

可溶性、活性などを検討した。本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、広島大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

SCA 患者群は正常コントロール群に比し有意に SCA8 において large な ( $85 \leq \text{CTA/CTG} < 400$ ) リピートが多かった ( $\chi^2=10.963$ ,  $p=0.0009$ ). large なリピートをもつ SCA 患者のうちわけは、SCA1,2 などの既知の原因遺伝子によらない遺伝性 SCA が最も多く、次いで SCA6、孤発性 SCA と続いた。また、large なリピートをホモで認めるのは SCA 患者のみであった。一方、正常コントロール群と PD または AD 患者群でリピートの分布に有意な差は認めなかった。

SCA6 は、“1-A-G-C”、“5-A-G-C”、“9-A-G-C”の3つの主要ハプロタイプが同定され、“1-A-G-C”、“5-A-G-C”は全国的に、“9-A-G-C”は中国関西地方に高い集積が認められた。

SCA14 において、SCA 孤発例から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。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徴とした若年発症例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。変異  $\gamma$ PKC-GFP は、主に細胞質内に斑点状に凝集体を形成し活性を有さず、一方細胞質内の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：SCA8 CTA/CTG リピートの large な伸長は SCA 患者群で有意に高く小脳性運動失調の発症に関与していると考えられる。large なリピートをホモでもつのは SCA 患者群のみであることもそのことを示唆する。

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。

### C. 結論

SCA8 CTA/CTG リピートの SCA 発症への関与が確認された。SCA6 には、3つの主要ハプロタイプが存在し、その一つが西日本における頻度の高さに関係している。新規 SCA14 家系を同定した。変異  $\gamma$ PKC は、凝集しやすいことが神経細胞死と関係している可能性がある。

### 研究発表

1. Maruyama H, Izumi Y, Morino H, Oda M, Toji H, Nakamura S, Kawakami H. Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: A study of 1,286 Japanese patients. *AM J Med Genet.* 2002 114:578-583
  2. Nishimura M, Kawakami H, Komure O, Maruyama H, Morino H, Izumi Y, Nakamura S, Kaji R, Kuno S. Contribution of the interleukin-1beta gene polymorphism in multiple system atrophy. *Mov Disord.* 2002 Jul;17(4):808-11.
  3. Izumi Y, Maruyama H, Oda M, Morino H, Okada T, Ito H, Sasaki I, Tanaka H, Komure O, Udaka F, Nakamura S, Kawakami H. SCA 8 repeat expansion - large CTA/CTG repeat alleles are more common in ataxic patients, including those with SCA6. *Am J Hum Genet* 2003 Mar;72(3):704-9.
  4. 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.

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

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

G. 知的所有権の取得状況

なし。

## 長野県における常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症の実態調査

分担研究者 吉田邦広 信州大学医学部附属病院 遺伝子診療部<sup>1)</sup> 副部長

共同研究者 清水雄策<sup>2)</sup>、岡野友美<sup>3)</sup>、大原慎司<sup>4)</sup>、橋本隆男<sup>3)</sup>、堺 温哉<sup>5)</sup>、  
福嶋義光<sup>1)</sup>、松本直通<sup>5)</sup>、池田修一<sup>3)</sup>

<sup>2)</sup> 伊那中央病院神経内科、<sup>3)</sup> 信州大学医学部第三内科、

<sup>4)</sup> 中信松本病院神経内科、<sup>5)</sup> 横浜市立大学大学院環境分子医科学、

研究要旨：長野県の常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症(ADCA)の疾患頻度を検討した。長野県出身の 86 家系の検討では SCA6(16 家系、19%)が最も多く、次いで DRPLA(9 家系、10%)であったが、全国的に多いとされる SCA3/MJD は少なかった(3 家系、3%)。また SCA1、SCA2、SCA3/MJD、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17、DRPLA のいずれにも該当しない原因遺伝子未同定の ADCA が 55 家系(65%)を占め、全国的な平均に比べ高頻度であった。この未同定家系のうち比較的高齢発症の純粋小脳型と考えられる 36 家系を用いて、第 16 番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性皮質性萎縮症(16q-ADCCA)のハプロタイプ解析を行ったところ、既報の創始者ハプロタイプに完全に一致する家系は見出せなかった。長野県には原因遺伝子未同定の ADCA 家系が多数集積する可能性が示唆された。次にこれらの未同定 ADCA 家系の成因解明を目的として連鎖解析を始めた。長野県南部の伊那地域出身の 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。長野県に集積する原因遺伝子未同定の ADCA については、16q-ADCCA との異同を含めて、その成因を解明していくことが今後の課題である。

### A. 研究目的

常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症(ADCA)は遺伝的異質性の高い疾患群であり、その疾患頻度には地域差があることが指摘されている。長野県は山岳県であり、遺伝性疾患が集積しやすい地形的特性を有すると思われる。本研究ではまず長野県における ADCA の疾患頻度を明らかにし、次いで原因遺伝子未同定家系における成因を解明することを目的とした。

### B. 研究方法

対象は長野県出身でかつ 2 世代以上にわたって複数の家系内罹患者が確認できた

ADCA86 家系である。末梢血白血球からゲノム DNA を抽出し、SCA1、SCA2、SCA3/MJD、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17、DRPLA に対する遺伝子解析を行い、当該原因遺伝子の CAG リピート数を算出した。

これら既知の病型が否定された 55 家系のうち臨床的に緩徐進行性の純粋小脳型と考えられる 36 家系につき、各家系から 1 名ずつ抽出して既報に従って 16q-ADCCA 患者に共通する創始者アレルの有無を検討した。解析には 16q22.1 に局在する 7 つの DNA マーカー(TTCC01、GATA01、TTTA001、CTTT01、D16S496、D16S3067、GT01)を用いた。

さらに 16q-ADCCA の創始者ハプロタイ

ブに合致しない家系の中から長野県南部の伊那地域出身のADCA家系3家系を抽出し、原因遺伝子座の同定に向けた連鎖解析を始めた。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。方法は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、ABI 3100を用いてPCR産物の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「臨床的遺伝子診断」および「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。遺伝子診断および連鎖解析研究にあたっては、患者および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。特に連鎖解析研究については、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、個人情報保護には十分に配慮した。

### C. 研究結果

2003年10月の時点で長野県内で集計された脊髄小脳変性症の臨床調査個人表は491名分であった。県の人口を約220万人とすると長野県全体の脊髄小脳変性症の頻度は10万人あたり約22人となり、これは全国的な平均の2倍程度と推定された。中でも木曾(10万人あたり58人)、佐久(同35人)、伊那(同32人)などの比較的限局した地域ではより高い頻度であった。

ADCA86家系のうち遺伝子検査により診断が確定したのは31家系(35%)であった。その内訳はSCA6が16家系(19%)と最も多く、次いでDRPLA(9家系、10%)、SCA3/MJD(3家系、3%)、SCA1(2家系、2%)、SCA2(1家系、1%)の順であった。また上記8疾患の

いずれもが否定された原因遺伝子未同定家系は55家系(65%)であった。未同定家系の頻度は地域差があり、上記の木曾(14/15家系、93%)、佐久(13/14家系、93%)および伊那(10/13家系、77%)の高頻度地域で高い傾向が見られた。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し、緩徐に進行する純粋小脳型であった。

なお家族歴が明らかでない孤発の26名について検索したところ2名がSCA6、1名がSCA3/MJDであることが確認されたが、他の23名については上記のいずれもが否定された。

16q-ADCCAの創始者ハプロタイプを検索した36家系のうち、検索した7つのマーカーすべてに関して、16q-ADCCA患者に共通して見られる創始者アレルを有する患者は見出せなかった。

伊那地域の1家系を対象とした連鎖解析では、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

国内の他地域比較して、長野県のADCAの特徴としては、1)SCA3/MJDの頻度が相対的に低いこと、2)原因遺伝子未同定のADCAの頻度が高いこと、が上げられる。脊髄小脳変性症のうち約40%が遺伝性でその大半が常染色体優性遺伝性とする、長野県にはおよそ100-150家系のADCA家系が存在する。したがって今回検討した86家系は全体の過半数を占めるものと推察され、およその疾患傾向は反映していると考えられる。

原因遺伝子未同定家系は全国的には10-40%台とされるが、今回の検討では65%に及んでおり、このことは長野県のきわだった特徴と考える。特に木曾、佐久、伊那など比較的限局した地域に集積する傾向が見られることは注目すべきと思われる。これらの家系の中で今回検索した7つのマーカー

一に関して 16q-ADCCA の創始者ハプロタイプに矛盾せず、16q-ADCCA が強く示唆される家系は見られなかった。ただ佐久地域の家系が比較的創始者アレルを保有する頻度が高いのに比し、伊那地域の家系ではその頻度が低い傾向が見られた。現時点では未同定家系の一部が 16q-ADCCA である可能性は否定できないが、新たな ADCA 病型が特定の地域に集積している可能性がある。そこで上記 3 地域のうち伊那地域出身の患者家系から協力を得て連鎖解析を行なった。

結果的に解析した 1 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。次に配偶者を含めた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 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囲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

長野県の ADCA の疾患頻度としては、SCA6 が最頻であるが、たかだか全体の 19% を占めるに過ぎない。一方、原因遺伝子未同定の ADCA は 65%を占め、全国的な平均に比べて高頻度である。これらの未同定家系は県内の比較的限局した地域に集積する傾向がある。長野県には新たな ADCA 病型が集積することは確実であり、今後、16q-ADCCA との異同を含めて、その成因解明が課題である。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表  
論文発表

Hashimoto T, Sasaki O, Yoshida K, Takei Y, Ikeda S. Periodic alternating nystagmus and rebound nystagmus in spinocerebellar ataxia 6. *Mov Disord* 18: 1201-1204, 2003.

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

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 (Autosomal 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 ARSACS 1 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ARSACS 4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、末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出し、SACS遺伝子PCR産物の直接シーケンシングおよび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。



## ポリグルタミン病の神経細胞変性に関する病態機序の解明

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 稲永親憲、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  
小野寺理 同 生命科学リソース研究センター  
藤田信也 長岡赤十字病院 神経内科  
森田昌宏 医療法人楽山会三島病院 精神科  
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ならびに Machado-Joseph 病の神経細胞では、伸長ポリグルタミン (PolyQ) 鎖の抗原性がリソゾーム内にも存在し、この病態が神経細胞核の病変とほぼ同程度の頻度で生じていることを明らかにした。ポリグルタミン病では PolyQ 鎖を含む変異蛋白質が、神経細胞核に加え、胞体内でもリソゾーム分解系に影響を及ぼしていることが示唆され、こうした病態の進行が神経細胞の機能異常を引き起こしている可能性がある。DRPLA トランスジェニックマウス (Q129 マウス) を用いた細胞計測学的検討では、神経細胞の胞体、樹状突起、軸索およびシナプスが萎縮し、スパインの減少も観察された。ポリグルタミン病では神経細胞死以前に神経細胞の萎縮が生じている。

### A. 研究目的

ポリグルタミン病では伸長ポリグルタミン (PolyQ) 鎖の神経細胞核内への蓄積が神経細胞変性の共通要因と考えられている。他方、我々は PolyQ 鎖の抗原性を有する顆粒状構造物が、神経細胞の胞体内にも多数存在することを報告してきた。この構造物は歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) を含む複数のポリグルタミン病に共通して認められ、ユビキチン免疫染色では認め難い。平成 14 年度ではこの顆粒状構造物の実態を明らかにするため、伸長 PolyQ 鎖の免疫電顕組織化学的解析法を確立し、その超微形態像を解析するとともに、核における伸長 PolyQ 鎖蓄積との関連を検索した。

また、剖検例の検索から脊髄小脳失調症 17 型 (SCA17) の homozygote 例を見出したことから、平成 15 年度にはその症例の PolyQ 鎖関連病理所見を明らかにし、既報の heterozygote 例との比較検討から、gene dosage effect の影響、loss of function の可能性等に関して解析した。

DRPLA を含む複数のポリグルタミン病では、選択的な神経細胞脱落にも関わらず脳全体が小さく、「小造り脳」と表現されてきた。近年の画像解析から、これが進行性の脳萎縮である可能性が指摘されてきている。平成 16 年度には、その細胞形態学的基盤を明らかにするため、DRPLA トランスジェニック (TG) マウスにおける神経細胞の計測学的解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 平成 14 年度

DRPLA 剖検例 3 例 (79 歳、Q59; 62 歳、Q59; 56 歳、Q65)、Machado-Joseph 病 (MJD) 剖

検例 1 例 (70 歳、Q74)、および対照例 3 例 (83 歳; 78 歳; 58 歳) の橋核を観察対象とした。伸長 PolyQ 鎖の蓄積に関する光顕観察には橋のパラフィン切片を用い、1C2 抗体 (1:16000) で免疫染色した。電顕観察にはホルマリン固定された橋底部を対象に、通常電顕観察と電顕免疫組織化学を隣接組織で対比しつつ行った。後者の解析には組織を 60 分間振盪下に室温でギ酸処理し、30 分間のメタノール処理後、リン酸緩衝食塩液で洗浄、LR White resin に包埋した。Resin 包埋ブロックから橋核神経細胞を含む領域の超薄切片を作成し、immunogold 法で免疫染色後、電顕観察した。

(倫理面への配慮)

本研究で対象とした剖検例は全例、病理解剖・組織保管・病理学的検索に関する同意書を得ている。また、研究遂行上、剖検例の個人情報が必要とせず、各個人情報は保護される。

#### 2. 平成 15 年度

死亡時 49 歳男性。両親いとこ婚、父は 50 歳代に痴呆症状出現、63 歳で死亡。母は 73 歳で自殺。38 歳頃、しゃべりにくいことを自覚。43 歳、HDS-R 12/30、眼球運動は saccadic だが眼振なし。軽度の体幹失調あり。下肢痙性。前頭葉徴候陽性。常にそわそわと動き、口をとがらせるような不随意運動あり。MRI では側脳室の拡大と頭頂葉の軽度萎縮あり。47 歳頃より人格の崩壊が顕著となる。48 歳、けいれん発作が出現。看護、介助に対する拒否が著しい。徐々に感情失禁や見当識障害出現。両足をあげてボタンとおろす粗大な不随意運動が出現。49 歳、活動性、意識レベルの低下が進行し死亡。全経

過約 10 年。臨床診断「分類困難な若年性痴呆症」。

神経系はホルマリン固定パラフィン切片による病理解析を進めるとともに、1C2 抗体による免疫組織化学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で対象とした剖検例は、病理解剖・組織保管・病理学的検索ならびに遺伝子検索に関する同意書を得ている。また、研究遂行上、個人情報保護は保護される。

### 3. 平成 16 年度

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

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。

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. 研究結果

### 1. 平成 14 年度

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

あった。

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

核病変との対比：DRPLA では胞体内顆粒は核病変と同一の広範な領域に認められ、PolyQ 鎖長依存性にその頻度が増加した。Juvenile type 例では、歯状核赤核系、淡蒼球ルイ体系、下オリーブ核が 60% 以上の高頻度を呈し、さらに動眼神経核、橋核は juvenile type、late adult type に共通して高頻度の領域となった。胞体内顆粒の出現頻度は多くの領域で核病変よりやや低い傾向を示した。

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

### 2. 平成 15 年度

脳重 1,055g。肉眼的に大脳は軽度に萎縮し、尾状核の萎縮と側脳室の拡大が認められた。小脳は軽度に萎縮。歯状核がやや細く、茶褐色調を呈していた。組織学的検索では、大脳皮質深層で軽度の神経細胞脱落とグリオーシスを認めた。大脳基底核では、尾状核、被殻で小型および大型神経細胞の中程度脱落とグリオーシスを認めた。小脳 Purkinje 細胞は中程度脱落し、Bergmann gliosis を伴っていた。脳幹では、黒質、下オリーブ核、網様体の細胞が軽度に脱落していた。1C2 抗体による免疫組織化学では、非常に多数の神経細胞の核がびまん性の陽性像を示した。その分布は、中枢神経系に広範にひろがり、大脳皮質深層、線条体で最も高頻度に認めた。1C2 陽性核内封入体は線条体、大脳皮質深層、中脳網様体においてごく少数認められた。神経細胞の胞体には 1C2 陽性の構造物はなく、一般内臓器にも陽性核は認められなかった。

家族の同意を得て遺伝子検索をした結果、本症例は TBP gene の CAG/CAA リピート (正常 29~42) が、48 のホモ接合であることが判明した。既報の SCA17 heterozygote 21 症例の臨床所見をまとめ本症例と比較し、発症年齢と TBP gene の CAG/CAA リピート数の相関を調べた。SCA17 heterozygote の polyQ 鎖の長さとは発症年齢は一定の傾向はあるものの有意な相関はみられなかった ( $r=0.228$ )。また本例の発症年齢は polyQ 鎖の長さから期待される範囲内にあった。

### 3. 平成 16 年度

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。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。

表

	Tg	Non-Tg	P value
胞体面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	175.8	216.3	<0.0001
樹状突起径 ( $\mu\text{m}$ )	2.28	2.95	<0.001
スパイン数	16.7	28.8	<0.001
軸索径 (nm)	690	749	<0.0001
シナプス面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	0.366	0.433	<0.0001
PSD 長 (nm)	258.3	292.6	<0.0001
樹状突起分枝数	23.3	22.5	0.9475

## D. 考察

### 1. 平成 14 年度

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

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

### 2. 平成 15 年度

本例は急速に進行する痙攣と chorea を主症状とし小脳症状は軽度で、臨床的には Huntington 病類似の症例であった。MJD や DRPLA では、

homozygote は heterozygote に比べて発症年齢が低下し、より重症の表現形をとることが知られているが、本症例はこれまで報告された heterozygote 例と比較して発症年齢の若年化、症状の重症化などの、gene dosage effect は明らかではなかった。病理組織学的所見では、heterozygote 例に比べ、脳幹に神経細胞脱落が広がっていたが、大脳を含めいずれの部位でも脱落程度は特に強調されていなかった。しかしながら、より広範な神経細胞の核内に polyQ の蓄積を認め、大脳皮質、線条体に特に高頻度に認められたことから、痙攣、不随意運動などの臨床症状に対応していることが示唆された。

また、本例の臨床症状、病理組織所見のパターンは heterozygote と大きな差は認められず、一般内臓器にも有意な所見がなかったことから、TBP の loss of function の可能性は低いと思われた。こうした現象が本疾患の特徴であるのか、SCA17 症例の蓄積が望まれる。

### 3. 平成 16 年度

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、超微形態レベルでの解析を行う必要がある。

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 では未報告である。スパインの減少が、痙攣発作による二次的現象か、あるいは伸長 PolyQ 鎖の蓄積に関連した現象であるのか、今後の検討課題である。

## E. 結論

ポリグルタミン病の伸長 PolyQ 鎖に関わる病変の一つとして、神経細胞核におけるびまん性蓄積が重要である。この病態は従来確立された変性部位を越えて広範囲に生じており、各疾患の本質的な病変分布を表している可能性が高い。他方、伸長 PolyQ 鎖を含む変異蛋白質の分解には、ユビキチン系に加えリソゾーム系も関与していることが示唆された。こうした神経細胞における核と細胞体両者における病態の進行が、

神経細胞の機能異常を引き起こし、細胞萎縮に結び対している可能性が考慮される。リソソーム系の関与は複数のポリグルタミン病に共通して広範囲の神経細胞に内在しており、治療法開発の一方となる可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

山田光則、高橋 均. ポリグルタミン病の神経病理. *脳と神経* 55: 921-931, 2003

山田光則、高橋 均. ポリグルタミン病の病理 - 大脳皮質における diffuse nuclear staining (1C2). *Cognition and Dementia* 2: 23-27, 2003

Toyoshima Y, Yamada M, Onodera O. et al. SCA 17 homozygote showing Huntington's disease-like phenotype. *Annals of Neurology* 55:281-286, 2004

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

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

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

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

山田 光則、辻 省次、高橋 均  
歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症における伸長ポ

リグルタミン鎖はリソソームで分解される  
第 43 回日本神経病理学会、東京、2002

豊島靖子、山田光則、稲永親憲、他.  
Spinocerebellar ataxia 17 の homozygote 例.  
第 44 回日本神経病理学会、名古屋、2003

山田光則、譚 春鳳、高橋 均.  
CAG リピート病神経細胞における伸長ポリグルタミン鎖のリソソーム内蓄積. 第 44 回日本神経病理学会、名古屋、2003

山田光則、稲永親憲、佐藤俊哉、他.  
CAG リピート病における細胞核内蓄積変異蛋白質は分解可能か. 第 44 回日本神経病理学会、名古屋、2003

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ソーム蛋白質分解系の病態解析. 第 45 回日本神経病理学会、前橋、2004

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

## 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克服に向けた治療法開発を試み、RNAi 法を用いた原因遺伝子発現抑制が病態の進行防止に極めて有効であることをハンチントン病モデルマウスで確認した。ハンチントン病原因遺伝子に特異的な 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、病理学的にも原因遺伝子産物の凝集形成が抑制された。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。また、小脳変性の発症にシヌクレイン、シヌクレインが早期から関与している可能性を示し、さらにプルキニエ細胞に特異的な新規遺伝子の同定を行った。

### 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、特に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。

また、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。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。

さらに、プルキニエ細胞の脱落を主病変に持つ小脳変性モデルマウス、pcd マウス、の網羅的遺伝子発現解析を行い、プルキニエ細胞の病態に関連する遺伝子を探索した。

### B. 方法

1) 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。

2) 雄 gad 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シヌクレインの一次抗体、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。

3) pcd マウスならびに正常マウスの小脳からそれぞれ RNA を精製し Affimetrix 社製マイクロアレーにより、約 6 千個の完全長遺伝子ならびに約 2 万 4 千個の EST 由来の遺伝子を含む合計約 3 万個の遺伝子の発現変化を解析した。その結果、pcd マウスで発現が低下している EST 由来の遺伝子配列を同定し、その全長 cDNA を RACE 法ならびに PCR 法によって分子クローニングした。また in situ ハイブリダイゼーション法により脳における発現局在を解析し、さらに発現ベクターを作製して各種細胞内オルガネラマーカールによる蛍光抗体染色によって細胞内分子機能の解析を行った。(倫理面への配慮)

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

### C. 結果

1) 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。

2) 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。

3) DNA マイクロアレー解析から pcd マウスにおいて顕著に発現が低下している EST 由来の cDNA 配列を同定することが出来た。この EST cDNA クローンをプローブとして用いて in situ ハイブリダイゼーション法により小脳における遺伝子発現パターンを調べたところ、プルキニエ細胞で特異的に発現していることが明らかとなった。次に RACE 法で全長 cDNA を分子クローニングしたところ、この遺伝子は GEF (guanine nucleotide exchanging factor) ファミリー分子である Trio の新規スプライシング産物をコードしていることが明らかとなった。さらに発現ベクターを作製し種々の細胞内小器官マーカールを用いて解析を行ったところ、細胞内の初期エンドソームにおいて特異的な局在を示す事が明らかとなった。一方、各ドメインの欠失変異体の発現ベクターを作製して解析を行ったところ GEF ドメインを介して初期エンドソームの凝集を促進していることが明らか

かになった。

#### 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、ハンチント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。

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が早期から蓄積したことから gad マウスの病態機序におけるベータおよびガンマシヌクレインの重要性が示唆される。とりわけ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、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。

pcd マウスの解析から得られた新規 Trio スプライシング産物はプルキニエ細胞において初期エンドソームの動態制御に関与する分子であることが示唆された。

#### E. 結論

- 1) 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。
- 2) 後索症状の病態機序におけるガンマシヌクレインの関与を示した。
- 3) プルキニエ細胞特異的新規遺伝子を同定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kanazawa I. Molecular pathology of dentatorubral-pallidoluyasian atrophy. in *Glutamine Repeats and*

*Neurodegenerative Diseases\* Molecular Aspects*, edited by Harper P & Perutz M, pp.249-260, Oxford University Press Inc, New York 2001

2) Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, Toyoda A, Ishii K, Jeong SY, Hashida H, Masuda N, Ogata K, Kasai F, Hirai M, Maciel P, Roulean GA, Sakaki Y, Kanazawa I. The Genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Gnet* 46:413-422, 2001

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

4) Kanazawa I. How do neurons die in neurodegenerative diseases? *TRENDS in Molecular Medicine* 7(8):339-344, 2001

5) Hashida H, Goto J, Suzuki T, Jeong SY, Masuda N, Ooie T, Tachiiri Y, Tsuchiya H, Kanazawa I. Single cell analysis of CAG repeat in brains of dentatorubral-pallidoluyasian atrophy (DRPLA). *J Neurol Sci*, 190:78-93, 2001

6) Fukutake T, Shinotoh H, Nishino H, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Hattori T. Homozygous Machado-Joseph disease presenting as REM sleep behaviour disorder and prominent psychiatric symptoms. *European Journal of Neurology*, 9:97-100, 2002

7) Tachikawa M, Nagai Y, Nakamura K, Kobayashi K, Fujiwara T, Hye-Jung Han, Nakabayashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Nakamura Y, Toda T. Identification of CAG repeat-containing genes expressed in human brain as candidate genes for autosomal dominant spinocerebellar ataxias and other neurodegenerative disease. *Journal of Human Genetics* 47:275-278, 2002

- 8)Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I. Chemical chaperones Reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiology of Disease* 10:88-99,2002
- 9)Hazeki N, Tukamoto T, Yazawa I, Koyama M, Hattori S, Someki I, Iwatsubo T, Nakamura K, Goto J, Kanazawa I. Ultrastructure of nuclear aggregates formed by expressing an expanded polyglutamine. *Bio Biophys Res Com* 294:429-440,2002
- 10)Okazawa H, Rich T, Chang A, Lin X, Waragai M, Kajikawa M, Enokido Y, Komuro A, Kato S, Shibata M, Hatanaka H, Mouradian M, Sudol M, Kanazawa I. Intracellular interaction between Mutant Ataxin-1 and PQBP-1 Affects Transcription and Cell Death. *Neuron* 34:701-713,2002
- 11)Okada T, Gondo Y, Goto J, Kanazawa I, Hadano S, Ikeda J. Unstable transmission of the RS447 human megasatellite tandem repetitive sequence that contains the USP17 deubiquitinating enzyme gene. *Hum Genet* 110:302-313,2002
- 12) Takahashi Y, Takata T, Hoshino M, Sakurai M, Kanazawa I. Benefit of IVIG for long-standing ataxic sensory neuronopathy with Sjogren's syndrome. *Neurology* 60:503-505,2003
- 13)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
- 14)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
- 15)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
- 16)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
- 17)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
- 18)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
- 19)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
- 20)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
- 21)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
- 22)Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. GalNAc-GD1a in human peripheral nerve.



Neurology.61:465-470,2003

23)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 SerB.79:293-298,2003

24)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

1) Liu W, Goto J, Murata M, Kanazawa I. Toward the Use of siRNA Interference (RNAi) as a Potential Therapeutic Tool for Huntington's Disease: siRNA targeting the Huntingtin exon 1 efficiently suppressed the exogenous huntingtin expression. Biennial Meeting on Huntington's Disease (Cambridge, Massachusetts) August 9 - 11, 2002

2)Murata M, Horiuchi E, Tsuji S, Kanazawa I. Long-term clinical effects of zonisamide; A new drug for Parkinson's disease. 6<sup>th</sup> International Conference AD/PD 2003 (Seville, Spain) May 8 - 12, 2003

3)Horiuchi E, Takahashi Y, Kanazawa I, Murata M. The action mechanism of Zonisamide; A new drug for Parkinson's disease. 6<sup>th</sup> International Conference AD/PD 2003 (Seville, Spain) May 8 - 12, 2003.

4)Murata M, Horiuchi E, Tsuji S, Kanazawa I. Zonisamide- A new drug for Parkinson's disease Long-term clinical effects. 55<sup>th</sup> Annual Meeting, American Academy of Neurology (Honolulu, Hawaii) March 29 - April 5, 2003

5)Goto J, Liu W, Murata M, Nemoto N, Kanazawa I. Suppression of Huntingtin Gene Expression by siRNA: A Possible Therapeutic Tool for Huntington's

Disease. 55<sup>th</sup> Annual Meeting, American Academy of Neurology (Honolulu, Hawaii) March 29 - April 2, 2003

6)Murata M, Horiuchi E, Takahashi Y, Kanazawa I. Zonisamide increase dopamine synthesis by inducing TH mRNA. 7<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (Miami) November 10-14, 2003

7) 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 34<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, Oct 24, 2004

8)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

9)村田美穂,堀内恵美子,金澤一郎:ゾニサミドの作用機序に基づく新規抗パーキンソン病薬の探索. 第43回日本神経学会総会・札幌 2002年5月29-31日

10)堀内恵美子,村田美穂,高橋祐二,辻省次,金澤一郎: zonisamide(ZNS)の抗パーキンソン作用の発現機序(2).第43回日本神経学会総会・札幌 2002年5月29-31日

11)村田美穂,堀内恵美子,辻省次,金澤一郎: Zonisamideのパーキンソン病に対する長期効果. 第44回日本神経学会総会・横浜 2003年5月15-17日

12)後藤順,劉万兆,村田美穂,根本直人,金澤一郎: siRNAによるハンチンチン遺伝子発現の抑制. 第44回日本神経学会総会・横浜 2003年5月15-17日

13)堀内恵美子,村田美穂,高橋祐二,辻省次,金澤一郎: Zonisamideの抗パーキンソン作用の発現機序(3). 第44回日本神経学会総会・横浜 2003年5月15-17日

14) 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

15)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

#### G. 知的所有権取得状況

##### 1. 特許取得

特許出願番号: 2003-136477

発明の名称:ハンチントン病遺伝子の発現抑制

発明者:金澤一郎他5名

特許出願人:科学技術振興事業団

出願年月日:平成15年5月15日

##### 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。これまでの実験で、VCP が神経変性疾患において重要な役割を果たすことを示す多くの実験結果を得た。すなわち、VCP 蛋白質はポリグルタミンの凝集体や Lewy 小体などの神経変性疾患に認められる異常蛋白質と共局在を示すこと、VCP の ATPase 活性の低下は ER ストレと ER の異常な膨潤による空胞形成及び細胞死を誘導すること、VCP は酸化によりその ATPase 活性を失活すること、VCP は、酸化以外にリン酸化やアセチル化といった蛋白質修飾を受けること、リン酸化やアセチル化によって VCP の ATPase 活性が変化すること、ポリグルタミンの発現によって特異的に VCP の蛋白質修飾が起きること、を見いだした。

### A. 研究目的

我々は、これまでに神経難病 Machado-Joseph 病(MJD)の原因遺伝子を同定し、この疾患が、球脊髄性筋萎縮症やハンチントン舞踏病と同じく、原因遺伝子内の CAG の繰り返し配列の異常な伸長によって引き起こされることを明らかにした。これらの原因遺伝子は、それぞれがコードする蛋白質は全く異なっていたが、原因遺伝子内の CAG の繰り返しが共通にポリグルタミンリピートに翻訳される。我々はこのことに着目し、伸長したポリグルタミンリピートを培養細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥るを見いだし、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

VCP が、ポリグルタミンの凝集体と共局在することが、ポリグルタミンを発現させたト

ランスジェニックラットやハンチントン病患者の脳切片においてみいだされた。さらに、孤発性 Parkinson 病や dementia with Lewy body の Lewy body との共局在や診断不明で亡くなった患者さんのニューロン内のユビキチン陽性凝集物や ALS のモデル動物である SOD1 マウスに認められる SOD1 の凝集物との共局在が確認され、VCP は、種々の変性蛋白質を神経細胞内で認識・結合していることが判明した。

VCP の 2 つ目の ATP 結合領域の変異体 (K524A: 524 番目のリジンをアラニンに変えたもの) を一過性トランスフェクション法で発現させると、細胞質に巨大な空胞を形成した後、細胞が caspase 阻害剤では抑制できない細胞死に陥ることを見出した。この時、ER ストレスが生じていた。

VCP は酸化ストレスに暴露されると 2 つ目の ATP 結合領域内の 522 番目のシステインが酸化を受け、その ATPase 活性が低下する  $k$  とを明らかにした。

精製 VCP に対してトリプシン分解後、質量解析を行った結果、VCP 内の複数のアミノ酸がリン酸化もしくはアセチル化を受けることを明らかにした。

リン酸化もしくはアセチル化を受けるセリン、スレオニン、スレオニンをリン酸化を模倣するアミノ酸 (グルタミン酸、アスパラギン酸) に、また、アセチル化を受けるリジンをアセチル化されないアルギニン等に置き換えたリコンビナント VCP を作成し、その ATPase 活性を野生型 VCP と比較した。その結果、VCP の ATPase 活性がリン酸化もしくはアセチル化によって制御されることが示唆された。

ポリグルタミンを発現させた培養細胞から VCP を回収し、質量解析を行った結果、上記以外のリン酸化やアセチル化を同定することができた。

## 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・リン酸化・アセチル化等の蛋白質修飾によって ATPase 活性が調節されていることが判明した。例え

ば、ポリグルタミンなどの異常蛋白質の蓄積によって、VCP 蛋白質の修飾化状態が変化し、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 蛋白質の修飾の実態を解明し、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・アセチル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) Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y., Fujikake, N., Matsukage, A., & Kakizuka, A. Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegenerations in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 9: 264-273, 2002.
- 2) Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., & Kakizuka, A. Unequal crossing-over in unique PABP2 Mutations: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Archives Neurology* 59: 474-477, 2002.
- 3) Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., & Ichijo, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Dev.* 16:1345-1355, 2002.
- 4) Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., & Fujita, T. Circumvention of chaperone requirement for aggregate formation of a short polyglutamine tract by the co-expression of a long polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 277:37536-37541, 2002.
- 5) Kobayashi, T., Tanaka, K., Inoue, K. & Kakizuka, A. Functional ATPase activity of p97/VCP is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally