

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

| 文献No | 課題番号 | | | |
|-----------|-------|---|-------|-----|
| 20000937A | 21008 | 血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発 | 加藤 久雄 | 1 |
| 938A | 21019 | 組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究 | 江崎 治 | 14 |
| 939A | 21045 | 慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用 | 斎藤 博久 | 18 |
| 940A | 21052 | 閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究 | 宮浦 千里 | 25 |
| 942A | 21067 | 細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発 | 渡辺 治雄 | 33 |
| 943A | 21073 | 脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発 | 内村 英幸 | 38 |
| 944A | 21079 | 疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用 | 松田潤一郎 | 46 |
| 945A | 21081 | 精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用 | 西川 徹 | 53 |
| 946A | 21086 | 新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析 | 鈴木 和男 | 60 |
| 948A | 21089 | 感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究 | 大川原明子 | 68 |
| 949A | 21092 | 生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用 | 西島 正弘 | 80 |
| 950A | 21096 | 免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御 | 田平 武 | 88 |
| 951A | 21102 | 移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究 | 木村 廣光 | 92 |
| 952A | 21104 | G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価 | 辻本 豪三 | 98 |
| 953A | 21107 | 難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究 | 藤本純一郎 | 111 |
| 954A | 21110 | 食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用 | 綱脇 祥子 | 118 |
| 955A | 21121 | 抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究 | 樋口 満 | 126 |
| 956A | 21130 | 神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析 | 桃井 隆 | 134 |
| 957A | 21142 | C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究 | 小長谷昌功 | 144 |
| 958A | 21150 | グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発 | 高坂 新一 | 149 |
| 959A | 21166 | 新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用 | 高橋 直之 | 160 |
| 960A | 21177 | コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索 | 松本 明世 | 167 |
| 961A | 21179 | 血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究 | 南野 直人 | 178 |
| 964A | 21215 | アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製 | 廣田 直美 | 183 |
| 965A | 21224 | ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発 | 湯尾 明 | 193 |
| 966A | 21225 | 癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索 | 松田 道行 | 200 |

| | | | | | |
|-----------|-------|-----------------------------------|-------|----|-----|
| 20000969A | 21228 | 細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索 | 上原 至雅 | …… | 204 |
| 968A | 21234 | スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発 | 望月 直樹 | …… | 208 |
| 969A | 21279 | 中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用 | 井上 和秀 | …… | 213 |
| 941A | 22055 | 宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用 | 高津 聖志 | …… | 221 |
| 949A | 22088 | ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究 | 水澤 英洋 | …… | 228 |
| 962A | 22183 | 炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用 | 清水 孝雄 | …… | 233 |
| 963A | 22194 | コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究 | 新井 洋由 | …… | 237 |

ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究

所 属 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態学教室
研究者 水澤英洋

分担研究者

| | |
|------|-------------------------------|
| 横田隆徳 | 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経機能病態学教室 |
| 清澤源弘 | 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科視覚応答調節学教室 |
| 内原俊記 | 東京都神経科学総合研究所神経病理部門 |
| 新井洋由 | 東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室 |

要旨

ビタミンE転送蛋白遺伝子の変異による脊髄小脳失調症症例の検索とそのノックアウトマウスを作製して臨床的・電気生理学的・神経病理学的検索を行い、このマウスが本症のモデルとして適切でビタミンE補充療が有効であることを世界で初めて明らかにした。

1. 研究目的

ビタミンEの欠乏には、吸収障害等による二次的なものと原因不明の一次性のものが知られており、神経系では脊髄後索の障害をきたしFriedreich病類似の失調症状を呈する。後者について、近年我々は、分担研究者の新井らが発見したビタミンE転送蛋白である α -tocopherol transfer protein (α TTP)の遺伝子変異によることを同定し、さらに網膜色素変性症をきたすことも明らかにするなど世界の最先端の研究を進めている。

本研究の目的は、 α TTPの遺伝子異常が神経細胞や網膜の障害をきたすメカニズムをヒト剖検組織やノックアウトマウスなどの動物モデルを作製して解析することと、そのシステムを用いてビタミンE補充療法の有効性の検討を行うことである。 α TTPの遺伝子異常によるビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症は多い疾患ではないと思われるが実態は不明であり、原因不明の網膜色素変性症患者の中にも本遺伝子変異を持つ者がある可能性もある。その治療研究に関しては我々のビタミンE補充療法の試みがあるのみであり、発症機序を解明しそれにもとづいた根本的治療法の早期開発が是非必要である。さらに、本症の発症機序の解明と治療法の確立は類似の臨床・病理所見を呈するFriedreich病はもとより、他の多くの脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の開発に大きく寄与することが期待される。

2. 研究方法

- 1) 得られたヒト剖検組織を用いて詳細な神経病理学的検索を行い、フレームシフト変異による外国例や二次的ビタミンE欠乏症、さらには臨床病理所見が類似しているFriedreich病との比較検討を行った。また、我々の症例で新しく見出された小脳病変につき、その発症機序を探るため酸化ストレスの指標であるadvanced glycation endproducts (AGE)と4-hydroxy-2-nonenal (4HNE)に対する特異抗体を用いた免疫組織化学的検索を行った。
- 2) 眼科学的研究として、本症にみられる網膜色素変性症について臨床的、病理学的にさらに詳細に検索を進めその発症機序を検討した。
- 3) 分担研究者の新井らによって樹立された α TTP遺伝子ノックアウトマウスについて、経時的に行動観察を行い失調症状を含む臨床症状を詳細に討した。その過程で明らかとなった不妊症については親マウスのみならず胎児も含めて検索した。また、病理変化が出現する前の機能的変化を検索するため電気生理学的検査として深部感覚障害の分析のためにマウスで体性感覚誘発電位を測定するシステムの開発を行った。いずれもさらに生化学的、神経病理学的解析を行った。次いで、ノックアウトマウスおよび野生型マウスをビタミンE欠乏食、過剰食または正常食で飼育し、行動解析とともに生後1年、および1年9ヶ月で神経病理学的にも検索しビタミンE補充による治療効果を検討した。

3. 研究成果

1) 我々の症例は、 α TTP遺伝子にHis101Glnのmissense点変異を有する本邦初の症例であり、世界で初めての剖検例である。症例は、52才時、四肢先端の知覚鈍麻と暗所での歩行時のふらつきで発症、後に構語障害も加わり次第に増悪した。62才時、彪紋状眼底、視野検査上での輪状暗点を指摘され、73才時、膵臓癌および肺炎による呼吸不全のため死亡した。神経病理学的には、とくに脊髄後索に有髄線維の減少と髄鞘の淡明化がみられた。小脳では軽度から中等度のプルキンエ細胞の脱落を認め、バルグマンガリアの増生を伴うも、病変の程度は一樣でなく、比較的良好に保たれている部位と、障害が目立つ部位が混在していた。Advanced glycation endproductsに対する抗体による免疫染色では残存プルキンエ細胞に陽性反応を認めた。一方、4-hydroxy-2-nonenalに対する抗体に対しては陽性反応がみられなかった。

2) 本症の網膜病変は病理学的に眼底後極部を中心とする色素上皮の障害が主で、ビタミンE欠乏食ラットの網膜病変と類似していた。臨床的には失調症状が出現する前に発現する事もあり網膜色素変性症のみの時でも積極的に α TTP遺伝子に検索を行う意義が認められた。

3) すでに報告したように、マウスの α TTPcDNAからターゲットイングベクターを作製し、ホモおよびヘテロの α TTP遺伝子ノックアウトマウスを作製することに成功した。ビタミンE欠乏食群、正常食群、過剰食群に分けて経時的に観察したが体重、脳重、外表所見には各群の間で有意な差異を認めなかった。 α TTPの発現量を抗 α TTPポリクローナル抗体で検出したところ、発現量は野生型：ヘテロ：ホモ=2：1：0で、確かにホモ欠損マウスでは α TTPが全く発現していないことが確認されたと同時に、ヘテロ欠損マウスでは野生型の約半分の α TTPが発現していることが明らかになった。表現型の検索では α TTP欠損マウスは不妊となることが明らかとなつたが、これは雌において胎児の吸収が生じるためであることが判明した。

行動解析では、生後1年頃より頭部のふるえや運動失調などの神経症状が出現し、進行性に増悪して1年6か月にはすべてのマウスに激しい頭部、体幹の振戦や歩行障害がみられた。振戦は安静時は明らかではないが、歩行時やストレスが加わるとより明らかとなった。歩行障害は小股歩行であることが足跡解析で明らかになり、加速度式回転車テストによりこの運動障害は定量的に記載され、このノックアウトマウスは臨床的にもヒトの疾患の適切なモデルであることが確認された。

電気生理学的検索では、座骨神経における末梢神経伝導機能は正常であったが、1次感覚領野から得られる体性感覚誘発電位は前足刺激、後足刺激ともに明瞭に低下しており、網膜電図では視細胞を起源とするa波、Muller細胞を起源とするb波ともにいずれの刺激強度においても著明にその振幅が低下していた。

眼の病理学的検索ではノックアウトマウスの網膜の外顆粒層と視細胞外節に高度、内顆粒層に軽度の萎縮を認める一方神経節細胞層、内網状層は比較的保たれていた。外顆粒層と視細胞外節にリポフスチンの沈着を認めた。神経病理学的には、まず脊髄後索に髄鞘の淡明化があり、後索核にはスフェロイド様の構造物がみられこれらの病変はグリオーシスを伴っていた。また、脊髄前角細胞や後根神経節細胞には多量のリポフスチンの沈着がみられた。

組織内ビタミンE濃度は、ノックアウトマウス群では血清、各脳組織いずれでも測定感度以下であった。ビタミンE過剰投与群では血清および α -TTPが発現していない心臓でビタミンEが正常範囲まで回復していたが、各脳組織では正常の1/5から1/10程度にしか回復しないことが明らかとなった。同時に測定した組織内の過酸化脂質濃度は、各脳組織いずれでもノックアウトマウスは野生型の1.5-2.0倍程度に上昇していた。

ビタミンEの過剰投与により、これらの歩行失調の出現が完全に抑制されるとともに、電気生理学的異常、神経病理学的異常、過酸化脂質の増加などがいずれも正常化しビタミンEの治療効果が証明された。また、不妊マウスではその生殖能力が完全に回復することが確認できた。

4. 考察

我々の α TTP遺伝子点変異ホモ接合体を有する症例の神経病理学的検索では、従来後天的ビタミンE欠乏症で報告された脊髄後索の変化に加えて、小脳プルキンエ細胞の脱落を認めた。今回免疫組織

化学的手法も加えた詳細な検討により酸化ストレスの指標であるadvanced glycation endproductsのプルキンエ細胞での沈着を認めた。このことはプルキンエ細胞の変性に酸化ストレスが関わっている可能性を示すとともに、酸化ストレスのもう一つの指標である4-hydroxy-2-nonenalは認められなかったことから本症に独特のメカニズムが存在する可能性がある。

網膜色素変性症の原因は様々であるが不明な場合も多い。その点で α TTP遺伝子異常が一つの原因と判明したことは大きな進展である。とくに、失調症状の発現前に視力障害が出現しうることが重要な知見であり、ノックアウトマウスでのビタミンEによる補充療法が失調症状や電気生理学的検査の異常などには有効であることから、本症の認識はきわめて重要である。

α TTP遺伝子ノックアウトマウスでは、ヒトのビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の場合と同様に血中ビタミンE値が検出限界以下にまで低下しており、このマウスはビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症のモデル動物としての必要条件を満たしている。さらに、約1年と長期間の経過観察を要するものの、本症の患者によく似た失調症状を呈し、電気生理学的検査所見、神経病理学的検査所見もヒト患者と同様であることが明らかとなり、このマウスがヒト疾患のモデルとして適切であることが確認された。しかも、これらの症状がビタミンEの過剰投与により予防可能であることも判明し、ヒト患者における早期診断と早期治療の重要性が裏付けられたといえる。

今後、さらに発症機序の詳細を明らかにし、治療開始時期、治療期間、投与量などを決定する必要がある。またビタミンE以外の治療法も検討することが可能となりつつあり重要な課題である。今回、判明したように酸化ストレスの亢進が本症一つのメカニズムであるが、類似の症候を呈するFriedreich病はもとよりアルツハイマー病、パーキンソン病あるいは筋萎縮性側索硬化症などヒトの神経変性疾患すなわち神経難病の多くはその病態として酸化ストレスの関与が想定されており、このマウスモデルはこれらの疾患の発症機序の解明と治療法の開発にも大いに役立つものと期待される。

5. まとめ

本年度は、 α TTP遺伝子点変異に起因するビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の神経病理学的検索をさらに進め、とくに従来の脊髄後索病変以外の小脳皮質の変性を見出しそこにおける酸化ストレスの関与の可能性を明らかにした。眼科的には網膜色素変性症患者における本症の重要性をさらに強調することができた。最も重要で特筆すべきことは、 α TTP遺伝子のノックアウトマウスの作製に成功し、雌に於ける不妊症に加え、生後約1年で失調症状や振戦を発現することが明らかになった。電気生理学的にも神経病理学的にもヒトの疾患にきわめてよく似ており、動物モデルとして適切であることが確認された。さらに重要なことはこれらの症状が充分量のビタミンEにより予防可能なことであり、ヒトの患者に於ける早期遺伝子診断と早期治療開始の重要性があらためて証明された。発症機序の完全な解明には今後も研究を続けなければいけないが、その一つとして酸化ストレスの亢進が証明されたことから、このノックアウトマウスモデルは酸化ストレスが病態に関与している他の神経難病の研究にも大いに役立つものと期待される。

6. 研究発表

- 1) Uchihara, T., Nakamura, A., Nagaoka, U., Yamazaki, M. & Mori, O. Dual enhancement of double immunofluorescent signals by CARD: participation of ubiquitin during formation of neurofibrillary tangles. *Histochem. Cell. Biol.* 114, 447-451 (2000)
- 2) Yaginuma, M., Ishida, K., Uchihara, T., Suzuki, F., Aoki, M., Tanaka, T., Murase, H., Ikeda, K. & Mizusawa, H. Paraneoplastic cerebellar ataxia with mild cerebello-olivary degeneration and an anti-neuronal antibody: a clinicopathological study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26, 568-571 (2000)
- 3) Takahashi, J., Fukuda, T., Tanaka, J., Minamitani, M., Fujigasaki, H. & Uchihara, T. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease with polyglutamine-immunoreactive inclusions. *Acta Neuropathol. (Berl)* 99, 589-94 (2000)

- 4) Koyano, S., Uchihara, T., Fujigasaki, H., Nakamura, A., Yagishita, S. & Iwabuchi, K. Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2. *Ann. Neurol.* 47, 550, 2000
- 5) Yokota, T., Uchihara, T., Kumagai, J., Shiojiri, T., Pang, J.J., Arita, M., Arai, H., Hayashi, M., Kiyosawa, M., Okeda, R. & Mizusawa, H. Postmortem study of ataxia with retinitis pigmentosa by mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 521-5 (2000)
- 6) Ohgami, N., Nagai, R., Miyazaki, A., Ikemoto, M., Arai, H., Horiuchi, S. & Nakayama, H. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* in press (2001)
- 7) Jishage, K., Arita, M., Igarashi, K., Iwata, T., Watanabe, M., Ogawa, M., Ueda, O., Inoue, K., Arai, H. & Suzuki, H. α -Tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblasts in mice. *J. Biol. Chem.* 276, 1669-1672 (2001)
- 8) Shibata, N., Arita, M., Misaki, Y., Dohmae, N., Takio, K., Ono, T., Inoue, K. & Arai, H. Supernatant protein factor (SPF), which stimulates the conversion of squalene to lanosterol, is a novel cytosolic squalene transfer protein and enhances cholesterol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 2244-2249 (2001)
- 9) Ohgami, N., Nagai, R., Ikemoto, M., Arai, H., Kuniyasu, A., Horiuchi, S. & Nakayama, H. CD36, a member of class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products (AGE). *J. Biol. Chem.* 276, 3195-3202 (2001)
- 10) Ikemoto, M., Arai, H., Fen, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M. & Inoue, K. Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 6538-6543 (2000)
- 11) Bae, K., Longobardi, L., Karasawa, K., Malone, B., Inoue, T., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K. & Lee, T.-C. Platelet-activating factor (PAF)-dependent transacetylase and its relationship with PAF acetylhydrolases. *J. Biol. Chem.* 275, 26704-26709 (2000)
- 12) Mizusawa, H., Ishii, T. & Bannai, S. Peroxiredoxin I (macrophage 23 kDa Stress Protein) is highly and widely expressed in the rat nervous system. *Neuroscience Letters* 283, 57-60 (2000)
- 13) Mitoma, H., Song, S.-Y., Ishida, K., Yamakuni, T., Kobayashi, T. & Mizusawa, H. Presynaptic impairment of cerebellar inhibitory synapses by an autoantibody to glutamate decarboxylase. *J. Neurological Sciences* 175, 40-44 (2000)
- 14) Toru, S., Murakoshi, T., Ishikawa, K., Saegusa, H., Fujigasaki, H., Uchihara, T., Nagayama, S., Osanai, M., Mizusawa, H. & Tanabe, T. Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters p-type calcium channel function. *J. Biol. Chem.* 275, 10893-10898 (2000)
- 15) Yang, Q., Hashizume, Y., Yoshida, M., Goto, Y., Mitsuma, N., Ishikawa, K. & Mizusawa, H. Morphological purkinje cell changes in spinocerebellar type6. *Acta Neuropathol.* 100, 371-376 (2000)
- 16) Nagaoka, U., Takashima, M., Ishikawa, K., Yoshizawa, K., Yoshizawa, T., Ishikawa, M., Yamawaki, T., Shoji, S. & Mizusawa, H. A gene on SCA4 locus causes dominantly inherited pure cerebellar ataxia. *Neurology* 54, 1971-1975 (2000)
- 17) Fujigasaki, H., Uchihara, T., Koyano, S., Iwabuchi, K., Yagishita, S., Makifuchi, T., Nakamura, A., Ishida, K., Toru, S., Hirai, S., Ishikawa, K., Tanabe, T. & Mizusawa, H.

Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. *Exp. Neurol.* 165, 248-256 (2000)

18) 水澤英洋. 脊髄小脳変性症. *Bio Clinica* 15, 33-37 (2000)

19) 水澤英洋. 遺伝性運動失調症の臨床. *神経研究の進歩* 44, 999-1007 (2000)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社