

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 12 年度 研究報告書

平成 13 年 3 月

主任研究者 辻 省次

目 次

I. 研究組織一覧表-----	1
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-----	3
主任研究者 辻 省次	
III. 分担研究報告書	
1. トリプレットリピート病の治療法の開発-----	11
分担研究者 辻 省次	
2. 球脊髄性筋萎縮症の transgenic mouse model の作成と臨床病理学的検索-----	15
分担研究者 祖父江 元	
3. CAG リピート病の細胞死モデル系の作成と抑制系の研究-----	21
分担研究者 貫名 信行	
4. 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-----	25
分担研究者 宮下 俊之	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表及びその別刷	
1. 辻 省次-----	29
2. 祖父江 元-----	59
3. 貫名 信行-----	93
4. 宮下 俊之-----	139

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・教授）

研究要旨

伸長したポリグルタミン鎖が、TATA-binding protein-associated factor の一つである TAF130 と結合して、CREB-依存性転写活性化を阻害すること、全長の TAF130 の共発現によりこの転写活性化の阻害が回復することを明らかにした。この結果は、ポリグルタミン病の病態機序において核の機能障害、特に、転写障害が重要であることを示すものである。全長のアンドロゲン受容体を発現する球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) のトランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスの表現型、病理学的変化が、宿主の性差によって大きく異なる（雄でより重症化する）ことを見だし、内分泌学的要因が SBMA の病態機序を修飾する因子として作用していることを示した。この発見は、SBMA の新たな治療法の開発に発展する可能性がある。伸長ポリグルタミン鎖による凝集体の形成過程、細胞死の誘導について、カスパーズ 8、分子シャペロンが関わっていること、分子シャペロンが細胞死を緩和することを見出した。伸長ポリグルタミン鎖が分子内 β 構造、分子間 β 構造をとっていることを明らかにした。

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
（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）

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法の開発、2. 核内凝集体の形成機序の解明とその緩和法の開発、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成、を目的として行った。

B. 研究方法

DRPLA における神経細胞障害機構： yeast two hybrid 法を用いて、転写因子関連タンパクが伸長ポリグルタミン鎖に結合するかどうかを検索した。yeast two hybrid 法によって結合が示されたタンパクについて、far-Western 法、免疫沈降法、transient co-expression により形成される伸長ポリグルタミン鎖を含む凝集体への co-localization について検討を加えた。TAF130 と伸長ポリグルタミン鎖の結合が、CREB-依存性転写の活性化に対して阻害作用があるかどうかを、5つの GAL4-認識配列を有する GAL4-CREB 発現ベクター、野生型 PKA ベクター、RSV- β gal コントロールプラスミド、伸長ポリグルタミン鎖発現ベクター (huntingtin, DRPLA-タンパク, MJD1 タンパク, atrophin-2 タンパク) を 293 細胞に導入して解析した。伸長ポリグルタミン鎖による細胞死については、核の断片化により解析した。

SBMA モデル動物の作成： 球脊髄性筋萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA) モデル動物の作成するために、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、トランスジェニックマウスを作成した。さらに、全長のアンドロゲン受容体

cDNA (97 リピート) を β -actin プロモーター制御下に発現するトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスの、表現型、病理学的所見について解析を行った。

CAG リピート病の細胞死モデル系の作成と抑制系の研究： エクダイソンにより誘導性に伸長ポリグルタミン鎖を発現する培養細胞系を確立した。この培養細胞系を用いて、HDJ1, HDJ2, HSP70, HSC70 などのシャペロンタンパクを共発現させ、伸長ポリグルタミン鎖との結合、細胞死、凝集体抑制作用などについて検討した。ポリグルタミン鎖をマッコウクジラミオヘモグロビンとの融合タンパクとして作成し、CD, IR, 常磁性 NMR を用いて構造解析を行った。

ポリグルタミンによって誘導される細胞死の機序解明とその抑制法の研究： カスパー 8 及び 9 が活性化される際に限定分解を受けて生じる C 末端の 6 アミノ酸を抗原として、活性化型カスパー特異抗体を作成した。GST と様々な長さのポリグルタミン鎖との融合タンパクを合成し、アイソトープ標識した何種類かのカスパーとの結合について解析した。DRPLA 遺伝子に相同性を示す新規遺伝子 (RERE) を得た。RERE 発現ベクターを用いて、RERE タンパク質の細胞内分布、DRPLA タンパクとの結合などについて検討した。

C. 研究結果

DRPLA における神経細胞障害機構： ポリグルタミン病における、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に結合する核内タンパクを検索し、伸長ポリグルタミン鎖が TATA-binding protein-associated factor の一つである TAF130 と結合することを見いだした。この結合は、1. yeast two hybrid 法、2. far-Western 法、3. transient expression における凝集体への co-localization、4. 剖検脳における神経細胞核内封入体の TAF130-immunoreactivity、5. 免疫沈降による結合の確認、などの異なる方法で確認した。さらに、レポーター遺伝子を用いた、TAF130 が CREB-依存性転写活性化を強く阻害すること、TAF130 の共発現によりこの阻害が回復することを明らかにした。伸長ポリグルタミン鎖による細胞死についても、全長の TAF130 の共発現により緩和されることを明らかにした。CREB-依存性の

