の遺伝的背景として、Mt5178 多型との関連が強く示唆され、また SCD の地域差と Mt5178 多型との関連も示唆された。
- 4)南九州・沖縄地方の家族性 SCD には、未知の遺伝子異常に基づく遺伝性 SCD が存在する可能性が考えられた。

文献

- 1)辻 省次. 遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝子と臨床像. 総論. 神経内科 1998; 49: 201-210.
- 2)阿部康二. 遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝子と臨床像. Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). 神経内科 1998; 49: 211-215.
- 3)Cann RL, et al. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature 1987; 325: 31-36.
- 4)Tanaka M, et al. Mitochondrial genotype associated with longevity. Lancet 1998; 351: 185-186.

表 2. 既知の遺伝子異常を認めない家族性 SCD の臨床的症状

家系	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
性別	F	F	M	M	M	M	M	M	F	F	M
遺伝形式	AD	AD	AD	AR	AD	AD	?	AD	AD	AD	AD
発症年齢	41	25	22	10	63	12	23	58	38	40	23
四肢失調	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
体幹失調	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±
眼球運動障害	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
眼振	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
構音障害	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
下肢の痙性	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
不随意運動	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
反射亢進	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
反射低下	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Babinski	+	+	-	-	-	+	-	-	-	±	+
感覚障害	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
排尿障害	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
画像 小脳萎縮	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
脳幹萎縮	+	+	+	-	±	-	-	±	-	-	-

遺伝性てんかんラット(Ihara epileptic rat:IER)海馬に認められる微少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

天野 殖¹、辻 篤司²、横山正男^{1, 3}、鳥居隆三⁴、芹川忠夫⁵

目的

遺伝性てんかんラット (IER) は前庭刺激や光刺激などの外的刺激を全く加えることなく、自然に辺縁系てんかん発作を発症するミュータントでありヒト側頭葉てんかんの良いモデル動物と考えられている¹。このてんかんミュータントでは海馬体に神経細胞の微少な異常配列が認められ、これらの形態異常は遺伝的に決定された神経細胞の増殖・移動・分化の異常に基づく病変 (microdys-genesis:MDG) と考えられている^{1, 2}。MDG は錐体細胞の配列の乱れや途絶、更にはは CA1 の錐体細胞領域下の St.radiatum と St.lacunosum moleculare の境界部分に存在する神経細胞の異常集簇 (neuronal cluster) などである。我々はこの MDG が IER のてんかん原性としての重要な役割を演じているのではないかと注目してきた。

本研究は連鎖解析法によりてんかん発作並びに MDG に関連する異常遺伝子の染色体マッピングを行い、併せててんかん発作と MDG との相関を明らかにしようとするものである。

動物ならびに方法

IER の発作活動を生後 2 カ月から 12 カ月まで、2 カ月毎に連続 3 日間、自動てんかんモニター装置で観察した³。生後 2 カ月頃から、mouth and facial movement, wet dog shakes, head lobbing, jumping、あるいは wild running などの異常行動 (abnormal behavior) が認められるようになった。3 カ月頃から非常に小さい回転半径で回転を繰り返す回転動発作 (circling seizure) を併せて生じるようになり、4 カ月頃には circling seizure が主体となった。5 カ月頃より forelimb clonus, rearing, falling と共に、全身性間代性・強直性けいれん発作 (generalized tonic-clonic convulsion:

GTC) が出現するようになり、6 カ月頃には GTC が主体となった。このように IER のてんかん発作は abnormal behavior, circling seizure, GTC の 3 段階に加齢と共に進展していくことが明かとなった。

連鎖解析のための交配ラットは、IER との間で遺伝的多型性に富むウィスターラット (WKY/Izm) を選択した。もどし交配を行い backcross 動物を 134 個体得た。その内 123 個体について、生後 2 カ月から 12 カ月まで 2 カ月毎に連続 3 日間自動てんかんモニター装置³で観察し、発作の有無およびタイプを明らかにし、てんかん発作の表現型を決定した。脳の採取が可能であった 106 個体の海馬領域の連続凍結切片 (30 μ) を作成し、ニッスル染色を行い MDG の中の一つの病変である NC の有無並びのその程度を検索し表現型を決定した。遺伝子型のタイピングは SSLP マーカーを使用して行った。backcross 動物の耳より genomic DNA を抽出し、PCR で増幅、PCR 産物を電気泳動し、ethidium bromide で染色、遺伝子型を明らかにした。上記方法でタイピングが不明瞭なマーカーは、蛍光プライマーを作成して、同条件下で反応させシークエンサーを用いて解析した。表現型(てんかん発作並びに海馬 NC 病変)と遺伝子型間の連鎖解析を行い染色体マッピングを行った。

結果

てんかんの初発症状としての発作型である abnormal behavior は、backcross 動物において 123 個体中 63 個体に認められた (表 1)。海馬体の NC 病変は 106 個体中 32 個体に認められ、それ等の局在あるいは病変の程度に差は認められなかった (表 2)。てんかん発作を表現型として連鎖解析した結果、15 番染色体と弱い連鎖 ($p < 0.01$) を認めたが、マッピングには至らなかった (表 3)。海馬体の NC 病変を表現型として連鎖解析を行った結果、8 染色体と強い連鎖 ($p < 0.001$) を認め、D8Rat68 と Thy1 の間にマッピングされ (表 4、図 1)、てんかん発作と NC 病変の相関についてカイ二乗検定の結果、発作発現と NC 病変の間には正の相関は認められなかった (表 5)。

1) 滋賀医科大学第 2 病理、2) 同脳神経外科、3) シミズ病院脳外科、4) 滋賀医科大学動物実験施設、5) 京都大学大学院医動物実験施設

	number of offspring	
	seizure(+)	seizure(-)
IER	60	0
F1 IER(♂) × WKY(♀)	0	10
backcross IER(♂) × F1(♀)	63	60

表1 てんかん発作(abnormal behavior 以上)の発現頻度

	number of offspring	
	NC(+)	NC(-)
IER	60	0
F1 IER(♂) × WKY(♀)	0	10
backcross IER(♂) × F1(♀)	32	79

NC:neuronal cluster

表2. Neuronal cluster(NC) 病変の発現頻度

考察

ヒトの難治性てんかんに対する切除手術によって得られた外科標本から、MDG を含む脳の形成異常が報告され、これらの形成異常がてんかん原性と深くかかわっていると推察されている⁴⁻⁶。一方動物実験により、胎生期の特定の時期に methyazoxymethanol acetate を投与することにより⁷、あるいは放射線の外照射を行うことで⁸、海馬体に IER と類似の neuronal migration disorder を生じるラットモデルが報告されている。これらの実験モデルでは、てんかん誘発に対しより過敏であったり、海馬 CA1 神経細胞の異常興奮が観察されている^{7,8}。この様に、ヒトてんかん患者の組織所見並びに実験てんかん動物による報告により、海馬の neuronal migration disorder がてんかん原性と密接に関連した構造異常であることが推測され、IER 海馬に見られる MDG も、てんかん原性に深く関与していることが推察されてきた^{1,2}。

