

### C. 研究結果

ヒト ALD 標的組織由来細胞株における ALDP の発現量を比較した。副腎皮質由来細胞株 (NCI-H295) やグリア細胞株 (U87, U251, T98G) で ALDP の発現量が高く、神経系細胞株 (IMR32) では殆ど発現は認められなかった。この結果は、マウス組織における発現と一致していた。また副腎皮質由来細胞株やグリア細胞株では、脂肪酸  $\beta$  酸化活性が神経系細胞株より高い値を示した。ヒト単球 THP-1 細胞を PMA 処理によりマクロファージ様細胞へと分化させると、ALDP や acyl-CoA oxidase の発現量が顕著に増加した。

グリア細胞株 (U87, U251, T98G) に 9 種の shRNA を transfection し、ALDP の発現低下を解析した。その結果、ALD mRNA の 990-1014 番目の塩基をターゲットとした shRNA により ALDP の発現が顕著に低下した。次いで transfection 後の ALDP の発現を解析すると、5 日後までは発現が低下していた。以後、ALDP の発現量と脂肪酸  $\beta$  酸化活性の測定は、transfection 後、4 日目の細胞を用いた。Scramble shRNA を transfection した細胞と比較すると、前者を導入した U87、U251 細胞において ALDP の発現量それぞれ、20%、21%に低下した。これに対応して、細胞レベルにおける極長鎖脂肪酸  $\beta$  酸化活性は、33%、50%に低下した。一方、長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化能は ALDP ノックダウンにかかわらず変化しなかった。

次いで、ALDP ノックダウンおよび対照 U87 細胞を用い、 $[1-^{14}\text{C}]$ lignoceric acid のリン脂質、コレステロールエステルへの取り込み (6 時間後)、 $[2-^{14}\text{C}]$ acetic acid から生合成されるコレステロールとリン脂質量 (24 時間後) を比較した。すると、ALDP ノックダウン U87 細胞において、 $[1-^{14}\text{C}]$ lignoceric acid のホスファチジルコリンおよびコレステロールエステルへの取り込みが有意に増加した。一方、 $[2-^{14}\text{C}]$ acetic acid から生合成される脂質に関しては、コレステロールとスフィンゴミエリンの合成量が有意に低下した。

初代培養した ALD ノックアウトマウス由来

ミクログリアは、FITC-tomato lectin の染色によりほぼ 100%ミクログリアであることが確認された。ミクログリアにおける極長鎖脂肪酸  $\beta$  酸化活性を、野生型マウスより調製した細胞と比較すると、その活性は約 50%低下していた。

Baicalein-tri-Me をリード化合物として、5, 6, 7 位のメトキシ基を水酸基、メチル基に変換した化合物、フラボノイド C 環の酸素原子を窒素原子に変えた化合物、1, 2 位の 2 重結合を水素で飽和させた化合物等を合成し、ALD 患者由来線維芽細胞に添加し、 $[1-^{14}\text{C}]$ lignoceric acid を基質として、極長鎖脂肪酸  $\beta$  酸化活性に与える影響を検討した。しかしながら、baicalein-tri-Me より有用な化合物は見出されなかった。なお、baicalein-tri-Me の作用機構に関しては、baicalein-tri-Me で 2 週間処理した細胞より調製したペルオキシソーム分画において、極長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化活性が上昇していることが明らかになった。よって、baicalein-tri-Me 処理によりペルオキシソーム  $\beta$  酸化系酵素の誘導が起こっている可能性が示唆された。

### D. 考察

ALD 患者における極長鎖脂肪酸の異常蓄積は、ペルオキシソームでの極長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化活性の減少、もしくは脂肪酸伸長反応の促進が原因ではないかと考えられている。また、極長鎖脂肪酸の蓄積は ALD の生化学的指標となっているものの、極長鎖脂肪酸蓄積と神経変性に至る病態の関連性はまだ不明な点が多い。我々はこれまでアッセイ系の簡便さを考慮し、ALD 患者線維芽細胞を用い、 $[1-^{14}\text{C}]$ lignoceric acid の  $\beta$  酸化活性回復を指標に、多数の植物性フラボノイド化合物をスクリーニングしてきた。その結果、baicalein tri-Me が ALD 患者線維芽細胞の極長鎖脂肪酸  $\beta$  酸化活性を回復させるとともに細胞内極長鎖脂肪酸量を改善することを見出した。しかしながら、baicalein-tri-Me を含む粉餌を ALD ノックアウトマウスに投与したが、現時点では脳、脊髄における極長鎖脂肪酸含量を改善するには至っていない。この理由としては、baicalein tri-Me

の効果が種や細胞間によって異なる可能性、血液脳関門を透過しない可能性、腸管からの吸収不全や代謝による不活性化等が考えられる。

そこで本研究では、ヒトならびにマウスにおける ALD 標的細胞系を確立し、脂質代謝を検討するとともに、baicalein tri-Me をリード化合物として、より有用な化合物の合成を試みた。ヒトグリア細胞株において ALDP をノックダウンすることが可能になった。また、ALDP の発現低下により、極長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化能の低下、極長鎖脂肪酸のホスファチジルコリンやコレステロールへの取り込み増加、コレステロールやスフィンゴミエリンの生合成の低下が明らかになった。アストロサイトは神経細胞へのコレステロールの供給を行っていることから、グリア細胞でのコレステロール代謝の異常が神経変性に関わっている可能性が推察された。今後、stable に shRNA を発現するグリア細胞株を作製することにより、ALD 治療薬のスクリーニングに使用できる可能性が示唆された。また、ALD マウス脳より調製したマイクログリアにおいても極長鎖脂肪酸の  $\beta$  酸化能の低下が確認された。現在、アストロサイトの培養も可能になったので、両細胞の脂質代謝異常の詳細を検討する予定である。また、ヒトとマウスの種差についての解析も可能となった。

今回、baicalein-tri-Me をリード化合物として多種類の化合物を合成し、その効果を検討した。しかしながら、再現性よく baicalein-tri-Me を超える効果を示す化合物は見出されなかった。ある 2 種の化合物は baicalein-tri-Me より極長鎖脂肪酸  $\beta$  酸化活性の促進を示す場合もあったが、medium への溶解度が低いことが問題となった。なお、新規合成化合物と baicalein-tri-Me との構造活性相関を検討すると、その作用には 5, 6, 7 位のメトキシ基が重要であり、水酸基やメチル基に置換すると効果が著しく低下した。また、フラボノイド骨格の C 環は平面構造をとる必要があること、3 位のカルボニル基も重要であることが示唆された。今後、ALD 標的細胞を用いての疾患と関連した指標を用いた有用化合物のスクリーニングとともに、baicalein-tri-Me