転写の活性化は、神経細胞の生存維持、可塑性など、神経細胞の機能にとって重要な機能に関わっていることが示されており、伸長ポリグルタミン鎖と TAF130 の結合によって、神経細胞の重大な機能障害をもたらす可能性が示された。

SBMA モデル動物の作成： 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を作成した。このトランスジェニックマウスは発症すると、運動量が減り、歩行時や立ち上がったときに転倒した。表現型には性差は認めなかった。このトランスジェニックマウスでは、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に核内封入体が観察された。これらの封入体はユビキチン化されていた。神経細胞の脱落とグリオーシスは認められなかった。

一方、全長アンドロゲン受容体 cDNA を用いたトランスジェニックマウスでは、雄で臨床症状が重いという明らかな性差が見られた。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と同様の核内封入体を運動ニューロンをはじめ、広範に認めたが、雄の出現頻度は雌の出現頻度に比べて明らかに高頻度であった。

CAG リピート病の細胞死モデル系の作成と抑制系の研究： 異なる長さのポリグルタミン鎖を発現した細胞からポリグルタミン融合タンパクを免疫沈降したところ、150Q を発現した細胞からの免疫沈降では、HDJ1, HDJ2, HSP70, HSC70 が結合していることが示された。HDJ1, HSC70 をこの細胞系に発現させると、凝集体抑制効果が認められた。さらに、この細胞系においてプロテアソームの活性がポリグルタミン鎖の増加とともに可溶性画分においては減少し、不溶性画分においては増加し、プロテアソームの基質である p53 の増加が認められ、プロテアソームの活性異常が細胞死に関与していることが示唆された。

ミオグロビンに 12Q, 28Q, 35Q, 50Q を挿入した融合タンパクを作成した。これらの融合タンパクを精製し構造解析を行った。CD, IR による検討結果では、ポリグルタミン鎖の伸長に伴い、分子内 β シート構造と、分子間 β シート構造をとることが示唆された。NMR による検討の結果では、ミオグロビンのコアの部分には影響が少ないこと

が示された。

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：今回作成した、活性化型カスパーズ 8 及び 9 に対する特異抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、伸長ポリグルタミン鎖によって形成される核内凝集体の部位が、活性化型カスパーズ 8 陽性であった。

DRPLA タンパクの相同分子として新たに発見された RERE は 1566 個のアミノ酸からなり、DRPLA タンパクと C 末端で相同性が高く（アミノ酸で 67%）、DRPLA タンパクと同様に、RERE 配列を有していたが、ポリグルタミン鎖は有していなかった。この RERE 配列を介して、両者はそれぞれホモ及びヘテロダイマーを形成し、細胞内でも核内に共存した。両者の結合は伸長ポリグルタミン鎖によって増強された。

D. 考 察

本年度の研究の成果としては、ポリグルタミン病に共通する病態機序として、伸長ポリグルタミン鎖を有する変異タンパクの核移行と核内集積の重要性、核の機能障害として CREB-依存性転写の活性化阻害が見いだされたことである。CREB-依存性の転写の活性化は、神経細胞の生存維持、神経細胞の可塑性において重要な役割を演じていることが知られている。従って、CREB-依存性の転写の活性化に障害が生じると、神経細胞の生存維持、可塑性に重大な障害が生じる可能性が考えられる。伸長ポリグルタミン鎖による CREB-依存性の転写活性化の阻害は、レポーター遺伝子を用いた *in vitro* の実験によって示されたものであり、この CREB-依存性の転写活性化の障害が実際に、生体内で生じているかどうかについてはさらに、本研究で作成した DRPLA トランスジェニックマウス (Q129 マウス) を用いて検討する必要がある。

SBMA のモデル動物についての重要な発見は、全長のアンドロゲン受容体を用いたトランスジェニックマウスで、その表現型に著しい性差が認められたことである。このことは、伸長ポリグルタミン鎖を有する変異アンドロゲン受容体の核移行が宿主の性ホルモンに依存している可能性を示している。すなわち、テストステロンの存在が、SBMA の細胞障害を強くする方向で作用している可能性があり、この知見は SBMA の治療法として大きく

発展する可能性がある。

凝集体形成機構については、細胞側の反応として、HSP40/70 のシャペロン系が結合していること、これらシャペロン系が凝集体形成の抑制、細胞死抑制作用があることを示した。これらの結果は、伸長ポリグルタミン鎖による細胞障害に対して、分子シャペロンによる治療法開発への道を開くものである。

活性化型カスパーズ 8 に特異的な抗体を作成し、伸長ポリグルタミン鎖による細胞死の過程がカスパーゼ 8 を介することを明らかにした。DRPLA タンパクと相同性を持つ RERE については、両者が互いに結合している可能性が見いだされ、さらに両者の結合がポリグルタミン鎖の伸長によって増強したことから、DRPLA の病態機序に関わっている可能性が示唆される。

