

錐体外路障害は表情の乏しさ以外認めない。

**脳神経** 眼底は萎縮性で、近視性の黄斑が疑われる。眼球運動：両側上直筋の不全麻痺、下直筋以外は他の眼筋も恐らく障害。両側の眼球突出。対光反射は減弱。顔面神経麻痺はないが、表情に乏しい。聴力は正常だが、前庭神経の興奮性が低下し、中枢性の障害がある。IX から XII 脳神経は正常

1943 年 8 月に死亡した。

**臨床診断** : Herédodégénération spinocérébelleuse

#### 剖検録の病理所見

萎縮は脳幹に目立つが、小脳は中程度。大脳レベルでは著変なし。脊髄：ハンマーやメスの傷があり切り出し法が大変悪い。脊髄は herédoataxie に特徴的でないにしても、前側索と辺縁部の硬化をみる。頸髄上部の標本では後索にも海綿状変化延髄の萎縮は他と比較するとほとんどない。延髄錐体は正常。restiforme body の海綿状変化（非常に萎縮性）。孤束核の萎縮。聴線条は異常なし。大脳：全体的な萎縮。しかし、特に橋底部に著しく、髄鞘の脱落が著しく進行している。全体に V 字状に変形しており、内側縦束は正常。A?? 異常なし。（診断を再考する程ではないが）脊髄小脳路の硬化の程度は極めて強いわけではない。この中等度の障害は系統を問わない脳幹の全体的な萎縮と対照的である。橋：同様に萎縮が強く、橋底部と橋小脳路の横走線維の淡明化（変性というよりもむしろ数の減少）。錐体路正常。橋正中部の近くに lacune 様で出血性の海綿状態がある。小脳白質は緻密だが、背側、外側では皮質下の淡明化があり一種の prelacune 様状態。歯状核の萎縮が強く、病変が著しい。細胞の脱落があり、

liquefaction, グリアの増生と *paleur de feutrage pericilliarie*。この病変は全体に脆く、上小脳脚の灰白質領域（赤核？）は淡明化し萎縮が強い。小脳：層状の萎縮があり、数の減少が顆粒細胞とプルキンエ細胞等異なる構成要素に中程度にみられる。全体的には、（小脳）皮質に層状にみられる一次性的萎縮が様々な脳幹諸核二次的に影響をおよぼしているという印象。とくに小脳と脳幹では系統性の萎縮が強調されている。錐体路が保たれ、脊髄小脳路の障害は腹側部に目立つことがなく、herédo-ataxie の診断を確かにする。

#### 考察と結論

##### 1 臨床所見のまとめ

常染色体優性遺伝に矛盾しない家族歴を背景に、34 歳ころ歩行障害で発症し、42 歳で死亡した。歩行と四肢の小脳失調に加え、経過中筋緊張、腱反射の亢進、表情の乏しさ、頭部の不随意運動、眼球突出、眼球運動障害、対光反射の減弱、中枢性の前庭神経障害、（近視性の）視力障害を認めた。

##### 2 病理所見のまとめ（現存標本にて確認できた所見）

脊髄小脳路が変性して、脊髄前側索は変性、萎縮。Clarke 柱と前角の変性が疑われる。下オリブ核は保たれる。橋の小脳白質の萎縮に比して、小脳皮質の変化が軽い。小脳歯状核の変性。黒質と動眼神経核の変性。淡蒼球内節のグリア増生をみる。

3 本例は臨床的には MJD の type 2 に矛盾せず、病理所見は MJD/SCA3 に一致するが、既知の spinocerebellar ataxia の諸疾患とは明らかに異なる。

4 本例を MJD/SCA3 とするには分子遺伝学的検索が不可欠である。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症における核内蓄積変異蛋白質の  
分解に関する動物モデルの作成

分担研究者 山田 光則 新潟大学脳研究所 病理学分野  
共同研究者 稲永 親憲、高橋 均 同上

研究要旨 下オリーブ核の肥大反応に伴い神経細胞核内に蓄積した伸長ポリグルタミン（PolyQ）鎖が減少する可能性を、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）剖検脳に見出した。DRPLA トランスジェニックマウスに下オリーブ核肥大を実験的に作成し、神経細胞核内の伸長 PolyQ 鎖の染色性低下を再現し得た。また、この実験系で核内封入体の形成も抑制された。

A. 研究目的

我々は、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）では下オリーブ核を含む広範な領域の神経細胞核に伸長ポリグルタミン（PolyQ）鎖が高頻度に蓄積することを以前に報告した。この検索過程で下オリーブ核肥大を呈する症例を見出し、肥大部位の神経細胞核が選択的に PolyQ 陰性であることを発見した。神経細胞の肥大反応が二次的に蓄積 PolyQ 鎖の分解に働いた可能性を想定し、DRPLA トランスジェニック（TG）マウスで同現象の再現を試みた。

B. 研究方法

1. 当脳研究所に保管されている DRPLA 剖検脳 19 例を対象に、下オリーブ核肥大の頻度と分布を解析した。また、肥大反応を呈する症例について、延髄のパラフィン切片を伸長 PolyQ 鎖に対する抗体（1C2、Chemicon 社、16,000 倍希釈）で免疫染色した。

本研究のヒト剖検脳組織は、死体解剖保存法に基づき遺族の承諾を得た病理解剖例を対象とした。

2. 下オリーブ核肥大の実験的作成：DRPLA TG マウス（Sato, Am J Hum Genet, 65: A30, 1999）ならびに non-TG マウスを対象とし、エーテル吸入による深麻酔下にバイポーラ凝固装置でマウスの左小脳半球を焼却した。術後はマウス用ケージ内で自由行動にて飼育した。経時的にマウスをホルマリンで灌流固定し、下オリーブ核の変化を観察した。また、脳のパラフィン切片を、伸長 PolyQ 鎖、atrophin-1、ユビキチンそれぞれに対する抗体を用いて免疫染色した。

動物実験は新潟大学動物実験指針ならびに日本実験動物学会：動物実験に関する指針に準拠し行った。

## C. 研究結果

1. 下オリーブ核の肥大は DRPLA 剖検脳 19 例中 2 例に認められ、いずれも若年型症例であった。肥大反応は両側の下オリーブ核内に巣状多発性に生じていた。いずれの症例でも、神経細胞核における伸長 PolyQ 鎖のびまん性陽性像は非肥大部位には高頻度に認められたが、肥大部位では減弱ないし陰性であった。