をリード化合物としてさらに効果のある誘導体の探索、個体レベルでの薬効評価する必要がある。

## E. 結論

ALD に有効な化合物の探索は、これまで主として ALD 線維芽細胞の極長鎖脂肪酸  $\beta$  酸化活性の改善を指標に行われてきた。しかしながら ALD 標的細胞における脂質代謝や ALDP の役割は皮膚線維芽細胞と異なる可能性が考えられる。また極長鎖脂肪酸（得に C26:0）の蓄積と神経変性との関連性についても未だはっきりしていないのが現状である。また種差の問題もある。今回得られたグリア細胞株での ALDP ノックダウン細胞や、ALD マウスノックアウトマウス由来初代培養細胞における ALDP の機能解析とこれら細胞を用いてのスクリーニングは、新規有用化合物の発見に有用と思われる。一方、baicalein tri-Me ならびにその誘導体については、ALD モデル細胞での効果の検討とともに、個体レベルでのバイオアベイラビリティを考慮した化合物の設計と投与実験が必要である。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kashiwayama, Y., Asahina, K., Shibata, H., Morita, M., Muntau, A. C., Roscher, A. A., Wanders, R. J. A., Shimozawa, N., Sakaguchi, M., Kato, H., and Imanaka, T.: Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisome. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1746: 116-128.
- 2) Suzuki, Y., Takemoto, Y., Shimozawa, N., Imanaka, T., Kato, S., Furuya, H., Koga, M., Kato, K, Hashimoto, N., Onodera, O., and Tsuji, S.: Natural history of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *Brain Dev.* 2005, 27: 353-357.
- 3) Ito, R, Morita, M, Takahashi, N., Shimozawa,

- N. Usuda, N., Imanaka, T., and Ito, M.: Identification of Pex5pM and retarded maturation of 3-ketoacyl-CoA thiolase and acyl-CoA oxidase in CHO cells expressing mutant Pex5p isoforms. *J. Biochem.* 2005, 138: 781-790.
- 4) 守田雅志, 今中常雄: 脂質代謝異常と神経変性疾患. *実験医学 (増刊): ダイナミックに新展開する脂質研究.* 2005, 23: 1020-1026.
- 5) 柏山恭範, 今中常雄: ペルオキシソーム ABC 蛋白質と脂肪酸代謝. 「ABC 蛋白質」植田和光編著, 学会出版センター, 東京, 2005, 159-187.
- 6) 今中常雄, 堀江修一: ペルオキシソームと脂肪酸  $\beta$  酸化活性. 「化学と生物実験ライン 53- 細胞生物学実験法 III 細胞解析法 (III)」大熊勝治編著, 廣川書店, 東京, 2005, 28-48.
2. 学会発表
- 1) 金井真梨子, 守田雅志, 高橋郁子, 岡藤文人, 岩島誠, 林利光, 渡辺志朗, 浜崎智仁, 今中常雄: フラボノイド誘導体の副腎白質ジストロフィー (ALD) 患者線維芽細胞における脂質代謝改善効果. (ワークショップ) 日本薬学会第 125 年会, 2005, 3, 東京.
- 2) Kashiwayama, Y., Asahina, K., Morita, M., and Imanaka, T.: Characterization of the peroxisomal targeting signal on the N-terminal region of PMP70. (ワークショップ) 第 78 回日本生化学会大会, 2005, 10, 神戸.
- 3) Seki, M., Kashiwayama, Y., Yamashita, Y., Sakaguchi, M., Morita, M., and Imanaka, T.: PMP70 related protein (P70R) seems to be not peroxisomal protein. (ワークショップ) 第 78 回日本生化学会大会, 2005, 10, 神戸.
- 4) Kumakura, M., Morita, M., and Imanaka, T.: PPAR $\delta$  up-regulated the expression of ALDP, a peroxisomal ABC protein in THP-1 monocytic cells during differentiation. (ワークショップ) 第 78 回日本生化学会大会, 2005, 10, 神戸.
- 5) 高橋則正, 原山雄太, 前田尚啓, 守田雅志, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー: 変異型ペルオキシソーム ABC タンパク質 ALDP の細胞内動態. 第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2005, 11, 京都.
- 6) 熊倉学, 守田雅志, 今中常雄: TH1 細胞におけるペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ALDP の発現制御と機能. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005, 12, 福岡.
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許出願
  2. 実用新案登録
  3. その他  
なし

## 小児大脳型 ALD の診断・治療システム、ガイドラインの構築についての問題点

分担研究者	小野寺理	新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
研究協力者	西澤正豊	新潟大学脳研究所神経内科

### 研究要旨

近年小児大脳型 ALD (CCALD) に対して、造血幹細胞移植 (HSCT) の有用性が唱えられ、本邦でも有効性が確認された。しかし、HSCT 施行後 1.5 年程度は緩やかに悪化するためできるだけ早期の移植が推奨される。本邦では、発病から専門医療機関に受診するのが遅い。まず、本症が頻度の高い疾患であることを認識し、早期に専門医受診を勧めることが必要である。次ぎに、発端者が見つかった場合は、倫理面に配慮しながら、積極的に本症の保因者である可能性と、気をつけるべき点について伝えるべきである。最後に、本症が緊急に HSCT を必要とする疾患であるという認識をもち、早急に移植医に相談することが重要である。未発症時に対しては、最低半年に一回の MRI と神経心理検査を行い、症状の進行が疑われた場合は、HSCT を考慮する。食事療法 Lorenzo's oil については、勧められるだけの証拠がなく慎重であるべきである。

### A. 研究目的

近年小児大脳型 ALD (CCALD) に対して、造血幹細胞移植 (HSCT) の有用性が唱えられている。昨年までの“副腎白質ジストロフィーの治療法開発のための臨床的及び基礎的研究班”における研究にて、本邦でも CCALD にたいする HSCT の有効性が確認された。しかし、HSCT は施行後も 1.5 年程度は緩やかに MRI 所見が悪化することが示され、その治療の問題も示された。また、診断までにも時間がかかり、かつ診断がついてから、HSCT に至るまでに 9 ヶ月あまりかかっていることも判明した。また HSCT を行うにあたっての、マッチング検査は、全額自費負担であり、患者家族に与える、精神的、経済的負担は大きい物がある。また、発症者を起点として、未発症時の診断がなされることも多いが、早期の HSCT という治療法が提唱されているにもかかわらず、その治療、およびフォローのガイドラインはできていない。本、班会議では、ここ数年間に、患児家族からの相談にあたり、明かとなってきた、診断体制、サポート体制の問題点に関して、整理し、本症に対する、理想的な、診断、サポート体制の構築を模索したい。

