

図 多系統萎縮症についての共同研究 (JAMSAC) の概要

## C. 進捗状況

### 1. 臨床データベース

具体的なデータ収集項目の調整、吟味を終え、共同研究参加施設ごとのデータベース構築としても使用でき、個人調査票作成など診療現場において応用のできるソフトを作成し、配布準備中である。臨床データの収集にあたっては、紙媒体で行うことを原則とし、倫理面、個人情報保護について細心の注意を払い、収集を進める。

画像データ収集に向けての、技術面、倫理面、個人情報の扱い等に関する検討を進めている。

### 2. 遺伝子解析研究

検体収集、管理等の中核的拠点となる東京大学での研究倫理審査を終了し、平成15年11月26日承認を受けた。

現在、幹事班員機関での研究倫理審査申請の手続きを進めるとともに、一般班員の施設や国立療養所等その他の共同研究への参加を募っている。

## D. 結 語

多系統萎縮症に関する全国多施設共同研究 JAMSAC の概要及び進捗状況を報告した。

## 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、ポリグルタミン病の発症に関与する因子として同定した VCP 蛋白質 (AAA ATPase ファミリーメンバー) の ATPase 活性の低下によって、神経細胞の変性・死が引き起こされていると考えている。今回の実験で、VCP 蛋白質はリン酸化・脱リン酸化によって、その ATPase 活性の調節を受けることが判明した。すなわち、異常蛋白質の蓄積に関連する VCP 蛋白質のリン酸化・脱リン酸化を同定し、それらの変化によって引き起こされる ATPase 活性の変化を解析することで、異常蛋白質の蓄積が引き起こす VCP 蛋白質の ATPase 活性の低下に対抗する方法を見出すことに繋がれば、異常蛋白質が引き起こす神経細胞死に対して、具体的な予防・治療法が見つかる可能性が生じてきた。

### 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、ポリグルタミンが引き起こす上記表現型をポリグルタミン病の病態を表す本体と位置づけ、その分子メカニズムを解析することを目的とした。

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

昨年までの研究で、伸長したポリグルタミンをもつ Machado-Joseph 病 (MJD) 原因蛋白質と物理的に相互作用する分子として AAA ATPase の VCP 蛋白質を同定し、さらには伸長したポリグルタミンを発現させたショウジョウバエモデルを用いた遺伝学的解析で、ポリグルタミンの神経変性に関わる遺伝子として VCP のショウジョウバエホモログ *ter94* を同定した。本研究では、VCP 蛋白質を神経変性疾患の鍵分子と位置づけ、その生化学的および遺伝学的な解析を行っている。

## C. D. 研究結果と考察

精製した VCP 蛋白質に対し、トリプシンで分解後、質量解析機を用いて VCP 蛋白質の質量解析を行った。その結果、これまで報告されていないリン酸化を受けるセリンとスレオニンとチロシン残基を複数個同定した。蛋白質がリン酸化を受けると予想される分子量より、約 80 重い分子量としてペプチド断片が計測される。続いて、リン酸化を受けると思われるアミノ酸 (セリン、スレオニン) をアスパラギンやグルタミン酸に変えた変異 VCP (それぞれ D 体、E 体) やリン酸化を起きなくするためにアラニンに変えた変異 VCP (A 体) をヴァキュロウィルスの高発現系で作成し、そこから変異 VCP 蛋白質を精製し、その ATPase 活性を測定した。その結果、いくつかの VCP 変異体で、ATPase 活性の顕著な上昇が観察された。このような ATPase 活性の上昇をもたらす変異体の元のアミノ酸とその周

囲のアミノ酸は種を超えて保存されており、VCP 蛋白質はリン酸化・脱リン酸化によって、その ATPase 活性の調節を受ける蛋白質であることが明らかになった。

現在、ここでみられたアミノ酸修飾を簡便に同定するために、リン酸化または脱リン酸化された VCP を特異的に認識する抗体を作成している。いい抗体ができ次第、ポリグルタミンの発現等で同様なアミノ酸修飾が励起または抑制されていないかどうかをポリグルタミン病モデルや患者のサンプルを用いて解析する。

VCP の D 体、E 体および A 体を発現させるショウジョウバエとポリグルタミン病のショウジョウバエモデルの掛け合わせによって、ポリグルタミンによる神経変性が増悪・軽減されるかを現在、解析中である。

## E. 結語

我々は、これまでの解析から、ATP 活性の低下した VCP 蛋白質によって、神経細胞の変性・死が引き起こされていると考えている。今回の解析で、VCP 蛋白質は、リン酸化・脱リン酸化によって ATPase 活性が調節されていることが判明した。すなわち、ポリグルタミンなどの異常蛋白質の蓄積によって、VCP 蛋白質のリン酸化状態が変化し、ATPase 活性の低下が引き起こされる可能性が生じてきた。したがって、異常蛋白質の蓄積に関連する VCP 蛋白質のリン酸化を同定し、それらの変化によって引き起こされる ATPase 活性の変化を解析することが、今後の重要な研究課題といえる。一方、ATPase 活性の低下を抑制する VCP 蛋白質のリン酸化・脱リン酸化を同定することによって、異常蛋白質の蓄積

が引き起こす VCP 蛋白質の ATPase 活性の低下に対抗する方法を見出すことに繋がれば、異常蛋白質が引き起こす神経細胞死に対して、具体的な予防・治療法が見つかるかもしれない。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1) Maeda, H., Hori, S., Ohizumi, H., Segawa, T., Kakehi, Y., Ogawa, O., & Kakizuka, A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of Arsenic Trioxide and L-Buthionine-Sulfoximine. Cell Death Differ. In press, 2004.
- 2) Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, H., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., Nakayama, K.I. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. EMBO J. in press, 2004
- 3) Sato, A., Imaizumi, M., Hoshi, Y., Rikiishi, T., Fujii, K., Kizaki, M., Kagechika, H., Kakizuka, A., Hayashi, Y., 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. In press, 2004
- 4) Kimura, Y., & Kakizuka, A. Polyglutamine diseases and molecular chaperones. IUBMB Life 55:337-345, 2003.
- 5) Kobayashi, T., & Kakizuka, A. Molecular analyses of Machado-Joseph disease. Cytogenet. Genome Res. 100: 261-275, 2003.
- 6) Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T.,

Miyoshi, M., Ezaki, O., & 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

- 7) Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A. & Okamoto, K. Vacuole-creating protein in neuro-degenerative diseases. Neurosci. Lett. 343:77-80. 2003.