しかし今回の実験結果より、海馬体の NC 関連遺伝子は 8 番染色体にマッピングされ、一方てんかん発作関連遺伝子は 15 番染色体との関係が示された。さらにてんかん発作と NC 病変の相関ついてカイ二乗検定の結果、両者の相関関係を肯定することはできなかった。従って IER における MDG の一型である NC 病変はてんかん原性とは直接的に関与していないこと結論された。微小神経形成異常(MDG)は、中枢神経系の発生段階

Chr	Locus name	Distance (cM)	epilepsy(+)		epilepsy(-)		χ^2	P value
			Ho	He	Ho	He		
15	D15Kyo1		38	25	27	33	2.894	0.0884
	D15Mgh7	40.65	39	24	26	34	4.253	0.0392
	D15Rat3	39.02	39	24	24	36	5.902	0.0151
	D15Rat52	34.15	44	19	23	37	12.302	0.0005
	D15Rat72	34.15	44	19	23	37	12.302	0.0005
	D15Mgh2	33.33	45	18	23	37	13.616	0.0002
	D15Mgh3	34.15	44	19	23	37	12.302	0.0005
	D15Rat20	34.15	44	19	23	37	12.302	0.0005
	D15Rat23		41	23	32	28	1.757	0.1849
	D15Rat40		39	24	31	29	1.314	0.2514
	EdnrB		40	23	33	27	0.919	0.3378
	D15Mgh6		36	26	27	33	2.084	0.1849

Ho: homozygote He: heterozygote

表3. てんかん発作と15番染色体マーカーとの連鎖解析

Chr	Locus name	Distance (cM)	NC(+)		NC(-)		χ^2	P value
			Ho	He	Ho	He		
8	D8Rat55	27.36	24	8	23	36	19.642	<0.0001
	D8Rat68	18.87	26	6	16	63	36.026	<0.0001
	Thy1	5.71	32	0	6	72	85.506	<0.0001
	Apoc3	5.66	32	0	7	72	83.007	<0.0001
	D8Rat80	6.73	31	0	8	70	77.755	<0.0001
	D8Rat43	7.55	32	0	9	70	76.764	<0.0001
	D8Mit2	9.52	31	1	10	68	68.569	<0.0001
	Cyp11a1	10.89	30	1	11	64	63.572	<0.0001
	D8N136	26.92	27	5	24	53	23.704	<0.0001
	D8Mit1	29.52	26	5	28	51	20.893	<0.0001

NC:neuronal cluster Ho: homozygote He: heterozygote

表4. NC 病変と8番染色体マーカーとの連鎖解析

	NC(+)	NC(-)
seizure(+)	15	39
seizure(-)	17	40

NC:neuronal cluster $\chi^2 = 0.057$

表5. てんかん発作とNC病変の相関

における神経細胞の増殖/消滅/移動を調節している遺伝子異常に基づく可能性が予測されている⁹。IER において NC 病変はてんかん発作発症と直接的に関連しているという証拠は得られなかった。他の MDG 病変については現在マッピングを進めておりてんかん原性との関連を検索中である。IER はてんかんモデルとして重要であると共に、中枢神経発生期における神経形成異常のモデル動物になるとも考えられる。

まとめ

IER のてんかん関連遺伝子並びに海馬体に見られる微小形成異常関連遺伝子座の染色体マッピングを連鎖解析法で行った。てんかん関連遺伝子は15番染色体上のマーカーに有意な連鎖が認められたが、特定のマーカー間

にマッピングは出来なかった。微小形成異常の中で異常神経集簇病変に関与する遺伝子は8番染色体上に強い連鎖が見られ、D8rat68とTyh1の間にマッピングされた。

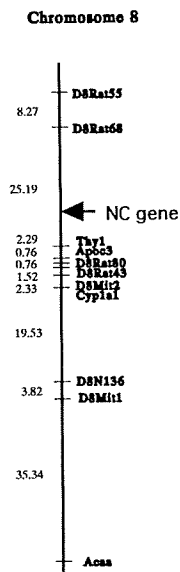


図1. NC遺伝子を含む8番染色体の遺伝子地図

文献

- 1) Amano S, Ihara N, Uemura S, Yokoyama M, Ikeda M, Serikawa T, Sasahara M, Kataoka H, Hayase Y, Hazama F: Development of a novel rat mutant with spontaneous limbic-like seizures. *Am. J. Pathol.* 149: 329-336, 1996
- 2) Amano S, Ihara N, Uemura S, Ikeda M, Yokoyama M, Sasahara M, Kataoka H, Hazama F: Hippocampal lesions on a newly developed epileptic rat mutant with spontaneous limbic-like seizures. *The hippocampus: Function and Clinical Relevance.* in Kato N(ed): 161-164, Amsterdam, Elsevier, 1996
- 3) Amano S, Yokoyama M, Torii R, Fukuoka J, Tanaka K, Ihara N, Hazama F: High performance seizure-monitoring system using a vibration sensor and videotape recording: behavioral analysis of genetically epileptic rats. *Laboratory Animal Science* 47: 317-320, 1997
- 4) Andermann F, Guerrini R: The cortical dysplasias and epilepsy: an overview. *Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy,* in Guerrini R(ed): 441-450, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
- 5) Hardiman O, Burke T, Phillips J, Murphy S, O'Moore B, Staunton H, Farrell MA: Microdysgenesis in resected temporal neocortex: incidence and clinical significance in focal epilepsy. *Neurol.* 38: 1041-1047, 1988
- 6) Vital A, Marchal C, Loiseau H, Rougier A, Pedespan JM, Rivel J, Vital C: Glial and neuronogial malformative lesions

associated with medically intractable epilepsy. *Acta Neuropathol* 87: 196-201, 1994

7) Baraban SC, Schwartzkroin PA: Electrophysiology of CA1 pyramidal neurons on an animal model of neuronal migration disorders: prenatal methyl-azoxymethanol treatment. *Epilepsy Research* 22: 145-156, 1995

8) Roper SN, Gilmore RL, Houser CR: Experimentally induced disorders of neuronal migration produce an increased propensity for electrographic seizures in rats. *Epilepsy Research* 21: 205-219, 1995

9) Rorke LB: A perspective: the role of disorderd genetic control of neurogenesis in the pathogenesis of migration disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 105-117, 1994

ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析

垣塚 彰

目的

我々は、これまでに神経難病Machado-Joseph病の原因遺伝子を同定し、この疾患が、球脊髄性筋萎縮症やハンチントン舞踏病と同じく、原因遺伝子内のCAGの繰り返し配列の異常な伸長によって引き起こされることを明らかにした(1)。これらの原因遺伝子は、それぞれがコードする蛋白質は全く異なっていたが、原因遺伝子内のCAGの繰り返し配列が共通にポリグルタミンリピートに翻訳される(2)。我々はこのことに着目し、伸長したポリグルタミンリピートを培養細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥ることを見だし、また、マウスの小脳の神経細胞に発現させると小脳の神経細胞が変性・萎縮し小脳失調を示すことを明らかにしてきた(3)。本研究では、ポリグルタミンを発現させる神経培養細胞系を作成し、ポリグルタミンが引き起こす神経変性の分子機構を解析することを目的とする。

研究方法

テトラサイクリン等の薬剤で遺伝子発現をコントロール出来るシステムを利用し(4)、同調してポリグルタミンを発現させる神経細胞株の樹立を試みる。そして、ポリグルタミンの発現によって引き起こされる神経細胞の形態・細胞死の生化学的解析を行う。