### C.D. 研究結果と考察

昨年までの副腎白質ジストロフィー症の治療法開発のための臨床的及び基礎的研究班において、小児大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植療法の効果が検討されてきた。その結果、造血幹細胞移植により、移植後 1.5 年以降 MRI 上の悪化が停止すること。また比し高齢と比して、長期的に MRI 所見が軽症にとどまること、さらに ADL 上も、寝たきりや、意思疎通不能に陥る例が HSCT 非施行例比して少ないことが報告され、本治療法が、小児大脳型 ADL の自然歴を良い方向に変化させることが、本邦の症例においても確認されてきた。

HSCT は施行後も 1.5 年程度は症状が進行すること。進行した神経症状を劇的に改善させる治療法でないことから、できるだけ早期の HSCT が推奨されている。しかし、本邦では、発病から専門医療機関での診断までに時間がかかり、移植の時期を逃している症例が少なからずいると推察される。造血幹細胞移植施行例と、非施行例の、発病してから ALD の診断がつくまでの中央値は、それぞれ、4 ヶ月、12 ヶ月と大きな差を見せる。早期に、移植するためには、まず、本症の存在を、好発年齢である 5 歳から 10 歳児の関係者に周知する必要がある。本邦での ALD の頻度は 2 万から 3 万男児に 1 人と考えられているが、これはマスキングが行われているフェニールケトン尿症の頻度に比して、決して低い頻度ではない。本症が男児に頻度の高い疾患であることを認識し、早期に専門医受診を勧めることが必要であると考えた。

次ぎに、小児大脳型の約 60% は家族歴を持っていたが、家族歴を有する症例と、有しない症例では、発病から診断にかかるまでの中央値が僅か半月しか違わなかった。この意味するところは、発端者がいたときに、本症の可能性について十分な周知が、親族に行われていないことを示唆する。本症の 40% 近くが発症する小児大脳型 ALD に対して、早期の HSCT という治療法がある現在、発端者が見つかった場合は、倫理面に配慮しながら、積極的に本症の保因者である可能性と、気をつけるべき点について伝えるべきである。その際、本遺伝子異常が決して稀ではないことを十分に伝えることは重要なことと考える。

最後に、診断から、移植までの中央値が約 4 ヶ月である。ドナーの選択などに時間がかかることは仕方がないと考えても、本症が緊急に HSCT を必要とする疾患であるという認識をもち、移植医に相談するこ

とが重要である。

また未発症時に対しては次の様な問題が上げられる。まず、未発症時の検査態勢であるが、最低半年に一回の MRI と神経心理検査を行い症状の進行が疑われた場合は HSCT を考慮する。多くの症例では MRI 上の変化が選考すると考えて良いと思われる。また、特に大脳型予防のための食事療法については、いまだに勧められるだけの証拠がない。Moserらは極超鎖脂肪酸の低下により大脳型発症の危険性を低下させることができると報告しているが、研究デザインは、Lorenzo's oil の薬効を判定できるデザインとはなっていない点に留意し、その判断は慎重であるべきである。

#### E. 結論

- 5歳から10歳の好発年齢男児を見る機会が多い公的機関へのALDの周知
- 発端者から可能性のある近親者への周知
- 医療関係者に、本症が高頻度の疾患であり、早期のHSCTを必要とする疾患である旨の周知
- Lorenzo's oil, 食餌療法については勧められるだけの証拠がない
- 未発症時に対して最低半年に一回のMRIと神経心理検査が必要である

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

「脊髄小脳変性症の治療を目的とした基礎的研究」

分担研究者 矢澤生 国立長寿医療センター研究所研究資源有効利用室長

脊髄小脳変性症 (SCD) は運動失調を呈する複数の疾患の集合である。遺伝性の SCD の多くはポリグルタミン病として解明されたが、非遺伝性の SCD の発病機序は不明である。本研究では遺伝性と非遺伝性の 2 つの SCD に関する研究を行うが、本年度は非遺伝性の多系統萎縮症 (MSA) の発病機序を検討した。MSA では中枢神経系のオリゴデンドロサイト (OLG) に  $\alpha$ -synuclein (Syn) が凝集し、GCI (glial cytoplasmic inclusion) が白質に出現する。GCI の病的な意義を解明するために、ヒト Syn を OLG に強制発現するトランスジェニック (TG) マウスを MSA モデルとして開発した。TG マウス脳では、OLG の Syn の過剰発現により神経細胞の変性が誘導された。変性した神経終末には Syn の蓄積を認め、OLG の変性と同様に神経変性でも Syn の過剰発現が重要な病的プロセスであることを示した。

A. 研究目的

高齢化社会を迎え、介護予防のために歩行障害は重要なテーマで、機序の解明は緊急の課題である。本研究では歩行障害の機序を明らかにするために、歩行障害を主症状とする脊髄小脳変性症 (SCD) の機序を解明する。SCD は単一の疾患ではなく、運動失調を呈する複数の疾患の集合である。分子生物学の進歩により飛躍的に病態解明が進んだ遺伝性の SCD は、ポリグルタミン病であることが明らかになった。一方、非遺伝性の

SCD については原因や発病機序は不明である。本研究では、遺伝性疾患であるポリグルタミン病の一つ歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) と、非遺伝性の多系統萎縮症 (MSA) の発病機序に関する研究をおこなう。遺伝性、非遺伝性の 2 つの疾患について、各々の発病機序を研究し、両者に共通する発病機序などの検討をおこなう。脊髄・小脳に起こる神経変性の部位の特異性 vulnerability の解明をおこない、歩行障害に対する治療法の開発を目指す。

## B. 研究方法

MSAのオリゴデンドロサイト(OLG)に起こる GCI(glial cytoplasmic inclusion) の病的な意義を解明するために、ヒト $\alpha$ -synuclein(Syn)をマウス脳の OLG に強制発現するトランスジェニック(TG)マウスを作製した。TG マウス脳の OLG で、MSA 患者脳の GCI に類似する封入体が形成されることを確認した上で、マウス運動機能、マウス脳の萎縮や神経細胞の脱落を検討した。