2. TG および non-TG マウスとも、片側下オリーブ核の神経細胞に肥大反応を惹起することができた。肥大反応は可逆的であり、小脳破壊後約 2 週目から 6 ヶ月目位まで明瞭に観察された。肥大側、非肥大側で神経細胞の atrophin-1 の染色性に差は認められず、また、神経細胞脱落は生じなかった。

Q76 リピート TG マウスでは、下オリーブ核神経細胞における伸長 PolyQ 鎖の核内蓄積は生後約 1 年以降徐々に生じたが、核内封入体は形成されなかった。生後約 2 年の高齢 TG マウスを用いた実験で、術後 5、10 週に肥大側での核内伸長 PolyQ 鎖の免疫染色性が低下した。

Q129 リピート TG マウスは生後 4 週で、下オリーブ核を含む広範な領域の神経細胞に伸長 PolyQ 鎖の核内蓄積が生じ、9 週以降、核内封入体が形成された。マウスは 16 週までに死亡するため生後 8 週に手術し観察したところ、術後 4~7 週で伸長 PolyQ 鎖の核内免疫染色性に差は指摘し得なかったが、核内封入体形成が肥大側で抑制された。

## D. 考察

神経細胞における核内封入体形成はポリ

グルタミン病の病態の本質に関連した組織変化である。一方、我々は神経細胞核内における伸長 PolyQ 鎖のびまん性蓄積に注目し、DRPLA 剖検脳における広範囲、高頻度の出現から、DRPLA の多彩な臨床症状に関連している可能性が高いことを提唱した。さらに、TG マウスの解析からびまん性蓄積が核内封入体形成に先行する病変であり、この段階でマウスが発症することから、病的意義としての重要性を指摘した。

DRPLA TG マウスを用いた今回の実験から、下オリーブ核の肥大反応によって、封入体形成が抑制されること、また、核内に蓄積した伸長 PolyQ 鎖が減少することが示された。この結果はポリグルタミン病の病態に関連する二つの核内現象が、神経細胞の内在性反応機構によって制御しうる可能性を示唆している。本実験のアイデアがヒト DRPLA 剖検脳における現象に基づいていることから、実験結果の分子メカニズムがヒトでも生じている可能性が高い。下オリーブ核における神経細胞肥大反応の分子機構は現在全く未解明であることから、今後、発現遺伝子の解析から上記反応に関わる分子の究明が必要である。

## E. 結論

ヒト DRPLA 剖検脳で、核内に蓄積した伸長 PolyQ 鎖が下オリーブ核神経細胞の肥大反応で分解除去される可能性が示唆され、DRPLA TG マウスで実験的に再現された。また、この肥大反応は核内封入体形成を抑制した。

## F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada M, Hayashi S, Tsuji S, Takahashi H. Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathologica*, 101:140-144, 2001

Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Interference by huntingtin and atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, 291:2423-2428, 2001

Takahashi H, Egawa S, Piao YS, Hayashi S, Yamada M, Shimohata T, Oyanagi K, Tsuji S. Neuronal nuclear alterations in dentatorubral-pallidoluyasian atrophy: ultrastructural and morphometric studies of the cerebellar granule cells. *Brain Research*, 919:12-19, 2001

Yamada M, Sato T, Shimohata T, Hayashi S, Igarashi S, Tsuji S, Takahashi H. Interaction between Neuronal Intranuclear Inclusions and Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear and Coiled Bodies in CAG Repeat Diseases. *American Journal of Pathology*, 159:1785-1795, 2001

## 2. 学会発表

山田 光則、下畑 享良、佐藤 俊哉、辻 省次、高橋 均

CAG リpeat病における神経細胞核内封入体：PML nuclear body の関与に伴う形態変化

第42回日本神経病理学会、東京、2001

山田 光則、下畑 享良、佐藤 俊哉、辻 省次、高橋 均

CAG リpeat病における神経細胞核内封入体は coiled body に接して存在する

第42回日本神経病理学会、東京、2001

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究  
分担研究者 山田正夫 国立小児病院小児医療研究センター 先天異常研究部

研究要旨

いくつかの神経変性疾患は、各責任遺伝子の翻訳領域に位置する CAG リピートの伸長が発症要因である。CAG リピート伸長によって神経細胞が死に至る分子機構と、疾患毎に特定領域を中心に神経変性死が生じる分子機構を解析する。また CAG リピート病の 1 つである歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の責任遺伝子の機能について解析する。伸長グルタミン鎖を持つ蛋白質を誘導的に強発現できる系を構築し、凝集体形成とアポトーシス誘導を解析してきたが、本年度、DNA チップを用いて転写レベルが変動する遺伝子群を解析した。DRPLA 蛋白質と会合する IRSp53 の機能について解析を進め、アクチン繊維の重合に関与し、神経軸索突起形成に関与することを明らかにした。また IRSp53 の局在が神経細胞死の生じる部位を決定するという報告が他研究室からなされたが、IRSp53 には多数のアイソフォームが存在することを見出し、それぞれについての局在を解析する必要があることを指摘した。

A. 研究目的

これまでに少なくとも 8 種類の神経変性疾患で、各責任遺伝子の翻訳領域に位置する CAG リピートが伸長すると発症することが明らかとなっている。疾患責任遺伝子研究から得られたこの結果によつて的確な診断が可能となったが、患者に利益を還元したわけではない。CAG リピート伸長によって神経細胞が死に至る分子機構と、疾患毎に脳の特定領域を中心として神経細胞死が生じる分子機構を解明して、将来の治療法の開発を目指す必要がある。責任遺伝子産物の機能の解明も、神経細胞死の組織特異性解明に重要であり、CAG リピート病の 1 つである歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)遺伝子の機能について解析する。

B. 研究方法

(1) 培養細胞で、伸長グルタミン鎖を持つ蛋白質を強発現させ、あるいは条件的に強発現させ、生じる凝集体とアポトーシス過程や、他遺伝子の転写レベルでの変動を解析する。

- (2) DRPLA 遺伝子の正常機能の解析を目的に、DRPLA と高い相同性を持つ RERE 遺伝子や、DRPLA 産物と会合するインスリン受容体チロシンキナーゼ基質 IRSp53 を単離してきた。それらの機能について、培養細胞系を用いて解析する。
- (3) 試験管内反応によってポリグルタミンの化学的性質を解析する。