結果

I. ポリグルタミンを同調的に発現させるPC12神経細胞の樹立

ラット副腎褐色細胞腫由来の神経細胞株PC12に、14(Q14)及び79(Q79)リピートからなるポリグルタミンをコードするCAGリピートをテトラサイクリンを培地から除くことで発現誘導が可能なプロモーター支配下にトランスフェクションし、その遺伝子が染色体に組み込まれた細胞株を樹立した。Q14とQ79には発現蛋白を検出するために共通のflagエピトープを付けた(5)。

テトラサイクリン存在下において、これらの細胞(PC12-Q14、PC12-Q79)は親株と同じく、NGF(Nerve Growth Factor)非添加では指数増殖を、NGF添加後は増殖の停止と神経様細胞への分化を示した(図1)。

テトラサイクリンを培地から除くのと同時にNGF添加すると、PC12-Q14細胞は親株のPC12と同様に増殖の停止と分化を示した。一方、PC12-Q79細胞は神経様の分化を遂げながら徐々に死んでいき、Q79を誘導後96から120時間にかけて、ほとんど全ての細胞が死に絶えた(5)(図1)。

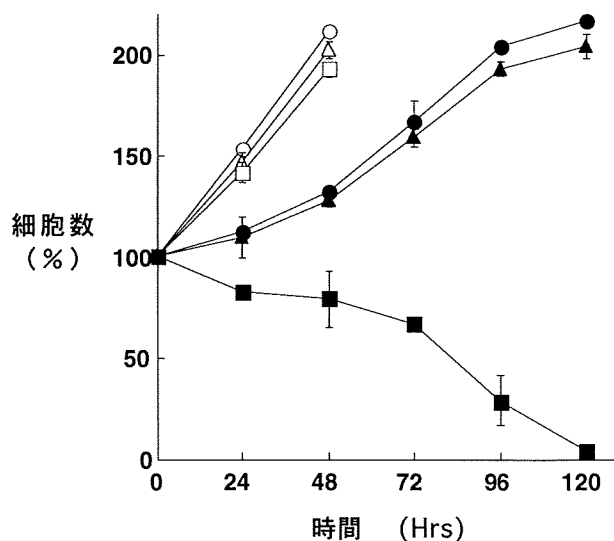


図1 ポリグルタミンを発現させたPC12細胞の増殖曲線
○PC12, tet(+), NGF(-)、●PC12, tet(-), NGF(+),
△PC12-Q14, tet(+), NGF(-)、▲PC12-Q14 tet(-), NGF(+),
□PC12-Q79, tet(+), NGF(-)、■PC12-Q79, tet(-), NGF(+)

II. 細胞内のポリグルタミンの凝集と神経細胞死

続いて、発現誘導されたポリグルタミンをflagエピトープに対する抗体で染色し、細胞内局在について解析を行った。Q79は、発現誘導から24時後にはほぼ細胞質内に均一的に分布し、48時間後には細胞質に、96時間後には細胞質と核内に大きな凝集体として観察された(5)。このような凝集体は、PC-12-Q14細胞では観察されなかった。上述したように4日から5日後にかけて、ほと

んどすべての細胞が死滅したが、その時点で細胞をつぶさに観察すると、時折、ポリグルタミンに抵抗性を示す細胞のコロニーが見いだされた。驚いたことに、その細胞では、ポリグルタミンの凝集体は細胞質のみに存在しており、核内での凝集が見受けられなかった(5)。さらに核外移行シグナルをつないでポリグルタミンを核外に発現させたPC12細胞は細胞死を引き起こさなかった(5)。以上の結果は、核内で凝集したポリグルタミンにより何らかの細胞死シグナルが活性化され神経細胞死が誘導されることを示しており、ハンチントン舞踏病やMachado-Joseph病などのポリグルタミン病発症において、ポリグルタミンの核内凝集体が極めて重要な役割を果たしていると考えられた。

III. CPP32カスパースの解析

ここで樹立した細胞では、ポリグルタミンの発現及び細胞死が同調的に引き起こされるため、生化学的な解析に適している。まず、いわゆるアポトーシスに極めて重要と考えられているカスパース、とくにCPP32(caspase 3)(6)が、この細胞死の過程でどのように活性化されるかを検討した。コントロールとしてこの細胞をCaイオノフォアA23187で処理すると、処理後18時間後に於いて顕著なCPP32の活性を検出することが出来た(図2)。予期に反して、PC12-Q79細胞においてはCPP32の活性はA23187で処理した時と比べてわずかに上昇するだけであった(5)(図2)。

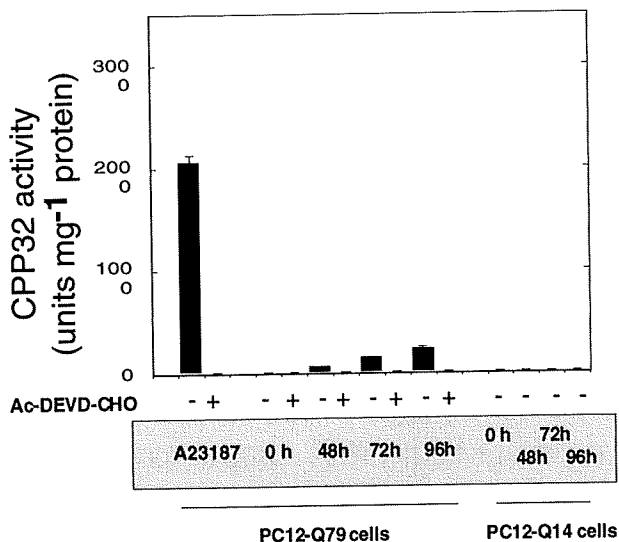


図2 ポリグルタミンの発現によって引き起こされるCPP32活性のわずかな上昇。

さらに、細胞をCPP32の阻害剤DEVD等で処理しても細胞死は抑制されなかった。この場合、核の凝集は抑制されたが細胞質の分断化は阻害されず、結果として細胞は死滅した(5)。従って、CPP32は、核の凝集やDNAのフラグメンテーションというようなアポトーシスの表現型を示すには重要であるが、細胞死のコミットメントには別の分子が関与していると考えられた。

IV. SEK1-JNK キナーゼの解析

この細胞を用い他のアポトーシス関連物質の活性化をいろいろ解析したところ、SEK1-JNKのキナーゼカスケイドが活性化されていることが見いだされた(5)。SEK1、JNKはそれぞれMAPKK、MAPKに属するキナーゼで、種々のストレスに応答して上流のキナーゼによってリン酸化を受けて活性化される(7)。これらの活性化型キナーゼは、リン酸化されたキナーゼを特異的に認識する抗体を用いてWestern blot及び免疫染色で同定することが出来る。Q79の発現によってJNK、SEK1ともその蛋白量にはそれほど変化を認めなかったが、Q79誘導24時間後からSEK1のリン酸化が、48時間後からJNKのリン酸化が検出された。この結果から、この系においてもSEK1-JNKのキナーゼカスケイドが順次活性化されていると考えられた(5)。もちろん、このようなSEK1-JNKの活性化はPC12-Q14細胞では認められなかった(5)。

