

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

CAGリピート病に対する治療法の開発に関する研究

(H13-こころ-022)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 貫名 信行

平成16(2004)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
CAG リピート病に対する治療法の開発に関する研究 貫名 信行	----- 3
II. 分担研究報告書	
1. CAG リピート病モデルシステムを用いた治療法の開発 貫名 信行	----- 13
2. CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発 辻 省次	----- 17
3. 球脊髄性筋萎縮症の治療法の開発 祖父江 元	----- 19
4. Machado-Joseph 病原因タンパク質切断酵素の解析 垣塚 彰	----- 21
5. ポリグルタミンにより誘導される細胞死の機序解析とその抑制法の開発 宮下 俊之	----- 23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 35

# I. 総括研究報告書

## CAG リピート病に対する治療法の開発に関する研究

主任研究者 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

ポリグルタミン病の伸長ポリグルタミン含有分子の構造病態に基づいて分子不安定性を抑える治療法の可能性について示した。またポリグルタミンの転写調節障害仮説に基づく治療の可能性についても転写障害の解析が進み、その薬物による回復の可能性が示唆された。これらを中心に CAG リピート病の病態と治療法の開発に関して、今後の展開が期待される多くの成果をもたらすことができた。

### A. 研究目的

CAG リピート病 (ポリグルタミン病) はハンチントン病、遺伝性脊髄小脳変性症、球脊髄性筋萎縮症などの代表的な神経変性疾患を含み、近年病因遺伝子が同定された後その病態解明が急速に進歩した疾患群である。しかしながら本疾患は未だ治療法に関しては十分な進展が見られていない。本研究では従来の研究で蓄積した本疾患群のモデルシステム (分子モデル、細胞モデル、マウスモデル) を有効に用い、従来の仮説の検証、病態解明の展開、治療法の開発を行おうというものである。具体的には 1) ポリグルタミンによる凝集体形成過程の解明とその抑制、2) ポリグルタミンによる細胞死、あるいは細胞機能障害機構の解明とその抑制、3) 動物モデルを用いた神経細胞死、神経細胞機能障害の抑制の試みを中心的な課題として行う。

### B. 研究方法

#### CAG リピート病モデルシステムを用いた治療法の開発

35 グルタミンリピート数をもつミオグロビンをもちいて凝集体形成を阻害する可能性のある 200 ほどの化合物を検討した。この中でも最も効果のあった trehalose について細胞レベルでは tHtt+EGFP 細胞をもちいて、個体レベルではトランスジェニックマウス R6/2 を用いてその病理、症状の進行に対する影響の検討を進めた。

#### CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発

DRPLA トランスジェニックマウスは、辻研究室で作成してきた Q79 マウスより、en masse expansion によって得られた Q129 マウスを用いた。4 週齢、8 週齢、12 週齢の Q129 マウスおよび対照として non-transgenic マウス (non-TG) を用いて全脳より total RNA を抽出し、polyA(+)RNA を調整した。発現プロファイリングを、Affymetrix GeneChip を用いて検討した。

#### 球脊髄性筋萎縮症の病態解明と治療法開発

2、4、8、16g/l の濃度で SB 水溶液を調整し、給水瓶により 5 週齢からマウスに ad libitum で経口投与した。マウスの症状は Rotarod や cage activity による運動機能測定や、体重、生存期間の測定を行い評価した。ヒストンのアセチル化はアセチル化ヒストンに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学およびウエスタンブロットにより解析した。

#### Machado-Joseph 病原因蛋白質切断酵素の解析

昨年までに同定した MJD 蛋白質を特異的にプロセシングする活性を持つ PC12 細胞で親株の PC12 細胞に比べて mRNA の発現量の変化した遺伝子を DNA チップで解析し、発現量の変化した遺伝子がコードする蛋白質の構造・機能解析を行い、MJD 蛋白質のプロセシング酵素の候補遺伝子を探った。

#### 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

siRNA の配列をヒト DRPLA に特異的なものを 3 種類、マウス DRPLA に特異的なものを 5 種類、ヒト、マウスに共通のものを 1 種類設計した。ヒトの場合は HeLa 細胞、マウスの場合は P19 細胞を用いて上記のプラスミドを遺伝子導入し、プラスミドがもつ薬剤耐性遺伝子を用いて導入細胞を選択した後、蛋白レベル、mRNA レベルで発現量を解析した。最も効率よく DRPLA 蛋白質の発現を抑制したプラスミドから必要最小限の DNA 断片を精製し、トランスジェニックマウスを作製した。

### C. 研究結果

#### CAG リピート病モデルシステムを用いた治療法の開発

化合物の検討によって、dissacharide に凝集抑制効果が認められ、その中でも treharose が最も強力であった。そこで treharose の効果を truncated huntingtin exon1-EGFP を発現した細胞において効果をみたところ、凝集抑制効果が認められ、treharose 合成酵素である OtsA+B を発現したところ凝集抑制効果、細胞死抑制効果は HDJ1 と同程度に認められた。さらに treharose は Mb-Q35 の変性実験の Cm value を Q12 と同程度に上昇した。さらにハンチントン病モデルマウス R6/2 マウスの飲料水に 2% の濃度で投与したところ 10% 程度の生存日数の延長、rotarod などの機能低下の遅延、病理学的な凝集体形成減少を認めた。

#### CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発

Q129 マウスの変異 DRPLA タンパクの核内集積は、4 週時点から強く認められた。

発現プロファイリングについては、週齢、Q129 vs. non-TG に関する 2-way ANOVA では 104 個の遺伝子が検出された ( $p < 0.05$ )。このうち、34 個の遺伝子は、12 週齢で有意な発現低下、21 個の遺伝子で 12 週齢で有意な発現上昇が確認され、これらの遺伝子について、時間依存性の発現量の変化が確認された。発現量が時間依存性に低下する遺伝子群の中には、c-FOS, EGR-1, preprosomatostatin など、CERB-依存性転写活性化が関与する遺伝子が含まれていた。