(倫理面への配慮)ヒト組織に関する研究は厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、国立長寿医療センター倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

TG マウス脳には生後 9 ヶ月で約 10%の脳萎縮が起こり、マウスの運動機能は約 6 ヶ月には著明な機能低下を認めた。組織学的に、TG マウスでは神経細胞数の減少を認め、明らかな神経細胞の変性所見を示していた。故に、ヒト Syn を OLG に強制発現する TG マウスでは、OLG の Syn 凝集により神経変性が起こった。TG マウスでは主に神経終末にマウス Syn の蓄積を認め、過剰な Syn が神経細胞の変性を誘導したことが考えられた。OLG 単離培養を行い、TG マウス由来の OLG の性質を検討した。

## D. 考察

MSA のモデルマウスでは、OLG での

ヒト Syn の過剰発現により GCI 様に Syn が凝集し、これにより神経細胞の軸索や神経終末にマウス Syn の過剰発現が引き起こされた結果、神経細胞の変性が誘導された。MSA モデルマウスで示された、OLG と神経細胞の両方での Syn の過剰発現が、MSA の神経変性でも重要であることが推定され、今後 Syn の過剰発現の機序を詳細に検討する必要がある。

## E. 結論

MSA では、Syn の過剰な発現が神経変性の基本的な原因であることが示された。

## G. 研究発表

### 論文発表

Yazawa I, Giasson BI, Sasaki R, Zhang B, Joyce S, Uryu K, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Mouse model of multiple system atrophy:  $\alpha$ -synuclein expression in oligodendrocytes causes glial and neuronal degeneration. *Neuron*, 2005 45, 847-859.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

熱ショック転写因子（HSF）活性化によるポリグルタミン病に対する治療法開発

分担研究者 永井義隆 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学 助手

共同研究者 藤掛伸宏<sup>1)</sup>、ポピエル明子<sup>1)</sup>、山口政光<sup>2)</sup>、戸田達史<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学、<sup>2)</sup>京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科染色体工学

研究要旨：ポリグルタミン（PolyQ）病では共通の発症分子機構として、PolyQ 鎖の異常伸長により原因蛋白質のミスフォールディングが生じ、その結果原因蛋白質の凝集・蓄積を引き起こし、神経変性を来たと考えられている。本研究では①蛋白質のフォールディングを助ける Hsp70 や Hsp40 などの分子シャペロン群を誘導する薬剤の投与、あるいは②熱ショック転写因子（HSF）の遺伝子発現によって分子シャペロン群の同調的発現誘導を試み、PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果を検討した。その結果、HSF 活性化剤である 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) は濃度依存的に PolyQ 蛋白質の封入体形成、複眼変性を抑制することを明らかにした。一方、HSF dsRNA による内在性 HSF の発現抑制では PolyQ 蛋白質の封入体形成、複眼変性は増悪したことから、HSF は PolyQ 病に対する防御機構として重要であると考えられた。しかし野生型もしくは常時活性型 HSF 変異体の遺伝子発現では、予想に反して PolyQ 蛋白質の封入体形成、複眼変性の増悪を認めた。以上の結果から HSF 活性化剤 17-AAG の PolyQ 病治療薬としての可能性が明らかになったが、HSF の遺伝子発現では発現誘導される遺伝子群が異なる可能性があり、この点を十分留意する必要があると結論した。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症は小脳の進行性変性を主病変とし、運動失調と様々な神経症状を呈する神経変性疾患の総称で、現時点で有効な治療法の乏しい神経難病である。これらの疾患の原因は長らく不明であったが、遺伝性脊髄小脳変性症の大部分については原因遺伝子異常が明らかにされた。その多く（脊髄小脳失調症 1、2、3、6、7、17 型）はそれぞれ異なる原因遺伝子内にグルタミンをコードする CAG 反復配列の異常伸長という共通の遺伝子異常により発症し、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 病に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 鎖を持つ異常蛋白質のミスフォールディング／異常コンフォメーション変移が生じ、その結果原因蛋白質の凝集・蓄積を引き起こし、神経変性を来たと考えられている。これまでの研究で、蛋白質のフォールディングを助ける分子シャペロン Hsp70 や Hsp40 などの遺伝子発現による PolyQ 病モデルショウジョウバエ、マウス

の治療効果が示された。しかし、分子シャペロン群は熱ショック転写因子（HSF）により同調的に発現誘導され、これらは協調的に働くため、単独の分子シャペロンの過剰発現は細胞毒性があることが知られている。また実際の PolyQ 病治療に応用するには、遺伝子改変による分子シャペロン遺伝子の発現でなく、体外から投与できる薬物による分子シャペロンの誘導が必要である。

そこで本研究では①同調的に分子シャペロン群の発現を誘導する薬剤の PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果を明らかにすることと、② HSF の遺伝子発現により分子シャペロン群の同調的発現誘導を試み、PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 分子シャペロン誘導剤の PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果の検討

PolyQ 病モデルショウジョウバエとして異常伸長 PolyQ 蛋白質 MJdtr-Q78 を発現する MJdtr-Q78 Fly



を用いた。また分子シャペロン誘導剤として HSF 活性化作用のある Hsp90 阻害剤の geldanamycin (GA)、17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)、および未知の機序で HSF を活性化する celastrol (CL)、geranylgeranylacetone (GGA) を用いた。これらの分子シャペロン誘導剤を培地に添加して MJDtr-Q78 Fly を飼育し、複眼変性を光学顕微鏡観察にて評価した。MJDtr-Q78 蛋白質の封入体形成については、3 齢幼虫の複眼原基での免疫染色により評価した。

#### (2) HSF 遺伝子発現の PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果の検討

野生型 HSF (wtHSF) もしくは常時活性化型 HSF 変異体 (HSFQ403L)、または HSF のヘアピン型二本鎖 RNA (HSF dsRNA) を発現するトランスジェニックショウジョウバエ wtHSF、HSFQ403L、HSF RNAi Fly を作成した。これらと MJDtr-Q78 Fly との遺伝学的交配により、wtHSF、HSFQ403L、HSF dsRNA を MJDtr-Q78 蛋白質と共に複眼に発現させた。(1)と同様に複眼変性を光学顕微鏡観察にて、MJDtr-Q78 蛋白質の封入体形成を 3 齢幼虫の複眼原基での免疫染色により評価した。またこの時の分子シャペロン遺伝子の発現誘導については、成虫頭部から total RNA を抽出し、定量的 RT-PCR にて評価した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトを直接対象とした研究および動物実験は行っておらず、特記すべきことはない。

### C. 研究結果

#### (1) 分子シャペロン誘導剤の PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果の検討

様々な分子シャペロン誘導剤のうち、17-AAG は濃度依存的 (0.3<0.9 μg/ml) に MJDtr-Q78 Fly の複眼変性を抑制した。GA、CL、GGA では明らかな複眼変性抑制効果は認めなかった。MJDtr-Q78 Fly 3 齢幼虫の複眼原基での免疫染色では、やはり 17-AAG は濃度依存的に MJDtr-Q78 蛋白質の封入体形成を抑制した。

#### (2) HSF 遺伝子発現の PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果の検討

HSF dsRNA の発現により内在性 HSF の発現が抑制された HSF RNAi/MJDtr-Q78 Fly では複眼変性は増悪した。しかし予想に反して、wtHSF、HSFQ403L を発現する wtHSF/MJDtr-Q78 Fly、HSFQ403L/MJDtr-Q78 Fly でも複眼変性の増悪を認めた。いずれも複眼変

性の増悪に相応して、MJDtr-Q78 蛋白質の封入体形成は増加していた。一方、定量的 RT-PCR では wtHSF、HSFQ403L の発現による Hsp70 や Hsp40 の発現誘導は認められなかった。

### 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、分子シャペロン誘導剤の投与、または HSF 遺伝子の発現により分子シャペロン群の同調的発現誘導を試み、PolyQ 病モデルショウジョウバエに対する治療効果を検討した。

その結果、HSF 活性化剤である 17-AAG が濃度依存的に PolyQ 病モデルショウジョウバエでの PolyQ 封入体形成を抑制し、複眼変性を抑制することを明らかにした。最近、Sobue らが PolyQ 病の一つである球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) モデルマウスに対する 17-AAG の治療効果を示したが (Nat Med 11; 1088, 2005)、その効果は Hsp90 阻害による原因蛋白質であるアンドロゲン受容体の特異的分解促進によってもたらされると結論している。本研究では 17-AAG の HSF 活性化による分子シャペロン群の同調的発現誘導に着目し、SBMA だけでなく広く PolyQ 病全般に対して治療効果を発揮することを初めて明らかにした。さらに同様に HSF 活性化作用のある geldanamycin、arimocloamol などが、やはり異常蛋白質の凝集・蓄積を認めるパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患モデル動物に対して治療効果を発揮することが示されている。これらのことから HSF 活性化による分子シャペロン群の発現誘導が、ミスフォールディングを起因とする神経変性疾患の治療法として広く応用できる可能性が考えられる。17-AAG は現在抗癌剤として第 II 相臨床試験が行なわれており、ヒトに対する安全性が既に確立されている。したがって、PolyQ 病に対しても治療効果・安全性が確認できれば、臨床応用への可能性が広がると考えられる。今後、PolyQ 病モデルマウスに対する治療効果を確証して、臨床応用を目指した研究を進めて行く予定である。

一方、HSF dsRNA による内在性 HSF の発現抑制によって PolyQ 病モデルショウジョウバエの PolyQ 封入体形成、複眼変性は増悪したことから、HSF は PolyQ 病の病態に対する生体内防御機構として重要であると考えられた。しかし予想に反して、HSF の遺伝子発現でも PolyQ 封入体形成、複眼変性の増悪

を認めた。この時に Hsp70 や Hsp40 の発現誘導は認められず、代わって別の分子シャペロン群が発現誘導されることが示唆されている。すなわち、HSF の分子シャペロン遺伝子群に対する転写調節は複雑に制御されており、場合によっては病態を悪化させる遺伝子の発現を誘導する可能性があることに十分留意する必要がある。

#### E. 結論

(1) 分子シャペロン誘導剤 17-AAG は PolyQ 病モデルショウジョウバエの PolyQ 封入体形成を抑制し、複眼変性を抑制した。したがって、17-AAG は PolyQ 病に対する有力な治療薬候補と考えられる。

(2) HSF dsRNA による HSF の発現抑制にて PolyQ 病モデルショウジョウバエの PolyQ 封入体形成、複眼変性は増悪したことから、HSF は PolyQ 病に対する防御機構として重要であると考えられた。

(3) 野生型 HSF もしくは常時活性型 HSF 変異体の遺伝子発現では、予想に反して PolyQ 病モデルショウジョウバエの PolyQ 封入体形成、複眼変性は増悪した。

(4) 17-AAG による HSF の活性化と HSF の遺伝子発現では、発現誘導される遺伝子群が異なる可能性が考えられ、PolyQ 病の治療法開発にあたってはこの点を十分留意する必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Chiyonobu T., Sasaki J., Nagai Y., Takeda S., Funakoshi H., Nakamura T., Sugimoto T., Toda T. Effects of fukutin deficiency in the developing mouse brain.

*Neuromuscular Disorders* 15, 416-426 (2005)

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

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

*FEBS Letters* 579, 3842-3848 (2005)

3) Kariya S., Hirano M., Uesato S., Nagai Y., Nagaoka Y., Furiya Y., Asai H., Fujikake N., Toda T., Ueno S.

Cytoprotective effect of novel histone

deacetylase inhibitors against polyglutamine toxicity.

*Neuroscience Letters* 392, 213-215 (2006)

4) 永井義隆

脊髄小脳変性症の話題「遺伝子治療の展望」

*難病と在宅ケア* 11, 24-27 (2005)

5) 永井義隆

タンパク質凝集阻害によるポリグルタミン病の治療法開発

*実験医学* 23, 2400-2407 (2005)

6) 永井義隆

ことばのカルテ 82「ポリグルタミン病」

*Medical Tribune* 39, 41 (2005)

7) 戸田達史、永井義隆

III. 研究の現状、1. 原因と発症の仕組み

パーキンソン病と関連疾患の療養の手引き (三重大学出版) 70-72 (2005)

8) 永井義隆

遺伝子治療の展望

*脊髄小脳変性症のすべて* 112-115 (2006)

##### 2. 学会発表

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

The soluble polyglutamine protein acquires cytotoxicity through a conformational transition to a  $\beta$ -sheet-rich structure.

3rd Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (July, 2005, South Hadley, MA, USA)

2) Popiel H.A., Nagai Y., Fujikake N., Toda T. Investigation of a potential therapy for the polyglutamine diseases using the cell permeable peptide inhibitor PTD-QBP1.

3rd Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (July, 2005, South Hadley, MA, USA)

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

Therapeutic approach for the polyglutamine diseases by activation of heat shock transcription factor in *Drosophila* polyglutamine disease models.

3rd Gordon Research Conference on CAG Triplet Repeat Disorders (July, 2005, South Hadley, MA, USA)

4) Nagai Y., Inui T., Popiel H.A., Fujikake N., Goto Y., Naiki H., Toda T.

Protein structural abnormalities and therapeutic targets of the polyglutamine expansion neurodegenerative disorders.

International Symposium on Life of Proteins (October, 2005, Hyogo, Japan)

5) Popiel H.A., Nagai Y., Fujikake N., Sasaki R.,

Toda T.

High-throughput screening for small chemicals that inhibit polyglutamine protein aggregation. International Symposium on Life of Proteins (October, 2005, Hyogo, Japan)

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

Effect of heat shock transcription factor on polyglutamine inclusions and neurodegeneration in *Drosophila* polyglutamine disease models. International Symposium on Life of Proteins (October, 2005, Hyogo, Japan)

7) Takahashi Y., Nagai Y., Kinjo M.

Detection of polyglutamine aggregate formation by fluorescence correlation spectroscopy. International Symposium on Life of Proteins (October, 2005, Hyogo, Japan)

8) 永井義隆、乾隆、ポピエルヘレナ明子、藤掛伸宏、後藤祐児、内木宏延、戸田達史  
異常伸長ポリグルタミン蛋白質の毒性構造変移の捕捉

第46回日本神経学会総会 (H17. 5、鹿児島)

9) 高橋保夫、永井義隆、金城政孝

蛍光相関分光法 (FCS) による異常伸長ポリグルタミン蛋白質凝集の測定

第5回日本蛋白質科学会 (H17. 6、福岡)

10) 藤掛伸宏、永井義隆、ポピエルヘレナ明子、山口政光、戸田達史

A genetic screen for modifiers of polyglutamine-induced neuronal dysfunction in *Drosophila*

第7回ショウジョウバエ研究集会 (H17. 7、兵庫)

11) 永井義隆

膜透過性ペプチド PTD-QBP1 を用いた神経変性疾患ポリグルタミン病に対する分子治療

第7回ペプチドフォーラム (H17. 8、京都)

12) 中山均、下家浩二、永井義隆、磯崎稔、佐藤広康、吉栖正典、池内俊彦

Relationship of polyglutamine-expanded GFP expression to ER stress in PC12 cells.

第48回日本神経化学会 (H17. 9、福岡)

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

## Actin 結合蛋白 L-plastin は、ポリグルタミン病で増加する

分担研究者 小野寺理 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

研究協力者 長谷川有香 西澤正豊 新潟大学脳研究所神経内科  
高橋俊昭 新潟大学医学部保健学科  
豊島靖子 高橋 均 新潟大学脳研究所病理学教室  
吉田 豊 新潟大学腎研究施設構造病理学分野

### 研究要旨

ポリグルタミン鎖安定発現細胞において、伸長ポリグルタミン鎖の発現に伴う蛋白発現量の変化について、蛍光標識二次元ディフェレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)法を用いて網羅的に検討した。その結果、伸長ポリグルタミン鎖発現細胞において、L-plastin が増加していることを見出した。加えて、一部のポリグルタミン病患者の剖検脳でも L-plastin の増加を認めた。L-plastin はアクチン結合蛋白で、アクチンの調節を介してシナプス機能やエンドサイトーシスに関与する。本症における初期変化として、L-plastin 増加に伴うアクチン機能異常の存在が推察された。今後、L-plastin の増加が、実際にシナプス機能異常やエンドサイトーシスの障害を起すか、また、L-plastin は広く発現するため、サロゲートマーカーとしての応用も期待され、エンドサイトーシス機能や他の臓器についての検討が必要と考える。

### A. 研究目的

ポリグルタミン病は、伸長ポリグルタミン鎖そのものが神経細胞障害性を有すると考えられ、その機序として、ユビキチン・プロテアソーム系の障害、転写障害、シナプス機能障害などが提唱されるが、何が本質的な変化か明らかでない。本症の病態機序に関わる初期変化を明らかとするには、最終産物である発現蛋白質の量的・質的变化を網羅的に捉え、比較する手法が有用であると思われる。

本研究では、ポリグルタミン鎖安定発現細胞における、伸長ポリグルタミン鎖発現に伴う細胞内の蛋白発現量の変化を、正常長ポリグルタミン鎖発現と比較し、ポリグルタミン病剖検脳での検討を加えた。

### B. 研究方法

遺伝的背景が同一で、ポリグルタミン鎖長のみが異なる、doxycycline にて発現誘導される安定発現 HEK293 細胞(部分 DRPLA-Q12 および Q79-HcRed/CREd2EGFP/HEK293) (以下 Q12, Q79 細胞)を用いた。発現誘導後 48 時間の細胞を用いて、蛍光標識二次元ディフ

レンスゲル電気泳動法(2D Differential Gel Electrophoresis; 2D-DIGE 法)にて、各スポットにおける Q12 細胞と Q79 細胞間の発現量比を比較した。スポットの同定は、トリプシン消化後 MALDI-TOF 型質量分析計を用いたペプチド・マスフィンガープリント法で行った。さらに、ポリグルタミン病患者剖検脳を用いて Western blotting(WB)で検討した。

(倫理面への配慮)

ポリグルタミン病患者剖検脳は、同意を得て、新潟大学脳研究所病理学教室で剖検された後、保存されていたものの一部を用いた。患者氏名の情報は得ておらず、この研究からの特定はできず、倫理面の問題はない。

### C. 研究結果

検出した全 2521 スポットのうち、各発現誘導蛋白のスポットを除き、Q79 細胞で、発現量比 1.5 以上の増加を有意 ( $p < 0.05$ ) に示したものは 12 個、1/1.5 以下の減少は 8 個と変動した蛋白は少数であった。変化が最大だったスポットは発現量比 2.91 ( $p < 0.001$ ) で、L-plastin と同定した。用いた細胞系の WB でも Q79 細胞

で L-plastin の増加を認め、免疫沈降の結果、L-plastin は伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白と結合していた。