V. 核内ポリグルタミンの凝集部位でのSEK1の活性化

続いて、免疫組織染色法をもちいてSEK1がどこで活性化を受けているかを検討した。先に述べたように、PC12-Q79細胞では、Q79発現24時間後では、ほとんどの細胞でQ79は、細胞質にとどまっている。解析の結果、そのような細胞では、活性化されたSEK1は検出されなかった。ところが、頻度は低いがいくつかの細胞でQ79が核内に凝集体を作りはじめている細胞が観察され、そのような細胞の核内で、活性化されたSEK1が検出された(5)。さらに、Q79発現72時間後では、ほとんど全ての細胞が細胞質と核内に大きなポリグルタミンの凝集体を有していたが、SEK1は核内のポリグルタミンの凝集体と一致した場所でのみ活性化を受けていることが見いだされた(5)。共焦点顕微鏡での解析では、観察した全ての細胞断面で核内のポリグルタミンの凝集部位に一致して活性化型SEK1が同定された。また、同じ場所でJNKの標的蛋白質の一つであるc-Junが活性化を受けていることが見いだされた(5)。

VI. ドミナント・ネガティブSEK1での細胞死の阻害

以上の結果は、核内でのポリグルタミンの凝集が、SEK1を活性化して細胞死シグナルを作り出しているという考えを導き出させる。したがって、続いての実験として、実際にSEK1の活性化が細胞死に繋がっているかどうかを解析した。

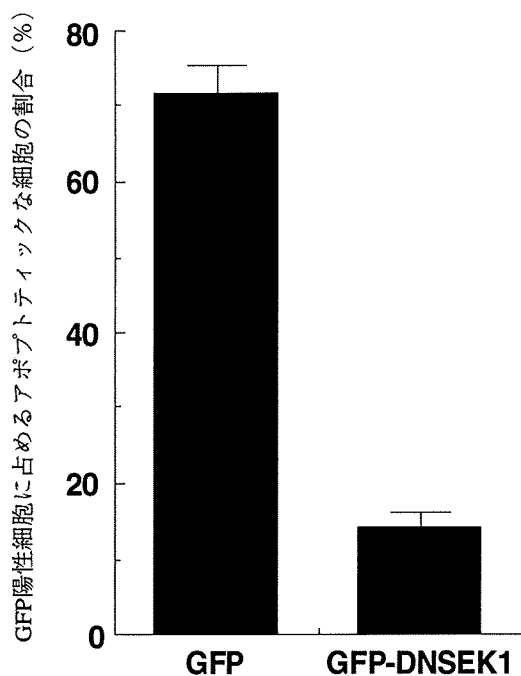


図3 ドミナントネガティブSEK1による細胞死の阻害

この実験では、SEK1の機能をブロックする変異体(ドミナントネガティブ変異体)(8)を発現させ、その結果細胞死が抑制されるかどうかの検討をおこなった。ドミナントネガティブSEK1 (DN-SEK1)を発現した細胞が判別出来るように、DN-SEK1はGFP(green fluorescent protein)のC-末端部位に融合した形(GFP-DN-SEK1)でPC12-Q79細胞に発現させた。

コントロールのGFPの発現ベクターのトランスフェクションでは、Q79誘導96時間後でGFPポジティブな細胞のおおよそ70%の細胞がアポトーシスに特徴的な形態をしめした(5)(図3)。一方、GFP-DN-SEK1発現ベクターのトランスフェクションでは、GFPポジティブな細胞の80%以上の細胞が健康な形態をとっていた(5)(図3)。また、これらの健康にみえるGFP-DN-SEK1を発現した細胞ではc-Junの活性化は観察されず、実際にSEK1-JNKのカスケイドがブロックされていると考えら

れた。さらに、核外移行シグナルをつないで核外に発現させたDN-SEK1では、このようなQ79による細胞死の阻害効果が認められなかった(5)。以上の結果を総合して、我々は、核内で凝集したポリグルタミンがSEK1を活性化して、神経細胞の細胞死を引き起こすと結論した。

考察と今後の展望

本年度の研究では、培養神経細胞を用いたポリグルタミン病のモデル系の構築に成功し、ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死を分子レベルで解析する見通しがたってきた。今後、ポリグルタミンが引き起こす細胞死の分子機構をより詳細に解析し、SEK1が活性化される分子機構やそれがどのようにCPP32の活性化に繋がって行くかというような点を明らかにしていく。加えて、現在進行中のモデル動物(マウス・ドロソフィラ)を作り上げる計画を押し進め、多角的にポリグルタミンが引き起こす神経変性・細胞死の解析を進めていく。

文献

- (1) Kawaguchi Y et al *Nature Genetics*, 8: 221-228, 1994
- (2) Kakizuka A *Trends in Genetics*, 14: 396-402, 1998
- (3) Ikeda H et al *Nature Genetics*, 13: 196-202, 1996
- (4) Gossen M & Bujard H *Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551, 1992
- (5) Yasuda S et al (submitted)
- (6) Fernandes-Alnemri T et al *J. Biol. Chem.* 269: 30761-30764, 1994
- (7) Davis RJ *Trends Biochem. Sci.* 19: 470-473, 1994
- (8) Sanchez I et al *Nature* 372: 794-798, 1994

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

田邊 勉

目 的

恒常性の維持が生体機能の究極的目標であり、病態とは恒常性の破綻した状態と規定できる。これまでにイオンアンバランスの関与が示唆されていたものの、原因が明らかではなかった種々の病態が、関与するイオンチャネルそれ自身の遺伝子変異、あるいはその制御異常に起因するものである例が近年次々と報告され、予想以上にこれらの異常に基づく疾患の多いことが明らかにされつつある。分子生物学的技術の進歩により生体機能において重要な働きをしている種々のイオンチャネルの分子構造が次々と明らかにされ、これらをカエル卵母細胞、種々培養細胞等に発現させることにより、これらチャネルの構造機能連関の研究が著しく進歩し、たとえばイオン選択性を決定している領域、電位を感受する領域、種々チャネルの機能的特異性を決定している領域等を一次構造上に同定することも可能になった。一方、遺伝学的研究から、遺伝病の原因遺伝子としてチャネル蛋白がマップされ、チャネル機能が完全に遮断されている場合は往々にして致死になり、チャネルの機能あるいはその制御のされ方が変わったり、活性が亢進、減退したりする場合に病態として所見されている。しかしながらこれら患者において見出された遺伝子変異を正常遺伝子に人為的に導入し、種々細胞に発現させて解析しても生体において観察される異常を全て説明できない場合が多い。この問題点を解決するには、変異導入遺伝子をそれが本来発現している環境において発現させ構造機能連関の解析を行うことが必須である。

本研究は、種々Ca²⁺チャネルの遺伝子ノックアウトマウスを用い、チャネル変異に基づく病態を解明し、治療法を開発することを目標とするものである。この際特に、皮質、辺縁系で興奮性・抑制性神経伝達機能のアンバランスが生じていると考えられるてんかんと、多くの神経変性疾患の最終局面を担うCa²⁺依存性の神経細胞死に焦点をあてて検討する。

壊れた部品を取り替えるように異常になったチャネルを正常のものと置き換える遺伝子治療の技術は依然として現実的でない以上、チャネル機能の制御によりチャネル活性を調節することが病態改善において最も現実的