#### 球脊髄性筋萎縮症の病態解明と治療法開発

SB 4g/l の投与により、運動機能の発症が有意に遅延し、症状の進行も抑制された。また脊髄前根の軸索萎縮や神経原性筋萎縮などの病理所見にも有意な改善が認められた。8g/l では発症の遅延はみられたものの運動機能障害の進行は抑制されなかった。より低い濃度 (2g/l) や高い濃度 (16g/l) では運動機能改善効果は乏しかった。16g/l の投与ではむしろ生存期間の短縮傾向が認められた。ヒストン H3 のアセチル化は野生型に比べ Tg において有意に低下しており、SB の投与により用量依存性に増加した。SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化は認められなかった。

#### Machado-Joseph 病原因蛋白質切断酵素の解析

MJD 蛋白質を特異的にプロセシングする活性を持つ PC12 細胞で親株に比べて発現上昇と下降が観察された遺伝子をそれぞれ 9 つ同定した。そのうち、発現上昇がみられた遺伝子の全長 cDNA を取得し、MJD 蛋白質と共発現させ、共発現によって MJD 蛋白質プロセシングが誘導されるか否かをウェスタンブロットで解析した。しかしながら、少なくともこれらの遺伝子の単独の強発現で、MJD 蛋白質のプロセシングの亢進を観察することはできなかった。

#### 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

ヒト DRPLA に対する siRNA は蛋白質の発現を 35% にまで抑制した。マウス DRPLA に対する siRNA は蛋白質の発現を 20% にまで、RNA の発現を 16% にまで抑制した。また今回使った細胞においては常に U6 RNA pol III プロモーターの方が H1 RNA pol III より発現抑制において優れていた。また生まれてきたマウスの tail DNA を用いてサザンブロット法で解析したところトランスジーンを持つマウスが得られた。

### D. 考察

本年度の研究によって CAG リピート病に対する治療法の開発のための幾つかの着実な成果が得られた。

Mb-Q35 を用いた凝集抑制効果のある化合物に disaccharide が多く存在し、そのうちでも treharose が最も効果が認められた。その機序としては treharose が直接ポリグルタミンに結合してアミロイド形成を阻害する可能性とホ

スト蛋白のアンフォールディングを抑え、それによる凝集の核形成を抑えている可能性が存在する。少なくとも trehalose 存在下における Mb-Q35 の変性実験の結果はこの蛋白の変性を抑制していることが示唆され、trehalose の分子安定化作用がこのポリグルタミン含有蛋白にも影響している可能性がある。tHttQ150 を発現しているトランスジェニックマウスにおいても、凝集体形成抑制。寿命の延長をみたことは、trehalose がマウスにおいても凝集体形成部位に到達し、凝集体形成抑制効果をもたらしたことを示唆する。ただし何らかのシグナル系を介して凝集抑制効果があったことは今回の実験では否定できなかった。Trehalose は飲料水などにも含まれており、毒性は極めて少ない安全なものである。この効果の機序をさらに解析し、より効果のある化合物の作成のリード化合物として考えていくことも可能であろう。

DRPLA Q129 マウスにおいては進行性の脳萎縮が確認されたが、神経細胞の消失は観察されないことから、病態機序の本質は神経細胞死にあるのではなく、神経細胞の機能障害、特に、時間依存性の生じる変異タンパクの核内集積の結果生じる核の機能障害が重要であると考えられた。

包括的発現プロファイリングにより Q129 マウスにおいては、選択的な遺伝子の転写障害、特に、転写抑制が生じていることが確認された、ポリグルタミン病の病態として、選択的な遺伝子群の転写抑制が重要であると考えられる。転写抑制が確認された遺伝子の中には、CREB-依存性転写活性化が関与する遺伝子が含まれており、これまでの *in vitro* での解析結果を裏付けるものであった。

このような転写抑制の緩和を目指す治療法として SB の SBMA マウスに対する治療が試みられたが、効果は用量依存性であり、その therapeutic window が極めて狭いことが示された。とくに高濃度ではヒストンのアセチル化は促進できるものの、毒性により生存期間を短縮させると考えられた。また、SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化がないことから、その治療効果は転写改善に基づくものと考えられた。

プロセッシングを制御するために、MJD 蛋白質を特異的にプロセッシングする活性を持つ

PC12 細胞において発現亢進を認めた 9 遺伝子を同定し、これら遺伝子の全長 cDNA を発現させることでこれらの遺伝子が MJD 蛋白のプロセッシングに関与する可能性を探った。その中には既知のプロテアーゼも一つ含まれていたが、これらの遺伝子の単独強発現によって MJD 蛋白質のプロセッシングの亢進は観察することができなかった。一方、この既知のプロテアーゼは細胞内では MJD 蛋白質と共局在し、凝集体様の構造物を MJD 蛋白質とともに形成している可能性が得られた。このことは、このプロテアーゼ単独ではプロテアーゼとしての活性が弱く（非活性型）、別の因子の関与によって、例えば阻害因子（蛋白質）の減少によって活性化をうける可能性を示唆する。

遺伝子の正常機能を解析するにはノックアウトマウスの作製が一般的であるが、時間的、経済的にみて負担が大きい方法でもある。今回 DRPLA 蛋白質の機能解析のために siRNA を用いたノックダウンマウスの作製を試みた。細胞レベルではマウスの細胞においても予想に反してヒト U6 RNA pol III の方がマウスのそれより有効であった。残念ながら今年度中にマウス個体を用いた解析結果を出すことはできなかったが、今後は発現抑制の程度、細かな表現型を解析予定である。今のところトランスジーン陽性のマウスに目立った表現型は出現していない。

## E. 結論

ポリグルタミン病の病態に基づいて分子不安定性を抑える治療法の可能性について示した。またポリグルタミンの転写調節障害仮説に基づく治療の可能性についても転写障害の解析が進み、その薬物による回復の可能性が示唆された。CAG リピート病の病態と治療法の開発に関して、今後の展開が期待される多くの成果をもたらすことができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N.R., Doi, H., Kurosawa, M.,