(倫理面での配慮)

既に確立されたクローンを使用した試験管内実験であり、本研究課題では患者から採取した検体を使用しないので、倫理の問題に該当しない。

C. 研究結果

(1) 伸長グルタミン鎖を持つ蛋白質（あるいはペプチド鎖）を GFP（あるいはその他のタグ）との融合型として、条件的に発現できる細胞株を得た。伸長グルタミン鎖を強発現すると、凝集体が形成され、アポトーシスが誘導されたが、正常範囲内の繰返し数を持つグルタミン鎖は、アポトーシス

を誘導しないし、また凝集体も形成しなかった。この系を用いてアポトーシスの素過程を解析し、早期に caspase8 と 10 が、次に caspase3 が活性化されることを見出した。顕微鏡下で観察できる凝集体形成あるいはその核内移行に先立って、アポトーシス反応が進行していることが示され、凝集体形成より、凝集性あるいはマイクロ凝集体形成が重要であると結論した（昨年度までに報告済、発表論文 1）。

(2) ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞は神経的な性質を有し、NGF 添加によって神経突起様構造を形成する。PC12 細胞でグルタミン鎖誘導発現実験系を構築した。NGF 添加後、正常範囲および伸張グルタミン鎖（19 と 56 回）を誘導発現させたところ、GFP-Q19 は細胞全体にびまん性に発現したのに対し、GFP-Q56 は主として核に凝集体を形成した。発現誘導の前後で RNA を抽出し、DNA チップ（Affymetrics, RatGenome U34A, B, C）を用いて遺伝子の発現プロフィールを解析した。GFP-Q19 の発現では転写レベルに変動が無く、GFP-Q56 の発現によって転写レベルが減少した遺伝子（一部 EST を含む）は 67 種、増加した遺伝子は 75 種認められた。これらを候補として、定量的 RT-PCR、さらに抗体が入手可能な場合には蛋白質の変化を解析した。我々のチップでの結果は、定量的 RT-PCR などの再検査で必ずしも再現性は高くなかったが、しかし、いくつかの変動する遺伝子を同定できた。これら転写レベルが変動する遺伝子を総括できるような顕著な群は見出せなかった。

(3) DRPLA 産物と会合する蛋白の 1 つとして、インスリン/IGF-1 受容体であるチロシンキナーゼの基質となる IRSp53 を同定した（既報告）。インスリン/IGF-1 は神経栄養因子でもあり、神経変性疾患と神経栄養因子との関連を示唆する点で重要である。従来から、IRSp53 は神経突起の形成に関与することが示唆されていたが、最近の研究から、IRSp53 は Rac と WAVE をつなげる因子であり、膜の Ruffling を制御していることが報告された（Miki et al.）。また、ラット脳での IRSp53 の局在部位は、歯状核赤核淡

蒼球ルイ体萎縮症の患者で選択的に障害を受ける脳の部位に一致するとの報告もされた（Thomas et al.）。我々は、ヒト IRSp53 には少なくとも 4 種類のアイソフォーム（L, S, T, 58）が存在することを見出した。各アイソフォームは N 末側 511 残基が共通で、C 末側の数～十数個のアミノ酸残基を異にするだけである。各アイソフォームは選択的スプライスによって形成されると推定した。HeLa 細胞に各アイソフォームをトランスフェクトした細胞系では、インスリン刺激によって L と S アイソフォームがリン酸化されたが、T アイソフォームはリン酸化されず、一方、IGF-1 刺激によって T アイソフォームはリン酸化されたが L と S アイソフォームがリン酸化されたが、L と S アイソフォームはリン酸化されなかった。次に、各アイソフォームを特異的に認識する抗体を作成し、アイソフォームごとの組織分布をラットで解析した。共通する 511 残基部位を認識する抗体では、53, 58, および 73kDal に及ぶ様々なサイズの産物を検出した。一般に、中枢神経系で多量の産物を検出したが、他の広範な組織でも少量の産物を認めた。中枢神経系では主として L と S アイソフォームが存在した。中枢神経系以外の組織では、LST のいずれも検出せず、またサイズが異なることから、別のアイソフォームである可能性が示差された。これらの結果は、各アイソフォームの C 末端の数アミノ酸残基が各種の制御を行っていることを示す。（発表論文 2） また IRSp53 の発現部位と歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の患者で選択的に障害を受ける脳の部位に一致するか否かは、アイソフォームごとの詳細な解析が必要であることを示している。

#### 引用文献

Miki et al. Nature 408, 732-735, 2000.  
Thomas et al. NeuroSci Lett 309, 145-148, 2001.

#### E. 結論

伸長グルタミン鎖を持つ蛋白質を強発現させるとアポトーシスが誘導され、このときに caspase8 と 10 が重要な役割をすること

を示した。神経細胞死の分子機構を推定するためのモデルとなるばかりでなく、治療法開発のターゲットにもなりうると考える。また DRPLA 産物の機能について解析し、特に、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の患者で選択的に障害を受ける脳の部位の決定におけ分子機構の手がかりを得た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. M. U, T. Miyashita, Y. Ohtsuka, Y. Okamura-Oho, Y. Shikama & M. Yamada. Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death and Differ.*, 8, 377-386, 2001.
2. Y. Okamura-Oho, T. Miyashita & M. Yamada. Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 289, 957-960, 2001.
3. Y. Shikama, M. U, T. Miyashita and M. Yamada. Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp. Cell Res.*, 264, 315-325, 2001.
4. M. U, T. Miyashita, Y. Shikama, K. Tadokoro & M. Yamada. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic BCL-2 family. *FEBS Lett.* 509, 135-141, 2001.
5. S. M. Cuddeback, H. Yamaguchi, K. Komatsu, T. Miyashita, M. Yamada, C. Wu, S. Singh & H-G. Wang. Molecular cloning and characterization of Bif-1: A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J. Biol. Chem.*, 276, 20559-20565, 2001.
6. M. Kosuga, S. Takahashi, A. Tanaka, M. Fujino, X.-K. Li, S. Suzuki, M. Yamada, K. Kakishita, F. Ono, N. Sakuragawa & T. Okuyama. Widespread distribution of adenovirus-transduced monkey amniotic epithelial cells after local intracerebral injection: Implication for cell-mediated therapy for lysosome storage disorders. *Cell Transplant.*, 10, 435-439, 2001.

