

小脳-大脳運動回路と大脳基底核運動回路のネットワーク解析

分担研究者：吉良潤一<sup>1)</sup>

研究協力者：谷脇考恭<sup>1)</sup> 岡山 晶<sup>1)</sup> 飛松省三<sup>2)</sup> 吉浦 敬<sup>3)</sup>

1) 所属：九州大学大学院医学研究院神経内科

2) 所属：九州大学大学院医学研究院臨床神経生理

3) 所属：九州大学病院臨床放射線科

研究要旨

脊髄小脳変性症で予想される小脳-大脳運動回路、および大脳基底核運動回路全体の機能連関の解析方法を開発した。若年健常人を対象に、手指複雑連続運動課題中に機能的 MRI を撮像し、ネットワーク解析を加えた。自己ペース運動中は大脳基底核運動回路に、外的ペース運動中は小脳-大脳運動回路に機能連関を認め、両回路の活動をヒトで解析する方法を確立できた。

A.研究目的

脊髄小脳変性症で予想される小脳-大脳運動回路、および大脳基底核運動回路の機能連関の解析方法の確立を目的とした。

B.研究方法

12 例の若年健常人を対象に、手指複雑連続運動課題を自己ペース、および外的ペースで行い、機能的 MRI を撮像後、ネットワーク解析を加え、両回路内の径路係数を算出した。

C.研究結果

自己ペース運動中は大脳基底核運動回路に、外的ペース運動中は小脳-大脳運動回路に機能連関を認めた。

D.考察

自己ペース運動中は大脳基底核運動回路が、外的ペース運動中は小脳-大脳運動回路の活動が示唆され、両回路は異なるタイミング調節に関与することが推定された。

E.結論

小脳-大脳運動回路、基底核運動回路の活動をヒトで解析する方法を確立できた。今後は脊髄小脳変性症患者を対象とし、小脳疾患の病態機序について解析する予定である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

Taniwaki T, et al: J Neurosci 23:3432-3438, 2003.

2.学会発表

Taniwaki T, et al: The 8<sup>th</sup> international Evoked Potentials Symposium. Fukuoka 2004. 10.8.  
谷脇考恭 他： 第 45 回日本神経学会総会、東京 2004. 5.13

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

2.実用新案登録

3.その他

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

遺伝性脊髄小脳変性症における phospholipase C  $\beta$  4 (PLCB4) の遺伝子解析

分担研究者 佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野

共同研究者：矢部一郎、相馬広幸

所 属：北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野

研究要旨：Protein kinase C  $\gamma$  (PRKCG)はSCA14の該当遺伝子であるが、このPRKCGはイノシトールリン脂質を介する細胞内情報伝達系として機能し、かつ小脳に高発現している。これらの事実より、この情報伝達系は小脳機能維持に対し重要な役割を為していることが推定される。PKCと関連してその情報伝達系機能を維持しているものとしてphospholipase C  $\beta$  が知られている。そのうち phospholipase C  $\beta$  4 (PLCB4)は小脳に高発現しており、加えてPLCB4 KOマウスでは小脳症状を呈することが知られている。そこでPLCB4は遺伝性SCAの有力な候補遺伝子の一つと考え、原因遺伝子が未知のSCA症例に対し本遺伝子の解析を行った。対象は既知の遺伝子変異が否定されたSCA家系の発端者24名を対象とした。その結果、6名において4種類のエキソン内多型を認め、そのうち一つはアミノ酸変異を伴っていたが、いずれもデータベース上SNPとして登録されており、病的意義は無いものと考えられた。

#### A.研究目的と背景

成年期に発病する脊髄小脳変性症 (spinocerebellar ataxia: SCA)は原因の異なる様々な疾患を含んでいる。我が国のSCAの60~70%は非遺伝性疾患からなり、その中で最も頻度の高い疾患は多系統萎縮症(MSA)である。残りの30~40%は、地域により異なるが、遺伝性疾患と推定されている。遺伝性SCAにおいても原因の異なる多様な疾患を含んでいる。現在までに、遺伝子座もしくは当該遺伝子の起因変異が同定された疾患は20余にのぼり、その多くはトリプレットリピート病である。その一方で原因遺伝子が未同定の遺伝性SCAも遺伝性SCAの約30%を占めている。その中で、我々は昨年度SCA14が第19染色体19q13.4に位置するセリン・スレオニンキナーゼファミリーに属するprotein kinase C  $\gamma$  (PRKCG)の遺伝子変異に起因することを報告した。PRKCGはprotein kinase C (PKC)の一群であり、イノシトールリン脂質を介する細胞内情報伝達系として機能し、かつ小脳に

高発現している。これらのことより、この情報伝達系は小脳機能維持に対し重要な役割を為していることが推定される。PKCと関連してその情報伝達系機能を維持しているものとしてphospholipase C  $\beta$  が知られている。そのうちphospholipase C  $\beta$  4 (PLCB4)は小脳に高発現しており、加えてPLCB4ノックアウトマウスにおいては小脳性運動失調を発症することが報告されている。そこで、我々はPLCB4は遺伝性SCAの有力な候補遺伝子であると考え、原因遺伝子が未知のSCA症例に対し本遺伝子の解析を行った。

#### B.研究方法

既知の遺伝子変異が否定されたSCA家系の発端者24名を対象とした。その臨床病型はADCA Iが6家系(25%)、DCCAが18家系(75%)であった。PLCB4遺伝子の全40エキソンをPCR法にて増幅した後、蛍光DNAシーケンサー (ABI PRISM377)を用い direct sequence 法にて解析を行った。

(倫理面での配慮)

研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守した上で実施し、北海道大学医学研究科医の倫理委員会の承認を得た。対象者には研究の趣旨を文書で説明し、文書で同意を得た。

C. 研究結果及び考察

6名において4種類のエクソン内遺伝子変化を認めた。（表）

	エクソン	遺伝子変異	アミノ酸変
No. 1	26	2100A→T	A700A
No. 2	28	2364G→A	P788P
No. 3	28	2364G→A	P788P
No. 4	19	1464C→T	S488S
No. 5	4	61G→A	A21T
No. 6	4	61G→A	A21T

表 エクソン内に認められた遺伝子変異

その内61番目のGがAに一塩基置換する変異は21番目のアミノ酸アラニンがスレオニンに変化する変異であった。加えてエクソン近傍のイントロンに7カ所の一塩基置換を認めた。しかしながら、データベース上これらの塩基置換は既に single nucleotide polymorphism (SNP)として登録されており、病的意義は無いものと考えられた。

D. 結論

今回の検討では遺伝性脊髄小脳変性症と関連する *PLCB4* 遺伝子変異は認められなかった。しかしながら、*PLCB4* は遺伝性脊髄小脳変性症の有力な候補遺伝子であると思われるので、今後も更なる検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1). Yabe, I., Soma, H., Takei, A., Fujiki, N.,