- Nekooki, M. and Nukina, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* *10*, 148-154, 2004.
- Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A. and Nukina, N. Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 11680-11685, 2004.
- Zemskov, E.A. and Nukina, N. Impaired degradation of PKC $\alpha$  by proteasome in a cellular model of Huntington's disease. *Neuroreport* *14*, 1435-1438, 2003.
- Zemskov, E.A., Jana, N.R., Kurosawa, M., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Nekooki, M. and Nukina, N. Pro-apoptotic protein kinase C delta is associated with intranuclear inclusions in a transgenic model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* *87*, 395-406, 2003.
- Wen, F.C., Li, Y.H., Tsai, H.F., Lin, C.H., Li, C., Liu, C.S., Lii, C.K., Nukina, N. and Hsieh, M. Down-regulation of heat shock protein 27 in neuronal cells and non-neuronal cells expressing mutant ataxin-3. *FEBS Lett.* *546*, 307-314, 2003.
- Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Hashikawa, T., Fujisawa, T. and Nukina, N. Expansion of polyglutamine induces the formation of quasi-aggregate in the early stage of protein fibrillization. *J. Biol. Chem.* *278*, 34717-34724, 2003.
- Park, T.J., Hamanaka, H., Ohshima, T., Watanabe, N., Mikoshiba, K. and Nukina, N. Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *302*, 671-678, 2003.
- Lee, J.A., Lim, C.S., Lee, S.H., Kim, H., Nukina, N. and Kaang, B.K. Aggregate formation and the impairment of long-term synaptic facilitation by ectopic expression of mutant huntingtin in Aplysia neurons. *J. Neurochem.* *85*, 160-169, 2003.
- Iwata, A., Maruyama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Kanazawa, I., Tsuji, S. and Nukina, N. Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 2625-2635, 2003.
- Hoshino, M., Dohmae, N., Takio, K., Kanazawa, I. and Nukina, N. Identification of a novel amino-terminal fragment of amyloid precursor protein in mouse neuroblastoma Neuro2a cell. *Neurosci. Lett.* *353*, 135-138, 2003.
- Fukumoto, H., Ingelsson, M., Garevik, N., Wahlund, L.O., Nukina, N., Yaguchi, Y., Shibata, M., Hyman, B.T., Rebeck, G.W. and Irizarry, M.C. APOE epsilon 3/epsilon 4 heterozygotes have an elevated proportion of apolipoprotein E4 in cerebrospinal fluid relative to plasma, independent of Alzheimer's disease diagnosis. *Exp. Neurol.* *183*, 249-253, 2003.
- Sano, Y., Date, H., Igarashi, S., Onodera, O., Oyake, M., Takahashi, T., Hayashi, S., Morimatsu, M., Takahashi, H., Makifuchi, T., Fukuhara, N. and Tsuji, S. Aprataxin, the causative protein for early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia, is a nuclear protein with a potential role as a nucleotide repair protein. *Ann. Neurol.* *55*, 241-249, 2004.
- Hara, K., Fukushima, T., Suzuki, T., Shimohata, T., Oyake, M., Ishiguro, H., Hirota, K., Miyashita, A., Kuwano, R., Kurisaki, H., Yomono, H., Goto, J., Kanazawa, I. and Tsuji, S. Japanese SCA families with a distinct phenotype linked to a locus overlapping with SCA15 locus. *Neurol.* *62*, 648-651, 2004.
- Sanpei, K., Ikeuchi, T., and Tsuji, S. DIRECT technologies for molecular cloning of genes containing expanded CAG repeats. *Methods in Molecular Biology* *217*, 73-81, 2003.
- Yabe, I., Sasaki, H., Chen, D.H., Raskind, W.H., Bird, T.D., Yamashita, I., Tsuji, S., Kikuchi, S. and Tashiro, K.

- Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C gamma. *Arch. Neurol.* *60*, 1749-1751, 2003
- Katsuno, M., Adachi, H., Tanaka, F., and Sobue, G. Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J. Mol. Med.* 2004 (in press).
- Katsuno, M. and Sobue, G. Polyglutamine diminishes VEGF; passage to motor neuron death? *Neuron* *41*, 677-679, 2004.
- Katsuno, M., Adachi, H., and Sobue, G. Sweet relief for Huntington disease. *Nat. Med.* *10*, 123-124, 2004.
- Katsuno, M., Adachi, H., Doyu, M., Minamiyama, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Inukai, A., and Sobue, G. Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat. Med.* *9*, 768-773, 2003.
- Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Pagoulatos, G., Angelidis, C., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G. Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J. Neurosci.* *23*, 2203-2211, 2003.
- Katsuno, M., Adachi, H., Inukai, A., and Sobue, G. Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy. *Cytogenet. Genome Res.* *100*, 243-251, 2003.
- Sobue, G., Adachi, H., and Katsuno, M. Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). In *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. Dickson Dickinson ed. INS Neuropath Press, LA, USA, pp275-279, 2003.
- Maeda, H., Hori, S., Ohizumi, H., Segawa, T., Kakehi, Y., Ogawa, O., and Kakizuka, A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of Arsenic Trioxide and L-Buthionine-Sulfoximine. *Cell Death Differ.* 2004 (in press).
- Sato, A., Imaizumi, M., Hoshi, Y., Rikiishi, T., Fujii, K., Kizaki, M., Kagechika, H., Kakizuka, A., Hayashi, Y., and Iinuma K. Alteration in the cellular response to retinoic acid of a human acute promyelocytic leukemia cell line, UF-1, carrying a patient-derived mutant PML-RARA $\alpha$  chimeric gene. *Leukemia Res.* 2004 (in press).
- Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, H., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., and Nakayama, K.I. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J.* *23*, 659-669, 2004
- Kobayashi, T., and Kakizuka, A. Molecular analyses of Machado-Joseph disease. *Cytogenet. Genome Res.* *100*, 261-275, 2003.
- Kimura, Y., and Kakizuka, A. Polyglutamine diseases and molecular chaperones. *IUBMB Life* *55*, 337-345, 2003.
- Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., and Kakizuka, A. PGC-1 $\beta$ /ERRL1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 12378-12383, 2003
- Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A. and Okamoto, K. Vacuole-creating protein in neuro-degenerative diseases. *Neurosci. Lett.* *343*, 77-80, 2003.
- Nagao, K., Fujii, K., Yamada, M., and Miyashita, T. Identification of a novel polymorphism involving a CCG repeat in the PTCH gene and a genome-wide screening of CCG-containing genes. *J. Hum. Genet.* *49*, 97-101, 2004.
- Yanagisawa, H., Miyashita, T., Nakano, Y.,

and Yamamoto, D. HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 10, 798-807, 2003.

Wu, Z., Shen, L., Inatomi, Y., U M, Miyashita, T., Toyama, K., and Miyauchi, J. Effects of TNF $\alpha$  on the growth and sensitivity to cytosine arabinoside of blast progenitors in acute myelogenous leukemia with special reference to the role of NF- $\kappa$ B. *Leuk. Res.* 27, 1009-1018, 2003.

Shikama, Y., Yamada, M., and Miyashita, T. Caspase-8 and caspase-10 activate NF- $\kappa$ B through RIP, NIK and IKK $\alpha$  kinases. *Eur. J. Immunol.* 33, 1998-2006, 2003.

Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., Nagao, K., Shima, S., Ogata, Y., Katada, T., Nishina, H., and Yamada, M. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein is phosphorylated by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1535-1542, 2003.

Miyahara, A., Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., Hoshika, A., and Yamada, M. Genomic structure and alternative splicing of the insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53-kDa protein. *J. Hum. Genet.* 48, 410-414, 2003.

Fujii, K., Miyashita, T., Omata, T., Kobayashi, K., Takanashi, J., Kouchi, K., Yamada, M., and Kohno, Y. Gorlin syndrome with ulcerative colitis in a Japanese girl. *Am. J. Med. Genet.* 121A, 65-68, 2003.

Fujii, K., Kohno, Y., Sugita, K., Nakamura, M., Moroi, Y., Urabe, K., Furue, M., Yamada, M., and Miyashita, T. Mutations in the human homologue of *Drosophila patched* in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum. Mutat.* 21, 451-452, 2003.

## 2. 学会発表

Nagaoka, U., Kim, K., Jana, N. R., Doi, H., Mitsui, K., Oyama, F. and Nukina, N. Identification of p62 as an increased

protein in expanded polyglutamine expressing cells. The Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Doi, H., Mitsui, K., Kurosawa, M., Kuroiwa, Y. and Nukina, N. Proteome analysis of interacting proteins with cytosolic and nuclear aggregates from Huntington's disease model cell lines. The Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Ikeda, T., Kurosawa, M., Uchikawa, C. and Nukina, N. Genechip analysis of mouse brain stimulated by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). The Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Sakurai, T., Okuno, M., Kaneko, K., Wada, K. and Nukina, N. Analysis of lipid raft domains enriched in BACE1, possible interaction domains between amyloid precursor protein and BACE1. The Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Oyama, F., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Jana, N. R., Kotliarova, S. E. and Nukina, N. Region specific changes of gene expression in a transgenic mouse model for Huntington disease. The American Society of Human Genetics 53rd Annual Meeting (Los Angeles, USA), Nov. 2003.

Nukina, N., Tanaka, M., Machida Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Hashikawa, T., and Fujisawa, T. Structural basis for polyglutamine disease pathogenesis: therapeutic strategy. Gordon Conference on CAG triplet repeat disorders 2003 (Barga, Italy), May 2003.

Nukina, N., Doi, H. and Mitsui, K. Systematic analysis of aggregates binding proteins in polyglutamine disease. Cold Spring Harbor Laboratory 2004 Meeting on the Ubiquitin Family (Cold Spring Harbor, USA), Apr. 2003.

筒井秀和, 清水英明, 貫名, 宮脇敦史. 珊瑚由来新規蛍光蛋白質の結晶構造解析. 日本

結晶学会年会 2003 (熊本), 2003 年 12 月.

小山文隆, 宮崎晴子, 貫名信行. ハンチントン病トランスジェニックマウスにおける領域特異的遺伝子発現変化. 第 26 回日本神経科学大会 (名古屋), 2003 年 7 月.

三井健一, 土井宏, 臼井正哉, 大月香, 太田和健之, 貫名信行. ハンチントン病モデル細胞における凝集体結合タンパク質のセルソーターおよび質量分析装置を用いた解析. 第 26 回日本神経科学大会 (名古屋), 2003 年 7 月.

池田哲朗, 黒沢大, 内川千春, 貫名信行. 反復経頭蓋磁気刺激法によるマウス脳発現変動遺伝子の解析. 第 26 回日本神経科学大会 (名古屋), 2003 年 7 月.

土井宏, 三井健一, 黒岩義之, 貫名信行. ハンチントン病モデル細胞を用いた核内および細胞質凝集体のプロテオーム解析. 第 44 回日本神経学会総会 (横浜), 2003 年 5 月.

長岡詩子, 金健, ジャナニーハーランジャン, 貫名信行. 伸長ポリグルタミンにより発現増加する 60kD 蛋白の解析. 第 44 回日本神経学会総会 (横浜), 2003 年 5 月.

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G. HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. *Molecular Mechanisms of neurodegeneration* (Milan, Italy), May 2003.

Adachi, H., Katsuno, M., Kobayashi, Y., and Sobue, G. Widespread distribution of nuclear and cytoplasmic mutant AR protein complex in the nervous system and visceral organs of patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Gordon Conference on CAG Repeat* (Il Ciocco, Italy), May 2003.

Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Kobayashi, Y., and Sobue, G. Hormonal intervention therapy in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscle atrophy (SBMA). *Gordon Conference on CAG triplet Repeat disorders* (Il Ciocco,

Italy), May 2003.

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Waza, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Inukai, A., Doyu, M., and Sobue, G. Widespread Occurrence of nuclear and cytoplasmic mutant AR accumulation in the neural and nonneural tissues of SBMA patients. *Society for Neuroscience 33<sup>rd</sup> Annual Meeting* (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Yanagisawa, H., Miyashita, T., Yamamoto, D. HSpin1 interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, and induces autophagic cell death. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Programmed Cell Death"* (Cold Spring Harbor, USA), Sep. 2003.

柳澤比呂子, 吉田瞳, 宮下俊之, 山元大輔. HSpin1 の細胞死・オートファジー促進作用と siRNA によるその抑制. 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸), 2003 年 12 月.

禹麻美, 宮下俊之, 山田正夫. グルココルチコイドによって誘導される標的遺伝子のアポトーシスへの関与の解析. 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸), 2003 年 12 月.

