

視覚性事象関連電位から見た MSA-C と MSA-P の共通点と相違点: 他系統萎縮症(MSA)の診断における連続性の確認

黒岩義之  
神谷俊明, 林栄子, 宮崎秀健, 波木井靖人,  
児矢野繁, 鈴木ゆめ  
横浜市立大学 医学部神経内科

視覚始動性認知課題(オドボール課題)に対する右手のボタン押し運動が、小脳とどのような関連を示すかを 50 歳以上の健康人で検討した。反応時間の標準偏差と変動係数を測定した。一方、sagittal スライスでの小脳 MRI 容積比を求めた。小脳 MRI 容積比と反応時間の標準偏差・変動係数との間の相関を検討した結果、有意な相関が得られた。特に左小脳半球の MRI 容積比との相関が高かった。また、男女に層別して相関を解析すると、男性よりも女性の方で、左小脳半球の MRI 容積比と反応時間の変動との相関が高かった。小脳は運動機能の調節に深く関与しており、小脳が障害されることにより運動の実行が不正確になると考えられる。認知活動に伴うボタン押し運動に関与するのは左小脳半球であるとするからの研究結果と我々の結果は矛盾しない。小脳性運動失調ならびに運動学習記憶障害を、非侵襲的、定量的、かつ簡便に測定しうる「ノートパソコンを用いる生理検査」を考案したので、これについても予報的に報告した。

#### 多系統萎縮症の長期臨床経過の解析

神田武政  
川田明広, 磯崎英治, 須田南美, 飛澤晋介,  
加藤修一, 林 秀明  
東京都立神経病院 神経内科

多系統萎縮症(MSA)患者死亡例 37 例(男性 17 例, 女性 20 例, 含剖検例 32 例)を対象とし、MSA の長期臨床経過を解析した。自律神経障害に加え小脳症状を主体とする MSA-C は 21 例, Parkinsonism を主体とする MSA-P は 16 例であった。死亡した全 MSA の平均発症年齢は 54.2 歳(39 ~ 71 歳), 以下の事象までの平均経過年数は、①車椅子使用開始(5.1 年), ②膀胱留置カテーテル導入(6.5 年), ③経管栄養導入(7.1 年), ④寝たきり(7.5 年), ⑤気管切開(7.8 年), ⑥死亡(10.2 年, 気切例 12.5 年, 非気切例 8.1 年)で、②と④のみ MSA-P が MSA-C より有意に短かった。頭部 MRI, OKP は異常検出率が高く, Caloric test は眼振の明所開眼固視での抑制消失後増強が平均 7.6 年後から高率にみられた(51.4%)。死因は気切前は声帯麻痺, 誤嚥, 嚥下性肺炎を含む突然死, 気切後は無呼吸に至る中枢性呼吸障害, 突然死, 肺炎が多く, 自律神経障害が予後に大きく関与していた。

脊髄小脳変性症の臨床評価方法の整備および大規模臨床治験の方向性の検討

服部孝道  
新井公人, 桑原 聡, 小河原一恵  
金井数明, Sung Jia-Ying  
千葉大学医学研究院神経病態学

本研究班班員に International cooperative ataxia rating scale (ICARS) の再評価、標準化に関するアンケートを行い、11 名から回答を得た。歩行能力の段階分けが多い一方で、姿勢・歩行の総点が少ないこと、上肢の企図振戦や動作時振戦の項が過剰であること、錐体外路系、自律神経系、ADL 評価を加えた重症度評価尺度を作成する必要があることが指摘された。さらに臨床評価方法の設定に関連して、Machado-Joseph 病 (MJD) 患者に対するタルチレリン水和物の効果を ICARS を用いて判定した。投与群 13 名の運動失調は、非投与群 7 名に比し 6~18 ヶ月目まで有意に軽度であり(p<0.05)、ICARS は薬物効果判定に有用と思われた。MJD に対しては、今後有痛性筋攣縮に対する塩酸メキシレチンの大規模臨床治験を行う予定であり、医師主導の治験について予備調査を行った。

## ALD症例のMRIセントラルレビュー

加藤俊一  
東海大学総合医学研究所  
柳町徳春  
東海大学医学部放射線診断科

本研究班ではALDの病態解明と病態の客観的評価法の統一を目的として昨年度からALD患者のMRIのセントラルレビューを開始した。

本年度は東海大学において全国のALD症例のMRIを読影して、Loes score を付けた。対象は14例で、MRIは合計68回の撮影分を検討した。観察期間は移植前から、移植後最短2カ月から最長5年であった。

Loes score 採点に際して画像評価のばらつきの原因となるものとして、①画像に由来するもの(体動、シーケンス、filming や copy の条件等)、②観察者によるもの(retrospective な観察によるバイアス、限局性萎縮の評価等)、とが考えられた。

これらのばらつきは内在するものの Loes score はALDの脳病変の評価方法として有用であると結論づけられたが、施設間、読影者間のばらつきを少なくするためのセントラルレビューは必要であると考えられる。

## 本邦に於ける小児大脳型 ALD 例での造血幹細胞移植後のMRI変化についての検討

辻 省次  
東京大学大学院医学系研究科神経内科学

昨年度の『副腎白質ジストロフィーの治療法開発のための臨床的及び基礎的研究班』において、小児大脳型ALD(CCALD)に対する造血幹細胞移植(HSCT)の有効性をLoes score を用い、MRI の central review にて検討した。本年度はより客観的に評価するため、独立した3名のreviewerによる評価を加えた。Cronbach 係数を用い評価者間変動を検討した。Loes score の各項目でCronbach 係数は高値を示し、尺度としても適切で、また評価者間変動も小さいと考えられた。次に、2者のscoreを元に、各症例毎の経時的経過を検討した。Loes score の変化率はHSCT後、徐々に低下し、移植後1.5年以降はMRI上の変化はほぼ停止することを明らかとした。

## 小児副腎白質ジストロフィー症への神経心理・生理学的アプローチ 継時的検査を行えた症例を中心に

加我牧子  
国立精神・神経センター精神保健研究所  
稲垣真澄<sup>1)</sup>、堀口寿広<sup>1)</sup>、中村雅子<sup>2)</sup>、  
白根聖子<sup>1)</sup>、佐々木匡子<sup>1)</sup>、羽鳥誉之<sup>1)</sup>、  
小穴信吾<sup>1)</sup>、加藤俊一<sup>3)</sup>  
<sup>1)</sup>国立精神・神経センター精神保健研究所  
<sup>2)</sup>東京大学医学部耳鼻咽喉科  
<sup>3)</sup>東海大学総合医学研究所

小児期発症の副腎白質ジストロフィー症の臨床指標として考案した本邦における検査バッテリーを用い骨髄移植前又は後の男児11例にのべ18回評価を行い、継時的検査可能であった症例を中心に検討した。詳細な検査により、視覚・視空間認知、記憶、前頭葉機能、聴覚認知などの障害が抽出され、MRI 所見から推測されるより広範囲な認知障害が確認された。継時的検査でIQが保たれているのは発症年齢が遅い群と思われた。術前PIQが80以上でも術後、著しい低下を示す場合があった。発症群は知能検査下位項目のうち算数の低下を示す者が目立った。動作性課題の低下項目は症例差があり、符号・記号探しは注意障害の評価に役立った。Wechsler 系知能検査以外で特別な器械や器具が不要で、短時間にできる項目としてレイの複雑図形、レイのAVLT、人物描画検査、立方体透視図模写をあげた。それ以外は更に専門的施設で実施を考慮すべきと考えられた。