## G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

ポリグルタミン病に対する治療法確立をめざして

分担研究者 永井義隆

大阪大学大学院医学系研究科ポストゲノム疾患解析学ゲノム機能 助手

共同研究者 ポピエル明子<sup>1)</sup>、藤掛伸宏<sup>1)</sup>、乾 隆<sup>2)</sup>、長谷川一浩<sup>3)</sup>、裏出良博<sup>4)</sup>、内木宏延<sup>3)</sup>、戸田達史<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学大学院ゲノム機能、<sup>2)</sup>三重短期大学栄養学、<sup>3)</sup>福井大学第2病理、<sup>4)</sup>大阪バイオサイエンス研究所第2部

研究要旨：ポリグルタミン（PolyQ）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 PolyQ 鎖が病的コンフォメーション変移を生じ、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 PolyQ 鎖選択的に結合するペプチド QBPI の発現が培養細胞、ショウジョウバエモデルにおいて異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成・神経変性を抑制することを明らかにした。本研究では QBPI に細胞膜透過性シグナルを付加した PTD-QBPI の投与により PolyQ 病モデル培養細胞、マウスにおいて異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成を阻害することを見出した。また QBPI は異常伸長 PolyQ 蛋白質の  $\beta$ -sheet への病的コンフォメーション変移を阻害することで凝集体形成を阻害することを明らかにした。さらに低分子化合物ライブラリーからの PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニングを開始しており、現在までに数種類の化合物を同定している。本研究が有効な治療法の乏しい PolyQ 病に対する治療法開発へ向けた突破口となることが期待される。

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、現時点で有効な治療法の乏しい神経難病である。これらの疾患の原因は長らく不明であったが、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（PolyQ）病と総称されている。

PolyQ 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 PolyQ 鎖自身が病的コンフォメーション変移を生じ、難溶性の凝集体を形成あるいは病的蛋白質間相互作用を獲得して神経細胞毒性を発揮すると考えられている。我々はこれらの難治性疾患の治療法開発という目的で、異常伸長 PolyQ 鎖に特異的に結合する分子によりその病的作用を阻害することを考えた。これまでの研究で異常伸長 PolyQ 鎖特異的結合ペプチド

QBPI (Polyglutamine Binding Peptide 1)を同定し、QBPI が *in vitro*、培養細胞およびショウジョウバエモデルにおいて異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成を阻害し、神経変性を抑制することを明らかにしてきた (*J. Biol. Chem.* 275: 10437, 2000, *Hum. Mol. Genet.* 12: 1253, 2003)。

本研究ではこれらの難治性疾患に対する治療法確立を目指して、①QBPI に細胞膜透過性シグナル (PTD) を付加した PTD-QBPI を用いて PolyQ 病モデルマウスに対する分子治療法を確立することと、②治療法確立へ向けたもう一つのアプローチとして、QBPI による PolyQ 凝集阻害の分子機構を明らかにし、QBPI と同様に PolyQ 凝集阻害活性を持つ低分子化合物をハイスループットスクリーニングにより検索することを目的とした。

B. 研究方法

(1) PTD-QBPI 投与による PolyQ 病モデルマウスに対する治療効果の検討

①QBPI に細胞膜透過性シグナル (PTD) を付加したペプチド PTD-QBPI を合成し、まず COS-7 細胞の培養液中に添加して、PTD-QBPI の細胞内導入効率を免疫染色にて検討した。さらに

PolyQ-GFP 蛋白質を発現する COS-7 細胞を用いて、PTD-QBP1 による PolyQ-GFP 凝集体形成・細胞死に対する抑制効果を検討した。次にマウスでの実験では、野生型マウス脳室内に PTD-QBP1 を注射し、3、24 時間後に脳切片を作成して免疫染色にて PTD-QBP1 の分布を評価した。さらに Q150 を持つ部分ハンチンチン蛋白質を発現するハンチントン病モデルマウス R6/2 の側脳室内にカニューレを留置し、浸透圧ポンプを用いて PTD-QBP1 を 7 週間持続投与後、免疫染色にてハンチンチン凝集体に対する抑制効果の評価した。

## (2) QBP1 による異常伸長 PolyQ 蛋白質の病的コンフォメーション変移に対する影響の検討と PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニング

*in vitro* で経時的、濃度依存的かつ PolyQ 鎖長依存的な凝集体形成を示す Thioredoxin-PolyQ 融合蛋白質 (Thio-PolyQ) を大腸菌で発現させ、アフィニティーカラムおよびイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。QBP1 の結合が Thio-PolyQ の二次構造に与える影響を明らかにするために、円偏光二色性分散 (CD) 測定を行った。さらに Thio-PolyQ 凝集体の濁度測定法により、1000 個の薬剤候補低分子化合物からなるライブラリーと種々のアミロイド結合化合物に対して PolyQ 凝集阻害化合物のスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

本研究での動物の使用にあたっては国の法律・指針を遵守し、動物が受ける苦痛を最小限に留めた。

## C. 研究結果

### (1) PTD-QBP1 投与による PolyQ 病モデルマウスに対する治療効果の検討

COS-7 細胞の培養液中に PTD-QBP1 を添加したところ、ほぼ 100 %の細胞にペプチドは導入された。さらに Q57-GFP 発現 COS-7 細胞では Q57-GFP の凝集体形成・細胞死を有意に抑制した。一方、野生型マウス脳室内に PTD-QBP1 を注射したところ、脳室周囲の細胞に高効率で導入されることを示した。ハンチントン病モデルマウス R6/2 の側脳室内に PTD-QBP1 を長期投与したところ、カニューレ挿入部付近の神経細胞内のハンチンチン凝集体形成が著明に抑制されることを明らかにした。

### (2) QBP1 による異常伸長 PolyQ 蛋白質の病的コ

### ンフォメーション変移に対する影響の検討と PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニング

CD 測定の結果、Thio-PolyQ は経時的に  $\alpha$ -helix から  $\beta$ -sheet へのコンフォメーション変移を経て凝集体を形成することを明らかにした。そして QBP1 は  $\beta$ -sheet へのコンフォメーション変移を阻害することで凝集体形成を阻害することを見出した。また PolyQ 凝集阻害化合物のスクリーニングの結果、Thio-PolyQ 凝集阻害活性を持つ化合物を新規のものを含めて数種類同定した。このうち Congo Red は PolyQ 病モデルショウジョウバエの複眼変性をも抑制することを示した。

## D. 考察

本研究では 11 アミノ酸のペプチドである治療分子候補 QBP1 の細胞内移行効率を高めるために、細胞膜透過性シグナル (PTD) を付加したペプチド PTD-QBP1 の治療効果について検討した。その結果、培養細胞において PTD-QBP1 は高効率で細胞内に移行し、異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成・細胞死を抑制することを示した。さらにマウス脳においても高効率で神経細胞内に導入され、PolyQ 病モデルマウス脳室内への PTD-QBP1 の長期投与により、PolyQ 凝集体形成を阻害することを見出した。これらのことから PTD-QBP1 は現時点で有効な治療法に乏しい PolyQ 病に対する新しい治療分子候補として期待される。今後は PTD-QBP1 の PolyQ 病モデルマウス腹腔内への長期投与も検討し、運動障害などの表現型に対する治療効果を明らかにしたい。

一方、CD 測定の結果から QBP1 は異常伸長 PolyQ 蛋白質の  $\beta$ -sheet へのコンフォメーション変移を阻害することで凝集体形成を阻害することが明らかになった。すなわち、PolyQ 病の治療標的としては異常伸長 PolyQ 蛋白質の病的コンフォメーション変移を阻害することが重要であると考えられる。また治療法確立へ向けたもう一つのアプローチとして、QBP1 で得られた知見に基づいて、PolyQ 凝集阻害化合物のスクリーニングを開始した。現在まで *in vitro* での PolyQ 凝集阻害活性を持つ化合物を新規のものを含めて数種類同定し、このうち一部のものは PolyQ 病モデルショウジョウバエにおいても神経変性抑制効果を示し、*in vivo* での有効性を明らかにした。今後、大規模な

低分子化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを進め、PolyQ 病に対する治療薬候補となる化合物を絞り込みたい。

#### E. 結論

- (1) PTD-QBP1 は PolyQ 病モデル培養細胞、マウスにおいて高効率で細胞内に導入され、PolyQ 凝集阻害効果を示すことが明らかになった。
- (2) QBP1 の作用機序として、異常伸長 PolyQ 蛋白質の $\beta$ -sheet への病的コンフォメーション変移を阻害することで凝集体形成を阻害することが明らかになった。
- (3) 低分子化合物ライブラリーからのハイスループットスクリーニングにより、PolyQ 凝集阻害活性を持つ化合物を数種類同定した。
- (4) 本研究は現時点で有効な治療法のないポリグルタミン病に対して、治療法開発へ向けた基礎を確立するものである。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Y. Nagai, N. Fujikake, K. Ohno, H. Higashiyama, H.A. Popiel, J. Rahadian, M. Yamaguchi, W.J. Strittmatter, J.R. Burke, T. Toda  
Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*.