である。本研究は、すでに限界の見えてきた従来の発現実験の問題点を解消し、生体における真のチャネル機能の解明のみならず、チャネルの機能異常を主たる原因とする疾患の治療法の開発にも役立つ。

方 法

本研究は、(1) 種々Ca²⁺チャネルの遺伝子ノックアウトマウスを作成する、(2) ノックアウトマウスそれ自身の機能解析を行う、(3) ノックアウトマウスから調製した組織に種々の変異導入チャネルを一時的に発現させ構造機能連関の解析を行う、(4) 興味ある結果の得られた変異に関してはさらにこの変異導入チャネルの発現するトランスジェニックマウスを作成する、(5) トランスジェニックマウスの機能解析を行う、(6) ノックアウトマウス及びトランスジェニックマウスをモデル動物として、チャネル変異によって引き起こされる種々生理機能の変異と病態との関係を調べる、の諸項目からなる。特に、てんかん様病態を皮質、辺縁系での興奮性・抑制性神経伝達機能のバランスの面から、また脊髄小脳変性症をCa²⁺依存性の神経細胞死の面から検討する。

結 果 と 考 察

昨年度、 α_{1E} Ca²⁺チャネルの遺伝子ノックアウトマウスの作成を報告した。本年度は、残り2種類(α_{1B} および α_{1A})のCa²⁺チャネルに関してもノックアウトマウスの作成を進めた。一方、作成の終了した α_{1E} Ca²⁺チャネルの遺伝子ノックアウトマウスに関しては、数を増やすとともに本マウスの機能解析を行った。

(1) チャネル遺伝子ノックアウトマウスの作成。

a) α_{1B} Ca²⁺チャネル：ES細胞へのターゲットベクターの導入は電気穿孔法により行った。そしてプラスミド(胚盤胞)内注入法によりキメラマウスを作成した。

b) α_{1A} Ca²⁺チャネル：最近 α_{1A} Ca²⁺チャネル遺伝子が脊髄小脳失調症6型(spino cerebellar ataxia type 6: SCA6)、家族性片麻痺性偏頭痛(familial hemiplegic migraine)、反復発作性失調症2型(episodic ataxia type 2)の原因遺伝子として、さらには欠神発作(absence epilepsy)のモデル動物として知られている

tg マウスおよびそのアレルでより重篤な *tg^{la}* マウスの原因遺伝子として同定された。しかしながら、個々の疾患において検出される $\alpha_{1A}Ca^{2+}$ チャンネル遺伝子変異の詳細はそれぞれ異なる。単一イオンチャンネル遺伝子内部の種々の変異が上記の様に多彩な神経疾患とそれぞれ独立にリンクしているということは、チャンネル分子の発現制御と生理機能の多様性の分子的基盤を考える上において非常に興味深い。一方、当初作製したターゲットベクター (α_{1E} および $\alpha_{1B}Ca^{2+}$ チャンネルと類似のコンストラクトで native プロモーターの下流に lacZ 遺伝子を接続しているもの) で目的とするリコンビナント ES 細胞が得られなかった。そこで $\alpha_{1A}Ca^{2+}$ チャンネル上の種々の遺伝子変異と疾患症状との関係を系統立って解析することを目的として新しいターゲットベクターを構築した。今回のターゲットベクターは変異導入 Lox 配列を含み、種々の疾患 Ca^{2+} チャンネル遺伝子を Cre リコンビナーゼ活性を利用してシングルコピー導入できるようにしたものであり、native プロモーターの制御により変異 Ca^{2+} チャンネルの発現を誘導することができる。そしてこのターゲットベクターを ES 細胞へ導入し相同遺伝子組換えがおきた変異 ES 細胞クローンの単離に成功した。

(2) $\alpha_{1E}Ca^{2+}$ チャンネル遺伝子ノックアウトマウスの解析

a) 発現部位の検討: native プロモーターの下流に lacZ 遺伝子を接続しているため、 β ガラクトシダーゼ活性を指標にして細胞内局在性を検討している。その過程で、海馬、扁桃体、小脳皮質、脊髄後根神経節、脊髄後角に強い発現が見い出された。

b) 電気生理学的解析: 現在、海馬、小脳スライス、摘出脊髄標本を用いた電気生理学的解析を行っている途中であるが、これまでのところ海馬、小脳スライスの標本を用いた実験で、シナプス伝達効率の差異がノックアウトマウスと野性型マウスの間で見られている。

c) 行動学的解析: 現在、オープンフィールドテスト、回転棒テスト、驚愕反射、恐怖条件付け、高架十字迷路、種々の痛覚テストを行っているがこれまでのところオープンフィールドテスト、回転棒テスト、痛覚テストにおいてノックアウトマウスと野性型マウスの間で差異が見られている。

(3) 今後の計画。

a) $\alpha_{1B}Ca^{2+}$ チャンネルに関しては現在 F1 マウスを作成中であり、今後さらにノックアウトマウス作成へと進展させる。

b) $\alpha_{1A}Ca^{2+}$ チャンネルに関しては現在種々の疾患 $\alpha_{1A}Ca^{2+}$ チャンネル遺伝子の構築を行っており、今後これら疾患遺伝子を今回取得に成功した変異 ES 細胞クローンへの導入する。そして最終的には疾患遺伝子を

シングルコピー発現するトランスジェニックマウスを作成する。

c) $\alpha_{1E}Ca^{2+}$ チャンネル遺伝子ノックアウトマウスに関しては今後さらに電気生理学的、行動学的実験データを蓄積し、これらデータの融合をはかり本チャンネルの生理機能を明らかにする。

文 献

- 1) Neuhuber, B., Gerster, U., Döring, F., Glossmann, H., Tanabe, T. & Flucher, B. E. (1998). Association of calcium channel α_{1S} and β_{1A} subunits is required for the targeting of β_{1A} but not of α_{1S} into skeletal muscle triads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5015-5020.
- 2) Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B.A. & Beam, K.G. (1998). Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling *Journal of Biological Chemistry*, 273: 24983-24986.
- 3) 三枝弘尚、田邊勉 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの構造と機能 1998年 脳の科学 20: 489-495.
- 4) 栗原崇、田邊勉 電位依存性カルシウムチャンネルの分子的多様性: 構造-機能相関と組織特異的発現 1998年 循環器科 44: 1-12.
- 5) 栗原崇、田邊勉 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル 1998年 蛋白質核酸酵素 43: 1579-1588.
- 6) 村越隆之、栗原崇、三枝弘尚、田邊勉 イオンチャンネルの分子生物学 1998年 羊土社 実験医学バイオサイエンスシリーズ

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

氏名：阿部訓也

所属：熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設

[目的]

ヒト運動失調疾患と類似した表現型を示す変異マウスはその原因解明のために有効に利用されてきた。例えば jimpy、trembler という変異体ではミエリン形成に異常を持ち運動失調を呈するが、その解析から PLP、PMP-22 遺伝子の異常がこれらの疾患の原因となることが明らかとなった。quaking(qkv)変異マウスはミエリン形成に障害を持ち、その結果、振戦などの運動失調を示す。我々は前年度報告したように、新規 RNA 結合蛋白質をコードする候補遺伝子 qkI をノックアウトしたマウスを作製し、その解析から qkI が quaking 変異の原因であることを示した。そこで、本年度はこのノックアウトマウスを利用した qkI 遺伝子の機能解析を行い、ミエリン形成過程の制御、或いはそれが破綻した場合の病理に関する知見を得ることを目的とする。さらに qkI 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、変異マウスと交配実験を行い、qkI 導入により神経学的症状が回復するか否かを検討する。またヒトホモログの単離を行い、ヒト疾患との関連に関しても追究する。

[方法]

qkI 遺伝子全体を含む BAC ゲノムクローンを材料にそのイントロン-エクソン構造を詳細に解析し、その情報をもとに各アイソフォームそれぞれの発現解析を行う。qkI 遺伝子自身、およびミエリン形成に必須の構造蛋白質のメッセージ、蛋白質レベルの発現解析を、ノーザンブロット、RT-PCR、ウエスタンブロット、免疫組織染色などの手法を用いておこなう。昨年度報告した qkI ノックアウトマウス、およびオリジナルの変異マウスである qkv 変異体のミエリン形成過程でそれらの遺伝子の発現動態を調べる。qkI 遺伝子を含むゲノムクローンを導入したトランスジェニックマウスを作製し、この導入個体のミエリン形成の程度、神経学的症状の有無を検討する。ヒト EST デ

ータベースを利用し、ヒト qkI ホモログの有無を検索する。またこれらの情報を元に、ヒト qkI 遺伝子の単離、構造解析をおこなう。FISH および radiation hybrid panel DNA を用いてヒト qkI のマッピングをおこなう。

[結果及び考察]

【qkI 遺伝子構造・発現解析】qk 遺伝子座近傍のゲノム DNA の詳細な物理地図の作製を行った。その結果、qkI 遺伝子は約 70kb のゲノム領域を占めており、少なくとも 9 つのエクソンからなることが判明した。また alternative splicing により 7 種類の転写産物がつくられること、理論的には 6 種類のアイソフォームがコードされること、それぞれの場合のエクソンの利用の仕方も明らかにした。5 種類の蛋白産物は KH ドメインと呼ばれる RNA 結合ドメインを共有し、C 末のみが異なったアミノ酸配列を持っていた。またそのうち 3 種の特異的な C 末配列を含むペプチドに対する抗体を利用し、この情報をもとにそれぞれのアイソフォームの発現量をミエリン形成過程、成獣組織にて測定した。その結果、各アイソフォームは脳、心臓に多く発現していた。脳の発生過程においては、ミエリン形成が盛んになる生後 2 週から発現が上昇するクラスと、生後、発現が減少傾向にあるクラスに分けられることを見いだした。hypomorph と考えられる qkv マウスでは、すべての転写産物、蛋白の発現量が野生型の約 30% に低下しており、欠失によるメッセージの発現量の低下はすべてのアイソフォームに関して起こっていた。これは各アイソフォームは一つの転写開始点を共有するためと考えられた。マウス遺伝子をプローブにヒト qkI を含む PAC クローンを単離した。現在、この構造解析を行っており、これまで調べたかぎり、マウス-ヒト間でその構造、配列は非常によく保存されていた。このヒト qkI(Hqk)は第 6 染色体、6q25 近傍にマップされることを Radiation

Hybrid パネルを用いて確かめた。この領域にミエリン形成に関係する疾患は未だマップされていない。神経学的症状を示す疾患としては EPILEPSY PROGRESSIVE MYOCLONIC 2 や Parkinson disease, juvenile, type 2 があるがいずれも最近原因遺伝子が同定され、Hqk と異なることが判明した。Hqk の発現をノーザン解析で調べたところ、多くの組織に発現しているが特に脳、心臓、精巣、子宮などで強く発現していた。また血球でも強く発現しているため、血液試料を利用し、疾患における Hqk の発現の変動、突然変異の有無の検索等が可能になると考えられた。

【qkI 遺伝子機能解析】 前年度、ジーンターゲットングの手法を用いて qkI ノックアウトマウスの作製し、qkv 変異マウスとの遺伝的相補性試験を行い qkI 遺伝子が quaking 変異の原因遺伝子であることを証明した。さらにこの 2 重ヘテロ接合体 (qkIKO/qkv) は元々の qkv ホモ接合体に比べ強度の障害を示すことを明らかにし、遺伝子発現量依存的に神経学的症状が現れると考えられた。そこで、この点を検証するために qkI 遺伝子全体を含む BAC クローンを導入したマウスを作製し、変異マウスと交配し、表現型の回復が起こるか否かを検討した。その結果、実際に顕著であった振戦や成長障害は回復し、生殖、出産も可能になった。BAC トランスジーンの導入により、調べるかぎりすべての qkI 転写産物の発現レベルが増加していることも確認された。このことから qk 変異マウスにみられる表現型は qkI 発現量の低下に原因するものであり、これを補えば正常な形質を持ちうるということが明らかになった。

しかし、これらの BAC 導入により振戦が回復した複数のマウス個体を観察したところ、振戦、成長障害は回復するものの、痙攣やてんかん様発作を示すことを見いだした。

このことは振戦と痙攣を引き起こす原因、あるいはその機序は異なることを示唆するとも考えられる。現在、このようなマウス個体数を増加させ、より詳細かつ定量的な検討を加

えようと計画している。

【qk 変異体におけるミエリン形成過程の解析】

qk 変異マウスは qkv ホモ接合体、qkIKO/qkv ともに振戦、痙攣を呈し、その原因はミエリンの低形成によるものと考えられている。そこで、qkI 遺伝子変異によりミエリン形成のどの段階が最も影響を受けているか調べるため、MAG (myelin associated glycoprotein), PLP (proteolipid protein), MBP (myelin basic protein) 等のミエリン蛋白の発現解析を行った。その結果、MAG はメッセージ、蛋白レベル双方の正常レベルの発現が qk マウスでも認められた。PLP, MBP に関してはメッセージの発現量は +/+ の 20 - 40% 程度であったが、蛋白レベルでは激減しており、正常の数%でしかなかった。

減少の程度は qkIKO/qkv においてより顕著であった。また、MAG, PLP, MBP の各アイソフォームの発現を正常マウス、変異マウスと比較したところ、正常ではミエリン形成が進行するに従って L-MAG から S-MAG への移行が見られたが、qk 変異体では初めから S-MAG が発現し、L-MAG の発現は全く認められなかった。PLP は DM-20 というアイソフォームを持ち、分化初期段階では DM-20 が発現し、ミエリン形成の進行につれて PLP がドミナントとなる。ところが、qk 変異マウスでは DM-20 型しか存在せず、PLP の発現は認められなかった。このようなアイソフォーム発現の変化は qkI が RNA 結合蛋白であることを考えると qkI がこれらミエリン形成に必須の遺伝子のスプライシングを制御している可能性を示唆するものとして大変興味深い。

qkI 発現細胞(オリゴデンドロサイト、アストロサイト)の数自体は変異マウスと正常マウスで大きな違いはなく、ミエリン形成の開始にいたる分化過程に異常があるものと考えられた。実際、脳組織を見ると qkv ホモマウスではミエリン形成が不完全ながらも認められるが、qkIKO/qkv ではミエリン形成は皆無に近い。電顕像を見ると、オリゴデンドロサイトが周囲に突起を伸ばすが、正常に軸索に巻き付いていくことが出来ておらず、まさにミ

エリン形成の開始段階から障害されていることが明らかになった。したがって、*qkv* ホモマウスの表現型から推察されるよりさらに早期から *qkI* は重要な働きをしていることが判明した。

[まとめ]

qkI ノックアウトマウスを用いた解析により、*qkI* レベルの低下に伴って神経学的症状が悪化することを示した。この点は、同一遺伝子の変異であるにも関わらず、表現型が著しく異なるという点で、遺伝性疾患全般を考える上でも良いモデル系となると考えられる。さらに、このノックアウトマウスを用いて初めて *qkI* がミエリン形成過程の開始時から必須の働きを持つことが明らかになった。*QkI* はオリゴデンドロサイト自身の出現には関与しないが、その機能発現、すなわち軸索との相互作用から、ミエリン蛋白の発現、実際の髄鞘形成に至る経路において必須の分子であることが判明した。*qkI* を軸とした解析により、ミエリン形成過程の制御、或いはそれが破綻した場合の病理に関する重要な知見が得られると期待される。

実際、今回、*qkI* がミエリン構成蛋白遺伝子のスプライシング制御など post-transcriptional regulation に関与する示唆を得ており、この点を追究することが今後重要であると思われる

(平成 10 年度発表論文)

Vernet, C., Abe, K. and Artzt, K. Genetic mapping of 10 microsatellites in the *t* complex region of mouse chromosome 17 (1998) *Mammalian Genome* **9**, 472.

Kimura, S., Fujishita, S., Ikezawa, M., Ogawa, M., Abe, K. and Miike, T. (1998). Muscle type promoter and its first intron abnormalities in dystrophin gene in patients with Duchenne muscular dystrophy. *J. Child Neurol.* **13**, 290-292.

Abe, K., Ko, M. S. H. and MacGregor, G.R. (1998) A Systematic Molecular Genetic Approach to Study Mammalian Germ Line

Development. *Int. National J. Dev. Biol.* **42**, 1051-1065.

S. Kawakami, Kikuti, Y.Y., Ando, A., Inoko, H., Yamamura, K. and Abe, K. (1998) *Tctex3*, related to *Drosophila Polycomblike*, is expressed in male germ cells and mapped to the mouse *t*-complex. *Mammalian Genome* **9**, 874-880.

Kaname, T., Uehara, K., Abe, K., Muramatsu, T. and Yamamura, K. (1998) Testis b-1,4-galactosyltransferase gene maps to mouse chromosome 5. *Genomics* **53**, 117-118.

Matsuki, Y., Kaname, T., Suematsu, S., Yamaguchi, Y., Abe, K. and Yamamura, K. (1998). Mouse K-glypican gene, *Gpc4*, maps to chromosome X. *Genomics* **54**, 358-359.

Ando, A., Kikuti, Y.Y., Abe, K., Shigenari, A., Kawata, H., Ikemura, T., Kimura M., and Inoko, H. (1998). cDNA cloning, Northern hybridization and mapping analysis of a putative GDS (guanine nucleotide dissociation stimulator of G proteins)-related protein gene at the centromeric ends of the human and mouse MHC regions. *Immunogenetics in press*

Kondo, T., Furuta, T., Mitsunaga, K., Ebersole, T., Shichiri, M., Artzt, K., Yamamura, K. and K. Abe. Genomic organization and expression analysis of the mouse *qkI* locus. *Mamm. Genome in press.*

Abe, K. and Suzuki, M. Molecular and embryological characterization of a new transgene-induced allele of mouse *Brachyury* locus. *submitted*

Yamauchi, Y., Abe, K., Kuratani, S., Mantani, A., Hitoshi, Y. and Yamamura, K. A novel transgenic technique that allows specific marking of neural crest cell lineage in mice. *submitted*

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-

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

はじめに

多くのCAGリピート病では、興味深いことに、原因遺伝子内のCAGリピート数が変動し、親子間で不安定であるという共通の特徴がある。我々はこれまでCAGリピート病における原因遺伝子内のCAGリピートの不安定化機構について研究を進めてきた。一昨年は、我々がそれまでにMachado-Joseph病 (MJD) 家系の臨床遺伝学的観察により報告してきた興味ある現象¹⁾⁻³⁾をsingle spermレベルで証明して報告した⁴⁾。まず、増大したCAGリピートは、病気が父親由来であるときに特に不安定であること、次にMJD1遺伝子内の正常アレルのCGG/GGG多型が増大CAGリピートの不安定性に大きく影響すること、すなわち不安定性に関与するtransのfactorが存在するであろうということについてである。また、父親由来では子供の世代での発症者と健常者の比率が1対1からかたより、有意に発症者の比率が高いというmeiotic driveの現象もspermレベルで明らかにした。そして昨年は、CAGリピート病のなかでも最も著明な表現促進現象を示すDRPLAについてのsingle spermの解析を行い、DRPLAのsingle spermにおけるCAGリピート数の分散は、他のCAGリピート病に較べて際立って大きく、DRPLAの精子形成段階ではCAGリピートの不安定性が顕著であることを報告した⁵⁾。しかし、これまでのところ、この分子機構についての詳細は不明である。

そこで今年度は、DRPLAの精子および卵子形成のどの分化段階でリピート数が不安定となるのかをレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)法を用いて、DRPLAの剖検組織において検討した。

対象および方法

DRPLA剖検例のformalin固定後の精巣と卵巣をparaffin包埋し、厚さ10ミクロンの連続切片を作成した。次いで、脱paraffin処理後、HE染色を行った切片から、LCM100 (ARCTURUS)を用いたLCM法により、直径30 ミクロンの大きさに精子・卵子の形成過程にある種々の細胞群を切り取り、single sperm analysisで報告したように⁵⁾、nested PCR法によりCAGリピート部分を増幅した。PCR産物は、ABI PRISM 310 genetic analyzerにて電気泳動し、CAGリピート数を同定した。

結果

(1) 精巣での検討

レーザービームの直径30 ミクロンでは、その直径が大きすぎて、精細管の精子形成過程にある個々の細胞を切り取ることが不可能であった。そこで、内腔側と基底膜側の細胞群を切り取ってCAGリピート数を比較した。その結果、精細管の内腔側の細胞群のリピート数のほうが、基底膜側の細胞群のリピート数よりも長い傾向にあった(図1)。

(2) 卵巣での検討

卵子形成過程の細胞群については、ある程度大きな細胞は、核を単離することが可能で、CAGリピート数を同定することができた(図2)。

1 自治医科大学神経内科

2 新潟大学脳研究所神経病理学部門病理学分野

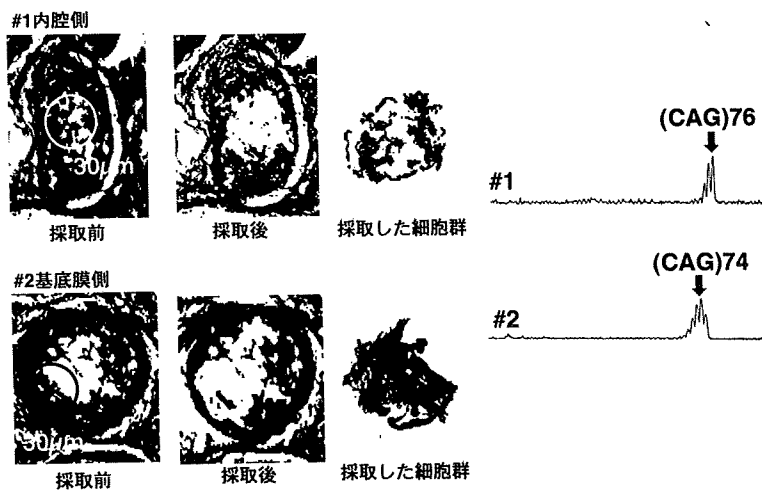


図1 精細管細胞群の採取とCAGリピート数

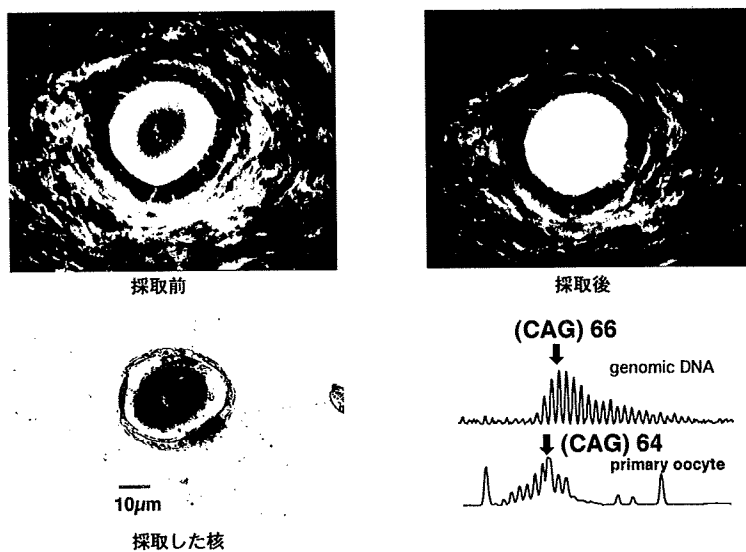


図2 卵巣細胞の採取とCAGリピート数

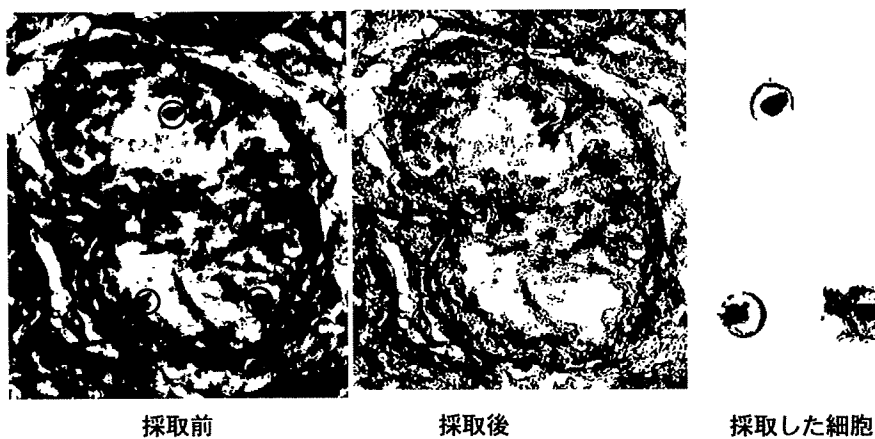


図3 LCM200を用いた精細管細胞の採取

今回我々は、formalin固定後の組織切片から採取した細胞(群)においても、CAGリピート数の解析が可能であることを示した。

細胞を採取するために用いたLCM法は、スライドガラス上の組織切片にレーザービームを当てて、顕微鏡下に採取したい領域の細胞を特殊な膜につけるというもので、簡便に細胞が採取でき、このままPCR解析へと移行できる利点がある⁶⁾。しかし、現時点で日本で販売されているLCM100では、細胞を切り取ることでできる範囲に制限があり、残念ながらそのスポットサイズを30ミクロン以下に絞り込むことはできない。

卵子については、LCM100を用いて、primary oocyteの核を切り取り、CAGリピート数が同定できた。しかし、今回対象とした患者の性周期にもよると思われるが、卵巣の連続切片の中に、成熟卵は存在せず、またレーザービームのスポットサイズの関係上、解析可能な細胞が少なかったもので、今後の更なる検討が必要である。

正常アリルと増大アリルのPCR効率には差があり、正常アリルのPCR効率は70%程度であったが、増大アリルのPCR効率は10%程度であった。formalin固定した組織切片からとったDNAでは、約300bpよりもおおきなサイズのDNAはほとんど変性していた。正常アリルのサイズは120bp程度であるが、増大アリルのサイズは300bpを越えるので、目的とするサイズの検出効率が低くなるのであろうと思われる。今後、random primerを用いて、DNAをpreamplificationした後に、nested PCRを行う方法⁷⁾を検討する予定である。

精巣においては、精原細胞は精細管の基底層に位置しており、基本的に内腔に向かって、一次精母細胞、二次精母細胞、精細胞、精子へと分化していく。今回の検討では、精細管の内腔側の細胞群のリピート数のほうが、基底膜側の細胞群のリピート数よりも長い傾向にあった。しかし、この結果はそれぞれ種々の分化段階の細胞が混在しているもので、やはり単一細胞を採取して検討する必要がある。ごく最近、米国で発売され始めたLCM200では、レーザービームの範囲を7.5ミクロンに絞り込むことが可能なので、図3に示すように精細管の細胞を単離することが可能である。我々の研究室では、LCM200を導入する予定であり、今後DRPLAをはじめとするCAGリピート病の生殖細胞を単一細胞レベルで解析し、精子・卵子のどの形成段階でリピートが不安定となるのかを明らかにし、その分子機構を解明したい。

1) Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, et al.: Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the *MJD1* gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease.

Hum Mol Genet 4: 1137-1146, 1995.

2) Igarashi S, Takiyama Y, Cancel G, et al.: Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (*MJD1*) is affected by the genotype of the normal chromosome: implication for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat.

Hum Mol Genet 5: 923-932, 1996.

3) Ikeuchi T, Igarashi S, Takiyama Y, et al.: Non-Mendelian transmission in dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis.

Am J Hum Genet 58: 730-733, 1996.

4) Takiyama Y, Sakoe K, Soutome M, et al.: Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for Machado-Joseph disease (*MJD1*): evidence for non Mendelian transmission of the *MJD1* gene and for the effect of the intragenic CGG/GGG polymorphism on the intergenerational instability.

Hum Mol Genet 6: 1063-1068, 1997.

5) Takiyama Y, Sakoe K, Amai M, et al.: Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA): the instability of the CAG repeats in the DRPLA gene is prominent among the CAG repeat diseases. Hum. Mol. Genet. (in press)

6) Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al.: Laser Capture Microdissection. Science 274: 998-1001, 1996.

7) Zühlke C, Hellenbroich Y, Schaaff F, et al.: CAG repeat analyses in frozen and formalin-fixed tissues following primer extension preamplification for evaluation of mitotic instability of expanded SCA1 alleles. Hum Genet 100: 339-344, 1997.

III 研究成果の刊行に関する一覧表