E. 結 論

本年度の研究において、重要な発見として、伸長ポリグルタミン鎖による細胞の機能障害に TAF130 と伸長ポリグルタミン鎖の結合、それによってもたらされる CREB-依存性転写活性化の阻害が関与している可能性を見いだした。この CREB-依存性転写活性化の阻害は、神経細胞の生存維持、可塑性に重大な障害をもたらす可能性があり、治療法開発の大きなターゲットになる。SBMA トランスジェニックマウスにおいては、その表現型に顕著な性差を認め、内分泌因子がその病態機序を修飾している可能性が考えられ、SBMA のまったく新しい治療法の開発に発展する可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y., Ishiguro, H., Sakoe, K., Ooshima, T., Sato, A., Ikeuchi, T., Oyake, M., Sato, T., Aoyagi, Y., Hozumi, I., Nagatsu, T., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Goto, J., Kanazawa, I., Davidson, I., Tanese, N., Takahashi, H. and

- Tsuji, S.: Expanded polyglutamine stretches associated with CAG repeat diseases interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nature Genet.* 26:29-35, 2000
- Yamada, M., Piao, Y.-S., Toyoshima, Y., Tsuji, S. and Takahashi, H. Ubiquitinated filamentous inclusions in cerebellar dentate nucleus neurons in dentatorubral-pallidoluysian atrophy contain expanded polyglutamine stretches. *Acta Neuropathol.* 99:615-618, 2000
- Yamada, M., Wood, J.D., Shimohata, T., Hayashi, S., Tsuji, S., Ross, C. A. and Takahashi, H.: Widespread occurrence of intranuclear atrophin-1 accumulation in the central nervous system neurons of patients with dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Ann. Neurol.* 49:14-23, 2001
- Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Lima, M., Zhou, Y.-X., Soong, B.-W., Watanabe, M., Giunti, P., Stevanin, G., Riess, O., Sasaki, H., Hsieh, M., Nicholson, G. A., Brunt, E., Higgins, J. J., Lauritzen, M., Tranebjaerg, L., Volpini, V., Wood, N., Ranum, L., Tsuji, S., Brice, A., Sequeiros, J. and Rouleau, G. A.: Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: A Worldwide haplotype study. *Am. J. Hum. Genet.* 68:523-528, 2001
- Doyu M, Sawada K, Mitsuma N, Niwa J, Yoshimoto M, Fujii Y, Sobue G, Kato K: Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. *Mol Brain Res*, in press
- Q Shanlou, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M: Differential effects of LAR on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant protein. *J Biol Chem.* in press
- McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, FischbeckKH: CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet.* 9: 2197-2202, 2000
- Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, 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.* 275: 8772-8778, 2000
- Wang, G-H., Sawai, N., Kotliarova, S., Kanazawa, I., Nukina, N. Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1795-1803 (2000).
- Jana, N-R., Tanaka, M., Wang, G-H., Nukina, N. Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2009-2018 (2000).
- Nagao, Y., Ishiguro, H., Nukina, N. DMSO and glycerol reduce bacterial death induced by expression of truncated N-terminal huntingtin with expanded polyglutamine tracts. *Biochim Biophys Acta* 1502, 247-256 (2000).
- Uchida, Y., Ito, S., Nukina, N. Sandwich ELSA for the measurement of Apo-E4 levels in serum and the estimation of the allelic status of Apo-E4 isoforms. *J. Clin. Lab. Anal.* 14, 260-264 (2000).
- Iwata, A., Miura, S., Kanazawa, I., Sawada, M., Nukina, N. α -synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J. Neurochem.* (in press).
- U, M., Miyashita, T., Ohtsuka, Y., Okamura-Oho, Y., Shikama, Y. and Yamada, M. Extended

polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death Differ.* (in press).

Shikama, Y., U, M., Miyashita, T. and Yamada, M. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of GFP-tagged eight apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.* (in press).

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-xL and promotes apoptosis. *Nature Cell Biol.* 2: 1-6, 2000.

Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C. and El-Deiry, W.S. Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60: 6318-6325, 2000.

Yanagisawa, H., Bundo, M., Miyashita, T., Okamura-Oho, Y., Tadokoro, K., Tokunaga, K. and Yamada, M. Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1433-1442, 2000.

宮下俊之, 鹿間芳明, 禹麻美. 特異抗体及び Green Fluorescent Protein によるアポトーシス関連蛋白の細胞内分布の解析. *Organ Biology* 7: 53-60, 2000.

宮下俊之. p53 とアポトーシス. *血液・腫瘍科* 41: 310-318, 2000.

宮下俊之. トリプレットリピート異常伸長とアポトーシス. (水野美邦 編) "アポトーシスと疾患、中枢神経系疾患編", 医薬ジャーナル社, 135-144, 2000.

2. 学会発表

辻 省次: Molecular mechanisms of neuronal dysfunctions in triplet repeat diseases. 滋賀医科大学分子神経科学研究センター第1回国際シンポジウム「神経難病の分子生物学」2000.10.2 大津

辻 省次: ポリグルタミン病の分子機構. 第73回日本生化学会大会ミレニアム・レクチャー, 2000.10.12, 横浜

辻 省次: ポリグルタミン病の分子病態機構. 関西医科大学 平成12年度「大学院企画セミナー」, 2000.10.13, 守口

S. Tsuji: Molecular pathogenesis of polyglutamine diseases. COE International Symposium on Molecular Bases of Neural Development and Neurodegenerative Diseases. (COE 国際シンポジウム「神経系の発生・分化と神経変性疾患の分子基盤」) 2000.11.30 Nagoya

Tanaka, M., Morishima, I., Nukina, N. Studies on sperm whale myoglobin mutants containing inserted glutamine repeats. P295 1064. 18th International Congress of Biochemistry and Molecular (Birmingham, 7.16-20, 2000).