## 副腎白質ジストロフィー症に対する非血縁者間臍帯血移植成績

加藤剛二  
名古屋第一赤十字病院 小児科

副腎白質ジストロフィー症(以下ALD)は進行性の遺伝性神経疾患であり、現時点では造血幹細胞移植が唯一の有効な治療法である。また本疾患は急速に進行するために緊急的に実施可能な非血縁者間臍帯血移植の効果が望まれる。これまで国内では5歳から10歳の本症例7例に対して9回の移植がなされ、内4例に生着がみられた。移植前処置は様々であるが移植細胞数の中央値は $4.5 \times 10^7/\text{kg}$ であり、血清学的HLA適合度は6/6、5/6、4/6がそれぞれ1、5、3例であった。本疾患に対しては早期の造血幹細胞移植が最も望ましくその意味でも非血縁者間臍帯血移植に対する期待は大きいが生着不全や移植後の合併症等によってその成績向上が阻まれている。今後は移植前処置や移植後の合併症対策等多くの課題を克服すべきである。

赤血球膜極長鎖脂肪酸値のみ高値を呈した白質脳症が疑われる2例

古谷博和  
九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科

新納信江<sup>1)</sup>、吉良潤一<sup>1)</sup>、高倉由佳<sup>2)</sup>、  
山口通子<sup>2)</sup>、三好 甫<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>九州大学医学部神経内科

<sup>2)</sup>大牟田労災病院神経内科

血漿極長鎖脂肪酸(pVLCFA)値が正常で、赤血球膜極長鎖脂肪酸(rVLCFA)値が高値であった、白質ジストロフィーが疑われる2症例を経験した。症例1は42歳男性。神経学的に異常はないが、頭部MRIで、白質ジストロフィーの所見あり。症例2は43歳男性。性格変化、知能低下、痙性対麻痺あり。兄に同様症状あり。頭部MRIは正常。これら2症例に、白質脳症を起こす既知の酵素の活性と、赤血球膜極長鎖脂肪酸(rVLCFA)の測定、およびALD-P遺伝子の解析を行った。いずれの症例も、rVLCFAのみ高値を認め、その他の酵素活性に異常はなかった。また、2症例ともALD-P遺伝子のエクソン10領域にアミノ酸置換を認めたが、日本人特有の遺伝子多型の可能性もあり、更に精査中である。これらの症例がALDの類縁疾患かどうかはまだ検討の余地があるが、今後ALDの発症機序や、極長鎖脂肪酸の代謝機序を調べる上で、重要な症例と考えられた。

副腎白質ジストロフィー遺伝子の欠損を認め、Zellweger症候群類似の臨床像を呈した症例に関する研究

鈴木康之  
岐阜大学医学部医学教育開発研究センター  
下澤伸行、竹本靖彦、長瀬朋子  
岐阜大学医学部小児病態学

副腎白質ジストロフィーには小児型、AMN、成人大脳型、小脳脳幹型、Addison病など多彩な臨床病型が存在するが、新生児期発症のタイプはPEX遺伝子異常に基づくペルオキシソーム形成異常症としての新生児型ALD以外には知られていない。今年度我々は、出生直後から呼吸障害、顔貌異常、黄疸、肝腫大などZellweger症候群様の臨床像を呈し、既存の新生児型ALDやペルオキシソームβ酸化酵素単独欠損症でない、新たな疾患単位と考えられる症例を経験したので報告する。症例は37週3日、1780gで出生した低出生体重児で、極長鎖脂肪酸の蓄積を認めたため、当初Zellweger症候群を疑ったが、蛍光抗体染色でペルオキシソームの存在が確認され、β酸化酵素の解析でも異常を検出できなかった。しかしWestern blotでALDPの欠損を認め、ALD gene全体を含むlarge deletionが存在することが明らかとなった。本症例の解析はALDPの機能を考える上で重要と考えられた。

ALD 治療薬開発のための生化学的研究

今中常雄  
富山医科薬科大学・薬学部

ALD 治療薬開発を目的として、約100種の生薬成分についてALD患者繊維芽細胞の極長鎖脂肪酸β酸化活性を正常化させる化合物の検索を行った。その結果、極長鎖脂肪酸β酸化活性を回復させる複数のフラボノイドを見出した。特に、baicalein-5, 6, 7-trimethylether (BTM)は、細胞の増殖には影響を与えず、極長鎖脂肪酸β酸化活性を濃度依存的に回復させた。BTMの作用には、5, 6, 7位がメキシ基であることが重要であった。BTM処理した細胞では、ALDPなどのペルオキシソームABCタンパク質の増加は認められなかった。よって、BTMはALDP非依存性の極長鎖脂肪酸β酸化経路を活性化している可能性が考えられる。また、各種フラボノイドを含む漢方方剤エキスの中にも、ALD患者繊維芽細胞の極長鎖脂肪酸β酸化活性を回復させるものが見出された。

ALDの発症における新規遺伝子リポドーシンの機能解析

橋本有弘  
宋 時榮  
三菱化学生命科学研究所

ヒト副腎白質ジストロフィー(X-ALD)における組織特異的障害の発症には未知の介在因子の関与が想定されている。リポドーシン(lipidosin, lpd)はX-ALDにおいて障害を受ける組織で特異的に発現する、長鎖脂肪酸アシルCoシクラーゼ活性を有するタンパク質である。LpdはALDにおける組織特異的障害発症機序に関わる介在因子の有力な候補分子である。私たちは免疫染電子顕微鏡によってLpdのアストロサイトにおける細胞内局在性を検討した。その結果、Lpdは特定の細胞小器官に局在することはなく、細胞質中に広く分布していることが明らかになった。特に、毛細血管との接触部位およびシナプス近傍の突起部分にはLpdが密に分布しており、血液-脳関門およびシナプスの機能とLpdの機能との関連性が考えられる。

---

## Ⅲ 分担別報告

---

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究  
（非多発地域由来の SCA1—2 剖検所見について—）

分担研究者 長谷川一子

国立相模原病院神経内科医長

共同研究者 柳下三郎\*，横山照夫\*\*，豊島至\*\*\*

（\*国立相模原病院臨床研究センター，\*\*国立箱根療養所神経内科，  
\*\*\*秋田大学医学部第一内科）

研究要旨

我が国に於いて報告されている SCA 1 家系の多くはその発祥を山形，宮城とする。今回，分子遺伝子学的に SCA 1 と診断された 2 家系 2 症例の出身地は秋田県にあり，山形，宮城には調べた範囲では血縁者はいなかった。この 2 症例につき剖検をおこなう機会を得た。自験 2 例の病変分布は多発地域で報告のある SCA 1 と基本的にはほぼ同様であったが，病変部位による強弱には山形・宮城家系と若干の差異が認められた。多発地域以外にも，SCA 1 の家系が存在することを喚起すると共に，家系により病変分布に若干の差異が存在する可能性について報告した。