Sasaki, H.: No association between *FMR1* and multiple system atrophy. *J Neurol.* 251, 1411-1412, 2004

2). 相馬広幸, 矢部一郎, 佐々木秀直: 片頭痛発作を伴う常染色体優性遺伝性小脳皮質萎縮症. *神経内科.* 60, 483-486, 2004

3). 矢部一郎, 佐々木秀直: Spinocerebellar ataxia type 14. *神経内科.* 60, 493-496, 2004

2. 学会発表

1). Soma, H., Yabe, I., Takei, A., Fujiki, N., Sasaki, H.: Clinical features of multiple system atrophy in Japan - MSA-C is the most common manifestation of MSA in Japan, 129th Annual Meeting American Neurological Association, Toronto, 2004, 10/2-10/6

F. 知的所有権の取得状況  
該当なし

## 第 16 染色体長腕に連鎖する常染色体優性遺伝性皮質性小脳萎縮症の原因遺伝子の同定

分担研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学分野 教授

今回我々は、第 16 染色体長腕に連鎖する常染色体優性遺伝性皮質性小脳萎縮症の原因遺伝子の同定を行うために、ハプロタイプ解析・遺伝子解析を行った。その結果、候補領域の絞り込みに成功し、患者に特異な遺伝子変化を見出した。また、病理学的検索で本病型に特徴的な変化を見出した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、第 16 番染色体に連鎖する優性遺伝性皮質性小脳萎縮症の原因遺伝子を同定し、その発症機序の解明と治療法の開発を行うことである。

昨年度までに、本症について、原因遺伝子の候補領域につき多数の DNA マーカーを検索した結果、全家系に共通する創始者ハプロタイプを認め、候補領域を狭めた。またその中に本症にのみ認められる遺伝子変化を見出した。また、剖検例についても報告した。本年度は、それらにつきさらに詳細に検討した。

### B. 研究方法

この領域をさらに狭めるために、多施設の協力を得て、連鎖が示唆され出身地の異なる新たな家系を追加し、既知のマイクロサテライト DNA マーカー 10 個、および我々が独自に見出した 15 個のマーカーについて、患者および正常対照者のゲノム DNA を用いて PCR を行い、蛍光オートシーケンサーを用いて解析を行い、元の 6 家系との共通したハプロタイプを示す領域を検索した。

また、候補領域の中に含まれる遺伝子をデータベースの中から検索し、それぞれにつきエクソンを含む領域を増幅するようなプライマーを設定し、患者および正常対照者のゲノム DNA を用いて PCR を行い、DNA 蛍光オートシーケンサーを用いて直接シーケンシングを行い、変異の有無について検索した。また、ゲノム情

報から 5' 端あるいは 3' 端の遺伝子情報が得られないものについては RACE 法を用いて上流の塩基配列を決定し、同様に患者での変異の有無を解析した。これまでに解析した遺伝子の総数は 50 近くに上った。

また、本症にのみ認められた遺伝子変化については、健常日本人を 500 人に増やし、この遺伝子変化の有無につき検討した。

さらに、我々の集積した家系で得られた剖検例については、免疫組織学的検査を追加し詳細な病理学的検索を行った。他の施設で得られた同様の症例についても検討した。

### （倫理面での配慮）

遺伝子解析を協力していただいた被検者には、該当施設の倫理規定に則った方法でインフォームドコンセントを得て、文書にて承諾を取り、実験を行った。

### C. 研究結果

#### 1. ハプロタイプ解析

本疾患との連鎖が示唆される家系は、さらに増え 52 家系に登った。これらにつき、既知のマイクロサテライト DNA マーカー 10 個および我々が独自に見出したマーカー 15 個、計 25 個につき、ハプロタイプ解析を行った結果、複数のマーカーについて全家系の発症者が共通したアレルを有しており、創始者効果を認めた。この結果、候補領域は約 600Kb の範囲内であることが確認できた。

## 2. 遺伝子解析

この領域は、遺伝子が大変豊富に存在しており、既に登録されているもので30以上ある。これらの遺伝子のほぼすべて解析をおこないその結果、ある遺伝子内に患者に特有な遺伝子変化を見出した。同変化は日本人健常者500人には見られていない。

## 3. 病理学的検索

剖検例は死亡時96歳の女性で、小脳性失調症が70歳頃より出現し、末期は難聴と老年性痴呆を伴っていた。

マクロ所見では小脳虫部上面に軽度の萎縮を認めた。

組織学的には小脳皮質の変性がみられ、特にプルキンエ細胞の萎縮・神経細胞脱落を認めるが、顆粒細胞の脱落は軽度であった。この変化は小脳虫部に最も強く認められた。強拡大で見ると、萎縮したプルキンエ細胞の周囲にはアモルファスな構造物を認めた。これを、シナプス前終末に特異的なシナプトフィジンで染色すると、このアモルファスな構造物の少なくとも一部はシナプトフィジン陽性であった。

次に、プルキンエ細胞のマーカーであるカルピンディンに対する免疫染色を行うと、形態の異常な樹状突起を多数胞体から出している異常なプルキンエ細胞が認められた。胞体がやや萎縮したものではアモルファスな構造物が形成され、顆粒状の構造物がみられた。さらに萎縮が進んだものでは、顆粒状の構造物がはっきりしていた。

ユビキチンの染色を行っても、これらの顆粒はみられた。

また、以上に示したような特徴的な病理学的変化を示す別の例においても、やはり上記した遺伝子変化が確認され、病理学的変化と遺伝子変化が1対1対応することが判明した。

## D, E. 考察および結論

今回、多数例の家系を追加して、ハプロタイプ解析を行った結果、本症の遺伝子の候補領域を600kbに狭めることができた。この領域に存在する遺伝子を解析した結果、患者に特有な遺伝子変化のある遺伝子内に見出した。同変化は日本人健常者には見られていない。現在、この遺伝子変化が真の遺伝子変異であるかどうかについて、剖検脳を用いた遺伝子の転写産物の解析を含めて、詳細に検討している。また、この遺伝子は機能について十分には判明していず、

これについても検討している。

また、病理学的検索を行った結果、萎縮したプルキンエ細胞の周囲には少なくとも一部はシナプトフィジン陽性であるアモルファスな構造物を認め、したがってプルキンエ細胞が変性・萎縮する過程で、これに inputs するシナプス前終末が増生しているという可能性が考えられる。このような変化はMSAやSCA6を含めプルキンエ細胞の変性を来す他の疾患では認められないこと、また、同様な変化を示す別の剖検例においても同じ遺伝子変化が認められたことから、本病型に特徴的な変化であると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

石川欽也, 融 衆太, 大和田潔, 石田 玄, 水澤英洋. 【遺伝性脊髄小脳変性症 遺伝子未解明の疾患を中心に】 第16番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性純粋小脳失調症. 神経内科 60 巻 5 号 Page462-468(2004.05)

### 2. 学会発表

融 衆太, 石川欽也, 李明順, 水澤英洋. 第16番染色体長腕連鎖型優性遺伝性皮質性萎縮症(16q-ADCCA)の原因遺伝子探索. 第45回日本神経学会総会. (2004.5.11-4, 東京)

石川欽也, 融 衆太, 大和田潔, 石田 玄, 李明順, 水澤英洋. 第16番染色体長腕連鎖型優性遺伝性皮質性小脳萎縮症の臨床的・神経病理学的研究. 第45回日本神経学会総会(2004.5.11-4, 東京)

## H. 知的所有権の獲得

なし

## 都城地域に多発する常染色体優性脊髄小脳変性症の原因同定の試み

分担研究者 納 光弘

（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科、老年病学）

共同研究者：高嶋 博、平野隆城、大窪隆一、荒田 仁、  
有里敬代、田島圭子、有村公良

### 研究要旨

都城に多発する高齢発症の常染色体優性脊髄小脳変性症の患者4家系30例について、遺伝子学的にも検討し、2点連鎖解析では遺伝子マーカー D16S3141 で Lod score 6.01 優位な値を示し、さらにハプロタイプ解析では 1.25MB の範囲に原因遺伝子の存在を同定しえた。この範囲内のすべての遺伝子をシーケンス解析したが、疾患に関連する遺伝子異常は見られなかった。今後は、さらなる新しい候補遺伝子存在の可能性を検索しつつ、イントロンの異常、特殊なりピート病、micro deletion/duplication の可能性、メチル化の異常など幅広く調べる必要がある。

分担研究者：納 光弘  
鹿児島大学医歯学総合研究科  
神経病学講座 神経内科・老年病学・教授

### A. 研究目的

都城に多発する高齢発症の常染色体優性脊髄小脳変性症の遺伝的原因を明らかにする。

### B. 研究方法

臨床的に、常染色体優性遺伝の形式で小脳症状を示す家系のうち、16番染色体に連鎖する4家族30名（うち患者20名）において、遺伝子学的に原因の同定を試みた。

具体的には、16q22 の DNA マーカーを用いて遺伝子連鎖解析を行い、2点連鎖解析、家系内および家系間の遺伝子ハプロタイプの比較により、疾患遺伝子存在部位の詳細なマッピングを行った。

さらに、絞り込んだ範囲にある36の遺伝子について、翻訳領域および splice site のシーケンス解析を行った。

また、1例 homozygous に疾患関連遺伝子を持つ患者がいるため、その患者において

PCR 法で、36 遺伝子の総計 289 exons の欠失がないか調べた。

### C. 研究結果

#### 遺伝子学的検討

2点連鎖解析では、遺伝子マーカー D16S3141 で Lod score 6.01 と最も高い値を示した。この周囲の8つのマーカーで Lod score 3 以上の優位な値を示した。

ハプロタイプ解析では、遺伝子マーカー 17msm（自作）と CTTT01 の間の 1.25MB の範囲に原因遺伝子の存在が考えられた。

この 1.25MB の範囲にある 21 の遺伝子と 15 のプログラムで予測された遺伝子の検討で、7つの遺伝子において9種の遺伝子異常が認められた。

ZFP90 遺伝子で heterozygous 822insG, 29polyglutamine を含む THAP11 では、1 glutamine deletion、その他4つの新しいシーケンスバリエーションを見つけたがこれらは、疾患と co-segregate していなかった。

homozygous に疾患関連遺伝子を持つ患者において、明らかな遺伝子の欠失は認めなかった。

#### D. 考察

本家系は、常染色体の 16 番染色体に連鎖する、高齢発症の pure な小脳失調症と特徴づけられる。

この領域は、既報告の SCA4 または、16q-ADCCA (16qADCA type III) と重なる領域であり、今回の検討から導かれた我々のデータは、今までの報告のほぼ中央部に存在した。この領域は、1.25MB にもかかわらず、推定されるものを含め、遺伝子が 36 もあり、遺伝子密度の高い領域であった。この範囲の考えられるすべての遺伝子をシーケンス解析したが、疾患に関連する遺伝子異常は見られなかった。

今後は、さらなる新しい候補遺伝子存在の可能性を検索しつつ、イントロンの異常、特殊なリピート病、micro deletion/duplication の可能性、メチル化の異常など幅広く調べる必要があると考えられた。

#### E. 結論

1. 遺伝子解析の結果から本疾患は 16q22 にマップされ、SCA4 または、16q-ADCCA と同一の原因（遺伝子異常）で起こる可能性が高い。

2. 候補領域は 1.25MB に縮小された。

3. 36 の遺伝子の配列には疾患関連の異常は見いだせず、新たなアプローチが必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hirano R, Takashima H, Osame M, et al. Fine mapping of 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia type III in Japanese families. *Neurogenetics*. 2004, 5:215-221
2. 大窪隆一、平野隆城、高嶋 博、有村公良、納 光弘 都城地域に集積する予後良好な常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症 *神経内科* 60(5),477-482, 2004

#### 2. 学会発表

第 45 回日本神経学会総会(2004 年,東京)

高嶋 博ら

都城地域に多発する常染色体優性脊髄小脳変性症の臨床的、遺伝学的研究

大窪隆一ら

都城地域に多発する優性遺伝性脊髄小脳変性症の臨床的特徴について

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

長野県南部地域に集積する優性遺伝性脊髄小脳変性症の連鎖解析

分担研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科 教授

共同研究者 吉田邦広<sup>1)</sup>、清水雄策<sup>2)</sup>、岡野友美<sup>3)</sup>、堺 温哉<sup>4)</sup>、福嶋義光<sup>1)</sup>、  
松本直通<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部、<sup>2)</sup> 伊那中央病院神経内科、

<sup>3)</sup> 諏訪赤十字病院神経内科、<sup>4)</sup> 横浜市立大学大学院環境分子医科学

研究要旨：長野県伊那地域に集積する原因遺伝子未同定の常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症の病因解明を目的として連鎖解析を始めた。罹患者 6 名を含む 22 名の研究協力者が得られた 1 家系において全ゲノムのスクリーニングを行ったところ複数の染色体において LOD 値が 1 を超える DNA マーカーを見出したが、いずれも有意な連鎖を示唆する(LOD 値>3)までには至らなかった。その要因として、マーカー間の遺伝学的距離が大きいこと、配偶者を含めて本家系の遺伝的背景が比較的均一なためアレルの種類が少なく、マーカーのヘテロ接合性が低いこと、などが考えられた。今後、LOD>1 のマーカーを中心に、その周辺に新たなマーカーを設定して候補領域を絞り込む予定である。

A. 研究目的

昨年度までに長野県における常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症(autosomal dominant cerebellar ataxia, ADCA)86 家系の疾患頻度を解析した結果、長野県では現時点で原因遺伝子未同定の ADCA が 55 家系(65%)と高頻度に存在することが判明した。しかもこれらの未同定家系は木曾、佐久、伊那などの比較的限局した地域に集積する傾向が見られた。また臨床的にはこれらの未同定家系の大半が中年期以降に発症する緩徐進行性の純粋小脳型を呈していた。このような知見を踏まえて、長野県内に集積する原因遺伝子未同定の ADCA の病因を解明するこ

とを目的にした。

B. 研究方法

対象は長野県伊那地域出身の ADCA 家系 3 家系である。今回はこの中から最も多くの検体数(罹患者 6 名を含めて家系全体で 22 名)が得られた 1 家系を用いて全ゲノムのスクリーニングを行った。末梢血白血球からゲノム DNA を抽出し、ABI PRISM Linkage Mapping Set ver. 2.5 を用いてゲノム上の約 400 の DNA マーカーを PCR で増幅した。増幅した PCR 産物は ABI 3100 を用いてサイズ解析を行った。得られたデータをもとに MLINK による二点パラメトリック連鎖解析を行



い、各マーカーに対する LOD 値を算出し、候補領域の絞り込みを行った。

(倫理面での配慮)

本研究は「ヒト遺伝子研究」として信州大学医学部倫理委員会の承認を得た。遺伝子解析にあたっては、研究協力者に対して口頭と文書による説明を行い、インフォームド・コンセントを得た。特に原因遺伝子の解明を目的にしたヒト遺伝子研究であり、すぐさま臨床的に有益な情報が得られるものではないこと、原則として結果は伝えないことを十分に説明した。また検体、遺伝子解析結果は当遺伝子診療部において一括管理し、個人情報の保護には十分に配慮した。

### C. 研究結果

浸透率 1.0 とした場合、第 3、6、8、10、16、17 番染色体に最大 LOD 値が 1 を超えるマーカーをいくつか見出したが、最大でも 1.7 程度にとどまり、LOD 値が 3 を超えるような有意なマーカーは見出せなかった。

### D. 考察

結果的に本家系においては有意な連鎖が示唆される (LOD 値 > 3) マーカーは見出せなかった。この理由としてはいくつかの要因が考えられる。最も大きな要因としては使用したマーカー間の平均の遺伝学的距離が 9.2 cM と大きいことが上げられる。このために原因遺伝子座が 2 つのマーカーから同程度の距離にある場合にはそのいずれのマーカーでも LOD 値が十分に上がらないことが予測される。次に配偶者を含めて本家系の遺伝的背景が比較的均一なためアレルの種類が少な

い、マーカーのヘテロ接合性が低いという可能性が考えられる。さらに臨床情報の精度の問題がある。本家系では大半の罹患者が 40-50 歳台に発症しているが、60 歳頃に発症した方もあった。今回は一様に浸透率 1.0 として LOD 値を算出したが、罹患者の子供で採血時に 57 歳、55 歳で無症状の方を非罹患者とみなすことには若干問題があるかも知れない。

いずれにしても今後はいくつかの染色体で確認された LOD 値 > 1 のマーカーを中心にその周辺に新たなマーカーを設定して、候補領域を絞り込む予定である。

### E. 結論

長野県に高頻度に存在する原因遺伝子未同定の ADCA の病因解明をめざして連鎖解析を始めた。現在までのところ有意な連鎖を示唆する理想的なマーカーには行き着いていない。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

論文発表

Shimizu Y, Yoshida K, Okano T, Ohara S, Hashimoto T, Fukushima Y, Ikeda S. Regional features of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Nagano: clinical and molecular genetic analysis of 86 families. *J Hum Genet* 49: 610-616, 2004.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

## 遺伝性脊髄小脳失調症 14 型(SCA14)の新規家系の同定と変異 $\gamma$ PKC の機能解析

分担研究者 川上秀史 広島大学病院脳神経内科

共同研究者 酒井規雄<sup>1</sup>、平本恵子<sup>1</sup>、森野豊之<sup>2</sup>、丸山博文<sup>2</sup>、井上貴美子<sup>3</sup>、関 貴弘<sup>1</sup>、  
足立直子<sup>4</sup>、斎藤尚亮<sup>4</sup>、松本昌泰<sup>2</sup>

広島大学大学院神経・精神薬理<sup>1</sup>、脳神経内科<sup>2</sup>

兵庫県立リハビリテーションセンター<sup>3</sup>

神戸大学バイオシグナル研究センター分子薬理<sup>4</sup>

研究要旨 遺伝性脊髄小脳失調症 14 型(SCA14)は、プロテインキナーゼ C(PKC)の神経特異的な分子種である  $\gamma$ PKC のミスセンス変異が発症原因と考えられている。本研究では、 $\gamma$ PKC の新たな変異による SCA14 家系を同定した。また PKC のターゲティングに注目して解析を行い、変異  $\gamma$ PKC は、容易に細胞内で凝集体を形成することが明らかとなった。SCA14 は、ポリグルタミン病などと同様にタンパク質の異常蓄積を起因とする神経細胞死により発症するのではないかと推測された。

### A. 研究目的

遺伝性脊髄小脳失調症 14 型(SCA14)は、プロテインキナーゼ C(PKC)の神経特異的な分子種である  $\gamma$ PKC のミスセンス変異が発症原因と考えられている。脊髄小脳変性症患者の DNA をスクリーニングして  $\gamma$ PKC の新たな変異による SCA14 家系の同定を試みた。

PKC は、活性化された際に局在が変化し（トランスロケーション）、トランスロケーションした先でリン酸化すべき標的基質を認識する機構（PKC ターゲティング機構）を有している。本研究ではこれらの変異  $\gamma$ PKC がどのような機序で神経細胞死を導くのかを明らかにする目的で PKC のターゲティングに注目して解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. SCA14 の新規家系の同定

変異の報告が集中している  $\gamma$ PKC の C1 領

域(exon4-5 領域)を PCR 解析のターゲットにした。広島大学の倫理委員会の承認のもと収集された、脊髄小脳変性症で既知の遺伝子異常の多くを除外された弧発例 650 人と家族歴を有する例 232 人のゲノムから  $\gamma$ PKC をコードする遺伝子 PRKCG の exon4-5 を PCR 法によって増幅させ、その産物を Denatured High-Performance Liquid Chromatography (WAVE<sup>®</sup>) を用いて遺伝子変異を検出し、検出された変異を、直接塩基解析法によって決定した。

#### 2. 変異 $\gamma$ PKC の細胞生物学的解析

変異  $\gamma$ PKC-GFP 発現ベクターを作製し、各種培養細胞に発現させた。発現した変異  $\gamma$ PKC-GFP の局在、受容体刺激によるトランスロケーション、可溶性、活性などを検討した。

### C. 研究結果

#### 1. SCA14 の新規家系の同定

SCA 弧発例から 1 例、家族歴を有する例から 1 例、PRKCG の exon4 内に 119 番目のセリ

ン残基がフェニルアラニン残基に変化するミスセンス変異を発見した。より詳細に検討した結果、これらは同一家系に属することが判明した。またコントロール群において同変異は認めなかった。臨床症状としては幼少時からの難治性てんかんおよび歩行障害を主体とした若年発症例1例を除いては、軽い失調症状を主とし比較的高齢で発症するものが4例を占めた。

## 2. 変異 $\gamma$ PKCの細胞生物学的解析

変異 $\gamma$ PKC-GFPは、主に細胞質内に斑点状に凝集体を形成し、トリトンX不溶画分として回収された。また凝集体を形成した変異 $\gamma$ PKCは、PDK1によるリン酸化を受けておらず活性を有さないことが予想された。一方、細胞質に発現した凝集していない変異 $\gamma$ PKCは活性を有していた。

次に、受容体刺激によるトランスロケーションでは、変異 $\gamma$ PKC-GFPは細胞質から細胞膜へトランスロケーションした後に高率に細胞内で凝集体を形成する傾向が強いことがわかった。

D. 考察：このように、変異 $\gamma$ PKCは、容易に細胞内で凝集体を形成することが明らかとなり、SCA14は、ポリグルタミン病など同様にタンパク質の異常蓄積を起因とする神経細胞死により発症するのではないかと推測された。

結論：新規SCA14家系を同定した。変異 $\gamma$ PKCは、凝集しやすいことが明らかになった。

## E. 研究発表

Oda M, Maruyama H, Komure O, Morino H, Terasawa H, Izumi Y, Imamura T, Yasuda M, Ichikawa K, Ogawa M, Matsumoto M, Kawakami H. Possible reduced penetrance of expansion of 44 to 47 CAG/CAA repeats in the TATA-binding protein gene in spinocerebellar ataxia type 17. *Arch Neurol.*

2004 ;61(2):209-12.

Terasawa H, Oda M, Morino H, Miyachi T, Izumi Y, Maruyama H, Matsumoto M, Kawakami H. Molecular basis of prevalence and founder effect for Japanese SCA6 population *Neuroscience Lett* 358/2 pp. 107-110

Honjo K, Ohshita T, Kawakami H, Naka H, Imon Y, Maruyama H, Mimori Y, Matsumoto M. Quantitative assessment of cerebral blood flow in genetically confirmed spinocerebellar ataxia type 6. *Arch Neurol.* 2004 Jun;61(6):933-7.

Influence of a tumor necrosis factor gene polymorphism in Japanese patients with multiple system atrophy. Nishimura M, Kuno S, Kaji R, Kawakami H. *Neuroscience Letters* 2005 ;374(3):218-21.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms in Japanese patients with sporadic Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and multiple system atrophy. Nishimura M, Kuno S, Kaji R,

Kawakami H. *Movement Disorders* (in press)

G. 知的所有権の取得状況

なし。

本邦の Charlevoix-Saguenay 型痙性失調症 4 家系 7 名における臨床・分子遺伝学的検討

分担研究者：瀧山嘉久 自治医科大学内科学講座神経内科学部門

共同研究者：嶋崎晴雄<sup>1</sup>、小川朋子<sup>1</sup>、安藤喜仁<sup>1</sup>、迫江公己<sup>1</sup>、中野今治<sup>1</sup>、  
平岡宏太良<sup>2</sup>、長野清一<sup>2</sup>、山本洋一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学内科学講座神経内科学部門

<sup>2</sup>大阪大学神経内科・脳卒中科

研究要旨

本邦のARSACS4家系7症例について、新規変異を含むSACS遺伝子変異を同定し、本邦にもARSACS家系が存在することを示した。その臨床像をカナダの例と比較検討したところ、本邦例では発症年齢が遅く、網膜有髄線維の増生は軽度であった。下肢痙性のみられない家系や、中等度の知能低下を伴う症例も存在し、臨床像の多様性が観察された。今回の検討では、遺伝子型と表現型の明らかな関連は認められず、今後の症例の蓄積が必要と考えられた。ARSACSに特徴的とされる網膜所見あるいは下肢痙性を欠くような劣性遺伝性早発性小脳失調の症例においても、ARSACSを疑って遺伝子診断を行うべきであると思われた。

A. 研究目的

Charlevoix-Saguenay 型痙性失調症 (Auto-somal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay : ARSACS) は、カナダのケベック州で最初に報告された遺伝性神経変性疾患で、SACS遺伝子の変異が見いだされている。その特徴的な臨床像は、早発性小脳失調、下肢痙性、末梢神経障害、足変形、網膜有髄線維の増生であり、知能はほぼ正常であるとされている。しかし、本年、本邦や地中海沿岸地方からも遺伝子変異が同定されたARSACSの報告がなされ、網膜有髄線維の増生を欠く例や知能低下を認める例も知られてきている。

昨年、我々は本邦のARSACS1家系について、はじめてSACS遺伝子変異を同定したが、その後、臨床的にARSACSが疑われる3家系を経験した。そこでこれら3家系についてSACS遺伝子変異を同定し、先の1家系と合わせて本邦におけるARSACSの臨床像および分子遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象はARSACS4家系7症例であり、うち1家系は血族結婚が確認された。神経学的所見を評価し、協力の得られた症例には、頭部MRI、末梢神経伝導速度、神経生検、知能テストを試行した。また、イ

ンフォームドコンセントを得て、末梢白血球よりゲノムDNAを抽出し、SACS遺伝子PCR産物の直接シーケンスおよびTAクローニングにより遺伝子変異を解析した。

#### C. 研究結果、考察

4家系でSACS遺伝子のミスセンス変異(T987C/T987C, T7492C/T7492C)とフレームシフト変異(3027-8delAG/3998delT)を同定した。全てこれまでに報告のない新規の変異であった。うち2家系では共通の変異(T7492C)を認めた。本邦ARSACSの発症年齢は早発性ではあるものの、ケベック州の症例に比し遅かった。基本的な臨床像はケベック州の症例と類似しており、早発性小脳失調、下肢痙性、アキレス腱反射を除いた四肢腱反射の亢進、Babinski徴候、末梢神経障害、足変形、網膜有髄線維の増生であったが、1家系では網膜の所見を欠いていた。興味深いことに、別の1家系では下肢痙性を認めず、四肢腱反射は低下～消失していた。これまで、ARSACSの中核症状である下肢痙性を認めない例の報告はなく、この家系はARSACSの臨床像の多様性を示唆していた。末梢神経生検は2例で試行し、軸索変性が認められた。WAIS-Rは3例で行い、軽度から中等度の知能低下がみられた。

今回の検討では、遺伝子型と表現型の明らかな関連は認められず、今後の症例の蓄積が必要であると考えられた。

#### D. 結論

1、ARSACS 4家系で3種類の新規遺伝子変異を同定した。

2、本邦のARSACSはケベック州の症例に比し、網膜有髄線維の増生、下肢痙性、四肢腱反射の亢進を認めない症例が存在し、また知能低下を認める症例もあり、臨床像の多様性が示された。

3、ARSACSに特徴的とされる網膜所見あるいは下肢痙性を欠くような劣性遺伝性早発性小脳失調の症例においても、ARSACSを疑って遺伝子診断を行うべきであると思われた。

#### E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ogawa T, Takiyama Y, Sakoe K, Mori K, Namekawa M, Shimazaki H, Nakano I and Nishizawa M. Identification of a SACS gene missense mutation in ARSACS. *Neurology* 62:107-109, 2004.

##### 2. 学会発表

1) 小川朋子, 瀧山嘉久, 迫江公己, 嶋崎晴雄, 滑川道人, 中野今治, 西澤正豊: Charlevoix-Saguenay型常染色体劣性痙性失調症1家系の臨床的・遺伝学的検討. 第44回日本神経学会総会. 2003年5月15日, 横浜.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症モデルマウスにおける  
脳萎縮の病態解明

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 坂井健二, 豊島靖子, 高橋 均 同上  
佐藤俊哉 同 動物資源開発支援研究部門  
辻 省次 東京大学大学院医学系研究科 神経内科

研究要旨 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) における脳萎縮の病態機序を解明するために, DRPLA トランスジェニックマウス (Q129 マウス) を用いて細胞計測学的検討を行った. Q129 マウスでは明らかな神経細胞脱落は認められなかったが, 中枢神経系が進行性に萎縮した. 神経細胞の胞体, 樹状突起, 軸索およびシナプスで優位な萎縮が認められ, スパイン数も優位に減少していた. しかし, 樹状突起の分枝数では明らかな差はなかった. DRPLA における萎縮脳には個々の神経細胞の萎縮が密接に関連している.

A. 研究目的

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) の臨床像は発症年齢に応じて多彩であり, 痙攣, ミオクロームス, 失調, 痴呆が種々の組み合わせで現れる. 他方, 病理組織変化は症例間で比較的均一であり, 神経細胞脱落が歯状核赤核系, 淡蒼球ルイ体系にほぼ限局する. このような選択性にもかかわらず中枢神経系は全体的に小さく, 従来「小造り脳」と表現されてきた. しかし, その現象が進行性の脳萎縮であるのか, 発達異常であるのかといった病態機序は不明であった. 本年度は DRPLA モデルマウスを対象に, 神経細胞の計測学的解析を行った.

B. 対象と方法

129 の CAG リピートを持つ DRPLA トランスジェニックマウス (Q129 マウス, 14-15 週齢) を研究対象とした.

1. 神経細胞の胞体面積, 樹状突起径と数, スパイン数の解析

アンモン角レベルの大脳皮質でゴルジ染色標本を作製し, 運動または感覚野第 5 層の錐体細胞を計測した. 樹状突起の径は apical dendrite を対象に, 起始部から 50  $\mu\text{m}$  遠位部の直径を計測. 分枝数は basal dendrite を対象に, 起始部より 20-60  $\mu\text{m}$  の領域にある分枝数を計測. スパイン数は basal dendrite を対象に, 起始部から 20-60  $\mu\text{m}$  の領域に存在する個数を数えた.

2. 軸索径, presynapse 面積, postsynaptic density (PSD) 長の解析

アンモン角レベルの大脳皮質運動野 2-3 層のシナプスと延髄錐体路の軸索を対象に, 電子顕微鏡写真を撮影し評価した.

(倫理面への配慮)

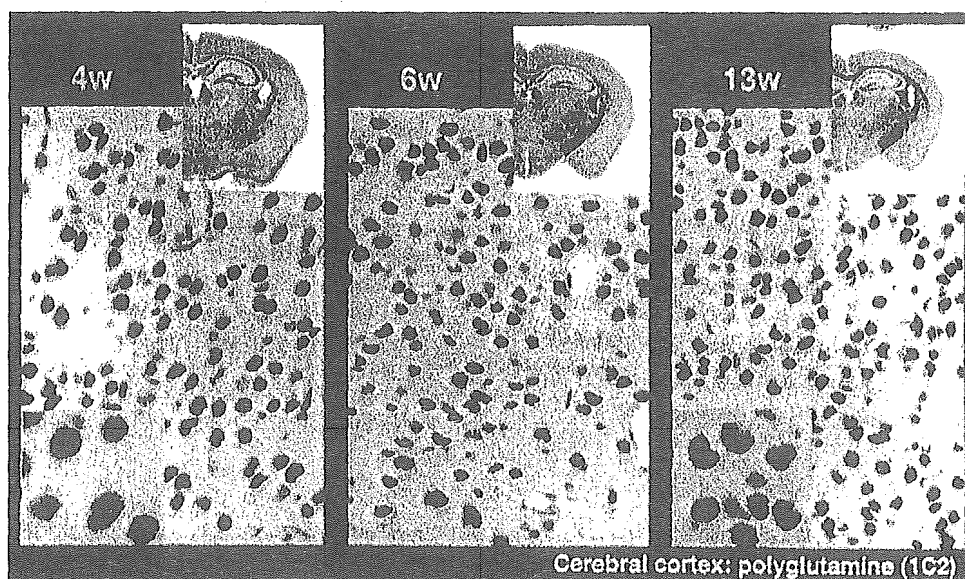
動物実験は「新潟大学動物実験規則ならびに指針」に基づいて行った.

### C. 結果

Q129 マウスは若年型 DRPLA に類似の表現型を呈し、生後 16 週までに痙攣重積状態となり全例が死亡した。生後 4 週齢までは正常対照と差のない脳重増加を示したが、それ以降脳は進行性の萎縮を呈し、14 週齢には脳重は正常対照の約 80%、大脳断面の面積は約 70%となった(図)。組織学的には神経細胞脱落は認められず、脳実質の neuropil の狭小化に伴い、神経細胞の密

度の増加を認めた。伸長ポリグルタミン鎖を含む変異タンパク質の蓄積は中枢神経系の広範な領域に認められ、9 週齢以後では核内封入体の形成も認められた。細胞計測学的検討の結果を表に示す。Q129 マウスでは正常対照と比較して胞体、樹状突起、軸索およびシナプスで優位な萎縮を認め、スパイン数も優位に減少していたが、樹状突起の分枝数では優位差は認められなかった。

図



表

	DRPLA	Non-TG	P value
胞体面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	175.8 (81.3%)	216.3	<0.0001
樹状突起径 ( $\mu\text{m}$ )	2.28 (77.2%)	2.95	<0.001
スパイン数	16.7 (58%)	28.8	<0.001
軸索径 (nm)	690 (92.1%)	749	<0.0001
presynapse 面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	0.366 (84.5%)	0.433	<0.0001
PSD 長 (nm)	258.3 (88.2%)	292.6	<0.0001
樹状突起分枝数	23.3 (103%)	22.5	0.9475

### D. 考察

DRPLA マウスでは脳が進行性に萎縮することが示されたが、中枢神経系のどの領域においても神経細胞の脱落は認められず、進行性の萎縮は、個々の神経細胞の萎縮によるものと考えられた。また、樹状突起の分枝数の減少はなく、個々の神経細胞で、

それぞれの細胞成分が均衡を保って萎縮していると推察された。従って DRPLA における「小造り」脳の本態も同様な個々の神経細胞レベルでの萎縮であると思われる。今回のシナプスにおける電子顕微鏡的検討では presynapse におけるシナプス小胞の径が DRPLA マウスでは小さくなっている

印象が得られた。神経細胞の萎縮が細胞内小器官レベルでの萎縮に起因している可能性があり、今後は超微形態レベルでの解析を行う必要がある。

DRPLA マウスでは4週齢まではほぼ正常な中枢神経系の発育を示すが、変異タンパク質の蓄積は既に広範囲に認められる。しかし、神経細胞の脱落は最終的にも認められない。このことから、伸長ポリグルタミン鎖を持つ異常蛋白が徐々に蓄積し、蓄積に伴い細胞レベルで機能異常を来し、最終的に神経細胞死に至るとの進行過程が推測される。これは、神経細胞にある程度の凝集体が蓄積しなければ細胞の機能異常や細胞死は生じないということを示している。DRPLAの原因遺伝子である atrophin-1 蛋白の機能については現在不明であるが、ポリグルタミンの凝集体によりアポトーシスの誘導が起こる、ミトコンドリア毒性が生じる、遺伝子の転写が阻害されるといった報告がなされている。今後、変異タンパク質の蓄積によるどのような機序が細胞レベルでの萎縮と関連しているかを解明することが必要であるが、変異タンパク質の蓄積後に機能異常や神経細胞死が生じているということは、変異タンパク質が蓄積したとしてもそれを分解するなどしてある一定量以上に蓄積しないようにコントロールできれば DRPLA の発症を予防したり、症状を軽減したりできる可能性を示すものである。

今回の検討ではシナプスの場である樹状突起のスパインの著明な減少が認められた。スパインの減少はハンチントン病やそのモデルマウスで報告されているが、DRPLA で減少していたとの報告はない。スパインが減少する原因はわかっていないが、痙攣発作においてスパインが減少しているとの報告があり、DRPLA モデルマウスにて生じる全身痙攣がスパインの減少に影響を及ぼしている可能性は高い。ただし、スパインの減少は神経細胞の機能異常を形態学的に示すものであり、DRPLA モデルマウスでの検討では、形態学的な変化が正常対象の80%程度の減少にとどまっているのに対

して、58%と著明に減少していた。これは DRPLA モデルマウスでは形態的な異常より早期に機能的な異常が生じることを明確に示している。

結論として、DRPLA モデルマウスでは変異タンパク質の蓄積に伴い神経細胞が機能異常を来して、最終的に萎縮することが判明した。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamada M, Tan C-F, Inenaga C, Tsuji S, Takahashi H. Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 30: 665-675, 2004.
- 2) 山田光則. 神経変性疾患における細胞死の意義. *Dementia Japan* 18:1-11, 2004
- 3) 山田光則、高橋 均. 遺伝性脊髄小脳変性症：病理学的再評価. *神経研究の進歩* 48:377-384, 2004

### 2. 学会発表

- 1) 山田光則、譚 春鳳、稲永親憲、他. ポリグルタミン病におけるリソゾーム蛋白分解系の病態解析. 第45回日本神経病理学会、前橋、2004
- 2) 山田光則. 遺伝性脊髄小脳変性症：遺伝子異常が示唆する真の病理とは？ 第93回日本病理学会総会 ワークショップ8 神経変性疾患の解析と診断の醍醐味. 札幌、2004



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

RNAi 法を用いたポリグルタミン病治療

分担研究者 金澤 一郎 国立精神・神経センター総長

研究要旨

ポリグルタミン病の一つであるハンチントン病に関し、RNAi 法による治療をモデル動物で確立した。ハンチントン病原因遺伝子 CAG リピート部分の 5'側近傍領域に設定した siRNA はハンチントン病原因遺伝子発現を特異的に抑制し、生直後に同 siRNA を投与された個体は臨床症状の進行が対照に比べ軽減した。病理学的にも原因遺伝子産物の凝集形成が抑制され、RNAi 法を用いたポリグルタミン病治療は有望な治療手段であることが示唆された。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症にはポリグルタミン病が多く、その根本的治療の開発が求められている。我々は RNAi 法を用いたポリグルタミン病治療の臨床応用を目指し、培養細胞ならびに疾患モデル動物を用いて効果的な siRNA の開発とその効果の検証を行うことにした。今年度はポリグルタミン病の一つであるハンチントン病の原因遺伝子ハンチンチンに対する検討を加えた。

B. 方法

ハンチンチン遺伝子の CAG リピート部分およびその 5'側近傍領域、さらには 5'非翻訳領域にある mRNA の特異配列を標的に、各配列に相同な二重鎖干渉 RNA (siRNA) を合成した。それぞれの siRNA を用いて、72 回の CAG リピートを含むハンチンチン遺伝子エクソン 1 部分と GFP の融合蛋白質を一過性に発現する COS 細胞、SH-SY5Y 細胞でハンチンチン遺伝子発現の knock down 効果を検討した。もっとも効果のあった siRNA (siHd1) をハンチントン病モデルマウス R6/2 脳内に注入し、ハンチントン遺

伝子の発現抑制と病態の改善程度を検討した。各 siRNA (200 ng) は細胞実験の場合は Lipofectamine 2000 を用いた transfection で、個体実験の場合は Lipofectamine 2000 あるいは ExGen 500 と混合し生後 2 日齢のマウス脳内に直接注入した。脳内への注入はプレグマより外側 1 mm、後方 1 mm、深さ 2 mm で片側に総量 5 マイクロリットルで行った。(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

3 種類の siRNA のうち、CAG リピートを標的にした siRNA はハンチンチン+GFP 融合タンパク質の発現を抑制したが、ハンチンチン遺伝子を含まない GFP 発現も非特異的に抑制した。5'非翻訳領域に設定した siRNA は効果を認めなかった。CAG リピート上流を標的にした siHd1 はハンチンチン+GFP 融合タンパク

質の発現を濃度依存性に抑制した。また siHd1 はハンチンチン遺伝子を含まない GFP 発現には影響を与えなかった。siHd1 を投与した個体はコントロール siRNA を投与した対照群と比べ体重減少が少なく生存期間は有意に延長した。尾吊り下げ試験、rotor rod 試験およびオープンフィールド試験においても行動障害の程度は対照に比べ改善を認めた。線条体におけるハンチンチン mRNA レベルの抑制効果は約 2 週間まで確認できた。他方、蛋白レベルではハンチンチン凝集に対する抑制効果は 8 週齢まで確認された。病理学的には線条体でのハンチンチン陽性あるいはユビキチン陽性の核内封入体の出現が減少した。

#### D. 考察

CAG リピート領域に設定した siRNA は期待に反し非特異的抑制効果を示した。この結果はポリグルタミン病全般に有効な siRNA の作製については更なる工夫が必要であることを示唆する。また、ハンチンチン遺伝子に特異的な siRNA のうち siHd1 が細胞レベルだけでなく個体においても有効であったことから、siRNA を用いた RNAi 法はハンチントン病治療の有効なツールであると考えられる。

#### E. 結論

RNAi 法を用いたハンチントン病治療を動物レベルで開発・確立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hoshino M, Tagawa K, Okuda T, Murata M, Oyanagi K, Arai N, Mizutani T, Kanazawa I, Wanker EE, Okazawa H. Histone deacetylase activity is retained in primary neurons expressing mutant huntingtin protein. *J Neurochem.* 2003 Oct;87(1):257-67.
- 2) Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciak C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, Tsuji S, van der Kooy D. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate

to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev.* 2004 Aug 1;18(15):1806-11.

- 3) Hazeki N, Kanazawa I. Solubilization of aggregates formed by expanded polyglutamine tract expression in cultured cells. *Methods in Molecular Biology* 277:129-137, 2004

##### 2. 学会発表

- 1) Liu W, Wang Y, Wada E, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Rescue of the HD model mouse by siRNA technology: Silencing the huntingtin expression in vitro and in vivo. The Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, Oct 24, 2004
- 2) Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I. Randomized, double-blind study of zonisamide with placebo in advanced Parkinson's disease. 8<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (Rome, Italy) June 14 - 17, 2004
- 3) 星野将隆, 田川一彦, 奥田智博, 植田弘子, 村田美穂, 小柳清光, 新井信隆, 水谷俊雄, 金澤一郎, Wanker E.E, 岡澤 均: ハンチントン病におけるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)変化の検討. 第 45 回日本神経学会総会・高輪 2004 年 5 月 12 - 14 日
- 4) 田川一彦, 星野将隆, 奥田智博, 村田美穂, 金澤一郎, Eric Wanker, 岡澤 均: 変異型ハンチンチン(mhtt)による Hsp70 の小脳神経細胞に特異的な発現誘導. 第 45 回日本神経学会総会・高輪 2004 年 5 月 12 - 14 日

#### 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

## 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）の機能変化によって、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 蛋白質は酸化によって、その ATPase 活性の低下が引き起こされることが判明した。従来、パーキンソン病を代表として、神経変性疾患に酸化ストレスが関与する可能性が提唱されて久しい。実際、ポリグルタミンの発現によっても酸化ストレスが生じていることを示唆するデータも得られた。神経変性疾患の発症に VCP 酸化による ATPase 活性の低下がどの程度関与するのかを調べるため、今後モデルマウス等をもちいた解析を行っていく予定である。

### 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

これまでの研究で、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ーグ 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、その詳細な分子解析を行った。

#### C.D. 研究結果と考察

パーキンソン病などの神経変性疾患の発症に酸化ストレスが関与することが古くから提唱されている。我々がこれまでに樹立したテトラサイクリンを培地から除くとポリグルタミン (Q79) を誘導発現させることができる PC12 細胞において、ポリグルタミンの発現によって活性酸素種(ROS)が生じる可能性を ROS 感受性色素 CM-H2DCFDA を用いて解析した。その結果、ポリグルタミンの発現誘導後、CM-H2DCFDA シグナルの亢進した細胞集団が有意に増加することが FACS を用いた解析で明らかになった。また、このとき、ポリグルタミンの凝集部位と一致して CM-H2DCFDA シグナルが生じていることが蛍光顕微鏡で観察された。

上述のように神経変性疾患の発症に酸化ストレスが関与する可能性が提唱されて久しいが、酸化の標的となる鍵分子が同定されていないためにこの可能性は実験的に検証されていない。我々は、いろいろな神経変性疾患の発症に深く関与していると想定している VCP が、これまで長らく探索されてきた神経変性疾患と酸化ストレスをつなぐ鍵分子であると考え、VCP の ATPase 活性が酸化ストレスによって影響を受けるか否かを検討した。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ジアミドなどの酸化剤によって VCP の ATPase 活性が速やかに低下することを見出した。また、この活性の低下は DTT 処理で回復した。

次にこのような酸化により修飾を受ける VCP 内のアミノ酸を同定するため、酸化処理をしたリコンビナント VCP をトリプシンで分解後、

そのペプチド断片に対して LC/MS を用いた質量解析を行った。VCP 蛋白質には 12 個のシステイン残基が存在するが、そのうちの 3 つのシステインが明らかな酸化修飾を受けることが判明した (それぞれ Cys69, Cys77, Cys522)。次に、それらのシステインを酸化修飾を受けないアミノ酸に置換したレコンビナントを作成した。未処理の状態では、個々の変異体の ATPase 活性には差が見られ無かったが、酸化処理に対して、Cys522 をスレオニンに変えた変異体のみが ATPase 活性の低下をほとんど引き起こさなかった。この Cys522 は多細胞生物の VCP で高度に保存されているが、酵母などの単細胞生物では保存されていない。実際、出芽酵母の VCP(Cdc48)は、ほ乳動物の VCP に比べて、酸化処理に対して抵抗性であった。以上の結果は、多細胞生物の VCP 蛋白質は酸化・還元によって ATPase 活性の調節を受けていることを示唆している。

#### 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、酸化・還元によって ATPase 活性が調節されていることが判明した。一方、従来より、パーキンソン病などの神経変性疾患の発症に酸化ストレスの関与が示唆されている。今回、我々のデータを含め、ポリグルタミンなどの異常蛋白質の蓄積によって、活性酸素種(ROS)が作り出されるという報告があり、異常蛋白質の産出が ROS を作り出すことによって、VCP 蛋白質を酸化し、ATPase 活性の低下が引き起こされる可能性が生じてきた。我々は、酸化に感受性を示す Cys522 を Thr に置換すると酸化による ATPase 活性の失活を受けにくくなることを明らかにしている。現在、