Iwata, A., Miura, S., Kanazawa, I., Nukina, N. Alpha-synuclein associates with transcription factor Elk-1 in glial cytoplasmic inclusion of multiple system atrophy. *Brain Pathol.* 10, 522-523 C05-03 (2000). XIVth International Congress of Neuropathology (Birmingham, 9.4, 2000).

Mitsui, K., Jana, N.R., Kotliarova, S. E., Tanaka, M., Nukina, N. Intranuclear polyglutamine aggregate does not affect protein synthesis in hepatocyte primary culture from Tg61 transgenic mouse strain of Huntington's disease. *Society for Neuroscience Abstracts* P197 382.1 (2000). *Society for Neuroscience 30th Annual Meeting* (New Orleans, 11.6, 2000).

Nukina, N., Wang, G-H., Sawai, N., Kotliarova,

- S.E., Kanazawa, I. Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with two human homologues of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. Society for Neuroscience Abstracts P248 479.1 (2000). Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans, 11.7, 2000).
- Iwata, A., Nukina, N., Kanazawa, I. • -synuclein associates with transcription factor Elk-1 in glial cytoplasmic inclusion of multiple system atrophy. Society for Neuroscience Abstracts P298 578.11 (2000). Society for Neuroscience 30th Annual Meeting (New Orleans, 11.7, 2000).
- Nukina, N. Polyglutamine diseases: molecular model to animal model. Second Korea-Japan Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (Kyongyu, 11.20-21, 2000).
- 貫名信行. シンポジウム 2「痴呆性疾患の細胞障害分子機構」3) CAG repeat 病. -日本学術会議 50 周年シンポジウム-第 34 回 脳のシンポジウム シンポジウム 2-3) (東京, 3.19, 1999).
- 岩田 淳, 三浦聖子, 三井健一, 金澤一郎, 貫名信行. 多系統萎縮症(MSA)の Glial cytoplasmic inclusion (GCI)における Elk-1 の共存について. 第 41 回日本神経学会総会 III-H-14 (松本, 5.24, 2000).
- 貫名信行. ハンチントン病~CAG リピート病の分子病態. 第 15 回日本大脳基底核研究会 シンポジウム 2-3 (S-2-3) (霞ヶ浦, 7.14. 2000).
- 王 光輝, 澤井紀子, スペトラーナ コトリャローワ, 金澤一郎, 貫名信行. MJD1 遺伝子の産物である ataxin-3 は、酵母 DNA 修復蛋白質 RAD23 の 2 つのヒトホモログ HHR23A, HHR23B と結合する. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会 227 P-440 (横浜, 9.5, 2000).
- Miyashita, T., Shikama, Y., U, M. and Yamada, M: Expanded polyglutamine selectively interacts with caspase-8 at nuclear aggregates American Association of Cancer Research, Special Conference, Programmed Cell Death, 2000.2.27-3.1, Lake Tahoe, USA
- Subramanian, R., Chen, J., Zhang, L., Miyashita, T. and Fu, H: Interaction of 14-3-3 proteins with apoptosis signal-regulating kinase 1. Fourteenth Symposium of the Protein Society, 2000.8.5-9, San Diego, USA
- Shikama, Y., U, M., Miyashita, T. and Yamada, M: Subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight apoptosis-related caspases. Keystone Symposia, Molecular Mechanisms of Apoptosis, 2001.1.16-22, Keystone, USA
- Shikama, Y., Kawakami, H., Yamada, M. and Miyashita, T: Fiber Formation of Caspase-8 and -10 Prodomain Correlates with Binding to FADD and NF- κ B Activation. Molecular Basis of Immune Cell Activation and Immunological Disorders, 2001.2.15- 18, San Diego, USA
- 鹿間芳明, 宮下俊之: カスパーゼ 8 種の細胞内局在とアポトーシス誘導能の比較. 第 54 回小児血液・腫瘍懇話会, 2000.7.19, 東京
- 鹿間芳明, 宮下俊之, 山田正夫: GFP 融合蛋白を用いたカスパーゼの細胞内局在の検討. 第 59 回日本癌学会総会, 2000.10.4-6, 横浜
- 井上 仁, 武村晴行, 吉田 明, 河合泰一, 上田孝典, 宮下俊之: Pre-B 白血病細胞株由来 dexamethasone 耐性株 697/DR には bcl-2 過剰発現が関与する. 第 59 回日本癌学会総会, 2000.10.4-6, 横浜
- 於保祐子, 緒方幸恵, 宮下俊之, 山田正夫: DRPLA 蛋白の機能ドメイン. 日本人類遺伝学会第 45 回大会, 2000.10.25-27, 福岡
- 於保祐子, 緒方幸恵, 宮下俊之, 山田正夫: 53kDa インスリン受容体基質 (IRSp53) の機能. 第 23

回日本分子生物学会年会，2000.12.13-16，神戸

鹿間芳明，禹麻美，大塚裕子，米谷元邦，宮下俊之，山田正夫：カスパーセの細胞内局在とアポトーシス誘導能の検討，第23回日本分子生物学会年会，2000.12.13-16，神戸