A. 研究目的：

我が国の遺伝性脊髄小脳変性症のうち，SCA 1 は比較的頻度が少なく，SCA 1 家系の多くはその発祥を山形，宮城とする。わが国で剖検された SCA 1 も発祥地を両県としており，ほぼ均一な病理像を呈することが報告されている<sup>1)</sup>。今回報告した分子遺伝子学的に SCA 1 と診断された 2 家系 2 症例の出身地は秋田県にあり，山形，宮城には調べた範囲では血縁者はなかった。疫学的にはまれであり，この 2 症例について剖検を行ったところ，秋田県 SCA 1，2 例の病変分布は多発地域で報告のある SCA 1 と基本的にはほぼ同様であったが，病変分布や病変の強弱には山形・宮城家系と若干の差異が認められた。多発地域以外にも，SCA 1 の家系が存在することを明らかとし，SCA 1 では他の遺伝性脊髄小脳変性症と異なり，家系間で病変分布に若干の差異が存在する可能性を示した。

B. 症例：

症例 1；発端症例は死亡時 52 歳男性。従姉妹に脊髄小脳変性症（病型は不明）と診断されているが，詳細は不明で，剖検もなされていない。既往歴には特記することなし。出身地は秋田県由利郡。  
現病歴；20 歳代後半より，バランスがとりにくかった。37 歳時ごろから素早く歩けなくなり，勤務先で受診を促されたため来院。小脳性言語，上方視障害と衝動性眼球運動の障害，四肢痙直および，小脳失調を認め脊髄小脳変性症と診断した。その後遺伝子検索を行い，SCA 1（リピート数 48）と診断した。症状は進行性であったが，経過中に測定障害は軽度で，スピードの低下と運動分解が目立った。言語は終始，断綴性言語ではあったが，末期まで会話は可能であった。45 歳頃より車椅子生活。51 歳頃より嚥下障害が増悪し，経鼻栄養を開始した。また，この頃より肺胞

低換気となった。52歳時、敗血症により死亡。

症例2：死亡時27歳女性。秋田県田沢湖町出身。父、父の兄が同症で死亡。

現病歴；12歳ごろから直線歩行が不可能となり、14歳時に脊髄小脳変性症と診断された。16歳時に家庭内介護困難となり、施設入所。22歳時に気切施行とPEG増設。25歳頃より反応低下し、肺泡低換気のため人工呼吸器管理。27歳時に突然、心肺停止で死亡。25歳時遺伝子診断によりSCA1（リピート数は50以下）と診断された。

### C. 剖検結果：

症例1；

脳重は1100g。著明なるいそうと肺炎を認めた。神経病理学的には脳幹、小脳の軽度の萎縮を肉眼的に認め、組織学的にはオリブ・橋・小脳病変を主体とし、脊髄小脳路の変性、クラーク柱神経細胞脱落を認めた。小脳では、顆粒細胞、プルキンエ細胞脱落（図1）と、小脳歯状核のグルモース変性をみた。基底核では淡蒼球外節神経細胞脱落を認めた。

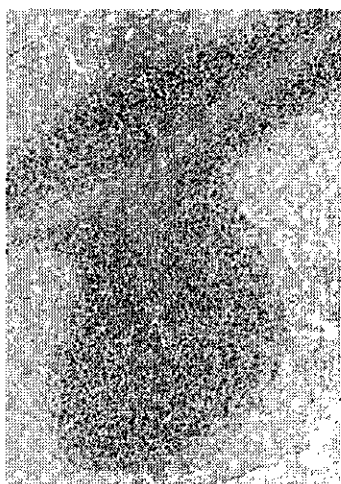


図1. 症例1小脳x200, HE染色

症例2；

脳重は985gで脳幹・小脳萎縮と同時に慢性の脳萎縮をみる。組織学的には高度のオリブ・橋（図2）・高度の小脳病変と著名な歯状核（図3、4）、赤核および黒質の神経細胞脱落、淡蒼球神経細胞脱落などのDRPL病変、高度の前角神経細胞脱落を伴う脊髄病変を認めた（図5）。さらに視蓋病変として上丘および眼球運動関連神経核の神経細胞脱落とグリオーシス、視床内側核群、外側膝状体神経細胞（図6）の脱落とグリオーシスを認めた。



図2. 症例2橋, HE染色



図3. 症例2小脳, HE染色

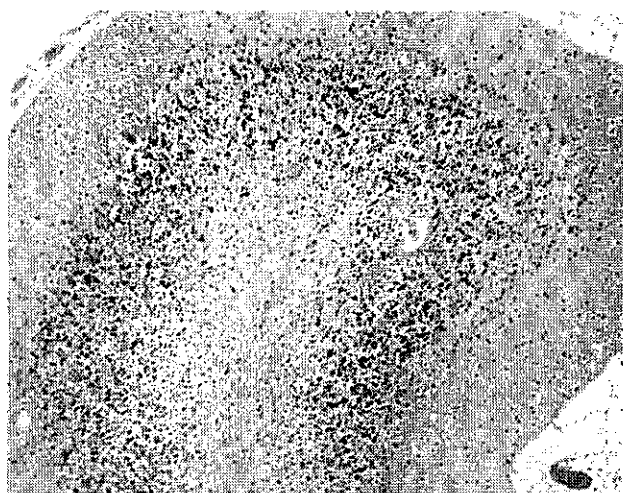


図4. 症例2. 小脳 x200, HE 染色

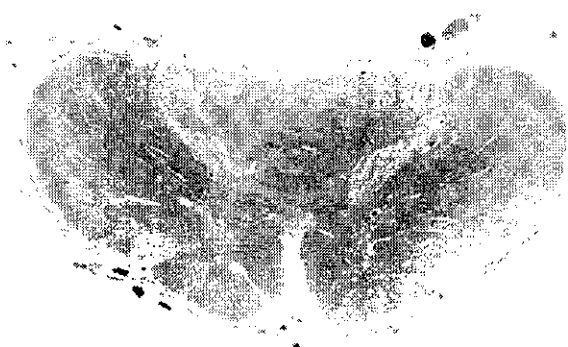


図5. 症例2, 脊髓 HE 染色

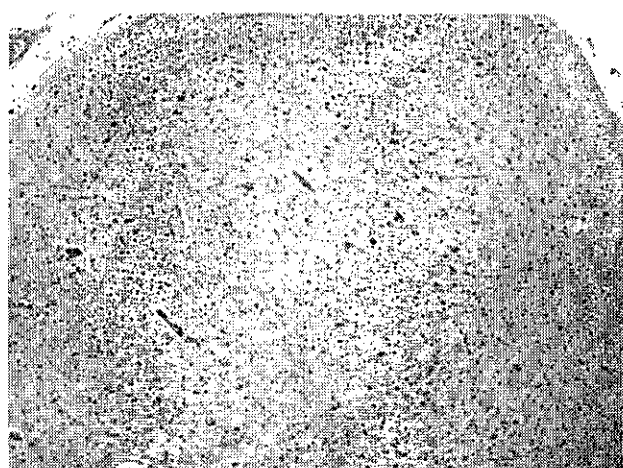


図6. 症例2. 外側膝状体 x200, HE 染色

#### D. 考案

多発地域以外の出身地の SCA 1, 2 症例の

剖検所見はいずれも、既報告例よりも病変が高度、かつ広範であった。特に症例2では既報告例に比較して DRPL 病変, OPC 病変, 視床, 視蓋病変 (腹側および外側膝状体で神経細胞脱落, グリオシスが強度) が極めて高度であった。視床病変については従来さほど注目されておらず, 報告されている山形・宮城家系の神経病理像と大きな差異を認めた。なお, 海外での SCA1 症例の病理像については詳細な記載が少なく, 比較することが困難であった。

自験家系が多発地域の家系と異なるかについて, 厳密に証明するにはハプロタイプ解析が必要であり, 今後の課題としたい。

#### E. 結論:

SCA 1 の診断については臨床像, 出身地で推定され, 遺伝子による確認がなされている。今回, 多発地域以外にも SCA 1 家系が存在することを報告し, 注意を喚起した。神経病理所見からは, 秋田 SCA1 は多発地域症例と病変の広がりには差異を認める可能性が自験例より得られた。

#### 参考文献

1. 岩淵潔, 池田輝明ら: Spino-cerebellar ataxial (SCA1) の臨床病理学的研究(1). 神経進歩 36: 665, 1992.

#### F. 研究発表:

1. 第44回神経病理学会発表予定

#### G. 知的所有権の獲得状況:

1. 特許取得; なし.
2. 実用新案登録; なし,
3. その他; なし.

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

ポリグルタミン病の病態におけるリソゾームの関与

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 高橋 均 同上

研究要旨 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症ならびに Machado-Joseph 病の神経細胞では、伸長ポリグルタミン鎖の抗原性がリソゾーム内にも存在し、この病態が神経細胞核の病変とほぼ同程度の頻度で生じていることを明らかにした。ポリグルタミン病では変異蛋白質が神経細胞の胞体内でも代謝されている可能性がある。

A. 研究目的

ポリグルタミン病に共通した病理組織学的所見として神経細胞核内封入体が認識されている。一方、我々は伸長ポリグルタミン (PolyQ) 鎖の抗原性を有する顆粒状構造物が、神経細胞の胞体内にも多数存在することを報告してきた。この構造物は歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA) を含む複数のポリグルタミン病に共通して認められ、ユビキチン免疫染色では認め難い。本研究では伸長 PolyQ 鎖の免疫電顕組織化学的解析法を確立し、顆粒状構造物の超微形態像を明らかにするとともに、核における伸長 PolyQ 鎖蓄積との関連を検索した。

B. 研究方法

1. 電顕免疫組織化学的観察

DRPLA 剖検例 3 例 (79 歳、Q59 ; 62 歳、Q59 ; 56 歳、Q65)、Machado-Joseph 病 (MJD) 剖検例 1 例 (70 歳、Q74)、および対照例 3 例 (83 歳 ; 78 歳 ; 58 歳)

の橋核を観察対象とした。伸長 PolyQ 鎖の蓄積に関する光顕観察には橋のパラフィン切片を用い、1C2 抗体 (1:16000) で免疫染色した。電顕観察にはホルマリン固定された橋底部を対象に、通常電顕観察と電顕免疫組織化学を隣接組織で対比しつつ行った。後者の解析には組織を 60 分間振盪下に室温でギ酸処理し、30 分間のメタノール処理後、リン酸緩衝食塩液で洗浄、LR White resin (London Resin Company, Berkshire, UK) に包埋した。Resin 包埋ブロックから橋核神経細胞を含む領域の超薄切片を作成し、immunogold 法で免疫染色後、電顕観察した。

2. 核病変との対比

DRPLA 剖検例 2 例 (76 歳、Q60 ; 18 歳、Q68)、MJD 剖検例 4 例 (58 歳、Q68 ; 72 歳、Q72 ; 45 歳、Q77 ; 32 歳、Q83) の中枢・末梢神経系を観察対象とした。

C. 研究結果

1. 電顕免疫組織化学的観察



DRPLA 脳では多数の橋核神経細胞核が 1C2 抗体でびまん性に染色され、同時に胞体内には陽性の顆粒状構造物が多数認められた。MJD でも多くの神経細胞核で封入体の陽性像あるいは核質のびまん性陽性像とともに、胞体内に同様の陽性構造物を多数認めた。この構造物は両疾患とも共通して約 1.5  $\mu\text{m}$  大までの顆粒状を呈し、核周辺部に集積しつつ、胞体辺縁部で散在していた。DRPLA 脳の電顕検査では神経細胞の胞体内に明らかな異常構造物は認められなかった。光顕所見との対比から陽性構造物の候補としてリソソームが考えられた。リソソームは 0.4 から 1.6  $\mu\text{m}$  大の種々の形態を呈し、電子密度の低い構造に高電子密度の領域が少量混在していた。低電子密度の部分には平行あるいは多方向に交錯する線維状構造が高頻度に認められた。MJD ならびに正常対照例の橋核神経細胞でも類似のリソソームが観察されたが線維状構造は少数であった。

免疫電顕観察では伸長 polyQ 鎖の抗原性の多くはリソソームに認められた。標識は核近傍の小型リソソームに高頻度に観察され、胞体中心部の大型リソソームでは減少し、それらの辺縁部に局在する傾向が見られた。伸長 polyQ 鎖の標識は一部の粗面小胞体にも観察された。

## 2. 核病変との対比

DRPLA では胞体内顆粒は核病変と同一の広範な領域に認められ、PolyQ 鎖長依存性にその頻度が増加した。Juvenile type 例では、歯状核赤核系、淡蒼球ルイ体系、下オリーブ核が 60% 以上の高頻度を呈し、さらに動眼神経核、橋核は juvenile type、late adult type に共通して高頻度の領域と

なった。胞体内顆粒の出現頻度は多くの領域で核病変よりやや低い傾向を示した。

MJD では胞体内顆粒の出現は核病変の分布とほぼ一致し、多くの領域で同頻度あるいは軽度減少する傾向が見られた。例外は脊髄前角の大型神経細胞であり、3 症例に共通して核病変より胞体内顆粒が高頻度 (~80%) となった。

## D. 考察

本研究から、伸長 PolyQ 鎖を含む変異蛋白質は神経細胞の胞体内にも代謝経路が存在し、その過程にリソソーム系が関与している可能性が示唆された。この過程がそれぞれの蛋白質の生理的代謝経路によるものであるのか、polyQ 鎖の伸長によって新たに獲得されたものかは今後の検討課題である。

後者とすれば、ユビキチン系と同様に、細胞変性の観点からリソソーム分解系の機能異常の有無の検討が必要になる。他方、リソソーム系の関与が変異蛋白質に対する神経細胞の防御機構との可能性も考慮される。胞体内に伸長 polyQ 鎖を有する神経細胞には形態上明らかな変性所見は見られないことから、変異蛋白質をリソソーム系で分解・除去しようとする機構が働いている可能性もある。変異 huntingtin を発現させる in vitro の実験系でもオートファジーの亢進が報告されていることから、今後ポリグルタミン病の病態におけるリソソーム系の意義を検討していく必要がある。

## E. 結論

ポリグルタミン病の伸長 PolyQ 鎖を含む変異蛋白質の分解には、ユビキチン系に

加えリソソーム系も関与していることが示唆された。リソソーム系の関与は複数のポリグルタミン病に共通して広範囲の神経細胞に内在しており、治療法開発の一方向となる可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yamada M, Tsuji S, Takahashi H.  
Involvement of lysosomes in the pathogenesis of CAG-repeat diseases. *Annals of Neurology*. 52:498-503, 2002

Yamada M, Sato T, Tsuji S, Takahashi H.  
Oligodendrocytic polyglutamine pathology in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Annals of Neurology*. 52:670-674, 2002

### 2. 学会発表

山田 光則、佐藤 俊哉、辻 省次、高橋 均  
歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の白質変性：グリア細胞核における伸長ポリグルタミン鎖蓄積  
第43回日本神経病理学会、東京、2002

山田 光則、辻 省次、高橋 均  
歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症における伸長ポリグルタミン鎖はリソソームで分解される  
第43回日本神経病理学会、東京、2002

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

$\alpha$ -synuclein の細胞内凝集と神経細胞死の関連

分担研究者 武田 篤 (東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野助手)

研究協力者 松崎理子、長谷川隆文、菊池昭夫、糸山泰人(東北大学神経内科)

【研究要旨】 MSA を含む synucleinopathy の病態解明のため  $\alpha$ -synuclein 過剰発現細胞を作成して蛋白凝集物生成の条件を検討した。検討した中では鉄、特に3価鉄が最も高率に細胞内  $\alpha$ -synuclein 凝集物を生成した。得られた凝集体はチオフラビン染色陽性、ニトロチロシンやコピキチン陽性、低分子モレキュラーシャペロン分子陽性で、synucleinopathy 脳内封入体の性状に類似していた。凝集体形成は微小管重合阻害剤や鉄キレート剤の投与により阻害され、このときアポトーシスの誘導がみられた。以上から細胞内  $\alpha$ -synuclein 凝集体形成は微小管輸送を介した能動的プロセスであり、細胞防御的反応である可能性が示唆された。

A. 研究目的

$\alpha$ -synuclein は 140 アミノ酸からなる可溶性蛋白で主に細胞質に存在する。その生理的機能については不明の点が多いが神経細胞、特にシナプス前終末に比較的多く局在し、神経可塑性に関係していると想定されている。また、細胞膜と細胞内オルガネラ間の脂肪酸輸送に関与していることも示唆されている。 $\alpha$ -synuclein はパーキンソン病脳内の Lewy 小体の主要構成蛋白であるのみならず、多系統萎縮症の pathological hallmark である glial cytoplasmic inclusion (GCI)の構成蛋白でもあり、これらの疾患群は synucleinopathy と総称されるに至った。こうした病態下の  $\alpha$ -synuclein は、コピキチン化、リン酸化、ニトロ化などの様々な修飾を受け、特有の高次構造をとって凝集している。すなわち、通常特定の高次構造を持たない natively unfolded protein として細胞内に存在している  $\alpha$ -synuclein が、病態下では、 $\beta$ -シート

構造を持った折りたたみ構造 ( $\beta$ -pleated sheets) に変化し、multimer として凝集体を形成する。こうした  $\alpha$ -synuclein 代謝過程の変化は synucleinopathy における神経変性機序の根幹をなすと考えられる。われわれは  $\alpha$ -synuclein 過剰発現細胞を完成させ、種々の実験環境下に曝露することにより、synucleinopathy の細胞病態モデル構築を試みた。

B. 研究方法

ヒト神経芽細胞種由来の cell line である SH-SY5Y 細胞に pCEP4 発現ベクターを用いてヒト  $\alpha$ -synuclein を過剰発現させた。家族性パーキンソン病 (Park1) で報告されている、A53T と A30P 変異を持つ発現系も同時に構築した。確立した細胞を鉄、NO donor (SIN1 や PAPA/NO) やミトコンドリア酵素阻害剤 (rotenone) などの酸化的ストレス誘発剤に曝露し、抗  $\alpha$ -synuclein 抗体を用いて凝集物形成の程度を検討した。更に、

この過剰発現細胞をレチノイン酸と brain-derived neurotrophic factor (BDNF)存在下に神経様細胞に分化させて諸検討を行った。

### C. 研究結果

過剰発現細胞は形態や増殖能に明らかな差異を示さず、 $\alpha$ -synuclein は細胞質内に均質に発現していた。酸化ストレスやNOの曝露により、凝集物の形成が認められたが、特に鉄の曝露により最も高率に $\alpha$ -synuclein 凝集体が形成された。凝集体形成能は特に3価鉄において顕著であった。また A53T 変異を導入した発現系では野生型や A30P 変異よりも有意に多くの細胞内凝集形成が認められた。共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討から、 $\alpha$ -synuclein 凝集体はニトロチロシン・コビキチン陽性、thioflavin S 染色陽性であった。また凝集部には molecular chaperone として知られる  $\alpha$ B-crystalline や HSP27 が共在していた。この細胞をレチノイン酸と BDNF で処理して分化させると、より大きな凝集物が細胞内に少数個観察され、顕微鏡上はLewy小体やGCIにきわめて類似した形態を示した。また、いずれの細胞モデルにおいても、 $\alpha$ -synuclein 凝集体は MTOC(microtubule organizing center)のマーカである  $\gamma$ -tubulin 陽性であった。

RA/BDNF 分化誘導モデルにおいて、微小管の重合阻害剤を投与すると $\alpha$ -synuclein 凝集体形成は阻害され、アポトーシスの誘導がみられた。また、rotenone と NO donor への曝露により $\alpha$ -synuclein 凝集体が効率的に形成される条件下の過剰発現細胞に、鉄キレート剤を添加することにより、やはり $\alpha$ -synuclein 凝集体の形成抑制とアポトーシスの誘導が観察された。

### D. 考察

酸化ストレスは種々の神経変性疾患において重要な役割を担っていると考えられる。実際 synucleinopathy でも、酸化ストレスの増大が示唆されており、病変部の神経細胞は常に酸化ストレスにさらされていると想定される。本細胞モデルにおける $\alpha$ -synuclein 凝集物は、酸化蛋白修飾、コビキチン、低分子分子シャペロンに陽性所見を示すなど、Lewy小体やGCIと組織化学的性状がきわめて類似しており、実際の synucleinopathy における細胞内封入体形成機序とある程度共通の病態基盤を持つものと推定できる。 $\alpha$ -synuclein 凝集体が  $\gamma$ -tubulin 陽性だったことは、凝集形成にあたって微小管輸送による aggresome 形成機序が関与することを強く示唆する。aggresome は細胞内での変異蛋白処理系の一つであり、細胞防御的な反応と考えられている。このことは $\alpha$ -synuclein 凝集体形成そのものは変性蛋白処理の結果としての細胞防御反応であることを示唆する。実際、我々の細胞モデルでも凝集体形成を抑制することによりアポトーシスの誘導が見られた。

最近の複数の報告は凝集体 (fibril 集合体) 形成に至る前の protofibril が主要な細胞毒性を担っていることを示唆している。すなわち通常は円滑に分解・処理されることにより、細胞内の protofibril プールはある量を超えない様にコントロールされているが、何らかの原因で protofibril の増加がおこると細胞死が惹起されるとする仮説が注目されている。Fibril 化による細胞内凝集体形成はむしろこうした toxic process に対して細胞防御的に働く想定される様になって来た。Lewy小体やGCIは、実は生き残ることのできた幸運な細胞の hallmark なのかもしれない。

### E. 結論

本細胞モデルは synucleinopathy の病態を良く再現しており、その発病のメカニズム解明のみならず、根源的な治療薬の開発においても有用であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kikuchi A., Takeda A., Onodera H., Kimpara T., Hisanaga K., Sato N., Nunomura A., Castellani RJ., Perry G., Smith MA., Itoyama Y., Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol. Dis.* 9 : 244-248, 2002.
- 2) Nunomura A., Chiba S, Kosaka K, Takeda A, Castellani RJ, Smith MA., Perry G, Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of dementia with Lewy bodies. *NeuroReport* 13 : 2035-2039, 2002.
- 3) Smith MA., Drew KL., Nunomura A., Takeda A., Hirai K., Zhu X., Atwood CS., Raina AK., Rottkamp CA., Sayre LM., Friedland RP., Perry G., Amyloid-beta, tau alternations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease : chickens or the egg? *Neurochem. Intern.* 40 : 527-531, 2002.
- 4) Raina AK., Sayre LM., Atwood CS., Rottkamp CA., Hochman A., Zhu X., Obrenovich ME., Shimohama S., Nunomura A., Takeda A., Perry G., Smith MA., Apoptosis and oxidative indicators in Alzheimer's disease, *Neuromethods* 37 : 225-246, 2002.
- 5) Takeda A., Kimpara T., Itoyama Y., Perry G., Smith MA., Possible roles of heme catabolism in neurodegeneration, Abraham

NG (ed.); Heme Oxygenase in Biology and Medicine., p135-143, 2002.

- 6) Castellani RJ., Hirai K., Aliev G., Drew KL., Nunomura A., Takeda A., Cash AD., Obrenovich ME., Perry G., Smith MA., Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease, *J. Neurosci. Res.* 70 : 357-360, 2002.
- 7) Perry G., Nunomura A., Hirai K., Zhu X., Prez M., Avila J., Castellani RJ., Atwood CS., Aliev G., Sayre LM., Takeda A., Smith MA. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radical Biology & Medicine.* 33 : 1475-1479, 2002.

### 2. 学会発表

- 1) 武田 篤、松崎理子、長谷川隆文、糸山泰人、菊池昭夫、 $\alpha$ -synuclein 凝集体形成における細胞内微小管系の関与、第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002
- 2) 松崎理子、武田 篤、長谷川隆文、糸山泰人、菊池昭夫、培養細胞を用いた  $\alpha$ -synuclein 細胞内凝集モデルの作成、第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002
- 3) 長谷川隆文、松崎理子、菊池昭夫、武田 篤、糸山泰人、 $\alpha$ -synuclein 過剰発現による細胞内凝集体形成と RA・BDNF 分化誘導、第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002
- 4) Hasegawa T., Matsuzaki M., Kikuchi A., Furukawa K., Takeda A., Itoyama Y. Accelerated formation of  $\alpha$ -synuclein aggregates in "differentiated" SH-SY5Y neuroblastoma cells. 7th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Miami, USA, 2002

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

多系統萎縮症のモデルマウス作製の試み

分担研究者 貫名 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

研究要旨

オリゴデンドロサイトに $\alpha$ -シヌクレインが高発現する、MSA モデルマウスの作製を試みた。このトランスジェニックマウスにおいて、リン酸化 $\alpha$ -シヌクレインのオリゴデンドロサイト内での蓄積、小脳抽出液における SDS 不溶性 $\alpha$ -シヌクレインの存在といった、シヌクレイノパチーと同様の異常を確認した。

共同研究者：岩田 淳、丸山 美枝子、橋本光広、赤木 巧、端川 勉、金澤 一郎、辻省次

A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) は本邦に多いにもかかわらず、その発症原因などは不明な点が多い。また、孤発性疾患のため、genetics からのアプローチが困難であった。MSA の主要病理所見はオリゴデンドロサイトに出現する嗜銀性封入体 glial cytoplasmic inclusion (GCI) である。近年、同封入体が不溶性 $\alpha$ -シヌクレインの蓄積であることが発見された。我々は MSA の病変をマウスで再現するために、オリゴデンドロサイトに $\alpha$ -シヌクレインの高発現を行い、モデルマウスとなりうるかどうか検討した。

B. 研究方法

マウスミエリン塩基性タンパク (Myelin basic protein, MBP) のプロモーターの制御下で、ヒト野生型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をマウスのオリゴデンドロサイトに特異的に発現させた。 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を導入した founder マウスはヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の PCR により同定した。現在、C57BL/6 へ戻し交配し繁殖させている。我々はトランスジェニックマウス特異的な変化、異常を同定する目的で、組織学的、生化学的、動物行動学的手法による解析を行った。

(倫理面への配慮)

実験中にマウスに苦痛を与えぬように十分配慮した。

C. 研究結果

我々の作製したトランスジェニックマウスにおいて、ヒト $\alpha$ -シヌクレインの発現を確認した。5-27 週まで蛋白発現の様子はほぼ同じで、88 週齢の老齢マウスにおいても、発現量がやや落ちるもののヒト $\alpha$ -シヌクレインの発現を観察できた。

次にトランスジェニックマウスに特異的な異常の検討を行ったところ、トランスジェニックマウスにおいて軽度のアストロサイトーシスを認めた。また、リン酸化 $\alpha$ -シヌクレイン (Pscr129) のオリゴデンドロサイト内での蓄積、小脳抽出液における SDS 不溶性 $\alpha$ -シヌクレインの存在といった、ヒトのシヌクレイノパチーと同様の異常をトランスジェニックマウス特異的に確認した。

さらに、88 週齢のトランスジェニックマウスにおけるフットプリントテスト、オープンフィールドテストで、運動能力および運動活動性の低下を認めた。

D. 考察

家族性パーキンソン病の遺伝子として $\alpha$ -シヌクレインが同定されて (1) 以来そのモデルマウス、ショウジョウバエモデルの作成が試みられ、症状を呈するもの、病理像が類似するものなどが報告されている

(2-5)。

一方同じシヌクレイノパチーである MSA のモデルマウスは作成の報告は少なく、今回我々はヒト  $\alpha$ -シヌクレインをオリゴデンドロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウスの作製を行った。トランスジェニックに特異的な所見として、リン酸化  $\alpha$ -シヌクレインの細胞内での蓄積、不溶性  $\alpha$ -シヌクレインの存在 (6, 7)、といった、ヒトのシヌクレイノパチーと同様の異常を見いだせたことから、我々の作成したマウスが、MSA のモデル動物としての可能性が考えられる。また、老齢トランスジェニックマウスにおいて認められた運動異常は、神経細胞死、もしくは神経細胞の機能異常を示唆する現象であり、現在は運動異常の原因として、神経細胞死の有無や、遺伝子発現プロファイルの検討を予定している。

#### E. 結論

オリゴデンドロサイトに  $\alpha$ -シヌクレインを高発現するトランスジェニックマウスを作成した。病理所見、行動試験の所見から MSA モデルマウスとなりうると考える。

#### [参考文献]

- 1) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. *Science*. 1997 Jun 27; 276(5321): 2045-7.
- 2) Feany MB, Bender WW. *Nature*. 2000 Mar 23; 404(6776): 394-8.
- 3) van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, et al. *J Neurosci*. 2000 Aug 15; 20(16): 6021-9.
- 4) Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, et al. *Neuron*. 2002 May 16; 34(4): 521-33.
- 5) Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, et al. *Am J Pathol*. 2001 Dec; 159(6): 2215-25.
- 6) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. *Nat Cell Biol*. 2002 Feb; 4(2): 160-4.
- 7) Takahashi M, Kanuka H, Fujiwara H, et al. *Neurosci Lett*. 2003 Jan 23; 336(3): 155-8.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Lee, J-A., Lim, C-S., Lee, S-H., Kim, H., Nukina, N., Kaang, B-K. Aggregate formation and the impairment of long-term synaptic facilitation by ectopic expression of mutant huntingtin in *Aplysia* neurons. *J. Neurochem.* (in press).

Mitsui, K., Nakayama, H., Akagi, T., Nekooki, M., Ohtawa, K., Takio, K., Hashikawa, T., Nukina, N. Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1 $\alpha$  and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J. Neurosci.* 22, 9267-9277 (2002).

Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Morishima, I., Hashikawa, T., Fujisawa, T., Nukina, N. The effects of aggregation-inducing motifs on amyloid formation of model proteins related to neurodegenerative diseases. *Biochemistry* 41, 10277-10286 (2002).

岩田 淳. 丸山美枝子. 貫名信行.  $\alpha$ -シヌクレインによる神経細胞死... (2). *臨床神経科学* 21, 126-127 (2003).

岩田 淳. 丸山美枝子. 貫名信行.  $\alpha$ -シヌクレインによる神経細胞死... (1). *臨床神経科学* 21, 6-7 (2003).

貫名信行. 田中元雅. ポリグルタミン含有蛋白の構造変化—マックス・ペルツ最後の挑戦—. *神経研究の進歩* 46, 661-668 (2002).

##### 2. 学会発表

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., Tsuji, S., Nukina, N. Generation of model mice for multiple system atrophy (Program Number: 595.8). Society for Neuroscience 32th Annual Meeting (Orlando, 11.5, 2002).

Nukina, N., Jana, N-R., Tanaka, M., Maruyama, M., Miyazaki, H., Machida, Y., Taniguchi, H. Misfolding triggers the ubiquitination of polyglutamine-expanded ataxin-3, the defective gene product in SCA3/MJD (Program Number: 596.4). Society for Neuroscience 32th Annual Meeting (Orlando, 11.5, 2002).

Mitsui, K., Itakura, C., Nukina, N. Analysis of protein expression pattern in hepatocytes isolated from HD transgenic mice by 2D-DIGE method (Program Number: 92.7). Society for Neuroscience 32th Annual Meeting (Orlando, 11.3, 2002).

Sakurai, T., Okuno, M., Akagi, T., Kobayashi, Y., Kaneko, K., Hashikawa, T., Nukina, N. Association of amyloid precursor protein with specialized lipid rafts in brain: possible involvement in its physiological functions and processing (Program Number: 296.13). Society for Neuroscience 32th Annual Meeting (Orlando, 11.4, 2002).

Oyama, F., Kotliarova, S-E., Harada, A., Ito, M., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N., Ihara, Y. Gene expression alterations in tau-deficient mice. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1735 (2002). The American of Human Genetics 52th Annual Meeting (Baltimore, 10.15-19, 2002).

Nukina, N., Jana N-R., Tanaka M., Maruyama M., Machida Y. Misfolding triggers the ubiquitination of polyglutamine-expanded protein. 7th European Congress of Neuropathology NEUROPATHOLOGY 2002 (Helsinki, 7.13-16, 2002).

Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Morishima, I., Hashikawa, T.

Structural and biochemical properties of aggregation-inducing motifs in chimera myoglobins as a model for neurodegenerative diseases. Cold Spring Harbor Laboratory 2002 Meeting on Molecular Chaperones & the Heat Shock Response (Cold Spring Harbor, 5.4, 2002).

Nukina, N., Jana, N-R., Mitsui, K. Chaperone and proteasome system in polyglutamine disease. Cold Spring Harbor Laboratory 2002 Meeting on Molecular Chaperones & the Heat Shock Response (Cold Spring Harbor, 5.3, 2002).

Nukina, N. Proteasomal degradation: Impaired breakdown of poly-Q-expanded polypeptides?. *Frontiers in Neurodegeneration: Huntington's disease* (Reisensburg, 1.31-2.1, 2002).

岩田 淳, 丸山美枝子, 金澤一郎, 貫名信行. 多系統萎縮症モデルマウス作成の試み. 第43回日本神経学会総会 P5-L-05 (札幌, 5.31, 2002).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)  
分担研究報告書

小脳プルキニエ細胞特異的新規分子の同定ならびに機能解析

研究分担者 金澤一郎 国立精神・神経センター神経研究所長

研究要旨

PCD (purkinje cell degeneration) マウスは小脳プルキニエ細胞が特異的に変性する運動失調モデルマウスである。最近、PCD の原因遺伝子として転写因子様の構造を有する分子 Nna1 が同定された。そこで PCD マウスにおける発現変動遺伝子のスクリーニングを DNA マイクロアレー法により行った。その結果、低分子量型 G 蛋白質 Rho・Rac の活性化因子である Trio の新しいスプライシング産物を同定する事が出来た。この Trio 新規スプライシング産物の発現は小脳プルキニエ細胞に限局し、細胞内では初期エンドソームの動態制御に関与する事が明らかとなった。近年、エンドソームはニューロンの生存維持に関与する様々な細胞膜表面分子の動態制御に関与していることが明らかになっており、この新規 Trio スプライシング産物の生体内での役割を明らかにすることが運動失調発症機序の理解に役立つと予想された。

A. 研究目的

神経変性による運動失調の発症機序を理解し、その有効な治療法を確立するためには遺伝性疾患の原因遺伝子を同定して遺伝子産物の分子機能を解明することが重要である。一方、運動失調のモデル動物を利用した神経変性の発症機序に関する組織レベル、細胞レベルならびに分子レベルでの詳細な研究も重要な意義を有している。

PCD マウスはプルキニエ細胞が特異的に変性・脱落することにより運動失調を発症する小脳神経変性のモデルマウスであり、Zinc カルボキシペプチダーゼ様核内分子ファミリー Nna1 遺伝子の変異がその原因であることが知られている。しかしながら、PCD マウスにおける神経変性の発症ならび

に細胞死の分子機序は現在のところ不明である。さらに原因遺伝子である Nna1 の発現は広範な脳内分布を示し、どのような分子機序によってプルキニエ細胞特異的な神経変性を引き起こすのは明らかになっていない。小脳プルキニエ細胞における神経変性の病態機序を明らかにするために PCD マウス小脳で特異的に発現が変動している遺伝子をマイクロアレー法によりスクリーニングした。

B. 方法

PCD マウスならびに正常マウスの小脳からそれぞれ RNA を精製し Affimetrix 社製マイクロアレーにより、約 6 千個の完全長遺伝子ならびに約 2 万 4 千個の EST 由来の遺伝子を含む合計約 3 万個の遺伝子の発現変化を解析した。その結果、PCD マウスで

発現が低下している EST 由来の遺伝子配列を同定し、その全長 cDNA を RACE 法ならびに PCR 法によって分子クローニングした。また in situ ハイブリダイゼーション法により脳における発現局在を解析し、さらに発現ベクターを作製して各種細胞内オルガネラマーカによる蛍光抗体染色によって細胞内分子機能の解析を行った。

#### (倫理面への配慮)

動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。

### C. 結果

DNA マイクロアレー解析から PCD マウスにおいて顕著に発現が低下している EST 由来の cDNA 配列を同定することが出来た。この EST cDNA クローンをプローブとして用いて in situ ハイブリダイゼーション法により小脳における遺伝子発現パターンを調べたところ、プルキニエ細胞で特異的に発現していることが明らかとなった。次に RACE 法で全長 cDNA を分子クローニングしたところ、この遺伝子は GEF ( guanine nucleotide exchanging factor )ファミリー分子である Trio の新規スプライシング産物をコードしていることが明らかとなった。Trio は 2つの GEFドメインと1つのプロテインキナーゼドメインを有し、Rho ならびに Rac などの低分子量 G 蛋白質の活性化を介して axon guidance の制御に重要な役割を担っていることが知られている。本研究で同定された

Trio スプライシング産物は C 末端側に存在する 1つの GEFドメインとプロテインキナーゼドメインを欠失し新たに膜貫通ドメインが付加された分子構造を有していることから、細胞膜へ局在する可能性が示唆された。そこで発現ベクターを作製し種々の細胞内小器官マーカを用いて解析を行ったところ、細胞内の初期エンドソームにおいて特異的な局在を示す事が明らかとなった。一方、各ドメインの欠失変異体の発現ベクターを作製して解析を行ったところ GEFドメインを介して初期エンドソームの凝集を促進していることが明らかになった。これらの結果から、このプルキニエ細胞特異的に発現する新規 Trio スプライシング産物は初期エンドソームの動態制御に関与する分子である事が示唆された。

### D. 考察

これまで神経変性疾患の原因遺伝子が数多く同定されているが、それらは脳内に広範に発現分布するケースが多く、どのようにして特定ニューロンだけが変性脱落するのかは明らかにされていない。神経変性の細胞タイプ特異性を規定する分子を同定する事は特定ニューロンならびに特定神経回路脱落による難治性神経変性疾患の発症機序を理解する上で重要な意義を有していると考えられる。本研究で同定された Trio の新規スプライシング産物はプルキニエ細胞特異的に分布し PCD マウスで特異的に発現が低下することから細胞タイプ特異的なニューロンの変性・脱落に関与する可能性が考えられた。

### E. 結論

小脳神経変性のモデルである PCD マウスからプルキニエ細胞特異的な新規 Trio スプライシング産物を同定し、エンドソームの動態制御に関与することを明らかにした。近年ニューロンの生存や神経回路維持に関与する様々な膜表面分子の動態制御においてエンドソームが重要な役割を担っていることが明らかになっている。今後、この分子の生体内での役割を明らかにしてゆくことは、小脳神経変性による運動失調の病態機序の理解に役立つことが予想された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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 European Journal of Neurology, 9:97-100, 2002
2. Momose Y, Murata M, Kobayashi K, Tachikawa M, Nakabayashi Y, Kanazawa I, Toda T: Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms. Ann Neurol, 51:133-136, 2002
3. Tachikawa M, Nagai Y, Nakamura K, Kobayashi K, Fujiwara T, Hye-Jung Han, Nakabayashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Nakamura Y, Toda T: Identification of CAG repeat-containing genes expressed in human brain as candidate genes for autosomal dominant spinocerebellar ataxias and other neurodegenerative disease. Journal of

Human Genetics; 47:275-278, 2002

4. Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I: Chemical chaperones Reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. Neurobiology of Disease; 10:88-99, 2002
5. Hazeki N, Tukamoto T, Yazawa I, Koyama M, Hattori S, Someki I, Iwatsubo T, Nakamura K, Goto J, Kanazawa I: Ultrastructure of nuclear aggregates formed by expressing an expanded polyglutamine Bio Biophys Res Com 294: 429-440, 2002
6. Okazawa H, Rich T, Chang A, Lin X, Waragai M, Kajikawa M, Enokido Y, Komuro A, Kato S, Shibata M, Hatanaka H, Mouradian M, Sudol M, Kanazawa I: Interaction between Mutant Ataxin-1 and PQBP-1 Affects Transcription and Cell Death. Neuron 34: 701-713, 2002.

## 学会発表

特になし

## G. 知的所有権取得状況

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

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

ポリグルタミン病に対する分子治療の試み  
分担研究者 永井義隆 大阪大学大学院医学系研究科  
ゲノム機能分野 助手

研究要旨

ポリグルタミン (po yQ) 病は種々の脊髄小脳変性症、ハンチントン病などを含む一群の神経変性疾患の総称で、異常伸長 po yQ 鎖が病的コンフォメーションを獲得し、難溶性凝集体の形成あるいは病的な蛋白質間相互作用などにより神経変性を引き起こすと考えられている。我々はこれまでに異常伸長 po yQ 鎖選択的に結合するペプチド QBP1 が試験管内、培養細胞において異常伸長 po yQ 蛋白質の凝集体形成・細胞死を抑制することを明らかにした。本研究ではショウジョウバエ複眼に QBP1 を異常伸長 po yQ 蛋白質と共発現させると、po yQ 蛋白質の凝集体形成・複眼変性を著明に抑制することを見出した。また神経系に QBP1 を異常伸長 po yQ 蛋白質と共発現させると、神経変性による寿命短縮の著明な改善を認めた。以上から QBP1 の異常伸長 po yQ 蛋白質による神経細胞死に対する生体内での有効性が明らかとなった。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症は小脳の進行性変性を主病変とし、運動失調と様々な神経症状を呈する神経変性疾患の総称である。主に中年以降に発症し、神経変性は徐々に進行するが、現時点で有効な治療法の乏しい神経難病であり、厚生労働省の特定疾患に指定されている。我が国では約2万人の患者がいと推定されており、早期の治療法開発が望まれている。

脊髄小脳変性症の原因は長らく不明であったが、我が国で約3分の1を占める遺伝性脊髄小脳変性症の大部分については原因遺伝子異常が明らかにされた。その多く（脊髄小脳失調症1、2、3、6、7、17型）はそれぞれ異なる原因遺伝子内にグルタミンをコードする CAG 反復配列の異常伸長という共通の遺伝子異常を持ち、同様の遺伝子異常を持つ球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症と併せてポリグルタミン (Po yQ) 病と総称されている。

Po yQ 病の共通の発症分子機構として異常遺伝子から翻訳される異常伸長 Po yQ 鎖自身が病的コンフォメーションを獲得し、難溶性の凝集体を形成あるいは病的蛋白質間相互作用により神経細胞毒性を発揮すると考えられている。我々は治療法開発という視点から、異常伸長 Po yQ 鎖に特異的に結合する分子がこのような病的作用を阻害する可能性を考え、ファージディスプレイ法によるランダムペプチドライブラリーのスクリーニングから異常伸長 Po yQ 鎖特

異的結合ペプチド、QBP1 (Po y glutamine Binding Peptide) を同定した。これまでの研究で QBP1 が *in vitro* および培養細胞の系で異常伸長 Po yQ 蛋白質による凝集体形成・細胞死を抑制することを明らかにしてきた (J. Biol. Chem. 275: 10437, 2000)。

本研究ではこれらの難治性疾患の治療法確立を目指して、①Po yQ 病ショウジョウバエモデルを用いて QBP1 の *in vivo* での治療効果を示すこと、②QBP1 の結合による異常伸長 Po yQ 鎖の病的コンフォメーション獲得に対する影響を明らかにし、凝集体抑制の分子機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

(1) Po yQ 病ショウジョウバエモデルでの QBP1 共発現による治療効果の検討

QBP1 と CFP との融合蛋白質 QBP1-CFP を GAL4-UAS システムの発現制御のもと発現するトランスジェニックショウジョウバエ QBP1 Fy を作成した。Po yQ 病ショウジョウバエモデルとして、異常伸長 Po yQ 蛋白質 FLAG-Q92 を複眼特異的プロモーター *gmr* により発現する Q92 Fy あるいは MJDtr-Q78 蛋白質を GAL4-UAS システムの発現制御のもと発現する MJDtr-Q78 Fy とを用いて、QBP1 Fy との遺伝学的交配を行った。

複眼での発現実験では複眼特異的プロモーター *eyeless* により QBP1-CFP を FLAG-Q92 より先行させて発現し、成虫の FLAG-Q92 によ