7. M. Kosuga, K. Sasaki, A. Tanabe, X-K. Li, H. Okawa, I. Ogino, O. Okuda, H. Arai, N. Sakuragawa, Y. Kamata, N. Azuma, S. Suzuki, M. Yamada & T. Okuyama. Engraftment of genetically-engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Therapy*, 3, 139-148, 2001.

8. Y. Kamata, T. Okuyama, M. Kosuga, A. O'hira, A. Kanaji, K. Sasaki, M. Yamada & N. Azuma. Adenovirus-mediated gene therapy for corneal clouding in mice with mucopolysaccharidosis type VII. *Mol. Therapy*, 4, 307-312, 2001.

### 2.学会発表

18 件

詳細は省略

## G. 知的所有権の取得状況

無し。

Ataxin-3 の機能と Machado-Joseph 病に選択的な細胞死の解析

分担研究者 西澤 正豊 国際医療福祉大学臨床医学研究センター教授

研究要旨

Machado-Joseph 病に特異的な系統変性の発症機序を解明するため、原因遺伝子産物である ataxin-3 蛋白の機能を解析した。ataxin-3 には multi-coiled-coil 領域が存在し、それ自身および C 末領域と相互作用することを two-hybrid 法により確認した。ataxin-3 はこれらの相互作用と、核内外への移行シグナルの働きにより蛋白の立体構造や細胞内局在を換えることができる。C 末領域は trans Golgi network に局在する  $\gamma$ -adaptin と共発現するが、今回 two-hybrid 法により、C 末領域と相互作用する蛋白を新たに 2 つ同定した。1 つは  $\gamma$ -adaptin と相互作用する蛋白として同定されている  $\gamma$ -synergin であり、もう 1 つはアクチンに結合する MacMARCKS である。これらの蛋白との相互作用と ataxin-3 の機能についてさらに検討している。

A. 研究目的

Machado-Joseph 病 (MJD) は世界的にも本邦でも最も頻度の高い優性遺伝性小脳変性症であり、原因遺伝子 MJD1 の翻訳領域に存在する CAG リピートの伸長によるポリグルタミン病の 1 つである。MJD 発症機序の解明には、ポリグルタミン病に共通する発症機構と共に、MJD に選択的な系統変性を生じる機構を解明する必要がある、この特異性は MJD1 の遺伝子産物である ataxin-3 蛋白が担っていると考えられる。我々は ataxin-3 の機能解析を行うことにより、MJD に選択的な系統変性の発症機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

これまでの研究から、ataxin-3 にはポリグルタミン鎖の他にいくつかの機能的配列が存在していることを明らかにしてきた。すなわち、核内外への移送に関与するシグナル配列、蛋白間・蛋白内の相互作用に関与すると考えられる multi-coiled-coil 領域、およびゴルジ装置への局在と tubulin との相互作用に関与する C 末領域 (319-360 残基) である。これらの領域間での直接的な相互作用を、*E. coli* を用いた two-hybrid 法により確認した。

さらに、C 末領域と相互作用する蛋白を単離する目的で、C 末領域を bait vector に組み込み、胎児脳 library (pTRG-fetal brain) をスクリーニングした。C 末領域に結合する遺伝子の塩基配列を決定するとと

もに、GFP、またはDsRedとの融合蛋白としてC末領域と共にCOS細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内局在を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞に遺伝子断片を導入してその発現様式を解析するものであり、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者への不利益、危険性の排除、インフォームドコンセントの関わる状況、実験動物に対する動物愛護上の配慮などに関する倫理的な問題は発生しないと判断している。

### C. 研究結果

これまでの研究から我々は、multi-coiled-coil領域がataxin-3のC末領域が形成する核周囲の凝集体、および伸長したポリグルタミン鎖が形成する核内凝集体とそれぞれ共存することを明らかにしてきた。two-hybrid法による解析からも、multi-coiled-coil領域はそれ自身、およびataxin-3のC末領域とそれぞれ直接に相互作用することが確認された。

Ataxin-3のC末領域と相互作用する蛋白として、今回新たに2つの遺伝子を単離した。塩基配列のホモロジー解析から、1つは $\gamma$ -synerginであることが判明した。この $\gamma$ -synerginをataxin-3のC末領域と共にCOS細胞に発現させると、C末領域によって核周囲に形成される凝集体と $\gamma$ -synerginが共存することを確かめた。

もう1つの蛋白は、細胞骨格蛋白と相互

作用する蛋白として同定され、MARCKSファミリーに属するMacrophage-enriched myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MacMARCKS)であることが判明した。これらの他にもいくつかの遺伝子が単離されており、現在その解析を進めている。

### D. 考察

今回確認したataxin-3のmulti-coiled-coil領域とC末領域、およびmulti-coiled-coil領域同士の相互作用は、ataxin-3蛋白のコンフォメーションに影響すると考えられる。さらに、このような相互作用はmulti-coiled-coil領域とポリグルタミン鎖の間に位置する核内移行シグナル、およびC末領域の末端に位置する核外移行シグナルの機能発現にも影響を及ぼすと想定される。

C末領域と相互作用する蛋白として同定された $\gamma$ -synerginは、 $\gamma$ -adaptinと同様にtrans Golgi network (TGN)に局在する蛋白である。ataxin-3のC末領域は $\gamma$ -adaptinと共存することを昨年度に報告したが、その $\gamma$ -adaptinと相互作用する $\gamma$ -synerginが単離されたことにより、ataxin-3は $\gamma$ -synerginとの相互作用を介して、TGNに局在している可能性が示唆される。

もう1つC末領域と相互作用するMacMARCKSは、アクチンとの結合部位をもち、microtubuleとの相互作用が示唆されている蛋白である。ataxin-3が核周囲に集

積するためにはC末領域が必要であり、集積した凝集体は抗 tubulin 抗体により染色されるので、C末領域は MacMARCKS 蛋白を介して、tubulin と相互作用している可能性が示唆される。

最近他のポリグルタミン病においても、核内のみならず、細胞質内にも凝集体が見出され、原因蛋白と細胞骨格系との相互作用が報告されている。Ataxin-3 は核内外への移行シグナルによって細胞内でその局在を変化させ得る蛋白であり、さらに介在する蛋白を介してゴルジ装置や microtubule と相互作用をしていると考えられる。

#### E. 結論

MJD の原因遺伝子産物である ataxin-3 分子には、他の蛋白と相互作用する領域や核内外への局在シグナルが存在している。今回新たに ataxin-3 のC末領域と相互作用する蛋白を2つ同定した。これらの蛋白を

介して、ataxin-3 はゴルジ装置および tubulin 系と相互作用していると考えられる。

(共同研究者：迫江公巳、永木洋后、滝山嘉久、嶋崎晴雄、滑川道人 (自治医科大学神経内科))

#### F. 研究発表

##### 2. 学会発表

迫江公巳、滝山嘉久、永木洋后、嶋崎晴雄、滑川道人、中野今治、西澤正豊：Ataxin-3 の機能 domain と細胞死誘導の検討. 第42回日本神経学会総会、東京、5. 11. 2001

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

## ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析

分担研究者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科 教授

**研究要旨** 近年、種々の神経変性疾患において、変性しつつある神経細胞内に異常蛋白の凝集物や形態的に類似する空胞がかなり普遍的に存在することが判明し、神経が変性・消失する過程には、似通った分子機構が存在するという考えが広まってきた。我々は、異常タンパク質を高発現させると細胞質に空胞化が引き起こされること、細胞内での異常タンパク質蓄積を感知するセンサータンパク質として AAA ATPase ファミリーに属する VCP/p97 を同定したことで、VCP のセカンド ATP 結合領域に変異を導入した変異 VCP タンパク質を過剰発現させると異常蛋白を発現させた時に認められる空胞と同様な空胞化が起こり、続いて細胞死が引き起こされることを見いだした。

### A. 研究目的

我々は、これまでに神経難病 Machado-Joseph 病(MJD)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。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 の繰り返しが共通にポリグルタミンリピートに翻訳される。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。この結果は、ポリグルタミンが神経変性を引き起こす起因物質であることを示すとともに、全長蛋白から、伸長したポリグルタミンを含む部分蛋白質が切り出

されることが、神経変性の第1ステップになることを示唆しており、我々は、この考えを「プロセッシングモデル」として提唱してきた。

本研究では、ポリグルタミンによる神経細胞変性に関わる蛋白質の生化学的な同定と解析を目的とした。

本研究は、培養細胞を用いた研究であり、倫理的な問題点は極めて低い。

### B. 研究方法

培養細胞から、79 リピートのポリグルタミンを含む MJD 蛋白と結合する蛋白質を精製し、その cDNA をクローニングして、その分子の神経変性疾患における役割を分子レベルで解析した。

### C. D. 研究結果と考察

ポリグルタミン病をはじめとする様々な神

経変性疾患において、神経細胞の脱落、変性蛋白の蓄積、細胞質の空胞化などの病理像が共通に認められる。筆者らは、これらの知見から、神経変性疾患には共通の分子メカニズムが存在すると考えてきた。この考えに基づくと、共通する分子メカニズムの第一段階に関与するはずの分子として、神経細胞には変性蛋白を認知するセンサータンパク質が存在すると仮定した。そこで、そのような変性タンパク質のセンサータンパク質の存在を念頭に置き、79 リピートに伸長したポリグルタミンを含む MJD タンパク質(MJD79)をモデルとして、MJD79 と結合するタンパク質が存在する可能性を検討した。その結果、調べた限りの培養細胞株において、MJD79 とは強く、正常範囲の 35 リピートをもつ MJD35 とは弱く共沈降する分子量約 100kDa のタンパク質が存在することが判明した。このタンパク質を MJD79 タンパク質を用い、細胞抽出液からアフィニティ精製することに成功し、PIP-1 (polyglutamine-interacting protein 1)と名付けた。精製した PIP-1 のトリプシン分解産物に対してマスアナリシス法および蛋白シーケンスを行ったところ PIP-1 は VCP/p97 という名前でも報告されていた AAA ATPase ファミリーのタンパク質であった。

ノーザンブロットで調べた限り、PIP-1/VCP/p97 は、ユビキタスに発現するタンパク質で、中枢神経系でも、すべての領域に発現していた。これは、このタンパク質が潜在的に中枢神経のすべての領域で、異常タンパク質の認知に関与し得ることを示している。そこで、PIP-1/VCP タンパク質に対する抗体を作成し、PIP-1/VCP と種々の疾患で認められる変性タンパク質との細胞内での局在を調べた。その結果、PIP-1/VCP は、ハンチントン病やMJD

の核内封入体や別の神経変性疾患に認められる Lewy 小体との共局在が確認され、実際複数の神経変性疾患で、病因と考えられている変性蛋白を認識し、結合していることが判明した。

培養神経細胞で、内在性の PIP-1/VCP を免疫組織科学的に染めると、PIP-1/VCP は、核から細胞質にかけてほぼ一様に存在している。そこにポリグルタミンを発現させ、凝集体を形成されると、PIP-1/VCP が凝集体に集積してくる像がとらえられた。このとき、細胞内に多くの空胞が形成されていることに気づいた。また、培養細胞をプロテアゾーム阻害剤で処理すると、細胞内にアグレオゾームと呼ばれる変性タンパク質の塊が生じることが報告されているが、このプロテアゾーム阻害剤によって生じるアグレオゾームにも PIP-1/VCP が集積してくることが判明した。この場合には、ポリグルタミンを発現させたときよりも、さらに大きい空胞が、細胞質全体にわたって形成されることが観察された。

VCP には、ATP 結合領域が2カ所存在し、また、おおよそその高次構造が X 線解析で解かれており、6量体を形成する。我々がおこなった PIP-1/VCP の欠失変異体の解析で MJD79 との相互作用には、PIP-1/VCP の N-末近傍の領域が必須であることが判明した。これらの点は、PIP-1/VCP を変性タンパク質に対するセンサーとした場合、以下のような新しい可能性を連想させるものである。すなわち、VCP 6量体は異常タンパク質を認識する部位を6ヶ所内在しており、6つの場所がどれだけ異常タンパク質で占拠されているかを自分自身で認知することによって、異常タンパク質の濃度を感知しうる可能性がある。これは、今までの受容体がりガンドを認識する方法とし

て知られているものとは全くことなる、新しいセンサータンパク質の作用機序であり、今後の証明が待たれる。

では、PIP-1/VCP が異常タンパク質と結合した結果、PIP-1/VCP にどのような変化が生じるのであろうか？いろいろな場所に変異を導入した VCP 変異体の発現実験から、VCP の2つ目の ATP 結合領域の変異体を細胞に発現させると、細胞質に巨大な空胞を形成した後、細胞死を誘導することを見出した。

## E. 結語

VCP は、いろいろな異常タンパク質を認識する分子であるだけでなく、その結果、ATPase 活性に変化が生じ、種々の神経細胞変性における空胞変性・神経細胞死などの病態に深く関与する分子であると考えられた。これらの観察事項から、筆者らは、VCP を *Vacuole Creating Protein* と呼ぶことを提唱している。今後、神経変性疾患における VCP の役割を詳細に解明することで、神経変性疾患に共通する分子メカニズムの解明に貢献できると期待している。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

1) Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., & Kakizuka, A. Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* (in press), 2002

2) Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., & Kakizuka, A. Unequal crossing-over in unique PABP2 Mutations: a possible cause of oculopharyngeal muscular

dystrophy. *Archives Neurology* (in press), 2002

3) Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A. H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S., & Kakizuka, A. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 8: 977-984, 2001

4) Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K., & Kakizuka, A. Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. *Cell Death Differ.* 8: 871-873, 2001

5) Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., & Fujita, T. Initial process of polyglutamine aggregate formation in vivo. *Genes Cells*, 6:887-897, 2001

6) Maeda, H., Hori, S., Nishitoh, H., Ichijo, H., Ogawa, O., Kakehi, Y., & Kakizuka, A. Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 61: 5432-5440, 2001

## G. 知的所有権の取得状況

特になし

---

## IV 研究成果の刊行に関する一覧表

---

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表業績 : 著者氏名・発表論文名・学協会誌名・発表年・(西暦)・巻号(最初と最後の頁)

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(2):523-528, 2001

Yamada, M., Hayashi, S., Tsuji, S. and Takahashi, H.: Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol.* 101:140-144, 2001

Shimohata, T., Onodera, O. and Tsuji, S.: Expanded polyglutamine stretches lead to aberrant transcriptional regulation in polyglutamine diseases. *Human Cell* 14(1):17-25, 2001

Nakamura, K., Jeong, S.E., Uchihara, T., Anno, M., Nagashima, K., Nagashima, T., Ikeda, S., Tsuji, S. and Kanazawa, I.: SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Human Molecular Genetics* 10(14): 1441-1448, 2001

Adachi, N., Arima, K., Asada, T., Kato, M., Minami, N., Goto, Y., Onuma, T., Ikeuchi, T., Tsuji, S., Hayashi, M. and Fukutani, Y.: Dentatorubral-Pallidoluysian Atrophy (DRPLA) presenting with psychosis. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 13:258-260, 2001

Date, H., Onodera, O., Tanaka, H., Iwabuchi, K., Uekawa, K., Igarashi, S., Koike, R., Hiroi, T., Yuasa, T., Awaya, Y., Sakai, T., Takahashi, T., Nagatomo, H., Sekijima, Y., Kawachi, I., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Fukuhara, N., Saito, K., Sugano, S. and Tsuji, S.: Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nature Genetics* 29: 184-188, 2001

Ozawa, T., Okuizumi, K., Ikeuchi, T., Wakabayashi, K., Takahashi, H. and Tsuji, S.: Analysis of the expression level of  $\alpha$ -synuclein mRNA using postmortem brain samples from pathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 102: 188-190, 2001

Yamada, M., Sato, T., Shimohata, T., Hayashi, S., Igarashi, S., Tsuji, S. and Takahashi, H.: Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. *American Journal of Pathology* 159(5): 1785-1795, 2001

Ozawa, T., Soma, Y., Yoshimura, N., Fukuhara, N., Tanaka, M. and Tsuji, S.: Reduced morning cortisol secretion in patients with multiple system atrophy. *Clinical Autonomic Research* 11(4): 271-272, 2001

Tanaka, M., Tanaka, K., Nakano, R., Inuzuka, T., Tsuji, S., Shinozawa, K., Kojo, T., Matsui, T., Kumamoto, T. and Suzumura, A.: HLA antigens in Japanese patients with anti-Hu antibodies. *Neurology* (in press)

Takahashi T., Igarashi S., Kimura T., Hozumi I., Kawachi I., Onodera O., Takano H., Saito M. and Tsuji S.: Japanese cases of familial hemiplegic migraine with cerebellar ataxia carrying a T666M mutation in the CACNA1A gene. (in press)

下畑享良, 辻 省次:トリプレットリピート病の最前線. *分子細胞治療* 2(1):56-61, 2001

辻 省次:歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症. *内科* 87(4):682-685, 2001

辻 省次:歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症. *臨床神経学* 40(12):1287-1289, 2001

原 賢寿、小野寺理、辻 省次:脊髄小脳変性症の遺伝子診断。小児科診療64(10):(65) 1505-(71)1511, 2001

辻 省次:神経変性疾患の克服への展望 careからcureへ。実験医学19(17): 2256-2258, 2001

五十嵐修一、天谷信忠、辻 省次:候補遺伝子アプローチによるポリグルタミン病遺伝子の検索。蛋白質核酸酵素46(16): 2295-2298, 2001

高橋哲哉、五十嵐修一、辻 省次:家族性片麻痺性偏頭痛。CLINICAL CALCIUM 11 (11),68(1460)-71(1463) 2001

辻 省次:遺伝子検査。ダイナミック神経診断学。西村書店、新潟、pp.664-673(732), 2001

辻 省次:脊髄小脳変性症。看護のための最新医学講座。中山書店、東京、pp.313-319 (646), 2002

Yabe I, Sasaki H, Yamashita I, Tashiro K, Takei A, Suzuki Y, Kida H, Takiyama Y, Nishizawa M, Hokezu Y, Nagamatsu K, Oda T, Ohnishi A, Inoue I, Hata A: Predisposing chromosome for spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) in Japanese. *J Med Genet* 38: 328-333, 2001

Namekawa M, Takiyama Y, Sakoe K, Shimazaki H, Amaike M, Niijima K, Nakano I, Nishizawa M: A large Japanese SPG4 family with a novel insertion mutation of the SPG4 gene: a clinical and genetic study. *J Neurol Sci* 185: 63-68, 2001

Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Amaike M, Nagaki H, Namekawa M, Sasaki H, Nakano I, Nishizawa M: Meiotic instability of the CAG repeats in the SCA6/CACNA1A gene in two Japanese SCA6 families. *J Neurol Sci* 185: 101-107, 2001