禹麻美，於保祐子，石井雅巳，目黒裕子，油谷浩幸，宮下俊之，山田正夫：伸長したポリグルタミンによって発現の変化する遺伝子の解析，第23回日本分子生物学会年会，2000.12.13-16，神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

ポリグルタミン病における、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に結合する核内タンパクを検索し、伸長ポリグルタミン鎖が TAF130 と結合することを見いだした。この結合は、1. yeast two hybrid 法, 2. far-Western 法, 3. transient expression における凝集体への co-localization, 4. 剖検脳における神経細胞核内封入体の TAF130-immunoreactivity, 5. 免疫沈降による結合の確認, などの異なる方法で確認した。さらに、レポーター遺伝子を用いて、TAF130 が CREB-依存性転写活性化を強く阻害すること、TAF130 の共発現によりこの阻害が回復することを明らかにした。伸長ポリグルタミン鎖による細胞死についても、全長の TAF130 の共発現により緩和されることを明らかにした。CREB-依存性の転写の活性化は、神経細胞の生存維持、可塑性など、神経細胞の機能にとって重要な機能に関わっていることが示されており、伸長ポリグルタミン鎖と TAF130 の結合によって、神経細胞の重大な機能障害をもたらす可能性が示された。

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 9 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。昨年度までの本研究において、DRPLA の病態機序をよく反映するトランスジェニックマウス (Q129 マウス) を作成し、その解析結果から、次の点を明らかにした。1. 伸長したポリグルタミン鎖を有する変異タンパクの核移行と核内集積が広範囲に認められる。2. 核内凝集体の形成は核内集積に先立って現れる。3. 明らかな神経細胞の消失は認めず、細胞の機能障害が病態機序の本質である可能性が高い。以上の結果から、伸長ポリグルタミン鎖の核移行に伴って、核の機能障害をもたらされる可能性が高いと考えられる。この考え方によって、核内タンパク、特に転写因子に関連するタンパクの中に伸長ポリグルタミン鎖が結合するものがあるかどうかを検索した。その結果、TATA-binding protein-associated factor の一つである TAF130 が伸長ポリグルタミン鎖と結合し、CREB-依存性転写活性化を阻害することを明らかにした。

B. 研究方法

yeast two hybrid 法を用いて、転写因子関連タンパクが伸長ポリグルタミン鎖に結合するかどうかを検索した。yeast two hybrid 法によって結合が示されたタンパクについて、far-Western 法、免疫沈降法、transient co-expression により形成される伸長ポリグルタミン鎖を含む凝集体への co-localization について検討を加えた。TAF130 と伸長ポリグルタミン鎖の結合が、CREB-依存性転写の活性化に対して阻害作用があるかどうかを、5 つの GAL4-認識配列を有する GAL4-CREB 発現ベクター、野生型 PKA ベクター、RSV- β gal コントロールプラスミド、伸長ポリグルタミン鎖発現ベクター (huntingtin, DRPLA-タンパク, MJD1 タンパク, atrophin-2 タンパク) を 293 細胞に導入して解析した。伸長ポリグルタミン鎖による細胞死については、核の断片化により解析した。

C. 結果結果

yeast two hybrid 法により、伸長ポリグルタミン鎖が TATA-binding protein-associated factor (TAF130) と結合することが示された。この結合は、far-Western 法によっても確認され、TAF130 の C 末 1/4 と結合することが示された。次に、TAF130 と伸長ポリグルタミン鎖の結合を、transient expression に

よって形成される凝集体に TAF130 が co-localize するかどうかを検討した。全長の TAF130 と、truncate した huntingtin, DRPLA タンパク, MJD1 タンパク, atrophin-2 を co-transfection により COS7 細胞に同時に発現させると、伸長ポリグルタミン鎖によって形成される凝集体に TAF130 が co-localize することが示された。剖検脳において観察される神経細胞内核内封入体についても、TAF10-immunoreactivity が co-localize することが示された。また、この伸長ポリグルタミン鎖と TAF130 の結合は、免疫沈降法によっても証明することができた。

TAF130 は、基本転写因子(TFIID)に含まれる co-activator の一つで、CREB-依存性の転写活性化に関わっていることが示されている。伸長ポリグルタミン鎖に TAF130 が結合することにより、CREB-依存性転写活性化を阻害するかどうかを、レポーター遺伝子を用いて検討した。その結果、伸長ポリグルタミン鎖 (truncate した DRPLA タンパク) が、CREB-依存性の転写活性化を強く阻害することが示された。さらに、TAF130 をこのレポーターアッセイの実験系で同時に発現させると、伸長ポリグルタミン鎖によって阻害された CREB-依存性転写活性化が回復することが示された。

伸長ポリグルタミン鎖の発現による細胞死について、COS7 細胞, Neuro2a 細胞を用いて、核の断片化を指標に検討を行った。伸長ポリグルタミン鎖 (truncate した DRPLA タンパク) を発現させると、COS7 細胞では、 $39.3 \pm 5.5\%$ の細胞が核の断片化を示すのに対して、TAF130 を同時に発現させると、 $26.7 \pm 3.2\%$ にまで低下することが示された ($P < 0.05$)。同様に、Neuro2a 細胞では、伸長ポリグルタミン鎖の発現により $41.0 \pm 3.4\%$ の細胞で核の断片化が観察されるのに対して、TAF130 を同時に発現させると、 $23.4 \pm 2.3\%$ にまで低下することが示された ($P < 0.05$)。