ポリグルタミン病剖検脳を用いた WB の結果、L-plastin 発現量は、前頭葉皮質では、対照群 (n=6) に対して DRPLA 群 (n=10) で有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた。HD 群 (n=3) でも増加し、小脳、後頭葉皮質、大脳白質においても HD と DRPLA で増加している傾向がみられた。DRPLA 群の前頭葉皮質の L-plastin 発現量と CAG リピート数との間に有意な相関を認めなかった。

#### D. 考察

本細胞系の 2D-DIGE では変化を示す蛋白は少なく、最も大きく発現量が増加したスポットとして L-plastin を見出し、一部のポリグルタミン病 (DRPLA, HD) 患者剖検脳でも、L-plastin の増加を認めた。

本細胞系における L-plastin の増加の機序として、伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白と L-plastin が結合することにより、L-plastin の量的不足が生じて細胞機能を維持するために、代償性に L-plastin が増加する可能性、もしくは、L-plastin の代謝・分解が妨げられて蓄積する可能性が考えられる。

L-plastin はアクチン結合蛋白で、F-アクチンフィラメントを架橋・束化し、アクチンの調節を介して細胞形態の維持や運動性に関与する。クラスリン依存性エンドサイトーシスにも関与し、plastin が適切な量で存在することが、エンドサイトーシスやアクチン機能維持に重要である。近年、ポリグルタミン病において神経細胞死に先行する初期の機能異常として、クラスリン依存性エンドサイトーシスの障害やシナプス機能異常が指摘され、シナプトパッチという概念が提唱されている。HD では、Huntingtin (Htt) のポリグルタミン鎖の伸長に伴い Htt とシナプス小胞蛋白との結合障害が生じ、クラスリン依存性エンドサイトーシスの障害が起きる機序が推察されている。SCA2 の原因遺伝子 ataxin2 は、エンドサイトーシスに関わる endophilin1,3、T-, L-plastin と複合体を形成し、過剰発現で T-plastin が増加することが示されている。ポリグルタミン病と、plastin-アクチン機能やクラスリン依存性エンドサイトーシスとの関連が注目される。

今後、L-plastin の増加が実際にシナプトパッチを起こすのか、また、L-plastin の発現は中枢神経系以外に広く確認されることからサロゲートマーカーとして応用できる可能性についても検討する必要がある。

#### E. 結論

- ・ ポリグルタミン安定発現培養細胞系を用いて、伸長ポリグルタミン鎖の発現に伴う、発現蛋白質の量的変化について検討し、加えてポリグルタミン病患者剖検脳でも検討した。

- ・ 2D-DIGE の結果、大きな発現量の変化を示すスポットは多くなく、発現量が最も増加したスポットを L-plastin と同定した。ポリグルタミン病 (Huntington 病・DRPLA) 患者剖検脳においても、L-plastin の発現が増加している例を認めた。

- ・ 免疫沈降の結果、伸長ポリグルタミン鎖発現蛋白と L-plastin との結合が示唆された。

- ・ L-plastin は actin 結合蛋白であり、actin の機能調節とエンドサイトーシスに必須で、適切な量で存在することが重要である。ポリグルタミン病の病態機序と、plastin-actin 機能およびクラスリン依存性エンドサイトーシスがどのように関与するか、今後の検討が必要である。

- ・ L-plastin は、発現が中枢神経系に限局せず、将来、ポリグルタミン病患者の臨床マーカーになりうる可能性も期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

長谷川有香、高橋俊昭、豊島靖子、吉田豊、高橋均、小野寺理、西澤正豊：増大ポリグルタミン鎖発現に伴う細胞内蛋白挙動の解析 神経学会総会 5月 2005 鹿児島

長谷川有香、高橋俊昭、豊島靖子、吉田豊、高橋均、小野寺理、西澤正豊：Actin 結合蛋白 L-plastin は、ポリグルタミン病で増加する 日本分子生物学会 12月 2005 福岡

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## アデノ随伴ウイルスをもちいた shRNA 導入によるポリグルタミン病モデルマウス治療の試み

分担研究者 貫名 信行

町田 陽子<sup>1)</sup>、岡田 尚巳<sup>2)</sup>、黒沢 大<sup>1)</sup>、小山 文隆<sup>1)</sup>、小澤 敬也<sup>2)</sup>

1) 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム

2) 自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部

**研究要旨** ポリグルタミン病の治療として蛋白発現の抑制、ミスフォールディングの阻害、分解の促進などの可能性が考えられる。本年度は遺伝子抑制による治療効果について検討した。ハンチンチンエクソン1 (190Q) と EGFP の融合蛋白を発現するトランスジェニックマウス 190QG を用いた。このマウスは核内、細胞質に封入体を形成し、細胞質封入体は蛍光を示すためその分布の同定が容易である。このマウスに EGFP に対する shRNA を、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて線条体に導入し、凝集体形成に対する影響を検討した。ウイルスを 1 2 週に感染させ、その効果を 2 4 週において検討した。封入体形成は線条体において 12 週においてすでに明らかであるが、24 週においてはその数は非処理の 12 週時の封入体よりも減少していた。以上の結果から病変の可逆性が示唆された。

### A. 研究目的

CAG リピート病はその病因遺伝子に CAG のリピートを含み、リピートの伸長を認める一群の神経疾患である。CAG リピートが病因遺伝子の翻訳領域に存在するため CAG リピートから翻訳されたポリグルタミンが病態に強くかかわっていると想定され、ポリグルタミン病とも呼ばれる。ポリグルタミン病の神経細胞の核にはポリグルタミンからなる封入体が存在することが確認され、これらの封入体、凝集体と神経細胞変性の関連が注目されている。遺伝性脊髄小脳失調症の多くがポリグルタミン病であり、共通の機序に基づく点から治療法の開発はこれらの疾患の共通の治療につながる可能性がある。本研究ではポリグルタミン病の治療を蛋白発現の抑制、ミスフォールディングの阻害、分解の促進などの観点から検討する。これまで我々は凝集体形成を抑えるという観点から、*in vitro* で凝集体形成抑制効果のあるトレハロースの効果を検討してきた。In vivo での効果に従来の報告されているものに比較して顕著な改善がみられないことから、より上流で異常遺伝子発現を抑えることによりどの程度の効果が期待されるかについて検討することとした。