*Human Molecular Genetics* 12, 1253-1260 (2003)

2) 永井義隆、戸田達史  
神経変性疾患ポリグルタミン病に対する治療ペプチド QBP1

*バイオインダストリー* 20, 52-63 (2003)

3) 永井義隆  
ポリグルタミン鎖結合ペプチド QBP1 によるポリグルタミン病に対する分子治療法の確立

*神経化学* 42, 443-456 (2003)

##### 2. 学会発表

1) Y. Nagai, N. Fujikake, H. A. Popiel, K. Ohno, T. Inui, Y. Urade, M. Yamaguchi, W. J. Strittmatter, J. R. Burke, T. Toda

Prevention of polyglutamine aggregation and neurodegeneration *in vitro* and *in vivo* by the peptide inhibitor QBP1 identified by combinatorial screening.

2nd Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2003, Garga, Italy)

2) H. A. Popiel, Y. Nagai, O. Onodera, T. Inui, Y. Urade, W. J. Strittmatter, J. R. Burke, A. Ichikawa, T. Toda

Disrupting the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch by proline insertion leads to dramatic suppression of aggregate formation and cell death.

2nd Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2003, Garga, Italy)

3) 永井義隆、乾 隆、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、内木宏延、裏出良博、戸田達史

ペプチド QBP1 の結合による異常伸長ポリグルタミン蛋白質のコンフォメーションへの影響

第 4 4 回日本神経学会総会 (H15. 5、横浜)

4) 永井義隆、乾 隆、ポピエルヘレナ明子、長谷川一浩、藤掛伸宏、福井健司、内木宏延、裏出良博、戸田達史

フォールディング病としてのポリグルタミン病とその治療標的

第 3 回日本蛋白質科学会 (H15. 6、札幌)

5) 永井義隆

ポリグルタミン鎖結合ペプチド QBP1 によるポリグルタミン病に対する分子治療法の確立

第 4 6 回日本神経化学会「奨励賞シンポジウム」 (H15. 9、新潟)

6) 永井義隆、乾 隆、長谷川一浩、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、福井健司、内木宏延、裏出良博、戸田達史

A molecular therapy for polyglutamine diseases targeting the toxic conformational transition of the polyglutamine protein using the inhibitor peptide QBP1

第 7 6 回日本生化学会 (H15. 10、横浜)

7) 藤掛伸宏、永井義隆、ポピエルヘレナ明子、福井健司、山口政光、戸田達史

The *Drosophila* heat shock transcription factor gene generates four transcript isoforms by alternative splicing

第 7 6 回日本生化学会 (H15. 10、横浜)

8) ポピエルヘレナ明子、永井義隆、小野寺理、乾 隆、藤掛伸宏、福井健司、裏出良博、市川厚、中山和久、戸田達史

Suppression of polyglutamine aggregation and cytotoxicity by the disruption of its toxic conformation via proline insertion

第 7 6 回日本生化学会 (H15. 10、横浜)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

## 皮膚線維芽細胞を用いたポリグルタミン病の病態解析

班員：<sup>1</sup>中島健二，  
共同研究者：<sup>1</sup>中曾一裕，<sup>1</sup>足立芳樹，<sup>1</sup>矢野英隆，<sup>1</sup>安井建一，<sup>1</sup>吉本祐子，  
<sup>1</sup>涌谷陽介，<sup>2</sup>澤明  
所属：<sup>1</sup>鳥取大学医学部脳神経内科  
<sup>2</sup>Johns Hopkins 大学神経科学部門，精神神経科

**研究要旨** 遺伝性疾患患者由来の細胞は，原因となる遺伝子のみならず，個々の患者の体質性因子を備えていると考えられ，病態解明のための強力なツールとなりうる。我々は，ポリグルタミン病（HD，SCA1，SCA3/MJD，SCA7，DRPLA，SBMA）患者の皮膚線維芽細胞を用い，ストレスへの反応性という観点から疾患分類を行うことにより，各疾患の病態解明を試みた。また細胞内構造物（凝集体など）を解析することにより，構造物の存在意義についての考察を行った。ポリグルタミン病患者由来皮膚線維芽細胞は健常者由来の皮膚線維芽細胞に比べてストレスへの脆弱性を示した。ことにHDにおいては顕著であった。UV，Etoposide 誘発細胞死への p53 の関与については SCA1，SCA3/MJD，SCA7，DRPLA および SBMA で軽度である一方，HD での関与は突出していた。caspase の関与に関しては，HD，SCA3/MJD，DRPLA で caspase3 および 9 の関与が強く，他のポリグルタミン病では caspase3 および 8 の関与が考えられた。以上より，皮膚線維芽細胞の挙動に関しては SCA3/MJD と DRPLA が HD に近い反応を示していると結論した。低密度長期培養により細胞内凝集体（核内，細胞質内）が観察される。HD においてはユビキチン，Huntingtin，p62 陽性，他の疾患ではユビキチン，ポリグルタミン（1C2）抗体で陽性だった。これらは，凝集体の形体，染色性の観点から疾患特異性のある構造物と考えられた。また，低濃度 Etoposide 持続暴露により，ユビキチン陽性の核内凝集体が出現するが，本凝集体はポリグルタミンや Huntingtin の陽性率が低く，疾患特異性の低い凝集体と考えられた。患者由来皮膚線維芽細胞は原因遺伝子産物のみならず，他の体質性因子を備え，かつ接着細胞であることから細胞内構造物を観察するのに適している。本モデルはポリグルタミン病の病態解析，治療研究に有用と考えられる。

### はじめに

遺伝性疾患患者由来の細胞は，原因となる遺伝子のみならず，個々の患者の体質性因子を備えていると考えられ，病態解明のための強力なツールとなりうる。患者由来の細胞は皮膚線維芽細胞やリンパ芽球に大別される。これらは，一般的な培養細胞に人為的な遺伝子導入を行ったものと異なり，個々の患者の遺伝的背景をよく反映していると考えられる。殊に，皮膚線維芽細胞は接着細胞であるが故に，細胞内形態（凝集体など）を観察するのに優れており，細胞内凝集体の存在が注目されているポリグルタミン病研究においては，極めて有用な細胞と考えられる。我々は，ポリグルタミン病（HD，SCA1，SCA3/MJD，SCA7，DRPLA，SBMA）患者の皮膚線維芽細胞を用い，ストレスへの反応性という観点

から疾患分類を行うことにより，各疾患の病態解明を試みた。また細胞内構造物（凝集体など）を様々な方法で作製し，その特徴を解析した。

### 方法

ポリグルタミン病患者由来の皮膚線維芽細胞（HD 5 例，SCA1 1 例，SCA3/MJD 1 例，SCA7 1 例，DRPLA 2 例，SBMA 2 例）および対象健常者（5 例）由来の皮膚線維芽細胞を用いた。皮膚線維芽細胞の採取，実験への使用に際しては文書による十分なインフォームドコンセントを得て行った。また，各実験につき継代数を統一して行った。

UV，Etoposide 暴露における細胞の脆弱性，p53 の関与，ミトコンドリアを介した caspase3，8，9 の活性化について検討した。これらの結果が



ら, SCA1, SCA3/MJD, SCA7, DRPLA および SBMA の細胞死機序を HD の結果を基準にして疾患分類することを試みた。

細胞内凝集体の観察においては, 低密度培養で1ヶ月, 細胞分化を促進する条件で維持した後観察した。また, 低濃度 Etoposide 持続暴露による凝集体形成の有無を確認した。

### 結果

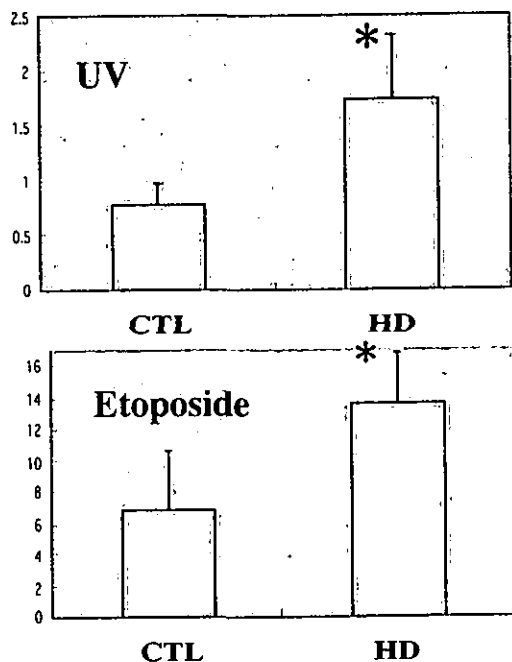


図1 UV(300mJ) : 上段, Etoposide (50 $\mu$ M) : 下段による 16 時間後の apoptotic cell を計測した。HD では有意に細胞死が認められた。縦軸は%apoptotic cell を示す。\*P<0.05

HD 由来皮膚線維芽細胞は UV, Etoposide に対して脆弱性を示した (図1)。この脆弱性は CAG リピート数および発症年齢とも関連していた。

さらに, HD 皮膚線維芽細胞においては UV および Etoposide 暴露時に p53 の Ser-15 がリン酸化されており, p53 自体の発現量も多い傾向にあった (図2)。また, UV, Etoposide による細胞死は p53 阻害薬である Pifithrin- $\alpha$  (PFT) で有意に抑制されたことから, この細胞死に p53 の関与が示唆された (図3)

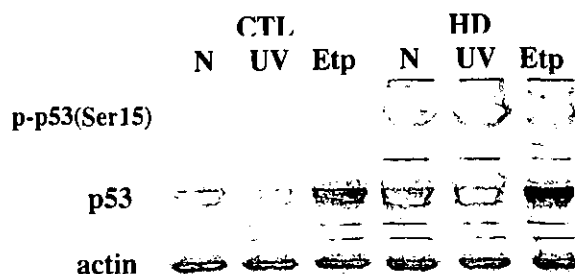


図2 上段: p53 (ser-15) 抗体, 中段: p53 抗体, 下段: 抗 actin 抗体を用いたウエスタンブロット。

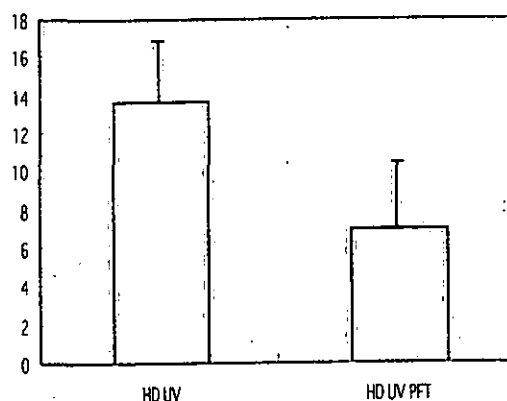


図3 UV(300mJ) による 16 時間後の apoptotic cell を計測した。縦軸 %apoptotic cell。PFT (10 $\mu$ M) 投与により細胞死の抑制が認められる。

アポトーシスの詳細を検討する為に, 各アポトーシス阻害薬による抑制効果を検討した。HD 由来皮膚線維芽細胞において, Caspase3 および 9 阻害薬は UV によるアポトーシスを抑制した。CyclosporineA による抑制は軽度だった (図4)。Etoposide の系では同様に caspase3, 9 の阻害剤によりアポトーシスは抑制され, cyclosporineA では抑制されなかった。以上より, HD 皮膚線維芽細胞におけるアポトーシスには caspase3, 9 の関与が示唆された。

同様に, 他のポリグルタミン病における検討を行ったところ, P53 阻害剤 PFT における抗アポトーシス効果は SCA3/MJD で中等度認められた以外は, 軽度の抗アポトーシス効果のみ認められた。

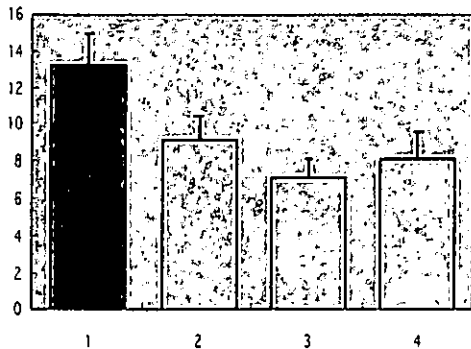


図4 各抑制剤による抗アポトーシス効果.  
1: UV, 2: UV+cyclosporineA, 3: UV+ caspase3  
阻害薬, 4: UV+caspase9 阻害薬.  
縦軸: %apoptotic cell.

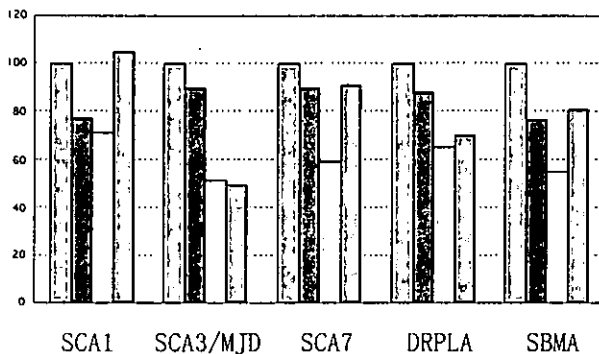


図5 各疾患患者由来の皮膚線維芽細胞における各薬剤の抗アポトーシス効果. 各疾患4本のBarのうち, UVによるアポトーシスを100%としたものを最左, 左より続いて cyclosporineA, caspase3 阻害剤, caspase9 阻害剤として示した.

各種アポトーシス阻害剤による抗アポトーシス効果の検討では (図5), SCA3/MJD がもっとも HD に近いパターンを示し, DRPLA も比較的類

似したパターンとなったが, 他の疾患では異なったパターンを示した. HD および SCA3/MJD は caspase9 阻害剤の効果があることから, ミトコンドリアを介した異常の存在が示唆された.

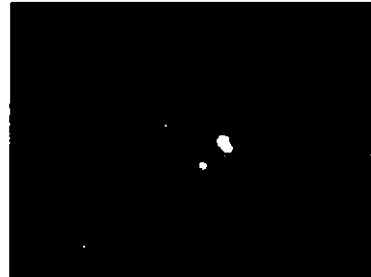


図6 HD 皮膚線維芽細胞における核内, 核外の凝集体. 抗 Htt(N 末端側)抗体を使用.

皮膚線維芽細胞内の凝集体の検討を行った. HD 由来皮膚線維芽細胞を低密度長期培養 (1ヶ月) により細胞内凝集体 (核内, 細胞質内) が観察された (図6). HD においてはユビキチン, Huntingtin, p62 陽性, 他の疾患ではユビキチン, ポリグルタミン (1C2) 抗体で陽性だった. これらは, 凝集体の形体, 染色性の観点から疾患特異性のある構造物と考えられた. また, 低濃度 Etoposide 持続暴露により, ユビキチン陽性の核内凝集体が出現するが, 本凝集体はポリグルタミンや Huntingtin の陽性率が低く, 疾患特異性の低い凝集体と考えられた.

#### 結論

- 1) ポリグルタミン病患者由来の皮膚線維芽細胞において, UV (および Etoposide) 誘発アポトーシスを検討し, HD と SCA3/MJD が比較的類似した反応を呈した.
- 2) 患者由来皮膚線維芽細胞を低密度長期培養により細胞内凝集体 (核内, 細胞質内) が観察された.
- 3) ポリグルタミン病患者由来皮膚線維芽細胞は, 病態解析に有用なツールとなりうる.

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
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形成と細胞死の関連を検討した。凝集体は synucleinopathy 脳内の封入体と組織化学的に多くの共通点を持っていた。酸化的ストレス曝露下の凝集体形成は、鉄の除去により抑制されたが、このとき細胞死は増加した。逆に鉄の追加曝露により、凝集体形成は促進されたが、細胞死は抑制された。二重染色の結果、凝集体陽性細胞と活性型 caspase 3 陽性細胞はほとんど一致しなかった。これらの実験結果は、病態下の蛋白凝集物形成が細胞防御的であることを強く示唆する。本細胞モデルは synucleinopathy の病態を検討する上で有用であると考えられた。

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が、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。synucleinopathy 病態下の  $\alpha$ -synuclein は、ユビキチン化、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ことが知られている。一方で、こうした蛋白凝集体形成が神経細胞死のトリガーとなるのか、それとも細胞死のプロセスでの副産物であるのかについては結論が出ていない。われわれは  $\alpha$ -synuclein 過剰発現細胞を用いて、種々の実験環境下に蛋白凝集体を形成させることにより、 $\alpha$ -synuclein 凝集と神

経細胞死の関連を検討した。

B. 研究方法

$\alpha$ -synuclein をヒトリンパ球 cDNA より PCR 法にて増幅しクローン化した。site directed mutagenesis により A30P、A53T 変異を導入したクローンと野生型クローンを作成し、発現ベクター（pCEP4）に組み込んだ。これらを SH-SY5Y 細胞に transfection して得た  $\alpha$ -synuclein 過剰発現細胞を、鉄、ROS (reactive oxygen species) donor、NO (nitric oxide) donor などに曝露して細胞質内に  $\alpha$ -synuclein 凝集体を生じさせた。凝集体の性状は免疫組織化学的に検討した。蛍光染色の結果は共焦点レーザー顕微鏡により定量的に行った。細胞死のマーカーとしては、MTT assay や活性型 caspase3 の免疫組織化学染色を用いた。

### C. 研究結果

$\alpha$ -synuclein の過剰発現により細胞の増殖や形態に特記すべき変化を認めなかった。凝集体はユビキチン、ニトロチロシン、ジチロシン陽性であり、構成蛋白は酸化的修飾を受けており、その代謝にユビキチン・プロテオソーム系が関与していると考えられた。またチオフラビン S 染色が陽性であることから  $\beta$ シート構造を主体とすることが示唆された。さらに HSP-27 や  $\alpha$ B-crystallin などの低分子モレキュラーシャペロンはこの細胞内凝集体に共存していた。凝集体陽性細胞の出現率を比較すると rotenone などの ROS (reactive oxygen species) inducer と papaNONOate などの NO (nitric oxide) donor の効果は相加的であったが、 $\text{FeCl}_2$  の曝露はさらに強力に凝集形成を促進した。さらに凝集体形成機構に対する鉄の効果を確認するために ROS inducer と NO donor 曝露下に鉄キレート剤を培地に加えたところ、凝集体形成は抑制されたが、このとき活性型 caspase 3 陽性細胞はむしろ増加した。逆に ROS inducer + NO donor 存在下に三価の鉄を曝露したところ、凝集体の生成は促進されたが、この時 caspase 3 陽性細胞の出現は抑制された。いずれの実験系においても凝集体陽性細胞においては活性型 caspase 3 の発現は確認されなかった。一方で凝集体陰性細胞においてのみ、活性型 caspase 3 の発現が見られた。以上の結果は、 $\alpha$ -synuclein による細胞内凝集体形成はむしろ細胞防御的であることを示唆している。さらに、その際に三価の鉄が重要な役割を担っていることが推定された。

### D. 考察

本細胞モデルにおける  $\alpha$ -synuclein 凝集体

は、酸化的蛋白修飾、ユビキチン、低分子分子シャペロンに陽性所見を示し、チオフラビン S 染色陽性であるなど、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共通の病態基盤を持つものと推定できる。一方で  $\alpha$ -synuclein 凝集体は  $\gamma$ -tubulin や dynein に対する抗体に陽性であり、凝集体形成に微小管を介した能動輸送が深く関与していることが示唆された。

鉄をキレートすることにより NO donor や ROS inducer による凝集体形成は抑制され、このとき細胞死は増加した。逆に三価の鉄を加えることにより凝集体形成は亢進したが細胞死は抑制された。また凝集体陽性細胞と活性型 caspase 3 陽性細胞は二重染色による検討で一致しなかった。以上の結果は、これまでの結果と併せて、病態下の  $\alpha$ -synuclein 凝集体形成は、細胞にとってむしろ自己防御的プロセスであることを強く示唆する。

こうしたことから、例えば凝集体形成を促進する様な薬剤の開発はむしろ細胞保護的である可能性もあり、新たな視点からの synucleinopathy 治療法の開発に繋がることが期待される。

### E. 結論

synucleinopathy を含む神経変性疾患における細胞内封入体の役割については議論が分かれているが、今回の研究結果は細胞内凝集体形成がむしろ細胞防御機構として働いていることを示唆する。

本細胞モデルは変性疾患脳内封入体に類似した蛋白凝集体を再現できる有用な実験系であり、新たな治療法の開発に向けて有力な実験系を提供すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Tateyama M., Takeda A., Onodera Y., Matsuzaki M., Hasegawa T., Nunomura A., Hirai K., Perry G, Smith MA., Itoyama Y., Oxidative stress and predominant Abeta42(43) deposition in myopathies with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathologica* 105 : 581-585, 2003.
- 3) Hasegawa T., Matsuzaki M., Takeda A., Kikuchi A., Furukawa K., Shibahara S., Itoyama Y., Increased dopamine and its metabolites in SH-SY5Y neuroblastoma cells that express tyrosinase. *J. Neurochem.* 87 : 470-475, 2003.
- 4) Masaki T., Matsushita S., Arai H., Takeda A., Itoyama Y., Mochizuki H., Kamakura K., Ohara S., Higuchi S., Association between a polymorphism of BDNF gene and sporadic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 54 : 276-277, 2003.
- 5) Tateyama M., Saito N., Fujihara K., Shiga Y., Takeda A., Narikawa K., Hasegawa T., Taguchi Y., Sakuma R., Onodera Y., Ohnuma A., Tobita M., Itoyama Y., Familial inclusion body myositis: a report on two Japanese sisters. *Internal Med.* 42 : 1035-1038, 2003.
- 6) Kikuchi A., Takeda A., Fujihara K., Kimpara T., Shiga Y., Tanji H., Nagai M., Ichinose H., Urano F., Okamura N., Arai H., Itoyama Y., The Arg (184) His mutant GTP cyclohydrolase I, causing recessive hyperphenylalanemia, is responsible for dopa-responsive dystonia: a case. *Movement Disorders* (in press), 2004.
- 7) Matsuzaki M., Hasegawa T., Takeda A., Kikuchi A., Furukawa K., Kato Y., Itoyama Y., Histochemical features of stress-induced aggregates in  $\alpha$ -synuclein overexpressing cells. *Brain Research* (in press), 2004.

2. 学会発表

- 1) 武田篤、長谷川隆文、松崎理子、菊池昭夫、糸山泰人、古川勝敏、Tyrosinase による Dopamine 合成細胞モデル、第 44 回日本神経学会総会、横浜、2003
- 2) 松崎理子、長谷川隆文、菊池昭夫、古川勝敏、武田篤、糸山泰人、鉄キレート剤による  $\alpha$ -synuclein 細胞内凝集体形成抑制と神経細胞死、第 44 回日本神経学会総会、横浜、2003
- 3) 長谷川隆文、松崎理子、菊池昭夫、古川勝敏、武田篤、糸山泰人、 $\alpha$ -synuclein 過剰発現 SH-SY5Y 細胞を用いた RA・BDNF 分化誘導下における凝集体形成モデルの作成、第 44 回日本神経学会総会、横浜、2003

# Neurosin による $\alpha$ シヌクレイン分解：シヌクレイノパチーにおける意義

研究協力者 貫名 信行<sup>1)</sup>

岩田淳<sup>1,2)</sup>, 丸山美枝子<sup>1)</sup>, 赤木巧<sup>3)</sup>, 端川勉<sup>3)</sup>, 金澤一郎<sup>4)</sup>, 辻省次<sup>2)</sup>

- 1) 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 構造神経病理研究チーム
- 2) 東京大学医学部神経内科
- 3) 独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 神経構築技術開発チーム
- 4) 国立精神・神経センター

**研究要旨** パーキンソン病や多系統萎縮症の特徴的な病態は  $\alpha$  シヌクレインの細胞内封入体としての蓄積である。本研究ではその蓄積過程を明らかにするため  $\alpha$  シヌクレイン分解酵素を探索し、分解酵素としての neurosin を同定した。Neurosin はミトコンドリアに主として存在しストレスによって遊離し、 $\alpha$  シヌクレインの分解に関与している。Neurosin は  $\alpha$  シヌクレイン凝集に対しては抗凝集的に働くと考えられた。

## A. 研究目的

パーキンソン病や多系統萎縮症の主要病変である Lewy 小体や glial cytoplasmic inclusion (GCI) の構成成分は  $\alpha$  シヌクレインであり、その蓄積機序を明らかにすることは、病態の解明に重要である。蛋白の蓄積過程は主にその生成過程と分解過程によって制御されていると考えられる。我々はヒト脳、マウス脳を検索中に  $\alpha$  シヌクレインの分解産物を思われる断片を同定した。そこでこの断片生成に関与する分解酵素を探索した。

## B. 研究方法

1) マウス脳で同定される  $\alpha$  シヌクレイン断片を指標に、これがどのタンパク分解酵素阻害剤で消失するかを検討した。2) Neurosin の抗体を作成しこれによって Lewy 小体、GCI を染色した。3)  $\alpha$  シヌクレインの組換え蛋白のオリゴマー形成に対する、neurosin による断片の影響を検討した。4) 抗体により neurosin の分布を検討し、様々なストレス刺激による neurosin の分布の変化を検討した。  
(倫理面への配慮)  
細胞、マウスレベルの実験のみである。

## C. 研究結果

1) 正常マウス脳のコモジェネートをいくつかの  $\alpha$  シヌクレイン抗体によってイムノプロットしたところ、免疫反応性のある  $\alpha$  シヌクレインより低分子のバンドが常に同定された。そこで  $\alpha$  シヌクレイン断片の出現を抑えるタンパク分解酵素を検討した結果セリンプロテアーゼインヒビターがこの分解を阻害することがわかった。以前の報告でセリンプロテアーゼである neurosin (kallikrein-6) が Lewy 小体に蓄積するとの報告があり、カリクレインによる分解を検討したところ同様の断片が出現し、この出現はカリクレイン阻害剤で抑制された。

2) そこで neurosin 抗体を作成し、その特異性を neurosin を発現した細胞を用いて確認した。さらにこれらの抗体で Lewy 小体、GCI の染色を行い染まることを確認した。

3) 次に neurosin によって形成されるこの分解産物が、 $\alpha$  シヌクレインの凝集に対して、促進的か抑制的に働くのかどうかを検討した。In vitro の実験によると分解断片の存在は  $\alpha$  シヌクレインのオリゴマー形成に抑制的に働く傾向が見られた。電顕による検索ではスフェアー様の凝集体が neurosin を加えないと形成されたが、この形成が neurosin の添加によって抑制された。

4) neurosin による  $\alpha$  シヌクレインの分解は A53T

変異を持つ場合弱い傾向が認められた。

5)抗体によって細胞内の分布を検討したところミトコンドリアに存在する所見が得られ、UV ストレスによって細胞質に遊離する所見が得られた。

6)さらにRNAiによってneurosinを減少させると $\alpha$ シヌクレインの量は増加した。

#### D. 考察

以上の結果neurosinが $\alpha$ シヌクレインを部分分解する酵素であることがわかった。これによって形成される $\alpha$ シヌクレイン断片は $\alpha$ シヌクレイン凝集に対して抑制的に働く。一方neurosinはミトコンドリアに存在しストレスによって遊離される。同様にミトコンドリアに存在しストレスによって遊離されるチトクロム c が $\alpha$ シヌクレイン凝集に促進的に働くのと反対の作用を示し、同様にLewy小体に共存しているのは興味深い。 $\alpha$ シヌクレインはストレスによって遊離されたneurosinによって分解が促進されるが、シヌクエイノパチーにおいてはneurosinによる分解が封入体への結合によって阻害されることにより、 $\alpha$ シヌクレインの蓄積が増強する可能性が考えられ、今後病態への関与の検討が重要と考えられた。

#### E. 結論

$\alpha$ シヌクレイン分解酵素としてのneurosinを同定した。neurosinはミトコンドリアに主として存在しストレスによって遊離し、 $\alpha$ シヌクレインの分解に関与している。neurosinは $\alpha$ シヌクレイン凝集に対しては抗凝集的に働くと考えられた。

#### 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. (2004). Trehalose effectively alleviates polyglutamine-mediated pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Nat Med* 10, 148-154.

Zemskov, E. A., Jana, N. R., Kurosawa, M., Miyazaki, H., Sakamoto, N., Nekooki, M., and Nukina, N. (2003). Pro-apoptotic protein kinase C delta is associated with intranuclear inclusions in a transgenic model of Huntington's disease. *J Neurochem* 87, 395-406.

Zemskov, E. A., and Nukina, N. (2003). Impaired degradation of PKCalpha by proteasome in a cellular model of Huntington's disease. *Neuroreport* 14, 1435-1438.

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

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. (2003). Down-regulation of heat shock protein 27 in neuronal cells and non-neuronal cells expressing mutant ataxin-3. *FEBS Lett* 546, 307-314.

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

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

#### 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(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

gracile axonal dystrophy マウスにおけるガンマシヌクレイン  
の病態生理学的役割

研究分担者 金澤 一郎 国立精神・神経センター総長

研究要旨

後索の spheroid 形成を主体とする gracile axonal dystrophy (gad) マウスを用い、後索病変形成時におけるシヌクレインファミリーの関与について免疫組織学的検討を加えた。その結果、gad マウス spheroid におけるガンマシヌクレインの早期からの沈着を観察した。gad マウスは脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 遺伝子の部分欠失を有する常染色体劣性遺伝性のミュータントで後索症状と運動麻痺を呈するが今回の結果は gad マウスの病態機序における UCH-L1 とガンマシヌクレインの機能連関を示唆する。

A. 研究目的

gracile axonal dystrophy (gad) マウスは脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 遺伝子の部分欠失を有する常染色体劣性遺伝性のミュータントで後索症状と運動麻痺を呈し、病理学的には延髄薄束核周辺の逆行性神経軸索変性、すなわち spheroid 形成が顕著である。今回、gad マウスの病態形成機序を明らかにするため、神経変性との関連で重要なシヌクレインファミリー分子を中心に spheroid に蓄積する物質の免疫組織学的解析を行った。

B. 方法

雄マウス脳・脊髄をパラフォルムアルデヒドで灌流固定後にパラフィン包埋し薄切標本を調製した。市販あるいは自家調製した一次抗体、市販二次抗体を使

用し DAB 法にて免疫組織化学反応を行い、光学顕微鏡にて免疫反応物を観察した。用いたマウスの週令は 3, 12, 20, 32 週で、各群3匹ずつ使用した。  
(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

gad マウスでは延髄薄束核周辺における spheroid 形成はヘマトキシリンエオジン(HE)染色にて生後3週から観察され始め、12 週~20 週にかけてその数が増加し、以後漸減した。特異的抗体を用



いた免疫組織学的観察ではアルファシヌクレインの沈着は spheroid で観察されなかったが、ベータシヌクレインの染色性は生後 12 週から陽性になり 20 週で増大し、以後漸減した。一方、ガンマシヌクレイン陽性 spheroid は生後 3 週から HE 染色で観察されるよりも広範囲で認め、その数は 20 週で最大になり 32 週では減少した。野生型対照マウスでは 20 週ころから spheroid 形成を認め、gad マウス同様ベータおよびガンマシヌクレインの蓄積が観察されたがアルファシヌクレインは陰性であった。

#### D. 考察

アルファシヌクレインは多くの神経変性疾患に認められる病理学的構造物にその蓄積が観察されているが、ベータ及びガンマシヌクレインについては十分な検索がまだなされていない。gad マウス spheroid ではアルファシヌクレインの蓄積を認めずにベータおよびガンマシヌクレイン、とりわけガンマシヌクレインが早期から蓄積するというこれまでに報告のない特徴ある結果を得た。ガンマシヌクレインは生後 3 週の早期において HE 染色で観察可能な spheroid よりも広範囲でかつ多くの spheroid で沈着像が観察されたことから、gad マウスの病態機序における重要性が示唆される。また、ガンマシヌクレインは gad マウスにおける spheroid 形成の良きマーカーとして使用できると考えられる。gad マウスは UCH-L1 発現を認めないことから、UCH-L1 とシヌクレインファミリーの機能連関の解明が今後の課題であ

るが、最近の報告ではシヌクレインファミリー分子はプロテアソームに対して抑制的に作用する可能性が示されており、ガンマシヌクレインは 20S プロテアソームとの関連性が重要視されている。本研究の更なる展開によって後索病変成立におけるガンマシヌクレインの役割解明だけでなくユビキチン・プロテアソームシステムを標的にした後索病変の予防・治療法開発が期待される。

#### E. 結論

本成果はシヌクレインファミリーの生理学的・病態生理学的役割の解明に役立つだけでなく、gad マウスで発現が欠損する UCH-L1 とベータ及びガンマシヌクレインの機能連関の解明、さらには後索病変の成立機序解明・治療法開発に貢献すると思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yazawa I, Hazeki N, Nakase H, Kanazawa I, Tanaka M: Histone H3 is aberrantly phosphorylated in glutamine-repeat diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302:144-149, 2003

2. Okabe S, Ugawa Y, Kanazawa I: 0.2-Hz Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Has No Add-On Effects as Compared to a Realistic Sham Stimulation in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*; 18(4):382-388, 2003

3. Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito

K.Hashida H,Aizawa H,Jeong SY,Kanazawa I:Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA:an implication for excitotoxicity in ALS. Journal of Neurochemistry 85:680-689,2003

4.Takahashi Y,Jeong SY,Ogata K,Goto J,Hashida H,Isahara K,Uchiyama Y,Kanazawa I:Human skeletal muscle calcium channel  $\alpha 1S$  is expressed in the basal ganglia:distinctive expression pattern among L-type  $Ca^{2+}$  channels. Neuroscience Research 45:129-137,2003

5.Ugawa Y,Hanajima R,Terao Y,Kanazawa I:Exaggerated 16-20 Hz motor cortical oscillation in patients with positive or negative myoclonus. Clinical Neurophysiology,114:1278-1284, 2003

6.Kawahara Y,Ito K,Sun H,Kanazawa I,Kwak S:Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. European J Neurosci,18:23-33,2003

7.Hanajima R,Furubayashi T,Kobayashi IN,Shiio Y,Okabe S,Kanazawa I,Ugawa Y: Further evidence to support different mechanisms underlying intracortical inhibition of the motor cortex. Exp Brain Res 151:427-434,2003

8.Kaida K,Kusunoki S,Kamakura K,Motoyoshi K,Kanazawa I: GalNAc-GD1a in human peripheral nerve. Neurology 61:465-470,2003

9.Liu W,Goto J,Wang YL,Murata M,Wada K,Kanazawa I: Specific inhibition of Huntington's disease gene expression by siRNAs in cultured cells. Proc Japan Acad 79 SerB:293-298,2003

10.Iwata A,Maruyama M,Akagi T,Hashikawa T,Kanazawa I,Tsuji S,Nukina N: Alpha-synuclein degradation by serine protease neurosin:implication for pathogenesis of synucleinopathies. Human Molecular Genetics 12(20):2625-2635,2004

2. 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（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

副腎白質ジストロフィーおよびペルオキシソーム病の  
病態と治療法開発に関する研究

分担研究者 鈴木康之（岐阜大学医学部医学教育開発研究センター）

**研究要旨**

（１）副腎白質ジストロフィーの患者データベースを試作し、ALD の前方視的調査の検討を行った。  
（２）新たなペルオキシソーム欠損症相補性群とその病因遺伝子 *PEX14* を明らかにした。*PEX14* は *PEX13* とともにペルオキシソーム蛋白を膜にドッキングさせるために必要な蛋白質で、ヒトにおいてもその正常な機能が生命維持に重要であることが明らかになった。今後、副腎白質ジストロフィーの病因蛋白である *ALDP* のペルオキシソームへの局在過程や代謝機能の解明につなげてゆきたい。

研究協力者

下澤伸行（岐阜大学小児病態学）

**A. 研究目的**

副腎白質ジストロフィーおよびペルオキシソーム欠損症はいずれも細胞内小器官ペルオキシソームの先天代謝異常症である。副腎白質ジストロフィーの病因遺伝子は明らかにされているが、その自然歴や臨床亜型の発病メカニズムは明らかにされていない。一方ペルオキシソーム欠損症は現在までに 12 相補性群が同定され、それぞれの病因遺伝子も同定されているが、酵母では 20 数個のペルオキシソーム形成遺伝子が同定されていることから、さらに新たな遺伝病が存在する可能性が考えられる。ペルオキシソーム欠損症の研究を進めることによりその代謝機構や病態の解明に新たな展開が期待される。今年度、我々は新たに 13 番目の相補性群に属するペルオキシソーム欠損症の存在と、その病因遺伝子を明らかにした。また副腎白質ジストロフィーの前方視的調査を行うために症例解析用データベースの開発を行った。

**B・C. 研究方法と結果**

**（１）データベースの構築**

副腎白質ジストロフィー患者の臨床所見、検査所見、臨床経過、治療歴、QOL、ADLなどを経時的に inputs し、種々の解析が可能なデータベースを開発した。これらは自然歴の解明のみならず、病態、早期診断、医療対策、福祉対策にも還元できると考えられる。これは患者登録、身体所見、Review of Systems、治療歴、神経心理学的検査、血液生化学検査、聴力検査、心電図・エコー、肺機能、レントゲン・MRI、歩行検査、画像取り込みなどが可能であり、報告書の

作成、ファイル出力も可能である。

**（２）新たなペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子**

症例：患者は Zellweger 症候群に典型的な顔貌異常や筋緊張低下などの神経学的異常を呈して生後 10 日で死亡、血清極長鎖脂肪酸の蓄積と赤血球プラスマローゲンの欠乏、皮膚生検により樹立した培養線維芽細胞での抗カタラーゼ抗体による蛍光染色よりペルオキシソーム欠損症と診断した。

解析結果：線維芽細胞を用いた細胞融合による相補性解析より、既存のペルオキシソーム欠損症 12 群とは異なる新たな相補性群と判明し、K 群と命名した。この患者細胞ではペルオキシソーム局在シグナルである PTS1 タンパクも PTS2 タンパクもペルオキシソームへの局在が障害されていた。酵母のペルオキシソーム形成遺伝子 *PEX14* のヒトホモログ *HsPEX14* はクローニングされていたが、ヒトでの遺伝子異常の報告がないため、この遺伝子を解析したところ、患者で Q185X のナンセンス変異を homozygote で有していることが明らかになった。野生型 *HsPEX14* を発現ベクターに組み込んで患者細胞に導入したところ、PTS1 タンパクも PTS2 タンパクも正常にペルオキシソームに局在化した。一方、Q185X 変異を有する *HsPEX14* を発現させても酵素のペルオキシソームへの局在は回復しなかった。さらに抗ラット *PEX14* 抗体を用いて患者細胞の蛍光染色を行った結果、*PEX14* タンパクの欠損が認められた。

（倫理面への配慮）

本調査は岐阜大学医学研究倫理審査委員会の承認のもと、文書による同意を得て実施した。

## D. 考 察

副腎白質ジストロフィーの患者データベースの構築は、ALD の自然歴と病態の解明に有用な情報を提供することが可能となるであろう。また新たなペルオキシソーム欠損症相補性群とその病因遺伝子 *PEX14* を明らかにした。*PEX14* は *PEX13* とともにペルオキシソーム蛋白を膜にドッキングさせるために必要な蛋白質で、ヒトにおいてもその正常な機能が生命維持に重要であることが明らかになった。今後、副腎白質ジストロフィーの病因蛋白である ALDP のペルオキシソームへの局在過程や代謝機能の解明につなげてゆきたい。

## E. 結論

副腎白質ジストロフィーの患者データベースを試作した。新たなペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子を解明した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozawa N, Wanders RJA, Kondo N. Gas chromatography / mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. *Brain & Development* 27:481-487, 2003
- 2) Yuzhi Jia, Chao Qi, Zhongyi Zhang, Takashi Hashimoto, M. Sambasiva Rao, Steven Huyghe, Yasuyuki Suzuki, Paul P. Van Veldhoven, Myriam Baes, and Janardan K. Reddy. Overexpression of PPAR $\alpha$  regulated genes in liver in the absence of peroxisome proliferation in mice deficient in both L- and D- forms of enoyl-CoA hydratase / dehydrogenase enzymes of peroxisomal  $\beta$ -oxidation system. *J Biol Chem* 278:47232-9, 2003
- 3) Une M, Iguchi Y, Sakamoto T, Tomita T, Suzuki Y, Morita M, Imanaka T. ATP-dependent transport of bile acid intermediates across rat liver peroxisomal membranes. *J Biochem.* 134:225-230, 2003
- 4) Shimozawa N, Nagase T, Takemoto Y, Ohura T, Suzuki, Kondo N. Genetic heterogeneity of peroxisome biogenesis disorders among Japanese patients: evidence for a founder haplotype for the most common *PEX10* gene mutation. *Am J Med Genet* 120A:40-43, 2003
- 5) Matsumoto N, Tamura S, Furuki S, Miyata N, Moser A, Shimozawa N, Moser HW, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y. Mutations in novel peroxin gene *PEX26* that cause peroxisome-biogenesis disorders of complementation group 8 provide a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet.*

73:233-246, 2003

### 2. 学会発表

- 1) 船戸道徳、下澤伸行、長瀬朋子、竹本靖彦、鈴木康之、今村善彦、近藤直実：ペルオキシソーム  $\beta$ 酸化酵素単独欠損症日本人症例の検討。第 106 回日本小児科学会学術集会、2003.4.25-27, 福岡
- 2) 長瀬朋子、下澤伸行、船戸道徳、竹本靖彦、鈴木康之、近藤直実：マウス小脳における発達過程でのペルオキシソーム局在についての検討。第 106 回日本小児科学会学術集会、2003.4.25-27, 福岡
- 3) 長瀬朋子、下澤伸行、船戸道徳、竹本靖彦、鈴木康之、山形崇倫、桃井真理子、近藤直実：Zellweger 症候群様の臨床像を呈し、ALDP 遺伝子を含む遺伝子欠失を有した 1 例。第 48 回日本人類遺伝学会、2003.10.21-24, 長崎
- 4) 下澤伸行、長瀬朋子、竹本靖彦、塚本利朗、鈴木康之、近藤直実：ペルオキシソーム欠損症新規相補性群の同定—*PEX14* 遺伝子異常。第 48 回日本人類遺伝学会、2003.10.21-24, 長崎
- 5) 鈴木康之、竹本靖彦、長瀬朋子、下澤伸行、近藤直実：副腎白質ジストロフィーの臨床経過。第 46 回日本先天代謝異常学会、2003.11.20-22, 松江
- 6) 下澤伸行、長瀬朋子、竹本靖彦、鈴木康之、松本 正、藤木幸夫、近藤直実：ペルオキシソーム欠損症 A 群における病因遺伝子 *PEX26* の解析。第 46 回日本先天代謝異常学会、2003.11.20-22, 松江

## H. 知的所有権の取得状況

なし