D. 考察

本研究において、伸長ポリグルタミン鎖が TAF130 と結合することを見いだした。この結合は、1. yeast two hybrid 法, 2. far-Western 法, 3. transient expression における凝集体への co-localization, 4. 剖検脳における神経細胞核内封入体の TAF130-immunoreactivity, 5. 免疫沈降による結合の確認、

などの異なる方法で確認することができた。

TAF130 は基本転写因子(TFIID)に含まれる転写 co-activator の一つで、CREB-依存性の転写の活性化に関わっていることが知られている。レポーター遺伝子を用いる、CREB-依存性転写活性化のアッセイ系を用いて調べたところ、確かに伸長ポリグルタミン鎖の発現により CREB-依存性転写活性化が強く阻害されることが示された。さらに、全長の TAF130 を co-transfection により同時に発現させると、伸長ポリグルタミン鎖によって阻害されていたレポーター遺伝子の転写活性が、伸長ポリグルタミン鎖非存在下のレベルにまで回復することが示された。

伸長ポリグルタミン鎖の発現によって誘導される細胞死についても、COS7 細胞に加えて、神経系の培養細胞株である Neuro2a 細胞を用いて、全長の TAF130 の共発現が核の断片化を強く抑制することを見いだした。

CREB-依存性の転写の活性化は、神経細胞の生存維持、神経細胞の可塑性において重要な役割を演じていることが知られている。従って、CREB-依存性の転写の活性化に障害が生じると、神経細胞の生存維持、可塑性に重大な障害が生じる可能性が考えられる。

われわれの研究室で作成した DRPLA トランスジェニックマウス (Q129 マウス) において、失調、ミオクローヌス、てんかん、などの表現型が認められるにもかかわらず、明らかな神経細胞の消失を認めていない。さらに、核内凝集体は、表現型の出現よりも遙かに遅れて出現する。表現型の出現ともっともよく相関するのは、変異タンパクの核内集積である。このような観察から、ポリグルタミン病の病態機序の本質は神経細胞死ではなく、神経細胞の機能障害ではないかとする考えが示唆されていた。今回の研究結果で、伸長ポリグルタミン鎖が TAF130 と結合して CREB-依存性の転写活性化を阻害することを明らかにしたが、このことは、神経細胞の機能障害の実体が、核の機能障害、特に、CREB-依存性転写活性化を含む転写障害である可能性を示している。

伸長ポリグルタミン鎖による CREB-依存性の転写活性化の阻害は、レポーター遺伝子を用いた *in vitro* の実験によって示されたものであり、この CREB-依存性の転写活性化の障害が実際に、生体

内で生じているかどうかについてはさらに検討する必要である。われわれがこれまでに作成した DRPLA トランスジェニックマウス (Q129 マウス) は、この検証に最適のモデルであると考えられ、現在、DNA chip を用いた発現プロファイリングを行っており、CREB-依存性の転写活性化の阻害が *in vivo* で生じているかどうかを検証中である。

E. 結論

今回の研究によって、伸長ポリグルタミン鎖による細胞の機能障害の重要な機構が明らかにされただけでなく、その機能障害が TAF130 の共発現によって緩和できることが示されたことは、治療法開発の上で重要であると考えられる。最近の *inducible promoter* を用いたハンチントン病トランスジェニックマウスモデルの研究成果により、伸長ポリグルタミン鎖によって生じる神経細胞の機能障害や病理学的変化は可逆性のものであることが示されている。これらの研究成果から、ポリグルタミン病においては、不可逆的な神経細胞死ではなく、可逆的な神経細胞の機能障害が本質であると考えられ、従って、治療に反応する *time window* も大きいと考えられる。ポリグルタミン病の病態機序をよく反映する DRPLA トランスジェニックマウスの作成も完了しており、今回の成果を治療法開発に向けてさらに発展させていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y., Ishiguro, H., Sakoe, K., Ooshima, T., Sato, A., Ikeuchi, T., Oyake, M., Sato, T., Aoyagi, Y., Hozumi, I., Nagatsu, T., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Goto, J., Kanazawa, I., Davidson, I., Tanese, N., Takahashi, H. and Tsuji, S.: Expanded polyglutamine stretches associated with CAG repeat diseases interact with TAF1130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nature Genet.* 26:29-35, 2000

Yamada, M., Piao, Y.-S., Toyoshima, Y., Tsuji, S. and Takahashi, H. Ubiquitinated filamentous inclusions in cerebellar dentate nucleus neurons in dentatorubral-pallidolusian atrophy contain expanded polyglutamine

stretches. *Acta Neuropathol.* 99:615-618, 2000

Yamada, M., Wood, J.D., Shimohata, T., Hayashi, S., Tsuji, S., Ross, C. A. and Takahashi, H.: Widespread occurrence of intranuclear atrophin-1 accumulation in the central nervous system neurons of patients with dentatorubral-pallidolusian atrophy. *Ann. Neurol.* 49:14-23, 2001

Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Lima, M., Zhou, Y.-X., Soong, B.-W., Watanabe, M., Giunti, P., Stevanin, G., Riess, O., Sasaki, H., Hsieh, M., Nicholson, G. A., Brunt, E., Higgins, J. J., Lauritzen, M., Tranebjaerg, L., Volpini, V., Wood, N., Ranum, L., Tsuji, S., Brice, A., Sequeiros, J. and Rouleau, G. A.: Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: A Worldwide haplotype study. *Am. J. Hum. Genet.* 68:523-528, 2001

2. 学会発表

辻 省次: Molecular mechanisms of neuronal dysfunctions in triplet repeat diseases. 滋賀医科大学分子神経科学研究センター第1回国際シンポジウム「神経難病の分子生物学」 2000.10.2 大津

辻 省次: ポリグルタミン病の分子機構. 第73回日本生化学会大会ミレニアム・レクチャー, 2000.10.12, 横浜

辻 省次: ポリグルタミン病の分子病態機構. 関西医科大学 平成12年度「大学院企画セミナー」, 2000.10.13, 守口

S. Tsuji: Molecular pathogenesis of polyglutamine diseases. COE International Symposium on Molecular Bases of Neural Development and Neurodegenerative Diseases. (COE 国際シンポジウム「神経系の発生・分化と神経変性疾患の分子基盤」) 2000.11.30 Nagoya

G. 知的所有権の取得状況

なし

球脊髄性筋萎縮症の transgenic mouse model の作成と

臨床病理学的検索

祖父江 元 (名古屋大学医学部)

研究要旨

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(SBMA)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。また完全長 AR (97CAG リピート) を発現するトランスジェニックマウスの作成にも成功した。さらに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。また完全長 (97CAG リピート) を発現するマウスでは臨床症状、病理所見に性差が見られ、ホルモンによる治療効果を検討中である。

A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症(X-linked spinal and bulbar muscular atrophy;SBMA)は伴性劣性遺伝形式をとり、主に 40 歳以後に発症する運動ニューロン疾患である。臨床的には球症状、四肢近位筋優位の筋萎縮、筋力低下を示し、緩徐進行性の経過をたどる。この他に手指振戦、著明な線維束攣縮、感覚神経障害などの神経症状や女性化乳房など多彩な徴候を伴うことも知られている。生殖機能は低下しても軽度である。病理学的には脊髄前角細胞や舌下神経核、疑核、顔面神経核などの運動ニューロンに加え、一次感覚ニューロンも障害される。1991 年、アンドロゲン受容体(AR)遺伝子の第 1 エクソン内の CAG リピート数が本症で約 2 倍に異常延長していることが示された。この AR 遺伝子内 CAG 繰り返し部位の異常延長は、SBMA に特異的であり、リピート数と本症の発症年齢や重症度との間に相関がみられることから本症の原因と考えられている。しかし、この遺伝子産物と本症の関係は未だ明らかになっておらず、その解明が現在の最も重要な課題である。モデル動物の作製は、この問題を解明する上で重要な示唆を与えるものと考えられる。

本研究では、ヒトの AR 遺伝子プロモーターの調節下で、異常延長ポリグルタミン鎖 (239Q) を発

現するトランスジェニックマウスと β -actin プロモーターの下流に 97CAG リピートを持つ完全長 AR 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成した。

B. 研究方法

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。また完全長 AR (97CAG リピート) を β -actin プロモーターの調節下で発現させるトランスジェニックマウスの作成にも成功した。

C. 研究結果

1. 遺伝子分析

239Q トランスジェニックマウスについては、4 系統のトランスジェニックマウスを得た。Transgene の 239CAG リピートをはさんだ primer により、トランスジェニックマウスの ゲノム DNA で PCR を行い、全てのサンプルで予想された 1671bp のバンドが得られ、トランスジェニックマ

ウス のゲノム DNA において 239CAG リピートが保存されていることを確認した。サザンブ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。

一方 AR (97CAG リピート) のトランスジェニックマウスでは AR gene の発現が mRNA、蛋白レベルで確認された。

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、週齢が進むにつれて体重差が開いた。

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。うち一系統では、死亡時は運動機能が高度に低下し、食事が十分にとれない状態であった。

トランスジェニックマウスは発症すると動作が遅くなり、運動量が減り、歩行時や立ち上がったときに転倒した。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 をとると、トランスジェニックマウスでは、筋力低下のため足を引きずり、運動失調のため間隔が不規則であった。

一方、完全長 AR (97CAG リピート) のトランスジェニックマウスでは 3 系統で体重減少と運動能力の低下を示したが、いずれの系統も雄に臨床症状が重く、雌は軽症で明らかな性差が見られた。

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にみられ、このほかにグリア細胞にも認めた。一般臓器では皮膚に認められたが、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、精巣、胸腺、骨格筋、心筋などにはみられなかった。SBMA における核内封入体の臓器別の分布に比し、神経組織にグリア細胞も含めて、広範に核内封入体を認めた。FLAG と GFAP の二重染色では、核内封入体は GFAP 陽性細胞と共存しており、アストログリア内にも核内封入体が存在

していた。これらの封入体はユビキチン化されていた。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。

一方完全長 AR (97CAG リピート) マウスでは同様の AR からなる核内封入体を運動ニューロンを始め広範に認めたが、雄の出現頻度は雌の出現頻度に比べて明らかに高頻度であった。

D. 考察

SBMA は SCA-1、Huntington 病、DRPLA などと共に CAG 繰り返し領域の異常延長に起因すると考えられる疾患で、この異常が coding region の中に存在する点で共通している。さらに異常延長の程度やいずれもが転写活性調節にかかわる蛋白をコードしていると考えられている点も共通しており、おそらく共通する機序がこれらの疾患の発症にかかわっていると考えられる。SBMA のトランスジェニックマウスについても、全長の遺伝子を発現する transgene では表現型の出現には至らなかったため⁷⁾、ヒト AR プロモーターの調節下に 239 リピートのポリグルタミン鎖のみを発現させるトランスジェニックマウスを作成した。臨床的には筋力低下に加え、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、非常に重要と考えられる。病変分布の決定因子は未だ不明であるが、Huntington 病の全長遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスではヒトと似通った病変分布を示し、coding region に決定因子が存在することを示唆させる。今回作成したモデルでは AR 遺伝子のプロモーター領域のみを挿入したこと、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、非

常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。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。一方完全長の AR (97CAG リピート) を発現するトランスジェニックマウスは臨床症状、生存期間、体重減少さらに病理所見に明らかに性差が見られ、性ホルモンの影響が示唆された。現在ホルモンの治療の可能性について検討中である。

E. 結論

我々はヒト AR プロモーターと 239CAG リピートの組み合わせと完全長 AR (97CAG リピート) で各々 SBMA モデル動物作成に成功した。今後はさらに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、ホルモン治療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

Doyu M, Sawada K, Mitsuma N, Niwa J, Yoshimoto M, Fujii Y, Sobue G, Kato K: Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. **Mol Brain Res**, in press

Q Shanlou, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M: Differential effects of LAR on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant protein. **J Biol Chem**. in press

McC Campbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH: CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. **Hum Mol Genet**. 9: 2197-2202, 2000

Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, 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**. 275: 8772-8778, 2000

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

Sato T, Oyake M, Nakamura K, Nakao K, Fukushima 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, et al: Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients. **Hum Mol Genet**. 8: 99-106, 1999

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

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

Li M, Miwa S, Kobayashi Y, Merry DE, Yamamoto M, Tanaka F, Doyu M, Hashizume Y, Fischbeck KH, Sobue G: Nuclear inclusions of androgen receptor protein in

- spinal and bulbar muscular atrophy. **Ann Neurol**, 44: 249-254, 1998
- 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, Permutt M: A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). **Nature Genet**. 20: 143-148, 1998
- Abe Y, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Hirayama M, Kachi T, Sobue G: CAG repeat number correlates with the rate of brainstem and cerebellar atrophy in Machado-Joseph disease. **Neurology**. 51: 882-884, 1998
- Yamamoto M, Mitsuma N, Ito Y, Hattori N, Nagamatsu M, Li M, Mitsuma T, Sobue G: Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and GDNFR- α mRNAs in human peripheral neuropathies. **Brain Res**. 809: 175-181, 1998
- Hayakawa K, Itoh T, Niwa H, Mutoh T, 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 Res**. 794: 313-319, 1998
- Ito Y, Yamamoto M, Li M, Doyu M, Tanaka F, Mutoh T, Mitsuma T, Sobue G: Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR α , LIFR β , IL-6R α and gp130) in injured peripheral nerves. **Brain Res**. 793: 321-327, 1998
- Niwa H, Takeda A, Wakai M, Miyata T, Yasuda Y, Mitsuma T, Kurokawa K, Sobue G: Accelerated formation of N-(carboxymethyl) lysine, an advanced glycation end product, by glyoxal and 3-deoxyglucosone in cultured rat sensory neurons. **Biochem Biophys Res Commun**. 248: 93-97, 1998
- Sobue G, Yamamoto M, Doyu M, Li M, Yasuda T, Mitsuma T: Expression of mRNAs for Neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their Receptors (p75^{NGFR}, Trk, and TrkC) in Human Peripheral Neuropathies. **Neurochem Res**. 236: 821-829, 1998
- Itoh T, Niwa H, Nagamatsu M, Mitsuma T, Miyakawa A, Pleasure D, Sobue G: Nerve growth factor maintains regulation of intracellular calcium in neonatal sympathetic neurons but not in mature or aged neurons. **Neuroscience**. 82: 641-651, 1998
- Watanabe H, Tanaka F, Matsumoto M, Doyu M, Ando T, Mitsuma T, Sobue G: Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6. **Clin Genet**. 53: 13-19, 1998
- Ito Y, Tanaka F, Yamamoto M, Doyu M, Nagamatsu M, Riku S, Mitsuma T, Sobue G: Somatic mosaicism of the expanded CAG trinucleotide repeat in mRNAs for responsible gene of Machado-Joseph Disease (MJD), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), and spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). **Neurochem Res**. 23: 25-32, 1998
- Yamamoto M, Keller MP, Yasuda T, Hayasaka K, Ohnishi A, Yoshikawa H, Yanagihara T, Mitsuma T, Chance PE, Sobue G: Clustering of CMT1A duplication breakpoints in a 700 bp interval of the CMT1A - REP repeat. **Hum Mut**. 11: 109-113, 1998
- Nakayabu M, Miwa S, Suzuki M, Izuta S, Sobue G, Yoshida S: Mismatched nucleotides may facilitate expansion of trinucleotide repeats in genetic diseases. **Nucleic Acids Res**. 26: 1980-1984, 1998