長尾和右, 禹麻美, 宮下俊之, 山田正夫. ショートヘアピン RNA による DRPLA 蛋白質の発現抑制. 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸), 2003 年 12 月.

於保祐子, 山崎麻由, 宮下俊之, 山田正夫. DRPLA 蛋白のリン酸化. 日本人類遺伝学会第 48 回大会 (長崎), 2003 年 10 月.

藤井克則, 山田正夫, 宮下俊之. Nevoid basal cell carcinoma syndrome における PTCH 遺伝子変異の検討. 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋), 2003 年 9 月.

宮下俊之, 藤井克則. (シンポジウム) 基底細胞母斑症候群 (NBCCS) の原因遺伝子 PTCH の解析. 第 9 回家族性腫瘍研究会学術集会 (東京), 2003 年 6 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

球脊髄性筋萎縮症の病態を再現する非ヒト動物、及び球脊髄性筋萎縮症治療剤. 2002 年 8 月 19 日出願 (特願 2002-238599).

神経変性疾患の治療薬. 2002年3月15日出  
願(特願2002-71924).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

## 1. CAG リピート病モデルシステムを用いた治療法の開発

主任研究者 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

ポリグルタミンの伸長によるホスト蛋白構造変化による分子不安定化と凝集抑制の可能性のある化合物を *in vitro* の系でスクリーニングし、disaccharide にその機能があることを認めた。Disaccharide のなかでも最も効果のあった trehalose についてポリグルタミン病細胞モデル系、マウスモデルともちいて検討したところ、どちらの系においても trehalose に凝集抑制効果があることがわかり、マウスにおいては寿命、臨床症状の改善も認めた。これらの結果は分子安定化療法がポリグルタミン病の発症予防の可能性を示している。

### A. 研究目的

CAG リピート病の病態においてポリグルタミン凝集体の形成が、重要な役割を果たす可能性が、疾患脳の病理やモデルマウスの病理において核内封入体が形成されること、細胞モデルにおいて凝集体形成が細胞死と関連することから示唆されている。我々は 1) 細胞モデル系においてシャペロン系がこれらの凝集体形成以前の可溶性の伸長ポリグルタミン含有蛋白を認識すること、2) さらにこの細胞モデル系ではプロテアソームが伸長したポリグルタミンの発現とともに不溶性分画にシフトし、これによってプロテアソーム活性が低下し、P53 などの基質の上昇が認められることを示した。さらにポリグルタミンをミオグロビンに挿入した分子モデルを用いた検討によって伸長したポリグルタミンは分子内ベータシートを形成すること、時間とともに分子間ベータシートを形成してアミロイド線維となることを示した。また伸長したポリグルタミンのホスト蛋白は部分的アンフォールディングの状態をとっていることを示した。このような結果から我々は伸長したポリグルタミンはこれを含む遺伝子産物の部分的アンフォールディングを引き起こし、この変化をシャペロン系が認識し、リフォールディングを試みる。これが十分働かない場合タンパク分解系としてプロテアソームが働くが、伸長したポリグルタミンの沈着がこの機

能を阻害し、その基質の蓄積をもたらし、細胞死をもたらすという病態仮説をうち立てた。この仮説からポリグルタミンの発症予防の方針としては 1) 異常ポリグルタミンの発現を抑える、2) 異常ポリグルタミン含有蛋白の分解を促進する、3) 異常ポリグルタミン含有蛋白のアンフォールディングを抑えるといった方向が考えられる。本研究ではポリグルタミン含有蛋白の凝集抑制作用のある化合物をスクリーニングし、trehalose にその効果を認め、マウスモデルにおいてもその効果を確認した。

### B. 研究方法

われわれはポリグルタミン鎖 Q35 を安定性の極めて高い蛋白質の一つであるマッコウクジラミオグロビンへ挿入した Mb-Q35 を用いて種々の凝集抑制効果を持つ可能性のある化合物について *in vitro* で検討した。約 200 種類の化合物について検討を行った。さらにこのうち効果の認められた trehalose に関しては truncated huntingtin-EGFP を発現した N2a 細胞の系を用いて、trehalose 合成酵素 OtsA, B を発現し、その凝集抑制効果、細胞死抑制効果を検討した。さらに huntingtin exon1 を導入したトランスジェニックマウス R6/2 を用いて飲料水に 2% trehalose を投与し、寿命、症状、病理について検討を行った。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験に関しては、理研の動物実験指針に基づいた。

C. 研究結果

Mb-Q35 を用いて 200 あまりの化合物を検討したところ、disaccharide に凝集抑制効果が認められ、その中でも trehalose が最も強力であった。この効果は QBP1 というポリグルタミン凝集抑制効果のあるといわれる合成ペプチドと同程度であった。そこで trehalose の効果を truncated huntingtin exon1-EGFP を発現した細胞において効果をみたところ、凝集抑制効果が認められ、trehalose 合成酵素である OtsA+B を発現したところ凝集抑制効果、細胞死抑制効果は HDJ1 と同程度に認められた。さらに trehalose は Mb-Q35 の変性実験の Cm value を Q12 と同程度に上昇した。これらの結果は trehalose が分子を安定化し、凝集抑制効果があり、その結果細胞死抑制効果が認められたと考えられる。さらにハンチントン病モデルマウス R6/2 マウスの飲料水に 2% の濃度で投与したところ 10% 程度の生存日数の延長、rotarod などの機能低下の遅延、病理学的な凝集体形成減少を認めた。

D. 考察

Mb-Q35 を用いた凝集抑制効果のある化合物に disaccharide が多く存在し、そのうちでも trehalose が最も効果が認められた。その機序としては trehalose が直接ポリグルタミンに結合しアミロイド形成を阻害する可能性とホスト蛋白のアンフォールディングを抑え、それによる凝集の核形成を抑えている可能性が存在する。少なくとも trehalose 存在下における Mb-Q35 の変性実験の結果はこの蛋白の変性を抑制していることが示唆され、trehalose の分子安定化作用がこのポリグルタミン含有蛋白にも影響している可能性がある。細胞内での trehalose 合成酵素の thtt-EGFP 発現細胞への導入によって trehalose を発現することにより、凝集体形成や細胞死抑制効果が HDJ1 と同程度に確認されたことは、trehalose の影響が他のポリグルタミン含有蛋白にも認められることを示している。さらに tHttQ150 を発現しているトランスジェニックマウスにおいても、

凝集体形成抑制、寿命の延長をみたことは、trehalose がマウスにおいても凝集体形成部位に到達し、凝集体形成抑制効果をもたらしたことを示唆する。ただし何らかのシグナル系を介して凝集抑制効果があったことは今回の実験では否定できなかった。Trehalose は飲料水などにも含まれており、毒性は極めて少ない安全なものである。この効果の機序をさらに解析し、より効果のある化合物の作成のリード化合物として考えていくことも可能であろう。

E. 結論

trehalose は伸長したポリグルタミンによるホスト蛋白の不安定化を抑え、凝集体形成を抑えることにより発症を遅延させたと考えた。この治療は変異誘導分子不安定化による凝集体形成を介する疾患の分子安定化治療法への展望を開くものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Khan, L.A. and Nukina, N. Molecular and functional analysis of *Caenorhabditis elegans* CHIP, a homologue of Mammalian CHIP. FEBS Lett. 2004 (in press).

Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N.R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M. and Nukina, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. Nat. Med. 10, 148-154, 2004.

Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A. and Nukina, N. Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. J. Biol. Chem. 279, 11680-11685, 2004.

Zemskov, E.A. and Nukina, N. Impaired degradation of PKC $\alpha$  by proteasome in a cellular model of Huntington's disease. Neuroreport 14, 1435-1438, 2003.

Zemskov, E.A., Jana, N.R., Kurosawa, M., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Nekooki, M.

and Nukina, N. Pro-apoptotic protein kinase C delta is associated with intranuclear inclusions in a transgenic model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* *87*, 395-406, 2003.

Wen, F.C., Li, Y.H., Tsai, H.F., Lin, C.H., Li, C., Liu, C.S., Lii, C.K., Nukina, N. and Hsieh, M. Down-regulation of heat shock protein 27 in neuronal cells and non-neuronal cells expressing mutant ataxin-3. *FEBS Lett.* *546*, 307-314, 2003.

Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Hashikawa, T., Fujisawa, T. and Nukina, N. Expansion of polyglutamine induces the formation of quasi-aggregate in the early stage of protein fibrillization. *J. Biol. Chem.* *278*, 34717-34724, 2003.

Park, T.J., Hamanaka, H., Ohshima, T., Watanabe, N., Mikoshiba, K. and Nukina, N. Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *302*, 671-678, 2003.

Lee, J.A., Lim, C.S., Lee, S.H., Kim, H., Nukina, N. and Kaang, B.K. Aggregate formation and the impairment of long-term synaptic facilitation by ectopic expression of mutant huntingtin in Aplysia neurons. *J. Neurochem.* *85*, 160-169, 2003.

Iwata, A., Maruyama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Kanazawa, I., Tsuji, S. and Nukina, N. Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin: implication for pathogenesis of synucleinopathies. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 2625-2635, 2003.

Hoshino, M., Dohmae, N., Takio, K., Kanazawa, I. and Nukina, N. Identification of a novel amino-terminal fragment of amyloid precursor protein in mouse neuroblastoma Neuro2a cell. *Neurosci. Lett.* *353*, 135-138, 2003.

Fukumoto, H., Ingelsson, M., Garevik, N., Wahlund, L.O., Nukina, N., Yaguchi, Y., Shibata, M., Hyman, B.T., Rebeck, G.W. and Irizarry, M.C. APOE epsilon 3/epsilon 4

heterozygotes have an elevated proportion of apolipoprotein E4 in cerebrospinal fluid relative to plasma, independent of Alzheimer's disease diagnosis. *Exp. Neurol.* *183*, 249-253, 2003.

## 2. 学会発表

Nagaoka, U., Kim, K., Jana, N. R., Doi, H., Mitsui, K., Oyama, F. and Nukina, N. Identification of p62 as an increased protein in expanded polyglutamine expressing cells. The Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Doi, H., Mitsui, K., Kurosawa, M., Kuroiwa, Y. and Nukina, N. Proteome analysis of interacting proteins with cytosolic and nuclear aggregates from Huntington's disease model cell lines. The Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Ikeda, T., Kurosawa, M., Uchikawa, C. and Nukina, N. Genechip analysis of mouse brain stimulated by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). The Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Sakurai, T., Okuno, M., Kaneko, K., Wada, K. and Nukina, N. Analysis of lipid raft domains enriched in BACE1, possible interaction domains between amyloid precursor protein and BACE1. The Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting (New Orleans, USA), Nov. 2003.

Oyama, F., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Jana, N. R., Kotliarova, S. E. and Nukina, N. Region specific changes of gene expression in a transgenic mouse model for Huntington disease. The American Society of Human Genetics 53rd Annual Meeting (Los Angeles, USA), Nov. 2003.

Nukina, N., Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Hashikawa, T., and Fujisawa, T. Structural basis for polyglutamine disease pathogenesis: therapeutic strategy. Gordon Conference on CAG triplet repeat disorders 2003 (Barga, Italy), May 2003.

Nukina, N., Doi, H. and Mitsui, K. Systematic analysis of aggregates binding proteins in polyglutamine disease. Cold Spring Harbor Laboratory 2004 Meeting on the Ubiquitin Family (Cold Spring Harbor, USA), Apr. 2003.

筒井秀和, 清水英明, 貫名信行, 宮脇敦史. 珊瑚由来新規蛍光蛋白質の結晶構造解析. 日本結晶学会年会 2003 (熊本), 2003 年 12 月.

小山文隆, 宮崎晴子, 貫名信行. ハンチントン病トランスジェニックマウスにおける領域特異的遺伝子発現変化. 第 26 回日本神経科学大会 (名古屋), 2003 年 7 月.

三井健一, 土井宏, 臼井正哉, 大月香, 太田和健之, 貫名信行. ハンチントン病モデル細胞における凝集体結合タンパク質のセルソーターおよび質量分析装置を用いた解析. 第 26 回日本神経科学大会 (名古屋), 2003 年 7 月.

池田哲朗, 黒沢大, 内川千春, 貫名信行. 反復経頭蓋磁気刺激法によるマウス脳発現変動遺伝子の解析. 第 26 回日本神経科学大会 (名古屋), 2003 年 7 月.

土井宏, 三井健一, 黒岩義之, 貫名信行. ハンチントン病モデル細胞を用いた核内および細胞質凝集体のプロテオーム解析. 第 44 回日本神経学会総会 (横浜), 2003 年 5 月.

長岡詩子, 金健, ジャナニーハーランジャン, 貫名信行. 伸長ポリグルタミンにより発現増加する 60kD 蛋白の解析. 第 44 回日本神経学会総会 (横浜), 2003 年 5 月.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

神経変性疾患の治療薬. 2002 年 3 月 15 日出願 (特願 2002-71924).

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 2. CAG リピート病における神経細胞機能障害機構の解明を基盤とした治療法の開発

分担研究者 辻 省次

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科

### 研究要旨

DRPLA トランスジェニックマウスモデル (Q129) マウスを用いて、包括的な遺伝子発現プロファイリングを行い、核の機能障害について検討を行った。その結果、34 個の遺伝子について、週齢依存性に発現が低下すること、21 個の遺伝子で週齢依存性に発現量が上昇することを見出した。発現が低下する遺伝子には、CREB-依存性の転写活性化が関与する遺伝子が含まれており、伸長ポリグルタミン鎖が核内転写アクティベーターの1つである TAF130 と結合して、CREB-依存性転写活性化を障害するというこれまでの *in vitro* の実験結果を支持するものであった。

### A. 研究目的

ポリグルタミン病の治療法開発のためには、伸長ポリグルタミン鎖によって引き起こされる細胞障害機構を明らかにする必要がある。われわれの研究室では歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症を対象として、培養細胞系、トランスジェニックマウスのモデルを用いて細胞障害機構の解 DRPLA トランスジェニックマウスは、われわれの研究室で作成してきた Q79 マウスより、*en masse expansion* によって得られた Q129 マウスを用いた。4 週齢、8 週齢、12 週齢の Q129 マウスおよび対象として non-transgenic マウス (non-TG) を用いて全脳より total RNA を抽出し、polyA(+)RNA を調整した。発現プロファイリングは、Affymetrix MullKsubA および MullKsubB を用いた。統計解析は、Rosetta Resolver を用いて、 $p < 0.05$  を有意水準として t-検定および 2-way ANOVA を用いて行った。析を行ってきた。その結果、伸長ポリグルタミン鎖の核移行と、核内集積が細胞障害機構に必須であること、さらに、伸長ポリグルタミン鎖が核内転写アクティベーターの1つである TAF130 と結合して、CREB-依存性転写活性化を障害することを明らかにしてきた。

DRPLA における転写障害について、DRPLA トランスジェニックマウスモデルを用いて、包括的な遺伝子発現プロファイリングにより、転写

障害の生じている遺伝子群の同定、特に、時間依存性に生じる転写障害に焦点を絞って解析を行った。

### B. 研究方法

DRPLA トランスジェニックマウスは、われわれの研究室で作成してきた Q79 マウスより、*en masse expansion* によって得られた Q129 マウスを用いた。4 週齢、8 週齢、12 週齢の Q129 マウスおよび対象として non-transgenic マウス (non-TG) を用いて全脳より total RNA を抽出し、polyA(+)RNA を調整した。発現プロファイリングは、Affymetrix MullKsubA および MullKsubB を用いた。統計解析は、Rosetta Resolver を用いて、 $p < 0.05$  を有意水準として t-検定および 2-way ANOVA を用いて行った。

### C. 研究結果

Q129 マウスは、3 週齢より、失調症状、ミオクロームスを示し、11 週齢よりてんかん発作を起こすようになり、16 週齢までに死亡する。病理学的には、進行性の脳の萎縮を示したが、明らかな神経細胞の消失は観察されなかった。興味深いことに、変異 DRPLA タンパクの核内集積は、4 週時点から強く認められた。

発現プロファイリングについては、週齢、Q129 vs. non-TG に関する 2-way ANOVA では 104

個の遺伝子が検出された ( $p < 0.05$ ). このうち、34 個の遺伝子は、12 週齢で有意な発現低下、21 個の遺伝子で 12 週齢で有意な発現上昇が確認され、これらの遺伝子について、時間依存性の発現量の変化が確認された。発現量が時間依存性に低下する遺伝子群の中には、c-FOS, EGR-1, preprosomatostatin など、CERB-依存性転写活性化が関与する遺伝子が含まれていた。

#### D. 考察

Q129 マウスは、失調症状、ミオクローヌス、てんかんなどの表現型を示し、若年発症型の齒状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症に対応するモデルと考えられる。Q129 マウスにおいては進行性の脳萎縮が確認されたが、神経細胞の消失は観察されないことから、病態機序の本質は神経細胞死にあるのではなく、神経細胞の機能障害、特に、時間依存性の生じる変異タンパクの核内集積の結果生じる核の機能障害が重要であると考えられた。

包括的発現プロファイリングにより分析では、遺伝子発現が有意に低下する遺伝子が、発現上昇を示す遺伝子よりもはるかに多く観察された。2-way ANOVA による解析から、時間依存性に発現量の変化する遺伝子が観察された。これらの解析結果より、Q129 マウスにおいては、選択的な遺伝子の転写障害、特に、転写抑制が生じていることが確認された。ポリグルタミン病の病態として、選択的な遺伝子群の転写抑制が重要であると考えられる。転写抑制が確認された遺伝子の中には、CREB-依存性転写活性化が関与する遺伝子が含まれており、これまでの *in vitro* の解析結果を裏付けるものであった。CREB-依存性転写活性化は、神経細胞の可塑性に重要な役割を演じており、今回のような steady-state level の転写だけではなく、転写活性化が生じる状況でのポリグルタミン病による影響を検討していく必要がある。治療法開発の可能性については、転写抑制を緩和することによって新たな治療法開発の可能性を検討していく必要がある。

#### E. 結論

ポリグルタミン病の病態機序として、変異タ

ンパクの核内集積とその結果生じる選択的な転写抑制が重要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sano, Y., Date, H., Igarashi, S., Onodera, O., Oyake, M., Takahashi, T., Hayashi, S., Morimatsu, M., Takahashi, H., Makifuchi, T., Fukuhara, N. and Tsuji, S. Aprataxin, the causative protein for early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia, is a nuclear protein with a potential role as a nucleotide repair protein. *Ann. Neurol.* 55, 241-249, 2004.

Hara, K., Fukushima, T., Suzuki, T., Shimohata, T., Oyake, M., Ishiguro, H., Hirota, K., Miyashita, A., Kuwano, R., Kurisaki, H., Yomono, H., Goto, J., Kanazawa, I. and Tsuji, S. Japanese SCA families with a distinct phenotype linked to a locus overlapping with SCA15 locus. *Neurol.* 62, 648-651, 2004.

Sanpei, K., Ikeuchi, T., and Tsuji, S. DIRECT technologies for molecular cloning of genes containing expanded CAG repeats. *Methods in Molecular Biology* 217, 73-81, 2003.

Yabe, I., Sasaki, H., Chen, D.H., Raskind, W.H., Bird, T.D., Yamashita, I., Tsuji, S., Kikuchi, S. and Tashiro, K. Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C gamma. *Arch. Neurol.* 60, 1749-1751, 2003.

#### 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

### 3. 球脊髄性筋萎縮症の病態解明と治療法開発

分担研究者 祖父江 元  
名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

#### 研究要旨

球脊髄性筋萎縮症のトランスジェニックマウスに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である sodium butyrate (SB) を経口投与した。SB によりヒストン H3 のアセチル化亢進が認められ、マウスの症状および病理所見は有意に改善した。しかしその効果は狭い濃度範囲でのみ認められ、臨床応用にあたっては慎重な検討が必要と考えられた。

#### A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、成人男性に発症する下位運動ニューロン疾患であり、アンドロゲン受容体 (AR) の CAG リピートの異常延長を病因とするポリグルタミン病のひとつである。ポリグルタミン鎖を有する変異 AR が核内に集積し、CBP などの転写関連因子の機能を阻害して転写障害をもたらすことが、神経細胞の機能障害の主因であると考えられている。Sodium butyrate などの HDAC 阻害剤はヒストンのアセチル化を促進することから、ポリグルタミン病における転写障害を軽減する可能性が示唆されている。今回、転写障害への治療介入として、SBMA マウスに対する sodium butyrate (SB) の治療効果を検討した。

#### B. 研究方法

2、4、8、16g/l の濃度で SB 水溶液を調整し、給水瓶により 5 週齢からマウスに ad libitum で経口投与した。マウスの症状は Rotarod や cage activity による運動機能測定や、体重、生存期間の測定を行い評価した。ヒストンのアセチル化はアセチル化ヒストンに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学およびウエスタンブロットにより解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋大学動物実験指針に基づき、動物の苦痛の緩和除去に十分配慮した。

#### C. 研究結果

SB 4g/l の投与により、運動機能の発症が有

意に遅延し、症状の進行も抑制された。また脊髄前根の軸索萎縮や神経原性筋萎縮などの病理所見にも有意な改善が認められた。8g/l では発症の遅延はみられたものの運動機能障害の進行は抑制されなかった。より低い濃度 (2g/l) や高い濃度 (16g/l) では運動機能改善効果は乏しかった。16g/l の投与ではむしろ生存期間の短縮傾向が認められた。ヒストン H3 のアセチル化は野生型に比べ Tg において有意に低下しており、SB の投与により用量依存性に増加した。SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化は認められなかった。

#### D. 考察

SB の SBMA マウスに対する治療効果は用量依存性であり、その therapeutic window が極めて狭いことが示された。とくに高濃度ではヒストンのアセチル化は促進できるものの、毒性により生存期間を短縮させると考えられた。また、SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化がないことから、その治療効果は転写改善に基づくものと考えられた。

#### E. 結論

Sodium butyrate はポリグルタミン病の治療薬として期待されるが、その効果は用量に大きく依存しており、臨床応用にあたって投与量の慎重な設定が必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Katsuno, M., Adachi, H., Tanaka, F., and Sobue, G. Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J. Mol. Med.* 2004 (in press).

Katsuno, M. and Sobue, G. Polyglutamine diminishes VEGF; passage to motor neuron death? *Neuron* 41, 677-679, 2004.

Katsuno, M., Adachi, H., and Sobue, G. Sweet relief for Huntington disease. *Nat. Med.* 10, 123-124, 2004.

Katsuno, M., Adachi, H., Doyu, M., Minamiyama, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Inukai, A., and Sobue, G. Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat. Med.* 9, 768-773, 2003.

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Pagoulatos, G., Angelidis, C., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G. Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J. Neurosci.* 23, 2203-2211, 2003.

Katsuno, M., Adachi, H., Inukai, A., and Sobue, G. Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy. *Cytogenet. Genome Res.* 100, 243-251, 2003.

Sobue, G., Adachi, H., and Katsuno, M. Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). In *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. Dickson Dickinson ed. INS Neuropath Press, LA, USA, pp275-279, 2003.

### 2. 学会発表

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Doyu, M., and Sobue, G. HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. *Molecular Mechanisms of neurodegeneration* (Milan, Italy), May 2003.

Adachi, H., Katsuno, M., Kobayashi, Y., and Sobue, G. Widespread distribution of nuclear and cytoplasmic mutant AR protein complex in the nervous system and visceral organs of patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Gordon Conference on CAG Repeat* (Il Ciocco, Italy), May 2003.

Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Kobayashi, Y., and Sobue, G. Hormonal intervention therapy in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscle atrophy (SBMA). *Gordon Conference on CAG triplet Repeat disorders* (Il Ciocco, Italy), May 2003.

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Wada, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Inukai, A., Doyu, M., and Sobue, G. Widespread Occurrence of nuclear and cytoplasmic mutant AR accumulation in the neural and nonneural tissues of SBMA patients. *Society for Neuroscience 33<sup>rd</sup> Annual Meeting* (New Orleans, USA), Nov. 2003.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

球脊髄性筋萎縮症の病態を再現する非ヒト動物、及び球脊髄性筋萎縮症治療剤。2002年8月19日出願(特願2002-238599)。

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし