

- differentiated mammalian PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277: 47358-47365, 2002.
- 6) Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A. & Okamoto, K. Vacuole-creating protein in neurodegenerative diseases. *Neurosci. Lett.* 343:77-80. 2003.
 - 7) Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., & Kakizuka, A. PGC-1/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.
 - 8) Kimura, Y., & Kakizuka, A. Polyglutamine diseases and molecular chaperones. *IUBMB Life* 55:337-345, 2003.
 - 9) Kobayashi, T., & Kakizuka, A. Molecular analyses of Machado-Joseph disease. *Cytogenet. Genome Res.* 100: 261-275, 2003.
 - 10) 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.* 7:737-746, 2004.
 - 11) 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.* 23:659-669, 2004.
 - 12) 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-RAR_α chimeric gene. *Leukemia Res.* 9:959-967, 2004
 - 13) Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A., & Fujita, T. The role of pre-existing aggregates in Hsp104-dependent polyglutamine aggregate formation and epigenetic change of yeast prions. *Genes Cells* 8:685-696, 2004.
 - 14) Goti, D., Katzen S.M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haiem, L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kakizuka, A., Sharp, A. H., Ross, C. A., Mouton, P. R., & Colmer V. A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brain of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J. Neuroscience* 24:10266-10279, 2004.
 - 15) Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., Sobue, G. Physical and functional interaction between dorfin and valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J. Biol. Chem.* 279:51376-852004, 2004.
- G. 知的所有権の取得状況
特になし

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ゲノム機能 助手

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を獲得して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 鎖選択的結合ペプチド QBP1 が *in vitro* および培養細胞において異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成・細胞死を抑制することを明らかにした。本研究ではこれらの難治性疾患に対する治療法の確立をめざして研究を行なった。PolyQ 病モデルショウジョウバエに QBP1 を共発現させたところ、PolyQ 封入体形成、複眼変性、寿命短縮を著明に改善し、*in vivo* での神経変性抑制効果を示した。また QBP1 に細胞膜透過性シグナルを付加した PTD-QBP1 は培養細胞、マウス脳室周囲の細胞に高効率で導入され、PolyQ 病培養細胞モデルでの PolyQ 封入体形成、細胞死、ショウジョウバエモデルでの寿命短縮、マウスモデルでの PolyQ 封入体形成を抑制した。一方、異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造解析では、Pro 残基挿入により PolyQ 鎖二次構造が破壊され、凝集体形成・細胞毒性が減少したことから、細胞毒性に対する PolyQ 鎖二次構造の重要性を示した。そして異常伸長 PolyQ 蛋白質が経時的に β シートへの病的コンフォメーション変移を経てアミロイド様線維状凝集体を形成することを明らかにした。さらに β シートへ変移した可溶性中間体が細胞毒性を発揮し、QBP1 は β シートへのコンフォメーション変移を阻害することによりアミロイド線維様凝集体形成を阻害することを見出した。一方、治療法確立へ向けたもう一つのアプローチとして、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行ない、66 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。本研究は現時点で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ある。主に中年以降に発症し、神経変性は徐々に進行するが、現時点で有効な治療法の乏しい神経難病であり、厚生労働省の特定疾患に指定されている。我が国では約 2 万人の患者がいると推定されており、早期の治療法開発が望まれている。

脊髄小脳変性症の原因は長らく不明であったが、我が国で約 3 分の 1 を占める遺伝性脊髄小脳変性症については、我が国や諸外国の研究者たちによって大部分の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 鎖が β シートへの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な蛋白質間相互作用を獲得して神経変性を引き起こすと考えられている。我々はこれらの難治性疾患の治療法開発という視点から、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。これまでの研究でファージディスプレイ法を用いてランダムペプチドライブラリーのスクリーニングを行ない、異常伸長 PolyQ 鎖選択的結合ペプチド、QBP1（Polyglutamine Binding Peptide 1）を同定した。さらに QBP1 が *in vitro* および培養細胞の系で異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成を阻害し、細胞死を抑制することを明らかにしてきた（J.

Biol. Chem. 275: 10437, 2000)。

本研究ではこれらの難治性疾患に対する治療法確立をめざして、①PolyQ 病ショウジョウバエモデルを用いて QBP1 の *in vivo* での神経変性抑制効果を明らかにすること、②QBP1 に細胞膜透過性シグナル (PTD) を付加した PTD-QBP1 を用いて PolyQ 病モデル動物に対する分子治療法を確立すること、③異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常と細胞毒性との関連を解明し、細胞毒性を発揮する構造異性体を特定して治療標的を明らかにすること、④治療法確立へ向けたもう一つのアプローチとして、生体への投与がより容易な低分子化合物で QBP1 と同様の PolyQ 凝集阻害活性を持つものをハイスループットスクリーニングにより検索・同定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) PolyQ 病モデルショウジョウバエでの QBP1 共発現による治療効果の検討

QBP1 と CFP との融合蛋白質 QBP1-CFP を発現するトランスジェニックショウジョウバエ QBP1 Fly を作成し、PolyQ 病モデルショウジョウバエ Q92 Fly あるいは MJDtr-Q78 Fly との遺伝学的交配を行った。複眼での発現実験では複眼特異的プロモーター *eyeless* により QBP1-CFP を Q92 より先行させて発現し、複眼変性を実体顕微鏡観察により評価した。また 3 齢幼虫の複眼原基の免疫染色により Q92 封入体を評価した。神経系での発現実験では神経系特異的プロモーター *elav* により MJDtr-Q78 と QBP1-CFP を共発現させ、生存曲線から寿命短縮を評価した。

(2) PTD-QBP1 投与による PolyQ 病モデル動物に対する治療効果の検討

QBP1 に細胞膜透過性シグナル (PTD) を付加したペプチド PTD-QBP1 を合成し、COS-7 細胞の培養液中に添加して、PTD-QBP1 の細胞内導入効率を免疫染色にて検討した。また COS-7 細胞に PolyQ-GFP を発現させて、PTD-QBP1 による PolyQ-GFP 封入体形成・細胞死に対する抑制効果を蛍光顕微鏡にて検討した。次に PTD-QBP1 を PolyQ 病モデルショウジョウバエ Q92 Fly あるいは MJDtr-Q78 Fly

に経口投与して、複眼変性・寿命短縮に対する抑制効果を評価した。次にマウスでの実験では、野生型マウス脳室内に PTD-QBP1 を注射後、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封入体に対する抑制効果を評価した。

(3) 異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常の解明、毒性構造体の特定と QBP1 結合による影響の検討

まず PolyQ 鎖構造と凝集体形成・細胞毒性の関連を明らかにするために、PolyQ 鎖に Pro 残基を挿入することにより二次構造を破壊して凝集体形成・細胞毒性への影響を検討した。PolyQ 鎖あるいは様々な数の Pro が挿入された QPQ 鎖を持つ Thioredoxin-PolyQ/QPQ (Thio-PolyQ/QPQ) 融合蛋白質を大腸菌で発現・精製して、円偏光二色性分散 (CD) にて二次構造を評価した。凝集体形成については濁度測定法にて評価した。また Thio-PolyQ 凝集体の構造についてフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) と電子顕微鏡 (EM)・原子間力顕微鏡 (AFM) 観察により検討した。また COS-7 細胞に PolyQ/QPQ-GFP を発現させて、蛍光顕微鏡にて封入体形成・細胞死を評価した。さらに細胞毒性を発揮する PolyQ 蛋白質構造異性体を特定するために、Thio-Q62 の様々な構造異性体をマイクロインジェクションにより COS-7 細胞内に導入して、細胞毒性を評価した。

(4) PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニング

Thio-Q62 凝集体形成の濁度測定法を用いて、種々のアミロイド結合化合物に加えて 24,000 個の化合物からなる大規模な低分子化合物ライブラリーから 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行った。すなわち Thio-Q62 蛋白質 (8 μ M) と候補化合物 (10-20 μ M) を自動分注ロボットにて 384 プレートに分注して 37°C でインキュベーションし、プレートリーダーにて経時的に濁度を測定し凝集体形成を評価した。その結果、有意な凝集阻害活性を示す化合物を選択した。

(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) PolyQ 病モデルショウジョウバエでの QBP1 共発現による治療効果の検討

複眼での発現実験において Q92 と QBP1-CFP とを共発現する Q92/QBP1 Fly では、対照の Q92 Fly あるいは Q92/SCR Fly に比し、複眼変性の明らかな軽減を認めた。複眼原基の免疫染色では Q92/SCR Fly に比し Q92/QBP1 Fly において Q92 封入体形成の著明な抑制が明らかになった。また神経系での発現実験において QBP1-CFP と MJDtr-Q78 とを共発現する MJDtr-Q78/QBP1 Fly では寿命中央値 52 日と、対照の MJDtr-Q78/SCR Fly の寿命中央値 5.5 日に比べ、著明な寿命延長を認めた。

(2) PTD-QBP1 投与による PolyQ 病モデル動物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 の封入体形成・細胞死を有意に抑制した。次に PolyQ 病モデルショウジョウバエ Q92 Fly あるいは MJDtr-Q78 Fly に対しては、PTD-QBP1 投与により明らかな複眼変性抑制は認めなかったが、寿命短縮を有意に改善した。次に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。さらに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封入体形成が著明に抑制されることを明らかにした。

(3) 異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常の解明、毒性構造体の特定と QBP1 結合による影響の検討

PolyQ 鎖への Pro 残基挿入による二次構造と凝集体形成・細胞毒性の関連性の検討では、CD により Thio-QPQ では Pro 数依存的に二次構造が破壊されることを示した。また Thio-QPQ の凝集体形成も挿入 Pro 数依存的に遅延した。COS-7 細胞での QPQ-GFP 発現実験ではやはり

Pro 数依存的に封入体形成・細胞毒性は減少した。

一方、Thio-PolyQ の CD 測定の結果、溶液状態では PolyQ 鎖長依存的に α ヘリックスの増大を認めた。しかし異常伸長鎖を持つ Thio-PolyQ は経時的に α ヘリックスから β シート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、FT-IR でも凝集体での β シート含有率の増大を示した。EM・AFM では Thio-PolyQ はアミロイド様の線維状凝集体を形成することを見い出した。さらに QBP1 は β シートへのコンフォメーション変移を阻害することによりアミロイド線維様凝集体形成を阻害することを見い出した。

また、Thio-Q62 構造異性体の COS-7 細胞へのマイクロインジェクション実験では、 α ヘリックス優位なモノマーでは Thio-Q19 と同様に有意な細胞毒性を示さなかったが、可溶性 β シート中間体およびアミロイド線維様凝集体ではいずれも細胞毒性を発揮することを見い出した。

(4) PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニング

種々のアミロイド結合化合物のスクリーニングの結果、30 種類以上の PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。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・寿命短縮も有意に抑制することを示した。一方、大規模な低分子化合物ライブラリー (24,000 個) のハイスループットスクリーニングを行ない、66 種類の新規の PolyQ 凝集阻害化合物と 80 種類以上の凝集遅延化合物を同定した。

D. 考察

本研究では現時点で有効な治療法の乏しい PolyQ 病に対する治療法開発をめざして、我々が同定した異常伸長 PolyQ 鎖選択的結合ペプチド QBP1 の *in vivo* での神経変性抑制効果について、PolyQ 病ショウジョウバエモデルを用いてその有効性を示した。これらのことから QBP1 は PolyQ 病に対する新しい治療分子候補と考えられる。しかし QBP1 は 11 アミノ酸のペプチドであり細胞内移行効率が低いと考えられるため、細胞膜透過性シグナル (PTD) を付加したペプチド PTD-QBP1 を作成し、その治療効果

を検討した。その結果、PolyQ 病培養細胞モデル、ショウジョウバエモデルにおいて PTD-QBP1 の高効率での細胞内移行を示し、治療効果を明らかにした。このことから PTD-QBP1 は PolyQ 病に対する有力な新しい治療分子候補として期待される。さらに PolyQ 病マウスモデルにおいても PolyQ 封入体形成の抑制を認めたが、ペプチドの浸透範囲が狭く、運動障害などの表現型の改善には至っていない。今後は PTD-QBP1 の PolyQ 病モデルマウス腹腔内への長期投与を検討すると共に、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療による PTD-QBP1 の広範囲での長期間発現も検討し、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、異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常を解明して毒性構造体を特定すること、さらに QBP1 の結合による PolyQ 凝集・神経変性抑制の分子機構を解明して治療標的を明らかにすることを試みた。Pro 残基挿入により PolyQ 鎖の二次構造を破壊したところ、凝集体形成・細胞毒性が減少したことから細胞毒性に対する PolyQ 鎖二次構造の重要性を示した。そして異常伸長 PolyQ 蛋白質は β シートへの病的コンフォメーション変移を経てアミロイド線維様凝集体を形成することを明らかにし、さらにこの可溶性 β シート中間体が PolyQ 細胞毒性を発揮する構造体であることを見出した。一方、QBP1 の PolyQ 神経変性抑制の作用点として、 β シートへの病的コンフォメーション変移を阻害することよりアミロイド線維様凝集体形成を阻害することを明らかにしたが、この結果と合致している。すなわち、PolyQ 病の治療標的としては異常伸長 PolyQ 蛋白質の β シートへ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。

しかし、前述のように PTD-QBP1 による分子治療法では、生体内への治療分子の浸透などの未解決な問題が残されている。そこで我々は、PolyQ 病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 凝集阻害活性を持つ低分子化合物のスクリーニングを行なった。これまでに候補化合物としてアミロイド結合化合物のスクリーニングを行ない、同定した PolyQ 凝集阻害化合物が *in*

vivo での治療効果を発揮することを PolyQ 病モデルショウジョウバエを用いて示し、このアプローチが有望であると考えられた。引き続き大規模な低分子化合物ライブラリー（24,000 個）からのハイスループットスクリーニングを行ない、66 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。今後、これらの化合物が治療標的である異常伸長 PolyQ 蛋白質の β シートへの病的コンフォメーション変移を阻害することを確認し、培養細胞モデル、さらには PolyQ 病モデルショウジョウバエを用いて、*in vivo* での神経変性抑制効果を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

- (1) 異常伸長 PolyQ 鎖選択的結合ペプチド QBP1 は PolyQ 病モデルショウジョウバエの PolyQ 封入体形成、複眼変性、寿命短縮を改善し、*in vivo* での治療効果を発揮する。
- (2) PTD-QBP1 は PolyQ 病培養細胞モデル、ショウジョウバエモデル、マウスモデルにおいて高効率で細胞内に導入され、PolyQ 封入体形成、細胞死、寿命短縮を抑制する。
- (3) Pro 残基挿入による PolyQ 鎖二次構造破壊によって凝集体形成・細胞毒性が減少したことから、細胞毒性に対して PolyQ 鎖二次構造が重要である。
- (4) 異常伸長 PolyQ 鎖は溶液状態では α ヘリックス構造を取り得るが経時的に β シートへのコンフォメーション変移を経てアミロイド様線維状凝集体を形成する。
- (5) 異常伸長 PolyQ 蛋白質は β シートへの病的コンフォメーション変移を生じることで細胞毒性を獲得する。
- (6) QBP1 は異常伸長 PolyQ 蛋白質の β シートへのコンフォメーション変移を阻害することによりアミロイド線維様凝集体形成を阻害する。
- (7) 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により同定した PolyQ 凝集阻害化合物は、PolyQ 病治療薬のリード化合物となる可能性がある。
- (8) 本研究は現時点で有効な治療法のない PolyQ 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) M. Tachikawa, Y. Nagai, K. Nakamura, K. Kobayashi, T. Fujiwara, H.-J. Han, Y. Nakabayashi, Y. Ichikawa, J. Goto, I. Kanazawa, Y. Nakamura, T. Toda

Identification of CAG repeat-containing genes expressed in human brain as candidate genes for autosomal dominant spinocerebellar ataxias and other neurodegenerative diseases.

J. Hum. Genet. 47, 275-278 (2002)

2) T. Azuma, T. Uemichi, M. Funauchi, Y. Nagai, T. Matsubara

Ambulatory blood pressure monitoring in patients with spinocerebellar degeneration.

Acta Neurol. Scand. 106, 213-217 (2002)

3) 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)

4) H.A. Popiel, Y. Nagai (equally contributed), O. Onodera, T. Inui, N. Fujikake, Y. Urade, W.J. Strittmatter, J.R. Burke, A. Ichikawa, T. Toda

Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 317, 1200-1206 (2004)

5) S. Kariya, M. Hirano, Y. Nagai, Y. Furiya, N. Fujikake, T. Toda, S. Ueno

Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches.

J. Mol. Neurosci. (in press)

6) Y. Nagai, T. Inui, H.A. Popiel, N. Fujikake, K. Hasegawa, Y. Urade, Y. Goto, N. Naiki, T. Toda

The soluble monomeric polyglutamine protein gains cytotoxicity through a conformational transition to a β -sheet-rich structure.

(in submission)

7) N. Fujikake, Y. Nagai, H.A. Popiel, H. Kano, M. Yamaguchi, T. Toda

Alternative splicing of *Drosophila* heat shock transcription factor regulates its transcriptional activity in response to heat/cold stress.

(in submission)

8) 永井義隆

神経変性疾患におけるオートファジーの意義－異常蛋白質分解機構としてのオートファジーとオートファジー性神経細胞死

医学のあゆみ 200, 305-308 (2002)

9) 永井義隆、小林千浩、戸田達史

神経系疾患の遺伝子学

最新医学 57, 2142-2157 (2002)

10) 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)

11) 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)

12) 戸田達史、永井義隆

難治性神経疾患

Molecular Medicine 41, 314-321 (2004)

2. 学会発表

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

Polyglutamine Binding Peptide 1 (QBP1) inhibits polyglutamine aggregation and cytotoxicity *in vitro* and in *Drosophila* polyglutamine disease models.

The Hereditary Disease Foundation Meeting (Aug, 2002, Cambridge, MA, USA)

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

Toward establishment of a molecular therapy for polyglutamine diseases; Polyglutamine Binding Peptide 1 (QBP1) inhibits polyglutamine aggregation and cytotoxicity *in vitro* and in *Drosophila* disease models.

The 15th Naito Conference (Oct, 2002, Kanagawa, Japan)

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

Polyglutamine Binding Peptide 1 (QBP1) inhibits polyglutamine aggregation and

rescues neurological phenotypes in *Drosophila* polyglutamine disease models.
52nd Annual Meeting of American Society of Human Genetics (Oct, 2002, Baltimore, MD, USA)

4) 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. (Oral)

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

5) Y. Nagai, T. Inui, H.A. Popiel, N. Fujikake, K. Hasegawa, Y. Goto, H. Naiki, T. Toda

The peptide inhibitor QBP1 inhibits the toxic conformational transition of the polyglutamine protein and amyloid-like fibril formation. (Oral)

2004 FASEB Summer Research Conference: Protein misfolding, amyloid and conformational disease (June, 2004, Snowmass Village, Colorado)

6) Y. Nagai, H.A. Popiel, N. Fujikake, H. Matsushima, T. Toda

A turbidimetric high-throughput screening assay for small chemicals that inhibit polyglutamine aggregation *in vitro*. (Invited)

The Hereditary Disease Foundation Meeting HD2004 (Aug, 2004, Cambridge, MA, USA)

7) Y. Nagai

A molecular therapy for the polyglutamine diseases using the peptide inhibitor QBP1. (Invited)

Massachusetts General Hospital Neuroscience seminar (August 16, 2004, Cambridge, MA, USA)

8) Y. Nagai

Molecular pathogenesis and therapeutic targets of the polyglutamine diseases. (Invited)

1st Italian-Japanese Workshop on Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies (December, 2004, Pavia, Italy)

9) 永井義隆、ポピエルヘレナ明子、Julia Rahadian、James R. Burke、Warren J. Strittmatter、藤掛伸宏、東山浩之、山口政光、戸田達史

Polyglutamine Binding Peptide 1 によるポリグルタミン凝集阻害と神経細胞死救済

第43回日本神経学会総会 (H14. 5、北海道)

10) 永井義隆、藤掛伸宏、ポピエルヘレナ明子、大野勝人、山口政光、Warren J. Strittmatter、James R. Burke、戸田達史

ポリグルタミン病の分子治療の試み—ショウジョウバエモデルを用いたペプチド QBP1 によるポリグルタミン凝集体阻害と神経細胞死救済(ワークショップ)

第25回日本分子生物学会 (H14. 12、横浜)

11) 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44回日本神経学会総会 (H15. 5、横浜)

12) 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(ワークショップ)

第3回日本蛋白質科学会 (H15. 6、札幌)

13) 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(奨励賞シンポジウム)

第46回日本神経化学会 (H15. 9、新潟)

14) 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 (シンポジウム)

第76回日本生化学会 (H15. 10、横浜)

15) 永井義隆、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、戸田達史

膜透過性阻害ペプチド PTD-QBP1 によるポリグルタミン病マウスの分子治療

第45回日本神経学会総会 (H16. 5、東京)

16) 永井義隆、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、乾 隆、内木宏延、戸田達史

ポリグルタミン蛋白質の構造異常・凝集体形成を標的とするポリグルタミン病の治療戦略(シンポジウム)

第47回日本神経化学会 (H16. 9、大阪)

17) 永井義隆、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、山口政光、乾 隆、内木宏延、戸田達史

阻害ペプチド QBP1 によるポリグルタミン病に対する分子治療法の確立(ワークショップ)

第49回日本人類遺伝学会 (H16. 10、東京)

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

家族性多系統萎縮症の連鎖解析とポリグルタミン病の病態機序の解析

分担研究者 小野寺理 新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター

共同研究者 原 賢寿¹⁾, 高橋俊昭²⁾, 菊池信矢²⁾, 西澤正豊¹⁾, 宮下哲典³⁾, 桑野良三³⁾, 柿田明美⁴⁾,
山田光則⁴⁾, 高橋 均⁴⁾, 若林孝一⁵⁾, 登木口 進⁶⁾, 平澤基之⁷⁾, 水野美邦⁷⁾,
尾方克久⁸⁾, 後藤 順⁹⁾, 辻 省次⁹⁾

所属：1) 新潟大学脳研究所神経内科 2) 新潟大学医学部保健学科 3) 新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター 4) 新潟大学脳研究所神経病理 5) 弘前大学脳神経疾患研究施設神経病理 6) 小千谷総合病院神経内科 7) 順天堂大学脳神経内科 8) 国立精神神経センター武蔵病院神経内科 9) 東京大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨：我々は脊髄小脳変性症の病因を明かとするために、次の二つのアプローチを行った。一つは、孤発性の代表的な疾患である多系統萎縮症(MSA)に対する感受性遺伝子同定の試みである。本疾患の家族内発症3家系を対象に全ゲノム領域の連鎖解析を行った。Parametric 解析では有意な連鎖部位を同定できなかったが、遺伝モデルを必要としない non parametric 解析では1, 2, 4, 5, 7, 11, 13, 16 番染色体上にそれぞれ NPL score >1.0 の領域を認めた。今後、候補領域を絞り込むには更なる家系の集積が必要である。もう一つは遺伝性の代表的疾患であるポリグルタミン病の病態機序の解明を目的とした。神経細胞障害性を持つと考えられる可溶性オリゴマーを可視化することを目的に、FRET による可視化システムの確立を目指した。ポリグルタミン鎖に monomeric CFP (以下 mCFP), monomeric YFP (以下 mYFP) を付加したプラスミドを作成し parallel および anti-parallel 条件下で細胞に導入し、共焦点レーザー顕微鏡を用い解析した。FRET は parallel の組合せのみで起こり、細胞内に一様に観察された。長さ依存性に FRET 陽性細胞の割合の増加と平均 ratio 値の増加を認めた。また経時的観察では、これらの dimer は短時間のうちに凝集体へと移行した。これらの結果からポリグルタミンダイマーは parallel 構造をとり長さ依存性に dimer 形成をきたすことを示した。本手法により凝集体形成前の細胞機能障害と、ポリグルタミンの状態の新たな関係が明らかとされる可能性がある。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症の病態機序を明らかにするために、我々は2つのアプローチで研究を進めた。一つは、孤発性脊髄小脳変性症の代表的な疾患である多系統萎縮症(以下 MSA)の、感受性遺伝子同定に向けたアプローチである(課題 A)。もう一つは、遺伝性脊髄小脳変性症の代表的なものであるポリグルタミン病に対する細胞生物学的なアプローチである。まず、神経細胞障害性を持つとされる、増大ポリグルタミン鎖による可溶性オリゴマーを生細胞内で FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 技術を用いて可視化するシステムを確立することを目的とした(課題 B)。

B. 研究方法

課題 A Gilman の consensus criteria に合致し、遺伝子解析にて SCA1, 2, 3, 6, DRPLA が否定され、かつ MRI 上 MSA を支持する所見(小脳+橋萎縮、橋の十字サイン、被殻後外側の異常信号)を有し、同胞発症者を有する3家系(A, B, C, definite 1名, probable 3名, possible 2名)を対象に、全ゲノム領域の parametric および non-parametric 連鎖解析を行った。Genotyping には全ゲノムを平均 4.6cM 間隔で分布する 811 の microsatellite marker を用いた。Parametric 解析のモデルとしては、両親の血族婚を1家系(A家系)に認めること、累代発症を認めないことから常染色体劣性遺伝のモデルを想定したが、B, C家系では両親の血族婚を認めない点から遺伝子頻度の高い劣性モデルを想

定した。2点解析の計算には LINKAGE program (ver 5.1)の MLINK を、多点解析には Allegro (ver 1.1)を使用した。また今回、Allegro による計算に要するファイルを、Excel の typing data から自動的に生成する program “MakeLink (ver 1.2)”を作成し、計算の効率化、加速化をはかった。

課題 B ポリグルタミン鎖(Q12, Q36, Q56, Q80)のC末もしくはN末に蛍光蛋白(mCFP, mYFP)を付加したコンストラクトを作成し種々の組み合わせで COS7 細胞にて一過性に発現した。48時間後に共焦点レーザー顕微鏡 (CSU10; 横河電気) 及び蛍光顕微鏡(TE-2000U; Nikon)、W-view, AQUACOSMOS 画像解析システム(浜松ホトニクス)を用い、ratio 画像解析、accepter bleaching 法にて解析を行った。mCFP の励起は iFLEX-200 (405nm; POINT SOURCE 社)にて行った。

(倫理面での配慮) 協力していただいた被験者には、DNA の保存と同疾患研究を行うことについ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。また、プライバシーを守るため十分な情報保全を行った。

C. 研究結果

課題 A 2点連鎖解析では5番染色体に2箇所(D5S422, D5S2050)、11番染色体に1箇所(D11S4174)にそれぞれ $LOD > 2.0$ の locus を認めしたが、各 locus の周辺をさらに詳細に解析した結果、多点解析では $LOD < 1.0$ と低下し連鎖の可能性は低いと考えられた。一方、Non-parametric連鎖解析の結果では、1, 2, 4, 5, 7, 11, 13, 16番染色体上にそれぞれ NPL score > 1.0 の領域を認めた。

また、今回構築したハイスループットな解析システムにより、全ゲノム領域の genotyping は約2ヶ月、1家系に要する全ゲノムの LOD 計算は約1日の短時間で可能となった。

課題 B parallel の組み合わせで Q12, Q56 ともに FRET を確認した。一方 anti-parallel の組み合わせでは FRET は認めなかった。確認された FRET は細胞内に一様に広がっており、長さ依存性に FRET 陽性細胞の割合 (Q12-9.5%, Q36-24.2%, Q56-27.2%, Q80-36.7%)の増加と FRET の平均 ratio 値 (Q12-0.77, Q36-0.82, Q56-0.90, Q80-0.91)の増加を認めた。また FRET 陽性細胞群と陰性細胞群では各細胞での ratio 値に

は不連続部分が存在し、二極化していた。FRET 陽性細胞 (Q56)の経時的観察では、細胞内に ratio 値の急増する spot が出現し、5~10分の短時間で凝集体を形成した。この際、細胞質の ratio 値は急激に減少した。

D. E. 考察と結論

課題 A Non-parametric連鎖解析は parametric連鎖解析と比べ、解析のアルゴリズムの違いから、浸透率や遺伝形式などが不明の疾患や多遺伝子疾患の解析が可能であるという大きな利点があるが、一方有意な LOD score を得るには多数の家系を必要とするため、今後この手法により候補領域を絞りこむには類似家系の集積が必須条件である。また、今回多点解析用の program として従来の GENEHUNTER の機能を拡張した Allegro を導入した。多点解析は一般に2点解析に比べ、haplotype を組みながら計算を行うため false positive が少ない利点もあるが、膨大な計算を行うため、計算に時間を要し、かつ解析する遺伝子座の数も制限されていた。しかし、この Allegro の導入により従来の GENEHUNTER の30倍の速さで計算が行え、かつ対象とする遺伝子座も無制限に行えるようになったため、連鎖解析を大幅にハイスループット化することができた。今後の課題としては、臨床的にできるだけ均一な類似家系を集積し、解析を進めていくことが挙げられる。また、本研究は今後、弧発性の MSA を対象とした大規模な association study を効率よく進めるための重要なステップと考えられる。

課題 B 従来、ポリグルタミン鎖のダイマー形成モデルとして、anti-parallel と parallel の二説が報告されていた。しかし、生細胞内での挙動に関してはいずれも示唆するデータは得られていなかった。今回我々は、生細胞内ではポリグルタミン鎖のダイマー形成は parallel 構造をとることを示した。また、このダイマー形成率はポリグルタミン鎖長による長さ依存性を認めた。さらに、FRET ratio 値は陰性群と陽性群で不連続であり、ダイマー形成には閾値が存在して急速に形成する可能性があることが示唆された。今後、このダイマー形成細胞と転写障害等の細胞障害との関連を明らかにしていきたい。

F. 研究発表

【主な学会発表】

原賢寿, 宮下哲典, 桑野良三, 柿田明美, 山田光則, 高橋均, 若林孝一, 登木口進, 平澤基之, 水野美邦, 西澤正豊, 後藤順, 辻省次 : 第44回日本神経学会総会 2003.5.15 横浜

Kenju H, Takao H, Mitsuteru S, Kenshi T, Akinori M, Ryozo K, Akemi K, Hitoshi T, Susumu T, Motoyuki H, Yoshikuni M, Jun G, and Shoji T: Clinical and Genetic Analysis of Familial Multiple System Atrophy. 55th Annual Meeting of the American Academy of Neurology 2003.3.29-4.5, Honolulu, Hawaii

『細胞内でのポリグルタミン鎖の可溶性 dimer 形成の可視化』第27回日本分子生物学会年会, 2004.12.10. 神戸, 講演要旨集 p999

Toshiaki Takahashi, Osamu Onodera, Kenkichi Nozaki, Masatoyo Nishizawa and Shoji Tsuji. Soluble expanded polyglutamine stretches accumulate in nucleus and repress the CRE mediated transcription. The American Society of Cell Biology 43rd Annual Meeting. Dec 13-17. 2003.

【論文発表】

Takahashi T, Nozaki K, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O. Polyglutamine represses cAMP-responsive-element-mediated transcription without aggregate formation. *Neuroreport*. 2005 Feb 28;16(3):295-299.

Date H, Igarashi S, Sano Y, Takahashi T, Takahashi T, Takano H, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O. The FHA domain of aprataxin interacts with the C-terminal region of XRCC1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Dec 24;325(4):1279-85.

Hara K, Onodera O, Endo M, Kondo H, Shiota H, Miki K, Tanimoto N, Kimura T, Nishizawa M. Sacsin-related autosomal recessive ataxia without prominent retinal myelinated fibers in Japan. *Mov Disord*. 2004 Oct 14

Kanazawa M, Shimohata T, Terajima K, Onodera O, Tanaka K, Tsuji S, Okamoto K, Nishizawa M. Quantitative evaluation of brainstem involvement in multiple system

atrophy by diffusion-weighted MR imaging. *J Neurol*. 2004 Sep;251(9):1121-4.

Popiel HA, Nagai Y, Onodera O, Inui T, Fujikake N, Urade Y, Strittmatter WJ, Burke JR, Ichikawa A, Toda T. Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 May 14;317(4):1200-6.

Gueven N, Becherel OJ, Kijas AW, Chen P, Howe O, Rudolph JH, Gatti R, Date H, Onodera O, Taucher-Scholz G, Lavin MF. Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet*. 2004 May 15;13(10):1081-93.

Toyoshima Y, Yamada M, Onodera O, Shimohata M, Inenaga C, Fujita N, Morita M, Tsuji S, Takahashi H. SCA17 homozygote showing Huntington's disease-like phenotype. *Ann Neurol*. 2004 Feb;55(2):281-6.

Sano Y, Date H, Igarashi S, Onodera O, Oyake M, Takahashi T, Hayashi S, Morimatsu M, Takahashi H, Makifuchi T, Fukuhara N, Tsuji S. Aprataxin, the causative protein for EAOH is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann Neurol*. 2004 Feb;55(2):241-9.

Sekijima Y, Hashimoto T, Onodera O, Date H, Okano T, Naito K, Tsuji S, Ikeda S. Severe generalized dystonia as a presentation of a patient with aprataxin gene mutation. *Mov Disord*. 2003 Oct;18(10):1198-200.

Toyoshima I, Sugawara M, Kato K, Wada C, Shimohata T, Koide R, Onodera O, Tsuji S. Time course of polyglutamine aggregate body formation and cell death: enhanced growth in nucleus and an interval for cell death. *J Neurosci Res*. 2002 May 15;68(4):442-8.

Takahashi T, Igarashi S, Kimura T, Hozumi I, Kawachi I, Onodera O, Takano H, Saito M, Tsuji S. Japanese cases of familial hemiplegic migraine with cerebellar ataxia

carrying a T666M mutation in the CACNA1A gene. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002 May;72(5):676-7.

Shimohata T, Sato A, Burke JR, Strittmatter WJ, Tsuji S, Onodera O. Expanded polyglutamine stretches form an 'aggresome'. Neurosci Lett. 2002 May 3;323(3):215-8.

【ポストゲノム時代の神経疾患の分子遺伝学】
感覚神経細胞と Purkinje 細胞に共通する神経変性の原因はあるのか-常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症の解明から学ぶこと 小野寺理 神経研究の進歩 48 巻 5 号 Page751-760(2004.10)

多系統萎縮症と自律神経障害 多系統萎縮症の突然死の病態の解明,および治療法の確立を目指して 下畑享良, 中山秀章, 篠田秀夫, 小野寺理, 西澤正豊 自律神経 41 巻 2 号 Page161-166(2004.04)

【遺伝性脊髄小脳変性症 遺伝子未解明の疾患を中心に】 アプラタキシン P206L ホモ接合体の兄妹例 EAOH の臨床的多様性について 丸田恭子, 園田至人, 小野寺理, 木脇隆史郎, 福永秀敏 神経内科 60 巻 5 号 Page520-528(2004.05)

舞踏運動を呈した症例に対する分子遺伝学的解析 下畑享良, 小野寺理, 本間義章, 廣田紘一, 布村仁一, 木村哲也, 河内泉, 三瓶一弘, 西澤正豊, 辻省次 臨床神経学 44 巻 3 号 Page149-153(2004.03)

【遺伝性脊髄小脳変性症 遺伝子未解明の疾患を中心に】 Hypogonadism を伴う小脳失調症他田正義(新潟大学脳研究所 神経内科), 小野寺理, 藤田信也, 永井博子, 西澤正豊 神経内科 60 巻 5 号 Page512-519(2004.05)

【遺伝性脊髄小脳変性症 遺伝子未解明の疾患を中心に】 常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 小野寺理 神経内科 60 巻 5 号 Page497-505(2004.05)

【遺伝子診断と画像診断】 神経領域における遺伝子診断の現状 脊髄小脳変性症(SCA3, SCA6)を中心に 小野寺理 臨床放射線 48 巻 4 号 Page455-463(2003.04)

【内科キーワード 2003】 神経・筋 ポリグルタミン病の新展開 小野寺理 内科 91 巻 6 号

Page1325(2003.06)

【内科キーワード 2003】 神経・筋 背髄小脳変性症の分類とわが国での頻度 小野寺理 内科 91 巻 6 号 Page1323-1324(2003.06)

【ポリグルタミン病の病態機序】 異常蛋白処理機構とポリグルタミン病 小野寺理 神経研究の進歩 46 巻 5 号 Page669-679(2002.10)

【常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症】 眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳失調症の分子遺伝学 伊達英俊, 小野寺理, 辻省次 神経内科 57 巻 2 号 Page113-118(2002.08)

【常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症】 眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳失調症の臨床 横関明男, 伊達英俊, 小野寺理 神経内科 57 巻 2 号 Page108-112(2002.08)

【常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症】 Friedreich 失調症と常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 小野寺理, 辻省次 神経内科 57 巻 2 号 Page99-107(2002.08)

【精神・神経疾患とゲノム】 常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症(アプラタキシン欠損症)伊達英俊(新潟大学脳研究所), 小野寺理, 辻省次 ゲノム医学(1346-4671)2 巻 3 号 Page241-250(2002.06)

変性疾患 副腎白質ジストロフィー(adrenoleukodystrophy:ALD) 治療法研究の進歩 小野寺理, 辻省次 Annual Review 神経 2002 巻 Page197-208(2002.01)

Spinocerebellar ataxia type 6(SCA6)遺伝子変異を合併したオリブ橋小脳萎縮症の 1 例 細山香織, 下畑享良, 平石哲也, 小野寺理, 辻省次 神経内科 56 巻 1 号 Page63-66(2002.01)

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

多系統萎縮症モデルマウスの作成とその解析

分担研究者 貫名 信行¹⁾

小山文隆¹⁾, 黒沢大¹⁾, 宮崎晴子¹⁾, 長岡詩子¹⁾, 岩田淳^{1,2)}, 丸山美枝子¹⁾, 赤木巧³⁾
端川勉³⁾, 金澤一郎⁴⁾, 辻省次²⁾

- 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 ヒト α -シヌクレインをマウスオリゴデンドロサイトに発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスのオリゴデンドロサイトではヒト α -シヌクレインの発現が認められ、その細胞体内には異常構造物が認められた。蓄積した α -シヌクレインはリン酸化 α -シヌクレイン抗体に反応し界面活性剤に不溶であり、シヌクレイノパチーと同様の異常を確認した。老齢トランスジェニックマウスでは歩幅の減少、探索行動の消失などの運動障害が認められた。このことから我々の作成したマウスは MSA のモデル動物としての可能性を有していると考えられた。また α -シヌクレインの分解酵素として neurosin を同定した。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) は、孤発性疾患のため分子遺伝学的アプローチが困難であったが、MSA に特異的な glial cytoplasmic inclusion (GCI) の構成成分が野生型 α -シヌクレインであることが発見され、 α -シヌクレインが病態解明の糸口となる可能性が出てきた。我々はオリゴデンドロサイトでヒト野生型 α -シヌクレインを発現するトランスジェニックマウスを作成し、MSA のモデルマウスとしての可能性を検討した。また、トランスジェニックマウスを DNA チップ法で解析した。さらに我々はヒト脳、マウス脳を検索中に α -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) ヒト野生型 α -シヌクレインをマウスミエリン塩基性タンパク質プロモーター制御下でオリゴデンドロサイトに特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。我々はトランスジェニック

マウス特異的な変化、異常を同定する目的で、組織学的、生化学的、動物行動学的手法による解析を行った。また、DNA チップ (Affymetrix 社 GeneChip U74) を用いて、トランスジェニックマウスとその同腹コントロールマウスの小脳における遺伝子発現プロファイルの比較検討を行った。

2) マウス脳で同定される α -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。Neurosin の抗体を作成しこれによって Lewy 小体、GCI を染色した。 α -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。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)

実験中はマウスに苦痛を与えぬように十分配慮した。

C. 研究結果

1) 我々の作成したトランスジェニックマウスでは

多くのオリゴデンドロサイトにヒト α -シヌクレインの発現が認められた。電子顕微鏡的にもオリゴデンドロサイトの細胞体内に異常構造物が認められ、ヒト野生型 α -シヌクレインが細胞内で異常な構造をとり細胞内の秩序を乱している可能性が示唆された。この蓄積 α -シヌクレインは、リン酸化 α -シヌクレイン抗体に反応し界面活性剤に不溶であり、ヒトのシヌクレイノパチーと同様の変化を示した。

我々のトランスジェニックマウスでは老齢マウスで歩幅の減少、探索行動の消失などの運動障害が認められた。

次にDNAチップを用いて8週齢における遺伝子プロファイルを解析した。8種類で減少、2種類で増加が示唆された。TaqMan RT-PCRで遺伝子発現変化を解析してみると、mouse melanoma antigenの発現上昇がトランスジェニックマウスで確認できた。88週齢のDNAチップ解析では4種類の遺伝子で発現の上昇、12種類で発現の現象が示唆された。

2) 正常マウス脳のコホモジェネートをいくつかの α -シヌクレイン抗体によってイムノブロットしたところ、免疫反応性のある α -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 α -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。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。次にneurosinによって形成されるこの分解産物が、 α -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 α -

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。neurosinによる α -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。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。さらにRNAiによってneurosinを減少させると α -シヌクレインの量は増加した。

D. 考察

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

一方同じシヌクレイノパチーであるMSAのモデルマウスは作成の報告は少なく、今回我々はヒト α -シヌクレインをオリゴデンドロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。トランスジェニックに特異的な所見として、リン酸化 α -シヌクレインの細胞内での蓄積、不溶性 α -シヌクレインの存在、といった、ヒトのシヌクレイノパチーと同様の異常を見いだせたことから、我々の作成したマウスが、MSAのモデル動物としての可能性が考えられる。また、老齢トランスジェニックマウスにおいて認めた運動異常は、神経細胞死、もしくは神経細胞の機能異常を示唆する現象である。

遺伝子発現変化は病態の特徴を示すことがあるが、本研究の結果ではポリグルタミン病などを比較して、変化が非常に少ないことがわかった。この原因として1) オリゴデンドロサイトの変化を小脳、脳幹全体として検討しているために十分検出し得なかった可能性、2) 症状が乏しいことから病変自体も少なく、GeneChipはその変化を検出する感度がなかった可能性、3) 本疾患の病態自体に転写へ

の影響が少ないことの可能性が考えられた。

一方シヌクレインの分解過程の検討から neurosin が α -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 α -シヌクレイン断片は α -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 α -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。 α -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、 α -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

オリゴデンドロサイト特異的にヒト野生型 α -シヌクレインを発現するトランスジェニックマウスにおいて生化学的・病理学的にシヌクエイノパチーと類似の変化を認めたことから、MSA のモデルマウスとなる可能性がある。

また α -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、 α -シヌクレインの分解に関与している。neurosin は α -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

Kotliarova, S., Jana, N.R., Sakamoto N., Kurosawa, M., Miyazaki, H., Nekooki, M., Doi, H., Machida, Y., Wong, H.K., Suzuki, T., Uchikawa, T., Kotliarov Y., Uchida, K., Nagao, Y., Tamaoka, A., Oyanagi, K., Oyama, F. &

Nukina, N. Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in transgenic mice with expanded polyQ-EGFP fluorescent aggregates. *J Neurochem* (2005) in press.

Nagaoka, U., Kim, K., Jana, N. R., Doi, H., Maruyama, M., Mitsui, K., Oyama, F. & Nukina, N. Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J Neurochem* 91, 57-68 (2004).

Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N. & Ihara, Y. Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in cho cells are antagonized by tau. *J Biol Chem* 279, 27272-27277 (2004).

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

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

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

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. *Hum Mol Genet* 12, 2625-2635 (2003).

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

546, 307-314 (2003).

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

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

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

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

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

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

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

2. 学会発表

Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N. & Ihara, Y. Gem GTPase and tau: morphological changes induced by Gem GTPase in CHO cells are antagonized by tau. *The American Society of*

Human Genetics 54 Annual Meeting, Toronto, Canada (October 2004).

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

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

小山文隆, 黒沢大, 宮崎晴子, 土井宏, 町田陽子, WONG Hon kit, 貫名信行. 伸長 polyglutamine-EGFP 蛍光凝集体を形成するハンチントン病トランスジェニックマウス脳における視床下部神経ペプチド類の発現低下 (II-B4). 第23回日本痴呆学会学術集会, 東京 (2004年9月).

長岡詩子, 金健, JANA Nihar Ranjan, 土井宏, 丸山美枝子, 三井健一, 小山文隆, 貫名信行. 伸長ポリグルタミンにより発現増加し封入体に局在する p62 の解析 (II-C5). 第23回日本痴呆学会学術集会, 東京 (2004年9月).

小山文隆, 黒沢大, 宮崎晴子, 土井宏, 町田陽子, 貫名信行. 伸長 polyQ-EGFP 融合タンパク質凝集体を形成するハンチントン病トランスジェニックマウスにおける視床下部神経ペプチドの発現の低下. 第27回日本神経科学大会・第47回日本神経科学学会大会 (Neuro2004), 大阪 (2004年9月).

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

岩田淳, 丸山美枝子, 金澤一郎, 貫名信行. 多系統萎縮症モデルマウス作成の試み (P5-L-05). 第43回日本神経学会総会, 札幌 (2002年5月).

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

α -synuclein の病的代謝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 長谷川隆文¹⁾、小林理子¹⁾、菅野直人¹⁾、糸山泰人¹⁾、菊池昭夫²⁾、古川勝敏³⁾

所属 ¹⁾東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野

²⁾仙台医療センター神経内科

³⁾Laboratory of Neuroscience, National Institute on Aging, NIH, USA

【研究要旨】 MSA を含む synucleinopathy の病態解明のため α -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。凝集体はチオフラビン染色陽性、ニトロチロシンやユビキチン陽性、低分子モレキュラーシャペロン分子陽性で、synucleinopathy 脳内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。野生型・変異型 α -synuclein の過剰発現により、細胞形態や増殖の程度に差異はなかった。しかしながら、電気生理学的検討から変異シヌクレインにより細胞膜の傷害が生じ、脱分極時のカルシウム流入が増強されることが示された。シヌクレイノパチーの細胞死の機序として細胞膜傷害が重要であることが強く示唆された。

A. 研究目的

α -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。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 (synucleinopathy) の病態機序解明の鍵を握っていると考えられている。われわれは α -synuclein 過剰発現細胞を用いて、 α -synuclein の病的代謝過程と神経細胞死の関連を検討することを目指した。そうした細胞病態モデルの確立により、多系統萎縮症などのシヌクレイノパチーの病態機序を解明し、更に有用な治療薬開発スクリーニングのためのツールとして応用することを目指した。

B. 研究方法

α -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 α -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 α -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。さらにパッチクランプ法による電気生理学的手技による分析により、細胞内電位変化を測定し膜コンダクタンスを定量的に検討した。同時に Fura2 による細胞内カルシウム濃度を検討し、静止時と脱分極時のカルシウム濃度の変化についても検討を加えた。

C. 研究結果

過剰発現細胞は形態や増殖能に明らかな差異を示さず、 α -synuclein は細胞質内に均質に発現していた。酸化ストレスや NO の曝露により、細胞内凝集体の形成が認められた。凝集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、 FeCl_2 の曝露はさらに強力に凝集形成を促進した。凝集体形成能は特に 3 価鉄において顕著であった。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 β 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 α 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在していた。凝集体は MTOC (microtubule organizing center) のマーカーである γ -tubulin 陽性であった。

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、 α -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。

次にパッチクランプ法を用いて、電気生理学的検討を加えた。静止膜電位を測定したところ、変異型のシヌクレイン発現時には細胞膜のコンダクタンスが上昇し、静止膜電位が浅くなることが確認された。Fura2 蛍光色素により細胞内カルシウム濃度を検討した所、脱分極時の細胞内カルシウム上昇の程度が、

変異シヌクレイン発現細胞では正常型に比して有意に増強された。

D. 考察

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

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 α -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。

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

くと想定される様になって来た。Lewy 小体や GCI は、実は生き残ることのできた幸運な細胞の hallmark なのかもしれない。こうしたことから、例えば凝集体形成を促進するよう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。

変異 α -synuclein の過剰発現により細胞膜傷害が生じていることが示唆された。膜傷害の程度は A53T 変異でより顕著であった。A53T 変異をもつ家族性パーキンソン病家系は、より若年発症の重篤な表現型を呈することが知られていることと本実験系の結果は矛盾せず、ヒトシヌクレイノパチーの神経細胞変性の病態機序を本臍傍モデルは良く反映していることが示唆される。これまでの検討から、細胞内 α -synuclein 凝集体形成は細胞保護的であることが示唆されて来たが、これらの結果は、凝集に至る以前の病的代謝過程が細胞死のプロセス上はむしろ重要であること、さらに細胞膜の傷害が細胞死の直接の引き金となっていることを強く示唆する。今後さらに α -synuclein による膜傷害のメカニズムが検討される必要があると考えられる。

E. 結論

本実験系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のみならず、シヌクレイノパチーにおける神経細胞死の機序を検討する上で有力なツールとなると考えられた。一連の実験結果は細胞死の機序について、凝集体形成よりも、それに先立って生じる細胞膜傷害が重要な役割を担っていることを示唆するものである。今後はこうした膜傷害を生じる実態としてのプロトフィブリルの生成機序を解明していく必要があると考えられる。またプロトフィブリルの増加を防ぐと言う観点からは、細胞内凝集体形成促進がシヌクレイノパチー治療のストラテジーの一つとして成り立つのではないかと考えられる。

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi A., Takeda A., Onodera H., Kimpara T., Hisanaga K., Sato N., Nunomura A., Castellani RJ., Perry G., Smith MA., Itoyama Y., Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol. Dis.* 9 : 244-248, 2002.
- 2) Nunomura A., Chiba S., Kosaka K., Takeda A., Castellani RJ., Smith MA., Perry G., Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of dementia with Lewy bodies. *NeuroReport* 13 : 2035-2039, 2002.
- 3) Smith MA., Drew KL., Nunomura A., Takeda A., Hirai K., Zhu X., Atwood CS., Raina AK., Rottkamp CA., Sayre LM., Friedland RP., Perry G., Amyloid-beta, tau alternations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease : chickens or the egg? *Neurochem. Intern.* 40 : 527-531, 2002.
- 4) Raina AK., Sayre LM., Atwood CS., Rottkamp CA., Hochman A., Zhu X., Obrenovich ME., Shimohama S., Nunomura A., Takeda A., Perry G., Smith MA., Apoptosis and oxidative indicators in Alzheimer's disease, *Neuromethods* 37 : 225-246, 2002.
- 5) Takeda A., Kimpara T., Itoyama Y., Perry G., Smith MA., Possible roles of heme catabolism in neurodegeneration, Abraham NG (ed.); *Heme Oxygenase in Biology and Medicine.*, p135-143, 2002.
- 6) Castellani RJ., Hirai K., Aliev G., Drew KL., Nunomura A., Takeda A., Cash AD., Obrenovich ME., Perry G., Smith MA., Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease, *J. Neurosci. Res.* 70 : 357-360, 2002.
- 7) Perry G., Nunomura A., Hirai K., Zhu X., Prez M., Avila J., Castellani RJ., Atwood CS., Aliev G., Sayre LM., Takeda A., Smith MA. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radical Biology & Medicine.* 33 : 1475-1479, 2002.

- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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* 19 : 590-593, 2004.
- 13) Matsuzaki M., Hasegawa T., Takeda A., Kikuchi A., Furukawa K., Kato Y., Itoyama Y., Histochemical features of stress-induced aggregates in α -synuclein overexpressing cells. *Brain Research* 1004 : 83-90, 2004.
- 14) Hasegawa T., Matsuzaki M., Takeda A., Kikuchi A., Akita H., Smith MA., Itoyama Y., Accelerated formation of α -synuclein aggregates in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Research* 1013 : 51-59, 2004.
- 15) Nunomura A., Chiba S., Lipka C.F., Cras P., Kalaria R.N., Takeda A., Honda K., Smith M.A., Perry G., Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 17 : 108-113, 2004.
- 16) Nunomura A., Chiba S., Takeda A., Smith MA., Perry G., Oxidative stress in Alzheimer disease: the earliest cytological and biochemical feature. Takeda M (ed); *Molecular neurobiology of Alzheimer disease and related disorders*, p164-171, Karger, Basel, 2004.
- 17) Lee HG., Casadesus G., Zhu X., Takeda A., Perry G., Smith MA., Challenging the amyloid cascade hypothesis: senile plaques and amyloid-beta as protective adaptations to Alzheimer disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1019 : 1-4, 2004.
- 18) Takeda A., Itoyama Y., Kimpara T., Zhu X., Avila J., Dwyer BE., Perry G., Smith MA., Heme catabolism and heme oxygenase in neurodegenerative disease. *Antioxidants and Redox Signaling* 6 : 888-894, 2004.
- 19) Lee H-g., Zhu X., Drew KL., Joseph JA., Nunomura A., Hirai K., Takeda A., Perry G., Smith MA., Oxidative adaptation in aging and Alzheimer disease: the roles of amyloid tau. Hiramatsu M. & Yoshikawa T. (ed); *Molecular Interventions in Lifestyle-Related Diseases*, (in press) Packer, Marcel Dekker, New York, 2004.
- 20) Liu Q., Lee HG., Honda K., Siedlak SL., Harris PL., Cash AD., Zhu X., Avila J., Nunomura A., Takeda A., Smith MA., Perry G., Tau modifiers as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* : 1739 (2-3):211-5, 2005.
- 21) Takeda A., Kimpara T., Itoyama Y., Perry G., Smith MA., Roles of heme catabolism in neurodegeneration revised, Abraham NG (ed.); *Heme Oxygenase in Biology and Medicine*. 2nd ed. (in press), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2005.
- 22) 武田篤、長谷川隆文、小林理子、 α シヌクレインと神経病態、Annual Review 神経 2005, p1-11, 中外医学社, 2005