

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

各種トリプレットリピート病に共通する  
治療法の開発に関する研究

（研究課題番号 H10—脳—008）

平成 11 年度 研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 辻 省次

# 1. 研究組織一覽表

「各種トリプレットリピート病に共通する治療法の開発に関する研究」

研究組織

区分	氏名	分担する研究項目	所属施設	職名
主任研究者	辻 省次	トリプレットリピート病の治療法の開発	新潟大学脳研究所 神経内科	教授
分担研究者	祖父江 元	変異アンドロゲン受容体 aggregates の形成と細胞死の阻止に関する研究	名古屋大学医学部 神経内科	教授
	貫名 信行	ハンチントン病における神経細胞死制御因子 in vitro での検討	理化学研究所脳科学総合研究センター 一病因遺伝子研究グループ	グループ ディレクター
	宮下 俊之	ポリグルタミンによって誘導される細胞死の機序解明とその抑制法の研究	国立小児病院小児医療研究センター 先天異常研究部遺伝染色体研究室	室長

## II. 総括研究報告書

# 各種トリプレットリピート病に共通する治療法の開発に関する研究

主任研究者 辻 省次 (新潟大学脳研究所神経内科)

## 研究要旨

伸長したポリグルタミンによって生じる神経細胞変性の病態機序を解明すること、さらに、治療法の確立を目指して、DRPLA および球脊髄性筋萎縮症のトランスジェニックマウスを作製した。DRPLA トランスジェニックマウスは、若年発症型の DRPLA に類似した表現型を示し、病理学的には多数の神経細胞の核内封入体が観察され、その分布は、DRPLA 剖検脳と類似しており、ヒトの DRPLA の病態機序をよく反映する動物モデルであると考えられた。神経細胞内核内封入体凝集体形成過程、アポトーシスの誘導に関して、分子シャペロンの一つである熱ショックタンパク (HSP70, HSP40) が緩和作用のあることを明らかにした。ポリグルタミン鎖により誘導されるアポトーシスの過程において、カスパー 8, カスパー 10 が活性化すること、これらのカスパーゼが凝集体と共凝集することを見いだした。DRPLA タンパクと結合するタンパクとしてインスリン受容体の一つである IRSp53 が同定された。

## 分担研究者

祖父江 元

(名古屋大学医学部神経内科・教授)

眞名信行

(理化学研究所脳科学総合研究センター・グループディレクター)

宮下俊之

(国立小児病院小児医療研究センター・室長)

球ルイ体萎縮症 (dentatorubral-pallidoluysian atrophy, DRPLA) 患者ゲノム DNA (CAG リピート数 79) より、コスミド (Super Cos1) をベクターとしてゲノムライブラリーを作成し、DRPLA cDNA 断片をプローブとしてゲノム DNA クローンを単離した。単一コピーのみ導入されたトランスジェニックマウスを得るためには、複数コピーが導入されやすい通常のマイクロインジェクション法より ES 細胞を用いた作成法が有利と、ES 細胞に導入した。得られた ES 細胞を C57BL/6J の胚盤胞に導入しキメラマウスを得た後、C57BL/6J との交配によりトランスジェニックマウス 3 系統を作製した。**SBMA モデル動物の作製**：球脊髄性筋萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA) モデル動物を作製するために、アンドロゲン受容体遺伝子プロモーター制御下に 293 リピートの CAG リピートを組み込み、4 系統のトランスジェニックマウスを得た。

**変異アンドロゲン受容体による凝集体の形成とその抑制の研究**：Neuro2a cell line を用いて変異アンドロゲン受容体部分タンパクを一過性に発現させ、熱ショックタンパクの cDNA (HSP70, HSP40, HSDJ) の co-transfection に

## A. 研究目的

本研究の目的は、トリプレットリピート病に共通する新たな治療法を開発することにある。トリプレットリピート病の中でも最も種類の多い CAG リピート病に焦点を当て、1. 凝集体の形成機序とその緩和方法の開発、2. 核内凝集体の形成機序の解明とその緩和方法の開発、3. 神経細胞に選択的な障害機構の解明と、神経細胞障害の緩和方法の開発、4. ポリグルタミン病の病態機序解明のための動物モデルの作製、を目的として行った。

## B. 研究方法

**DRPLA モデル動物の作製**：歯状核赤核・淡蒼

より、共発現させ、凝集体形成とその抑制効果について検討を行った。

huntingtin タンパクによる細胞障害機構：マウス neuroblastoma cell line である N2a 細胞を用いて、CAG リピートの存在する huntingtin 遺伝子エクソン 1（コードするポリグルタミン鎖の鎖長が 16, 60, 150）を発現するシステムを構築し、ポリグルタミン鎖の発現により誘導されるアポトーシス、熱ショック蛋白の挙動について解析を行った。

ポリグルタミンによって誘導される細胞死に関わるカスパーゼの研究：PC12, IGROV-1 の培養細胞を用いて、伸長したポリグルタミンを発現する stable transformant を作成し、凝集体の形成を解析した。HeLa 細胞のポリグルタミンタンパクを発現させ、免疫沈降法により、ポリグルタミンタンパクに結合するタンパクを検索した。酵母 two hybrid 法を用いて、DRLA タンパクに結合するタンパクについて検索を行った。

### C. 研究結果

DRPLA モデル動物の作製：得られたトランスジェニックマウス (Q76 マウス) は、世代間で CAG リピートの不安定性を示し、male transmission において年齢依存性の伸長を、female transmission においては年齢依存性の短縮を認めた。体細胞モザイクについても、小脳、心筋で体細胞モザイクの程度が軽いことが示された。不安定性の解析過程において CAG リピートの著明伸長を来したマウス (Q129 マウス) が見いだされ、失調、ミオクロヌス、てんかんなど、若年発症型の DRPLA 症例の臨床型ときわめて類似した表現型を示した。病理学的所見としては、著明な神経細胞内核内封入体の存在が示され、その分布はヒトの DRPLA 剖検脳の病変分布と極めて類似していた。

SBMA モデル動物の作製：アンドロゲン受容体遺伝子プロモーター制御下に 293 リピートの CAG リピートを発現するトランスジェニックマウス 4 系統を作製し、運動失調、体重減少を示し病理学的に広範に神経細胞の核内封入体が観察され、ポリグルタミン病の病態機序解明に有用であると考えられた。

変異アンドロゲン受容体による凝集体の形成とその抑制の研究：神経細胞として、Neuro2a 細胞を用いて、伸長したポリグルタミンを有するアンドロゲン受容体部分タンパクを発現させ、各種分子シャペロン (Hsp70, Hsp40, Hsdj) を共発現させたところ、Hsp70/Hsp40 群、Hsp70 群において核内凝集体形成の抑制、アポトーシスの抑制を観察した。

huntingtin タンパクによる細胞障害機構：マウス neuroblastoma cell line である N2a 細胞を用いて、ポリグルタミン鎖の鎖長が 16, 60, 150 のハンチンチン部分蛋白の発現系を構築し、150 リピートのポリグルタミン鎖の凝集体の発現に伴ってアポトーシスが生じること、熱ショック蛋白 (HDJ-1, HDJ-2, HSC70, HSP70) が凝集体と共存することを免疫沈降、免疫組織学的な観察により証明した。

ポリグルタミンによって誘導される細胞死に関わるカスパーゼの研究：ポリグルタミン鎖の発現によって、カスパーゼ 8、カスパーゼ 10 が活性化されること、伸長したポリグルタミン鎖によって形成される凝集体にカスパーゼ 8、カスパーゼ 10 が取り込まれていることを免疫沈降法により証明した。また、酵母 2 hybrid 法により、DRPLA 蛋白に結合する蛋白を検索し、インスリン受容体の 1 つである IRSp53 を同定した。

### D. 考察

本年度の研究の成果としては、DRPLA, SBMA のモデル動物系の作製が完成したことである。特に、DRPLA トランスジェニックマウスについては、1. ヒト DRPLA 遺伝子の調節領域（プロモーター）を含めた全長の遺伝子が導入されている、2. 導入遺伝子は単一コピーである、という特徴を有し、その結果、導入した遺伝子の発現分布が生理的な分布をよく反映し、さらに、発現量も内在性のマウス DRPLA 遺伝子の発現レベルと同等であることから、ヒトの DRPLA における病態機序をよく反映するモデルと考えられる。

このトランスジェニックマウスの解析から得られた知見としては、1. 表現型の出現が 3 週齢から観察されるのに対して、神経細胞の核内

封入体の出現は 9 週齢と、核内封入体は必ずしも、病態機序の primary の原因ではないこと、2. 神経細胞の減少、gliosis は観察されず、病態機序の主体は神経細胞の機能障害であって、細胞死ではないこと、である。これらの知見は、ポリグルタミンタンパク→凝集体形成→アポトーシス、というパラダイムを全面的に見直す必要があることを示している。トランスジェニックマウスのこれまでの解析から、神経細胞核の機能障害、特に転写障害が重要な役割を演じているものと考えられ、転写制御の異常を次年度以降詳細に解析する必要がある。

SBMA トランスジェニックマウスについても、病変分布は SBMA 症例に比較すると広範であるが、アンドロゲン受容体プロモーターを用いていることから、SBMA の病態機序をよく反映するモデルと考えられる。この研究で得られた、DRPLA および SBMA トランスジェニックマウスは、病態機序の解析だけでなく、治療研究の上でも重要な役割を持つものである。

凝集体形成機構については、変異 huntingtin, 変異アンドロゲン受容体の凝集体形成機構に関して詳細な解析が行われ、伸長したポリグルタミン鎖が凝集体を高率に形成し、神経系の細胞を含む培養細胞に対して強い毒性を示すことが確認された。さらに、HSP70, HSP40 といった熱ショックタンパクが凝集体と共凝集すること、これらの熱ショックタンパクの共発現がアポトーシスを緩和することを見いだした。

ポリグルタミンタンパクの凝集体形成、アポトーシスの誘導過程で、カスパーゼ 8, カスパーゼ 10 の活性化が見いだされ、免疫沈降法により、カスパーゼ 8, カスパーゼ 10 が凝集体と共凝集することも見いだされた。酵母 two hybrid 法により、ポリグルタミンタンパクに結合するタンパクの検索が行われ、DRPLA タンパクに結合するタンパクとしてインスリン受容体の 1 つである IRSp53 が同定された。このことは DRPLA タンパクがシグナル伝達に参与する可能性を示唆するものであり、DRPLA タンパクの生理的機能を明らかにしていく上で重要である。

## E. 結 論

本年度は、ポリグルタミン病のモデルマウスとして、DRPLA トランスジェニックマウス、SBMA トランスジェニックマウスが作製された。これらは、変異遺伝子自身のプロモーターを使用していることなど、ヒトのポリグルタミン病の病態機序をよく反映するモデルと考えられ、今後の病態機序の解明、治療法の開発の上で貴重なモデル動物となると期待される。このトランスジェニックマウスの解析の結果、ポリグルタミンタンパク→凝集体形成→アポトーシスというパラダイムでなく、ポリグルタミンタンパク→神経細胞核の機能障害というパラダイムを新たに構築する必要が示された。培養細胞系を用いた研究では、凝集体形成過程に分子シャペロンの一つである熱ショックタンパク (HSP70, HSP40) が緩和作用のあること、カスパーゼ 8, 10 が活性化され、共凝集していることを見いだした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Schilling, G., Wood, J.D., Duan, K., Slunt, H.H., Gonzales, V., Yamada, M., Cooper, J.K., Margollis, R.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Takahashi, H., Tsuji, S., Price, D.L., Borchelt, D.R. and Ross, C.A. Nuclear accumulation of truncated atrophin-1 fragments in a transgenic mouse model of DRPLA. *Neuron* 24: 275-286, 1999

Koide, R., Kobayashi, S., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Maruyama, M., Saito, M., Yamada, M., Takahashi, H. and Tsuji, S.: A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum. Molec. Genet.* 8: 2047-2053, 1999

Sato, T., Oyake, M., Nakamura, K., Nakao, K., Fukusima, Y., Onodera, O., Igarashi, S., Takano, H., Kikugawa, K., Ishida, Y., Shimohata, T., Koide, R., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Futamura, N., Matsumura, R., Takayanagi, T., Tanaka, F., Sobue, G., Komure, O.,

Takahashi, M., Sano, A., Ichikawa, Y., Goto, J., Kanazawa, I., Katsuki, M. and Tsuji, S.: Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable to those in DRPLA patients. *Hum. Mol. Genet.* 8: 99-106, 1999

Sato A., Shimohata T., Koide R., Takano H., Sato T., Oyake M., Igarashi S., Tanaka K., Inuzuka T., Nawa H. and Tsuji S. Adenovirus-mediated expression of mutant DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches in neuronally differentiated PC12 cells. Preferential intranuclear aggregate formation and apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 8: 997-1006, 1999

Mitsuma, N., Yamamoto, M., Li, M., Ito, Y., Mitsuma, T., Mutoh, T., Takahashi, M. and Sobue, G.: Expression of GDNF receptor (RET and GDNFR- $\alpha$ ) mRNAs in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 820:77-85, 1999

Hattori, N., Ichimura, M., Nagamatsu, M., Li, M., Yamamoto, K., Kumazawa, K., Mitsuma, T. and Sobue, G.: Clinicopathological features of Churg-Strauss syndrome-associated neuropathy. *Brain* 122:427-439, 1999

Tanaka, F., Reeves, M. F., Ito, Y., Matsumoto, M., Li, M., Miwa, S., Inukai, A., Yamamoto, M., Doyu, M., Yoshida, M., Hashizume, Y., Terao, S., Mitsuma, T. and Sobue, G.: Tissue-specific somatic mosaicism in spinal and bulbar muscular atrophy is dependent on CAG-repeat length and Androgen receptor-gene expression level. *Am. J. Hum. Genet.* 65:966-973, 1999

Misu, K., Hattori, N., Nagamatsu, M., Ikeda,

S., Ando, Y., Nakazato, M., Takei, Y., Hanyu, N., Usui, Y., Tanaka, F., Harada, T., Inukai, A., Hashizume, Y. and Sobue, G.: Late onset familial amyloid polyneuropathy type I (transthyretin Met-30-associated familial amyloid polyneuropathy) unrelated to endemic focus in Japan. Clinicopathological and genetic features. *Brain* 122:1951-1962, 1999

Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Yamamoto, Y., Fuyuhiko, H., Komure, O., Tanaka, F., Sobue, G., Tsuchiya, K., Hamada, K., Sasaki, H., Takeda, K., Ichijo, H. and Kakizuka, A.: Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes Cells* 4:743-756, 1999

Kobayashi, Y., Kume, A., Li, M., Dohu, M., Hata, M., Ohtsuka, K. and Sobue, G.: Chaperones Hsp70 and Hsp40, suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* (in press)

Sieradzan, K. A., Mehan, A. O., Jones, L., Wanker, E. E., Nukina, N. and Mann, D. M. A.: Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated ubiquitinated huntingtin protein. *Exp. Neurol.* 156:92-99, 1999

Wang, G.-H., Mitsui, K., Kotliarova, S., Yamashita, A., Nagao, Y., Tokuhiko, S., Iwatsubo, T., Kanazawa, I. and Nukina, N.: Caspase activation during apoptotic cell death induced by expanded polyglutamine in N2a cells. *NeuroReport* 10:2435-2438, 1999

貫名信行: Huntington病の原因遺伝子(IT15)



の遺伝子産物ハンチンチン(huntingtin)の生物学的活性と発症機序. 日本臨床 57:908-911, 1999

貫名信行: 痴呆性疾患の細胞障害分子機構「CAG リピート病」. 神経進歩 43:851-857, 1999

Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., Ohmi, K. and Yamada, M.: Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. Hum. Mol. Genet. 8:947-957, 1999

Miyashita, T., Matsui, J., Ohtsuka, Y., U, M., Fujishima, S., Okamura-Oho, Y., Inoue, T. and Yamada, M.: Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 257:724-730, 1999

Takahashi, M., Saito, H., Okuyama, T., Miyashita, T., Kosuga, M., Sumisa, F., Yamada, M., Ebinuma, H. and Ishii, H.: Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. J. Hepatol. 31:315-322, 1999

Fujii, K., Miyashita, T., Takanashi, J., Sugita, K., Kohno, Y., Nishie, H., Yasumoto, S., Furue, M. and Yamada, M.:  $\gamma$  -irradiation deregulates cell cycle control and apoptosis in nevoid basal cell carcinoma syndrome-derived cells. Jpn. J. Cancer Res. 90:1351-1357, 1999

宮下俊之: Caspase は神経変性疾患に深く関与する? 細胞工学 18:1799-1804, 1999

Komatsu, K., Miyashita, T., Hang, H., Hopkins, K. M., Zheng, W., Cuddeback, S., Yamada,

M., Lieberman, H. B. and Wang, H. G.: Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-x<sub>L</sub> and promotes apoptosis. Nature Cell Biol. 2:1-6, 2000

## 2. 学会発表

辻 省次: トリプレットリピート伸長による神経疾患. 第 25 回日本医学会総会シンポジウム「1. 脳と神経—神経疾患の分子遺伝学」, 1999.4.2, 東京

辻 省次: 神経変性疾患の分子機構. 第 5 回東海ニューロサイエンス研究会, 1999.4.10, 名古屋,

辻 省次: 3塩基反復による遺伝性神経疾患. 第 102 回日本小児科学会学術集会 1999.4.25, 東京

辻 省次: 神経変性疾患の分子機構. 第 26 回東京大学医科学研究所シンポジウム「分子神経科学」, 1999.6.1, 東京

辻 省次: 神経変性疾患の分子機構. 第 28 回 BNM 研究会, 1999.6.18, 東京

辻 省次: 脊髄小脳変性症の分子機構. 第 16 回城南神経懇話会, 1999.6.24, 東京

辻 省次: 神経変性疾患の分子機序. 第 17 回ニューロクラブ, 1999.7.2, 京都

辻 省次: 脊髄小脳変性症の臨床と最近の研究の進歩. 第 6 回青森脳神経カンファレンス, 1999.10.2, 弘前

辻 省次, 下畑享良, 小野寺理: ポリグルタミン病の発症機構. 第 72 回日本生化学会大会シンポジウム「トランスグルタミナーゼによるタンパク質架橋反応の多様性—発生から病態まで—」, 1999.10.8, 横浜

S. Tsuji: DRPLA advances. The Inherited Ataxias - A focus group meeting (Supported

by the Movement Disorder Society),  
1999.10.14, Seattle

辻 省次： 神経変性疾患の臨床と研究の進歩。第 21 回日本内科学会信越支部生涯教育講演会, 1999.10.31, 新潟

辻 省次： 脊髄小脳変性症の臨床とその分子病態機構。第 11 回 山形神経内科懇話会 学術講演会, 1999.11.19, 山形

辻 省次： ポリグルタミン病における神経細胞障害の機構。新潟薬科大学セミナー, 1999.12.10, 新潟

貫名信行： CAG リピート病と核内封入体。第 25 回日本医学会総会, 1999.4.2, 東京

長尾芳朗, 石黒啓司, 貫名信行： 伸長したポリグルタミンを含むペプチドを発現した大腸菌の細胞死及びこれを防御する薬剤の検索。第 41 回日本小児神経学会総会, 1999.5.13-15

王 光輝, Kotliarova, S. E., 貫名信行： 異常伸長ポリグルタミン含有ハンチンチン N 端断片の細胞死モデル。第 22 回日本神経科学大会, 1999.7.6, 大阪

Kotliarova, S. E., 王 光輝, 上出由希子, Zemskova, M. A., 貫名信行： ハンチンチンエキソン 1 発現細胞の DD による mRNA 発現の解析。第 22 回日本神経科学大会, 1999.7.6, 大阪

Kotliarova, S. E., Wang, G.-H., Kamide, Y., Zemskova, M. A. and Nukina, N.: Differential display analysis of inducible N2a cells stably expressing huntingtin exon 1 with normal and expanded polyglutamine region. The American Society of Human Genetics 49<sup>th</sup> Annual Meeting, 1999.10.19-23, San Francisco

Nukina, N., Wang, G.-H., Mitsui, K., Iwata, A.,

Shinbo, I., Tanaka, M. and Kotliarova, S. E.: A cellular model for the toxicity of mutant truncated n-terminal huntingtin and the activation of caspases. Society for Neuroscience 29<sup>th</sup> Annual Meeting, 1999.10.25, Miami Beach

Miyashita, T., Matsui, J., U, M., Okamura-Oho, Y. and Yamada, M.: Expression of polyglutamine induces activation of caspase-3-like proteases. Keystone Symposia, "Apoptosis and Programmed Cell Death", 1999.4, Breckenridge (U.S.A.)

藤井克則, 宮下俊之, 高梨潤一, 河野陽一： Gorlin 症候群における細胞生物学的特性と遺伝子変異。第 102 回日本小児科学会学術集会, 1999.4.23-25, 東京

難波裕幸, 宮下俊之, 山下俊一： G1/S 期における c-Myc による E-box を介した Bcl-2 遺伝子発現の調節機構の存在。第 58 回日本癌学会総会, 1999.9.29-10.1, 広島

宮下俊之, 山田正夫： 伸長したポリグルタミンによるカスベースの活性化。第 72 回日本生化学会大会シンポジウム, 1999.10.6-9, 横浜

宮下俊之： ポリグルタミンとカスベース。大阪大学蛋白質研究所セミナー「細胞死の分子機構—その共通性と特異性—」, 1999.11 大阪

柳澤比呂子, 宮下俊之, 於保祐子, 文東美紀, 徳永勝士, 山田正夫： DRPLA 蛋白と相同配列を有する RERE 蛋白の機能ドメインの解析。日本人類遺伝学会第 44 回大会, 1999.11.17-19, 仙台

於保祐子, 嶋 誠悟, 宮下俊之, 山田正夫： 53kDa インスリン受容体基質(IRSP53)のインスリン刺激による細胞膜近傍への移行。第 22 回日本分子生物学会年会, 1999.12.7-10,

## 福岡

宮下俊之, 鹿間芳明, 禹 麻美, 東島今日子, 於保祐子, 山田正夫: 伸長したポリグルタミンによるカスベース 8 の限定分解. 第 22 回日本分子生物学会年会, 1999.12.7-10, 福岡

禹 麻美, 宮下俊之, 山田正夫: ポリグルタミンに限らず, 単一アミノ酸からなる伸長リピートを発現すると細胞死が誘導される. 第 22 回日本分子生物学会年会, 1999.12.7-10, 福岡

柳澤比呂子, 宮下俊之, 於保祐子, 文東美紀, 徳永勝士, 山田正夫: DRPLA と高い相同性をもつ RERE 蛋白質の, DRPLA 蛋白質との相互作用. 第 22 回日本分子生物学会年会, 1999.12.7-10, 福岡

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### III. 分担研究報告書

# トリプレットリピート病の治療法の開発

辻 省次 (新潟大学脳研究所)

## 研究要旨

CAG リピート病における、神経細胞の変性機構を明らかにする目的で、伸長ポリグルタミン鎖をコードする変異 DRPLA 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。得られたトランスジェニックマウス (Q76 マウス) は、世代間で CAG リピートの不安定性を示し、male transmission において年齢依存性の伸長を、female transmission においては年齢依存性の短縮を認めた。体細胞モザイクについても、小脳、心筋で体細胞モザイクの程度が軽いことが示された。不安定性の解析過程において CAG リピートの著明伸長を来したマウス (Q129 マウス) が見いだされ、失調、ミオクロヌス、てんかんなど、若年発症型の DRPLA 症例の臨床型ときわめて類似した表現型を示した。病理学的所見としては、著明な神経細胞内核内封入体の存在が示され、その分布はヒトの DRPLA 剖検脳の病変分布と極めて類似していた。

## A. 研究目的

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) を始めとする 8 つの遺伝性神経変性疾患において、ポリグルタミン鎖をコードする CAG リピートの異常伸長が病因となっていることが明らかにされている。最近までの研究成果から、1. 伸長したポリグルタミンを有するタンパクは凝集体を形成しやすい、2. 細胞障害性を示すためには伸長したポリグルタミンを有するタンパクが核移行することが必要であるらしい、3. 核内凝集体を形成する細胞は高率にアポトーシスを示す、などのことが明らかにされてきている。

CAG リピート病の治療法を開発していくためには、核内凝集体の形成機構、伸長したポリグルタミンを有するタンパクによる細胞障害機構、を分子レベルで明らかにしていく必要がある。これらの分子病態機序を解明し、その緩和法を開発し治療法開発につなげていくためには、神経細胞の変性を示すモデル動物系を確立することが必須である。

DRPLA 動物モデルの作製にあたって、(1) CAG リピートの不安定性機構、(2) 選択的神経障害機構、の 2 点を明らかにしていくことが必

須であると考え、全長のヒト変異 DRPLA 遺伝子を単一コピーで導入したトランスジェニックマウスを作製し、CAG リピートの不安定性、表現型についての解析を行った。

## B. 研究方法

DRPLA 患者ゲノム DNA (CAG リピート数 79) より、コスミド (Super Cos1) をベクターとしてゲノムライブラリーを作成し、DRPLA cDNA 断片をプローブとしてゲノム DNA クローンを単離した。

単一コピーのみ導入されたトランスジェニックマウスを得るためには、確率的に複数コピーが導入されやすい通常のマイクロインジェクション法より ES 細胞 (CCE) を用いた作製法が有利である。このため変異型 DRPLA 遺伝子をエレクトロポレーション法により導入し、単一コピーのみ導入された ES 細胞を選択した。得られた ES 細胞を C57BL/6J の胚盤胞に導入しキメラマウスを得た後、C57BL/6J との交配によりトランスジェニックマウス 3 系統を作製した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、動物実験指針に基づき、動物福祉・

苦痛の軽減に配慮して行った。

### C. 結果結果

このような手法で作製したトランスジェニックマウス (Q76) は DRPLA 家系において観察される CAG リピートの不安定性に類似した CAG リピートの不安定性を示した。すなわち、male transmission においては、年齢依存性の CAG リピートの増加 ( $+0.043 \pm 0.020$  リピート,  $n=211$ ), female transmission においては年齢依存性の CAG リピートの短縮 ( $-0.340 \pm 0.043$ ,  $n=215$ ) を認めた。両者の間には統計的な有意差を認めた ( $P < 0.001$ )。

体細胞モザイクについて、64 週齢のマウスの各臓器で調べたところ、小脳および心筋では、大脳や他の臓器に比べて体細胞モザイクの程度が小さいことが判明した。また、同一個体の尾の DNA の経時的な解析から、体細胞モザイクが年齢に依存して増大することも判明した。

1 年以上の観察を行ったが、Q76 マウスについては、明らかな表現型は示さなかった。ところが、不安定性の解析のために、2000 匹以上の Q76 マウス (ヘミ接合体) を解析したところ、76 リピートの導入遺伝子に加え、129 リピートの遺伝子を同時に有するモザイクマウスを発見した。モザイクマウスを交配した結果、Q129 マウス 96 匹 (20%), Q76 マウス 162 匹 (33%), non-TG232 匹 (47%) という分離比が得られたため、2 あるいは 4 細胞期に CAG リピートが著明に伸長したものと考えられた。

Q76 マウス、Q129 マウスにおける transgene の発現レベルを、competitive RT-PCR によって解析したところ、両マウスの発現レベルは等しく、マウスの内在性の DRPLA 遺伝子の約 80% であることが判明した。Q129 マウスは 3 週でミオクローヌス、失調、11 週にはてんかんを認め、16 週までにすべて死亡した。脳重は体重減少に先立って 4 週頃から著明な低下を認めた。さらに 9 週以降では、大脳皮質を含む広範な領域にわたり多数の核内封入体を認め、核内封入体の分布も剖検脳の結果に極めて類似していた。

### D. 考察

Q76 マウスは、DRPLA 症例で認められると同様に、世代間の CAG リピートの不安定性と体細胞モザイクを示し、CAG リピートの不安定性機構の研究に適したモデル系と考えられる。male transmission に認められた年齢依存性の CAG リピートの伸長は、精原細胞が生涯を通じて分裂を続ける過程で生じる CAG リピートの不安定性が蓄積する結果であると考えられる。female transmission における CAG リピートの年齢依存性の短縮傾向は、出生から排卵までの間の減数分裂停止 (meiotic arrest) の時期に生じるものであると推定されるが、その分子機構についてはさらに検討を加える必要がある。体細胞モザイクに関しては、DRPLA 剖検脳で見いだされたと同様に、小脳で体細胞モザイクの程度が小さいことが見いだされ、これは小脳が postmitotic cell としての神経細胞が非常に豊富であることに関連するものと思われた。また、年齢依存性に体細胞モザイクが増加する現象は剖検脳でも推定されていた現象であるが、同一個体でこの現象が確認されたのはこれが初めてである。

Q129 マウスはヒト DRPLA 症例と類似の表現型、病理学的所見を示した。transgene の挿入部位は、Q76 マウスと Q129 マウスで同一で、発現レベルも等しいことから、この表現型は Q129 と著明に増大したポリグルタミン鎖によって生じるものと考えられる。transgene は全長のヒト DRPLA 遺伝子であり、DRPLA 遺伝子自身のプロモーターによって発現が制御されていること、発現量は内在性の DRPLA 遺伝子の発現量とほぼ同じレベルであること、核内封入体の分布がヒト DRPLA 剖検脳で観察されるものと同様であること、表現型が失調、ミオクローヌス、てんかんであり、若年発症型の DRPLA 症例 (progressive myoclonus type) に類似した表現型を示す等の点で DRPLA の病態機序を忠実に反映する優れたモデルであると考えられる。

神経細胞内の核内封入体については、光顕で観察されるようになるのが 9 週以降であるが、表現型は 3 週の時点から観察された。このことは、核内封入体の形成が神経細胞変性の原因と

なっているというよりは、かなり後になって生じる結果であることを示唆している。神経細胞内の核内封入体の存在は当初、ハンチントン病のモデルマウスで見いだされ、その後、ハンチントン病、Machado-Joseph 病、などで見いだされ、ポリグルタミン病の発症機序の上で重要な役割を演じているのではないかと考えられてきたが、この結果は、核内封入体の形成よりもはるかに早い段階で神経細胞の機能障害が生じていることを意味している。さらに、この Q129 マウスにおいては神経細胞の明らかな消失、グリオーシスは認めないにも関わらず強い表現型を示している点が重要であると考えられる。すなわち、培養細胞を用いた研究で、伸長ポリグルタミン鎖の過剰発現→アポトーシス、というパラダイムが提唱されてきたが、このパラダイムは生体内では成立しないことを意味している。むしろ、ポリグルタミン病の本質は、細胞死にあるのではなく、細胞の機能障害、特に、核の機能障害である可能性が高いと考えられる。このような考え方にたって、神経細胞、特に核の機能障害の実態を解析していく必要がある。

## E. 結論

Q129 マウスは、DRPLA の病態機序を忠実に反映したマウスモデルであり、ポリグルタミン病の病態機序の解明と治療法開発研究にとって最適なモデル動物である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Schilling, G., Wood, J.D., Duan, K., Slunt, H.H., Gonzales, V., Yamada, M., Cooper, J.K., Margollis, R.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Takahashi, H., Tsuji, S., Price, D.L., Borchelt, D.R. and Ross, C.A. Nuclear accumulation of truncated atrophin-1 fragments in a transgenic mouse model of DRPLA. *Neuron* 24: 275-286, 1999

Koide, R., Kobayashi, S., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Maruyama, M., Saito, M., Yamada, M., Takahashi, H. and Tsuji, S.: A neurological disease

caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum. Molec. Genet.* 8: 2047-2053, 1999

Sato, T., Oyake, M., Nakamura, K., Nakao, K., Fukusima, Y., Onodera, O., Igarashi, S., Takano, H., Kikugawa, K., Ishida, Y., Shimohata, T., Koide, R., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Futamura, N., Matsumura, R., Takayanagi, T., Tanaka, F., Sobue, G., Komure, O., Takahashi, M., Sano, A., Ichikawa, Y., Goto, J., Kanazawa, I., Katsuki, M. and Tsuji, S. Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable to those in DRPLA patients. *Hum. Mol. Genet.* 8: 99-106, 1999

Sato A., Shimohata T., Koide R., Takano H. m Sato T., Oyake M., Igarashi S., Tanaka K., Inuzuka T., Nawa H. and Tsuji S. Adenovirus-mediated expression of mutant DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches in neuronally differentiated PC12 cells. Preferential intranuclear aggregate formation and apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 8: 997-1006, 1999

### 2. 学会発表

辻 省次： トリプレットリピート伸長による神経疾患。第 25 回日本医学会総会シンポジウム「1. 脳と神経—神経疾患の分子遺伝学」, 1999.4.2, 東京

辻 省次： 神経変性疾患の分子機構。第 5 回東海ニューロサイエンス研究会, 1999.4.10, 名古屋,

辻 省次： 3 塩基反復による遺伝性神経疾患。第 102 回日本小児科学会学術集会 1999.4.25, 東京

辻 省次： 神経変性疾患の分子機構。第 26

回東京大学医科学研究所シンポジウム「分子神経科学」, 1999.6.1, 東京

なし  
3. その他  
なし

辻 省次: 神経変性疾患の分子機構. 第28回B NM研究会, 1999.6.18, 東京

辻 省次: 脊髄小脳変性症の分子機構. 第16回城南神経懇話会, 1999.6.24, 東京

辻 省次: 神経変性疾患の分子機序. 第17回ニューロクラブ, 1999.7.2, 京都

辻 省次: 脊髄小脳変性症の臨床と最近の研究の進歩. 第6回青森脳神経カンファレンス, 1999.10.2, 弘前

辻 省次, 下畑享良, 小野寺理: ポリグルタミン病の発症機構. 第72回日本生化学会大会シンポジウム「トランスグルタミナーゼによるタンパク質架橋反応の多様性-発生から病態まで-」, 1999.10.8, 横浜

S. Tsuji: DRPLA advances. The Inherited Ataxias - A focus group meeting (Supported by the Movement Disorder Society), 1999.10.14, Seattle

辻 省次: 神経変性疾患の臨床と研究の進歩. 第21回日本内科学会信越支部生涯教育講演会, 1999.10.31, 新潟

辻 省次: 脊髄小脳変性症の臨床とその分子病態機構. 第11回山形神経内科懇話会学術講演会, 1999.11.19, 山形

辻 省次: ポリグルタミン病における神経細胞障害の機構. 新潟薬科大学セミナー, 1999.12.10, 新潟

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録



# 球脊髄性筋萎縮症における

## 治療法の開発

祖父江 元 (名古屋大学医学部)

### 研究要旨

CAG リピート病は異常延長ポリグルタミン鎖がその病因であると考えられている。我々はまず変性タンパクに対する生体防御系の一つとしてあるシャペロンの CAG リピート病に対する治療応用の可能性を探るため、培養神経細胞モデルを用いてその効果を検討した。その結果シャペロンにより異常延長ポリグルタミン鎖よりなる核内凝集体形成の抑制と共に細胞死の抑制効果を認めた。次に CAG リピート病の病態研究及び各種治療法の開発のためには、疾病動物モデルの作成が不可欠である。我々は球脊髄性筋萎縮症のモデル動物としてヒトアンドロゲン受容体遺伝子のプロモーターを使い、その下流に 239CAG リピートを持つ外来遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作成に成功した。これらのマウスにおいて運動機能の低下、体重減少、生存率の低下及び病変部における核内封入体を認めた。

### A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症 (X-linked spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA) を始めとする CAG リピート病では、異常延長ポリグルタミン鎖がその病因であると考えられている。細胞内の変性タンパクに対する生体防御系の一つとしてシャペロンがある。各種シャペロンは大腸菌からヒトに至るまでそのホモロジーはかなり高く保たれており、その機能が細胞生存に必須のものであると考えられる。我々はシャペロンの CAG リピート病に対する治療応用の可能性を探るため、SBMA 培養神経細胞モデルを用いてその効果を検討した。また、CAG リピート病の病態研究及び各種治療法の開発のためには、疾病動物モデルの作成が不可欠である。最近他の CAG リピート病モデルマウスにおいてその責任遺伝子由来のプロモーターを利用することで、ヒト疾病とアナロジーが高いモデル動物の作成が報告されている。そこで我々は SBMA モデル動物作成のためヒトアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子のプロモーターを使い、その下流に 239CAG リピートを持つ外来遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作成を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. シャペロンによる治療効果

Neuro2a 細胞に truncated AR(CAG)<sub>97</sub>-GFP vector (tAR97-GFP) を各種シャペロン (Hsp70, Hsp40, Hsdj) と共に遺伝子導入し、tAR97-GFP 単独群及び各種シャペロン共導入群での凝集体形成率、細胞死の抑制効果を検討した。

#### 2. SBMA モデル動物作成

ヒトゲノム DNA より PCR 法にて得た 3.4Kb からなる AR 遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片と 239CAG リピートを、pFLAG vector に組み込み cloning した。Sal I と Pst I により transgene を切り出しマイクロインジェクション法にてトランスジェニックマウスを作成し、運動機能・体重・生存率及び病理学的検討した。

### C. 研究結果

#### 1. シャペロンによる治療効果

##### 1) SBMA 培養神経細胞モデル作成

Neuro2a 細胞に tAR97-GFP 単独で遺伝子導入したものを系時的に観察したところ、導入 48 時間後には  $46.3 \pm 1.0\%$  に核内凝集体形成を、 $10.8 \pm 0.1\%$  に apoptosis を認めた。正常リピートの 24CAG リピート tAR24-GFP を遺伝子導入したものにはいづれ

も認めなかった。tAR97-GFP を遺伝子導入したのは、SBMA での神経変性死とのアナロジーを認め培養神経細胞系におけるモデルと考えられた。

## 2) シャペロンによる治療効果の検討

SBMA 培養神経細胞モデルに各種シャペロン (Hsp70, Hsp40, Hsdj) を共導入したところ、導入 48 時間後に Hsp70/Hsp40 群(核内凝集体 13.8±0.4%; Apoptosis 4.6±1.1%)及び Hsp70 群(核内凝集体 18.3±1.5%; Apoptosis 5.6±0.2%)で強い核内凝集体形成抑制・apoptosis 抑制効果を認めた(図 1)。

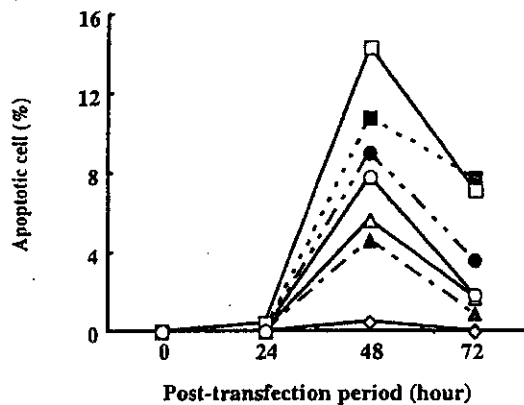


図 1. Frequency of cells with aggregate, nuclear aggregate, or apoptosis in cotransfecting Neuro2a cells with tAR-GFP and chaperones. A, total aggregate-positive cells that contain aggregates cytoplasm and/or nucleus. B, nuclear aggregate-positive cells that contain nuclear aggregate with/without cytoplasmic aggregates. C, TUNEL-positive cells. ◆, tAR24; ■, tAR97; △, +Hsp70; ●, +Hsp40; □, +HSDJ; ▲, +Hsp70/HSDJ; ○, +Hsp70/HSDJ.

## 1. SBMA モデル動物作成

### 1) 遺伝子解析

4 系統のトランスジェニックマウスモデルを得た。トランスジェニックマウスの テールゲノム DNA で PCR を行い、239CAG リピートが保存されていることを確認した。サザンプロット法で確認した transgene のコピー数はそれぞれ 50, 1, 30, 20 コピーであった。Transgene の RT-PCR で、脊髄、大脳、小脳、肝臓において mRNA レベルでの発現を確認した。

### 2) 臨床所見

トランスジェニックマウスでは体格が縮小し、三系統で雄/雌共に優位な体重差を認めた。

三系統で累積生存率が徐々に低下し、half life はそれぞれ 90, 90, 120 日であった。

Rotarod による運動機能の評価では、一系統で第 8 週より有意な運動能力低下を示した。

Foot print 解析においてトランスジェニックマウスでは、筋力低下による足の引きずり及び運動失調による間隔の不規則性を認めた。

## 3) 病理学的検索

FLAG の免疫染色標本で、ヒトの SBMA に認められるのと同様の核内封入体が脊髄前角細胞をはじめとして大脳・小脳顆粒細胞層の神経細胞/グリア細胞に認められた。一般臓器では皮膚のみに認め、他臓器見られなかった。ヒト SBMA 例における核内封入体の臓器別の分布に比し、神経組織においてグリア細胞も含め広範に分布した。また、神経細胞の脱落と gliosis については、明らかな所見を認めなかった。これらの核内封入体は、生後 1 日で既に神経組織に認め、週齢が進むとともに増加した。有意な運動機能の低下が生後 8 週よりみられており、核内封入体の出現は臨床症状よりも先行していた。

## D. 考察

### 1. シャペロンによる治療効果

SBMA を始めとする CAG リピート病では、異常延長ポリグルタミン鎖がその病因であると考えられている。また病変部に認められる各責任遺伝子産物よりなる核内封入体の存在は CAG リピート病特異的である。現在この核内封入体形成が直接的に神経変性死を誘導する要因か否かについては議論のあるところである。我々は細胞内における変性タンパクに対する生体防御系の重要な因子であるシャペロンを SBMA 培養神経細胞モデルを用い、異常延長ポリグルタミン鎖の細胞障害性に対する防御効果を検討した。我々の実験結果ではシャペロン特に Hsp70/Hsp40 の組み合わせは apoptosis を抑制しかつ核内凝集体形成の抑制効果を認めた。シャペロンがこのような抑制効果をもたらした機序仮説としては、1)凝集体形成を抑制することで直接的に凝集体形の持つ細胞障害性を軽減した、2)凝集体形成を抑制とは無関係に ubiquitin-proteasome

系の機能を賦活し、異常延長ポリグルタミン鎖の持つ細胞障害性を軽減した、3) 異常延長ポリグルタミン鎖により賦活された細胞死関連シグナル伝達系を阻害したなどの可能性が考えられた。どのような機序でシャペロンがこのような治療効果をもたらすかについては、今後さらに検討する必要がある。

## 2.SBMA モデル動物作成

SBMA モデル動物作成に対しては過去もいくつかの試みがあるが、いずれも表現形の獲得にまでは至っていない。これにはいくつかの原因があると思われる。最大の要因が CAG リピート長であると考えられる。SBMA では延長した CAG リピート数が多くは 40~50 程であり、他の CAG リピート病に比べ短い傾向がある。結果として SBMA モデル動物作成にもやや短い延長 CAG リピートを持つ transgene が使われている。またより CAG リピート部分のみに truncate することで細胞障害性が高まることが実証されているが、今までの試みではすべて完全長のものが使われている。我々は 239CAG リピートを使用した。次に最近他の CAG リピート病の動物モデルにおいて責任遺伝子のプロモーターを使うことにより病変選択性などに良いモデル動物が作成できたとの報告がされている。そこで我々は SBMA の責任遺伝子であるヒト AR プロモーター領域をクローニングし、AR プロモーターと 239CAG リピートとを組み合わせることで、今回 SBMA モデル動物で表現形を獲得したモデルの作成に成功した。

今回のモデルでは臨床的に筋力低下に加え、運動失調、体格の縮小、寿命短縮が観察され、病理学的にも核内封入体が SBMA よりも広範にみられたが、その病変分布には選択性がみられ、また神経機能の低下がみられたことは、重要と考えられる。今回作成したモデルでは AR 遺伝子のプロモーターを挿入したこと、ポリグルタミン鎖が非常に延長していること、種の相違などが病変の選択性に関与したと推察される。核内封入体の形成は、CAG リピート病の分子病態を考える際に、重要な

因子であり、封入体の形成メカニズム、また、封入体自身あるいは形成過程が毒性を発揮する機序の解明が CAG リピート病の病態解明につながると考えられる。そして、核内封入体の形成を抑制することが神経細胞死、あるいは神経機能低下の抑制につながり、治療に結びつくと考えられる。以上より、このトランスジェニックマウスは SBMA のモデル動物となりうると考えられるが、さらに病態について詳細な検索が必要である。

## E. 結論

### 1.シャペロンによる治療効果

本研究により SBMA を始めとする CAG リピート病に対してシャペロンは有効な治療法となる可能性が示唆された。今後はさらにシャペロンがどのような機序で効果を発揮するのかを検討する必要がある。

### 2.SBMA モデル動物作成

我々はヒト AR プロモーターと 239CAG リピートを組み合わせることで SBMA モデル動物作成に成功した。今後はさらに 4 系統のラインを詳細に解析する。そしてモデル動物を利用し先に述べたシャペロンによる治療応用の可能性などについて検討を加える。

## F. 研究発表

### 1.論文発表

Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K and Sobue G. Chaperones, Hsp70 and Hsp40, suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *Journal of Biological Chemistry* in press

Tanaka F, Reeves M F, Ito Y, Matsumoto M, Li M, Miwa S, Inukai A, Yamamoto M, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Terao S, Mitsuma T, Sobue G. Tissue-specific somatic mosaicism in spinal and bulbar muscular atrophy is dependent on CAG-repeat length and Androgen receptor-gene expression level. *Am J Hum*

Genet 65:966-973, 1999

Kobayashi Y, Miwa S, Merry DE, Kume A, Li M, Doyu M and Sobue G. Caspase-3 cleaves the expanded androgen receptor protein of spinal and bulbar muscular atrophy in a polyglutamine repeat length-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998 252: 145-150.

Li M, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Merry DE, Tanaka F, Doyu M, Mitsuma T, Fischbeck K.H. and Sobue G. Non-neural nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *American Journal of Pathology* 1998 153: 695-701.

Li M, Miwa S, Kobayashi Y, Merry DE, Yamamoto M, Tanaka F, Doyu M, Hashizume Y, Fischbeck K.H. and Sobue G. Nuclear inclusions of androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Annals of Neurology* 1998 44: 249-254.

Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, Mueckler M, Marshall H, Donis-Keller H, Crook P, Mikuni M, Kumahiro H, Higashi K, Sobue G, Oka T and Permutt M. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genetics* 1998 20: 143-148.

Abe Y, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Hirayama M, Kachi T and Sobue G. CAG repeat number correlates with the rate of brainstem and cerebellar atrophy in Machado-Joseph disease. *Neurology* 1998 51: 882-884.

Yamamoto M, Mitsuma N, Ito Y, Hattori N, Nagamatsu M, Li M, Mitsuma T and Sobue G. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and GDNFR- $\alpha$  mRNAs in human peripheral neuropathies. *Brain Research* 1998 809: 175-181.

Hayakawa K, Itoh T, Niwa H, Mutoh T and Sobue G. NGF prevention of neurotoxicity induced by cisplatin, vincristine and taxol depends on toxicity of each drug and NGF treatment schedule: In vitro study of adult rat sympathetic ganglion explants. *Brain Research* 1998 794: 313-319.

Ito Y, Yamamoto M, Li M, Doyu M, Tanaka F, Mutoh T, Mitsuma T and Sobue G. Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$ , IL-6R $\alpha$  and gp130) in injured peripheral nerves. *Brain Research* 1998 793: 321-327.

Niwa H, Takeda A, Wakai M, Miyata T, Yasuda Y, Mitsuma T, Kurokawa K and Sobue G. Accelerated formation of N-(carboxymethyl) lysine, an advanced glycation end product, by glyoxal and 3-deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998 248: 93-97.

Sobue G, Yamamoto M, Doyu M, Li M, Yasuda T and Mitsuma T. Expression of mRNAs for Neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their Receptors (p75<sup>NGFR</sup>, Trk, and TrkC) in Human Peripheral Neuropathies. *Neurochemical Research* 1998 236: 821-829.

Itoh T, Niwa H, Nagamatsu M, Mitsuma T, Miyakawa A, Pleasure D and Sobue G. Nerve growth factor maintains regulation of intracellular calcium in neonatal sympathetic neurons but not in mature or aged neurons. *Neuroscience* 1998 82: 641-651.

Watanabe H, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Ando T, Mitsuma T and Sobue G. Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Clinical Genetics* 1998 53: 13-19.