Namekawa M, Takiyama Y, Ando Y, Sakoe K, Muramatsu S, Fujimoto K, Nishizawa M, Nakano I: Choreiform movements in spinocerebellar ataxia type 1. *J Neurol Sci* 187: 103-106, 2001

Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S: Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 29: 184-188, 2001

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

Takashima M., Ishikawa K., Nagaoka U., Shoji S., Mizusawa H.: A linkage disequilibrium at the candidate gene locus for 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia type III in Japan. *Journal of Human Genetics* 46:167-171, 2001

水澤英洋: 遺伝性脊髄小脳変性症. (杉田秀夫、福内靖男、柴崎 浩、平井俊策、山口武典、金澤一郎、田代邦雄、糸山泰人、小林祥泰、祖父江 元 編集) 先端医療シリーズ14. 神経・筋疾患神経・筋疾患の最新医療、先端医療技術研究所; 169-174, 2001

水澤英洋: 脊髄小脳変性症. (中井利昭、奈良信雄、登 勉、野村文夫、舩渡忠男、川上康 編集) 遺伝子検査早わかり事典、中外医学社; 70-71, 2001

水澤英洋: 脊髄小脳変性症 . *BIO Clinica* 15 : 33-37 , 2000

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

水澤英洋: What can we see in a single picture? <SCA6>. *Brian Medical* 12:5-7, 2000

石川欽也, 融衆太, 水澤英洋: 脊髄小脳失調症6型. *Clinical Neuroscience* 18: 50-53, 2000

水澤英洋: イオンチャンネル病と発作性神経疾患-発作性神経筋疾患を見たらイオンチャンネル病を疑う-. *医学のあゆみ* 193 : 575-580, 2000

水澤英洋: 脊髄小脳変性症とCaチャンネル異常 . *脳と神経* 53 : 14-24 , 2001

石川欽也, 水澤英洋: 脊髄小脳失調症6型. *Clinical Calcium* 11 : 59-63, 2001

富満弘之, 水澤英洋: 反復発作性失調症2型. *Clinical Calcium* 11 : 64-67 , 2001

水澤英洋: Spinocerebellar ataxia type 6 . *内科* 87: 678-681 , 2001

水澤英洋: 《神経・筋》脊髄小脳変性症. *内科* 87(6) : 1488-1492 , 2001

水澤英洋: 脊髄小脳変性症? -SCA6, その他-. *最新医学* 56: 67-71, 2001

Higashiyama H., Hirose F., Yamaguchi M., Inoue Y., Fujikake N., Matsukage A., & Kakizuka A. Identification of ter94 , *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* (in press), 2002

Nakamoto M., Nakano S., Kawashima S., Ihara M., Nishimura Y., Shinde A., & Kakizuka A. Unequal crossing-over in unique PABP2 Mutations: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Archives Neurology* (in press), 2002

Hirabayashi M., Inoue K., Tanaka K., Nakadate K., Ohsawa Y., Kamei Y., Popiel A. H., Sinohara A., Iwamatsu A., Kimura Y., Uchiyama Y., Hori S., & Kakizuka A. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 8: 977-984, 2001

Yamamoto Y., Hasegawa H., Tanaka K., & Kakizuka A. Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. *Cell Death Differ.* 8: 871-873, 2001

Kimura Y., Koitabashi S., Kakizuka A., & Fujita T. Initial process of polyglutamine aggregate formation in vivo. *Genes Cells*, 6:887-897, 2001

- M. U, T. Miyashita, Y. Ohtsuka, Y. Okamura-Oho, Y. Shikama & M. Yamada. Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death and Differ.*, 8, 377-386, 2001.
- Y. Okamura-Oho, T. Miyashita & M. Yamada. Distinctive tissue distribution and phosphorylation of IRSp53 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 289, 957-960, 2001.
- Yamada M, Hayashi S, Tsuji S, Takahashi H. Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathologica* 2001;101:140-144
- Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Interference by huntingtin and atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 2001;291: 2423-2428
- Takahashi H, Egawa S, Piao YS, Hayashi S, Yamada M, Shimohata T, Oyanagi K, Tsuji S. Neuronal nuclear alterations in dentatorubral-pallidoluysian atrophy: ultrastructural and morphometric studies of the cerebellar granule cells. *Brain Research* 2001;919:12-19
- Yamada M, Sato T, Shimohata T, Hayashi S, Igarashi S, Tsuji S, Takahashi H. Interaction between Neuronal Intranuclear Inclusions and Promyelocytic Leukemia Protein Nuclear and Coiled Bodies in CAG Repeat Diseases. *American Journal of Pathology* 2001; 159:1785-1795
- Shiga Y., Tsuda T., Itoyama Y., Shimizu H., Miyazawa K., Jin K and Yamazaki T.: Transcranial magnetic stimulation alleviates truncal ataxia in spinocerebellar degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2002) 72: 124-126
- Abe T., Abe K., Tsuda T., Itoyama Y. and Tamai M.: Ophthalmological findings in patients with spinocerebellar ataxia type 1 are not correlated with neurological anticipation. *Graef's Arch Clin Exp Ophthalmol* (2001) 239: 722-728
- Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K: Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias. triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol* 102: 149-152, 2001
- Fujigasaki H, Uchihara T, Takahashi J, Matsushita H, Nakamura A, Koyano S, Iwabuchi K, Hirai S, Mizusawa H: Preferential recruitment of ataxin-3 independent of expanded polyglutamine: an immunohistochemical study on Marinesco bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 518-520, 2001
- Shimohata T, Sato A, Burke JR, Strittmatter WJ, Tsuji S, Onodera O.: Expanded polyglutamine stretches form an "aggresome". *Neurosci Lett.* (in press)
- Nozaki K, Onodera O, Takano H, Tsuji S.: Amino acid sequences flanking polyglutamine stretches influence their potential for aggregate formation. *Neuroreport*. 2001 Oct 29;12(15):3357-64.
- Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S. : Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet.* 2001 Oct;29(2):184-8.

原 賢寿, 小野寺 理, 辻 省次 : 脊髄小脳変性症の遺伝子診断, 小児科診療 2001 Oct 1;64(10):1505-1511

Nagaya M, Kachi T, et al. Effect of swallowing training on swallowing disorders in Parkinson's disease. Focus on Parkinson's disease. 13:10-11,2001.

Nishimura M, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Kuno S, Kaji R, Nakamura S. Influence of interleukin-1beta gene polymorphism on age-at-onset of spinocerebellar ataxia 6(SCA6) Neurosci Lett. 2001 13;307(2): 128-30.

Modulation of event-related potentials in normal human subjects by visual divided attention to spatial and color factors. Neurosci Lett 2001 311:198-202.

Yamazaki T, Kamijo K, Kinuya T, Takaki Y, Kuroiwa: Multiple dipole analysis of visual event-related potential during oddball paradigm with silent counting. Brain Topography 2001 13:161-168.

Yamazaki T, Kamijo K, Kinuya T, Takaki Y, Kuroiwa, Ochi A, Otsubo H: PC-based multiple equivalent current dipole source localization system and its applications. Res Adv in Biomedical Eng 2001 2:97-109.

Kamitani T, Kuroiwa Y, Wang L, Li M, Suzuki Y, Takahashi T, Ikegami T, Matsubara S: Visual event-related potential changes in two subtypes of multiple system atrophy, MSA-C and MSA-P. J Neurol 2002 249: in press.

Sakai T: Effects of tetrahydrobiopterin on ataxia in Machado-Joseph disease may be based upon the theory of "cerebellar long-term depression". Medical Hypotheses. 2001;57(2); 180-182.

Sakai T, Antoku Y, Koike F, Tanaka K, Matsuishi T, Yamada S: A therapeutic strategy for spinocerebellar ataxias. I. An open trial with tetrahydrobiopterin in Machado-Joseph disease: An anti-ataxic drug. J.Neurol.Sci. 2001;187(S);S514.

Sakai T: A therapeutic strategy for spinocerebellar ataxias.II.Tetrahydrobiopterin treatment may give a clue to the therapeutic strategy for spinocerebellar ataxias. J.Neurol.Sci. 2001;187(S); S514.

Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M, Sobue G. Progression and prognosis in multiple system atrophy: An analysis of 230 Japanese patients. Brain. 2001, in press.

渡辺宏久, 平山正昭, 祖父江 元: 多系統萎縮症. 神経・筋疾患の最新治療. 先端医療医学研究所, 2001, p.161-168

渡辺宏久, 道勇 学, 饗場郁子, 寺尾心一, 加知輝彦, 齋藤由扶子, 満間照典, 祖父江 元 : 多系統萎縮症の臨床縦断像の解析 第41回日本神経学会総会 松本 2000. 5. 臨床神経学 40: 1407, 2000

Ikeda K, Kubota S, Isashiki Y, Eiraku N, Osame M, Nakagawa M.: Machado-Joseph disease with retinal degeneration and dementia. Acta Neurologica Scandinavica 2001;104: 402-405

Isashiki Y, Ohba N, Nakagawa M, Izumo S. Optic neuropathy and cerebellar ataxia associated with a rare missense variation (A14510G) of mitochondrial DNA. *British J Ophthalmol* 2001;85:1009-1010

Isashiki Y, Kii Y, Ohba N, Nakagawa M. Retinopathy associated with Machado-Joseph disease (spinocerebellar ataxia 3) with CAG trinucleotide repeat expansion. *Am J Ophthalmol* 2001;131:808-810

Okamoto Y, Mitsuyama H, Jonosono M, Hirata K, Arimura K, Osame M, Nakagawa M. Autosomal dominant palatal myoclonus and spinal cord atrophy. *J Neurol Sci* (in press)

Mori M., Adachi Y., Kusumi M., Nakashima K. A genetic epidemiological study of spinocerebellar ataxias in Tottori prefecture, Japan. *Neuroepidemiology* 20:144-9,2001

Mori M., Adachi Y., Kusumi M., Nakashima K. Spinocerebellar ataxia type 6: Founder effect in Western Japan. *J. Neurol. Sci* 185: 43-47, 2001.

Mori M., Adachi Y., Mori N., Kurihara S., Kashiwaya Y., Kusumi M., Takeshima T., Nakashima K. Double-blind crossover study of branched-chain amino acid therapy in patients with spinocerebellar degeneration. *J. Neurol. Sci*: in press.

神経・筋ネットワークにおけるCreutzfeldt-Jakob病入院診療の現状と問題点、医療, 川井充、中島孝、湯沢龍彦 第55巻 第10号:516-519 H13.10.20

統計学的脳血流SPECTを用い、鑑別診断の有用性を検討したパーキンソニズムの2例" 臨床と薬物治療 中島孝、亀井啓史 Vol.20 No.7:740-744 2001年7月

マシャド・ジョセフ病における臨床症状と123I-IMP SPECT所見の評価について、臨床神経学(印刷中), 林恒美、中島孝、福原信義

A patient homozygous for the SCA6 gene with retinitis pigmentosa. *Clin Genet* (in press), Fukutake T, Kamitukasa I, Arai K, Hattori T, Nakajima T

K. Ishikawa, K. Owada, K. Ishida, H. Fujigasaki, M. Shun Li, T. Tsunemi, N. Ohkoshi, S. Toru, T. Mizutani, M. Hayashi, N. Arai, K. Hasegawa, T. Kawanami, T. Kato, T. Makifuchi, S. Shoji, T. Tanabe, H. Mizusawa: Cytoplasmic and nuclear polyglutamine aggregates in SCA6 Purkinje cells. *Neurology* 56:1753-1756,2001.

T Yokoyama, J-i Kusunoki, K Hasegawa, H Sakai, S Yagishita :Distribution and dynamic process of neuronal cytoplasmic inclusion (NCI) in MSA: A correlation of the density of NCI and the degree of involvement of the pontine nuclei. *Neuropathology* 21:145-154,2001

Takahashi J, Tanaka J, Arai K, Funata N, Hattori T, Fukuda T, Fujigasaki H, Uchihara T. Recruitment of nonexpanded polyglutamine proteins to intranuclear aggregates in neuronal intranuclear hyaline inclusion disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60(4): 369-376

Isono S, Shiba K, Yamaguchi M, Tanaka A, Hattori T, Konno A, Nishino T. Pathogenesis of laryngeal narrowing in patients with multiple system atrophy. *J Physiol* 2001; 536(1): 237-249

Fukutake T, Shinotoh H, Nishino H, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Hattori T. Homozygous Machado-Joseph disease presenting as REM sleep behaviour disorder and prominent psychiatric symptoms. *Eur J Neurol* 2002; 9: 97-100