### B. 研究方法

モデルマウス：ハンチンチンエクソン1 (190Q) と EGFP の融合蛋白を発現するトランスジェニッ

クマウス 190QG を用いた (1)。マウスは進行性の神経症状と病理学的には核内封入体などの凝集体形成を示し、とりわけ細胞質凝集体については EGFP による蛍光を示した。また寿命の減少を認めた。

rAAV の作成：EGFP のシーケンスに基づきこれを抑える shRNA の候補シーケンスを 10 ほど作成し、pEGFP ベクターの発現への影響を検討した。これによって効果のもっとも強いシーケンス (shEGFP) と影響のないシーケンス (shEGFPcontrol) を選んだ。U6 プロモーターの下流にこれをつなぎ、さらに mRFPcDNA を同時に発現するように CMV プロモーターを用いてコンストラクトを作成した。これを rAAV に組み込みウイルスを調整した。作成したウイルスの効果は HEK293 細胞に発現した 16, 60, 150Q-EGFP への抑制効果で確認した。

ウイルスの脳への導入：12 週の 190QG の線条体に 3 $\mu$ l のウイルスを一側に導入し、対側に PBS を同量導入した。

ウイルスの導入の確認と凝集体の同定：マウス脳をパラホルムアルデヒド固定し、40 ミクロンの切片を作成し、MOLECULAR IMAGER FX によって GFP, RFP のシグナルを検出した。

免疫染色：40 ミクロンの切片を抗 RFP, GFP, Ubiquitin 抗体によって染色し、ABC ELITE KIT で検出した。この組織を用いて MACVECTOR で凝集

体の検出を行った(2)。

フィルタートラップアッセイ：線条体と海馬のサンプルを用いてフィルタートラップアッセイを行い GFP, htt 抗体を用いてトラップされた凝集体量を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては理研動物実験指針に基づき行った。

### C. 研究結果

in vitro screening によって shEGFP, shEGFP control を決定し、これに基づき AAV vector を作成した。HEK293 細胞における検討では shEGFP が EGFP の蛍光を十分抑制することが確認された。

マウスに rAAV-shEGFP を 12 週齢で導入し、24 週齢で効果を検討した。RFP の蛍光は導入した部位を中心に観察され、感染細胞の同定が可能であった。GFP の凝集体による蛍光は対照実験側では観察されたが、shRFP 導入側では減少していた。

さらに GFP, htt, Ubiquitin 抗体による封入体の同定によってもそれぞれ対側の 19%, 18%, 34%程度まで減少していた。この減少は導入時の 12 週のマウスの封入体数よりも減少していた。フィルタートラップアッセイの結果もこれらの結果を確認するものだった。

さらに線条体において比較的初期から発現の減少する DARPP-32 の遺伝子発現を in situ hybridization において検討したところ、ウイルス導入側では遺伝子発現の減少が部分的ではあるが減弱していた。

### D. 考察

本研究において我々はポリグルタミン病に伴う異常所見である不溶性蛋白の集積や DARPP-32 の発現異常が RNAi の導入によって改善することを示した。すでに RNAi の導入による遺伝子発現抑制に基づく治療の試みはいくつかのポリグルタミン病モデルマウスを用いて行われている。これまでの研究では発症前の導入が主であり、病理所見の可逆性を示すものはない。すなわち遺伝子発現を抑えたことによる凝集体形成の遅延効果とその効果である可能性を示すものである。一方本研究では凝集体の数の減少は遺伝子導入時点よりも減少していることから、凝集体は遺伝子の抑制によって新たな凝集体形成が抑制されるの

みでなく、形成された凝集体も細胞内の処理機構によって処理され、減少していることが示唆された。遺伝子発現をコントロールできるトランスジェニックマウス(3)の検討から、異常遺伝子発現をオフにすると凝集体形成が減少することが示唆されていたが、本研究の結果は AAV を用いた遺伝子抑制によっても同様の効果が認められることを示し、今後の治療の方向性を示すものである。また本研究においては運動機能や寿命に対する影響は病理学的変化の検討を優先したために行えなかったが、遺伝子抑制が著明な DARPP-32 の変化が減弱していることから凝集体形成が遺伝子発現に影響を与えており、この発現変化は不可逆的なものではないことが示唆された。

### E. 結論

AAV を用いた shRNA 導入による異常遺伝子発現抑制はポリグルタミン病において凝集体形成などの病理変化を来した後でも病変の可逆性を示し、今後異常遺伝子の選択的遺伝子抑制と広汎な遺伝子導入の手法の開発が重要な課題と考えられた。

### 文献

- 1) Kotliarova, S., Jana, N.R., Sakamoto, N., Kurosawa, M., Miyazaki, H., Nekooki, M., Doi, H., Machida, Y., Wong, H.K., Suzuki, T., Uchikawa, C., Kotliarov, Y., Uchida, K., Nagao, Y., Nagaoka, U., Tamaoka, A., Oyanagi, K., Oyama, F. & Nukina, N. Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in Huntington disease transgenic mice with expanded polyglutamine-EGFP fluorescent aggregates. *J Neurochem* (2005) **93**, 641-653.
- 2) 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* (2004) **10**, 148-154.
- 3) Yamamoto, A., Lucas, J.J., & Hen, R. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* (2000) **101**, 57-66.

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R. & Julien, J.P. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* (2006) **9**, 108-118.
  - 2) Iwata, A., Christianson, J.C., Bucci, M., Ellerby, L.M., Nukina, N., Forno, L.S. & Kopito, R.R. Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) **102**, 13135-13140.
  - 3) Chang, W.H., Cemal, C.K., Hsu, Y.H., Kuo, C.L., Nukina, N., Chang, M.H., Hu, H.T., Li, C. & Hsieh, M. Dynamic expression of Hsp27 in the presence of mutant ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **336**, 258-267.
  - 4) Kotliarova, S., Jana, N.R., Sakamoto, N., Kurosawa, M., Miyazaki, H., Nekooki, M., Doi, H., Machida, Y., Wong, H.K., Suzuki, T., Uchikawa, C., Kotliarov, Y., Uchida, K., Nagao, Y., Nagaoka, U., Tamaoka, A., Oyanagi, K., Oyama, F. & Nukina, N. Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in Huntington disease transgenic mice with expanded polyglutamine-EGFP fluorescent aggregates. *J Neurochem* (2005) **93**, 641-653.
  - 5) Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P. & Nukina, N. beta subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* (2005) **280**, 23009-23017.
  - 6) Jana, N.R. & Nukina, N. BAG-1 associates with the polyglutamine-expanded huntingtin aggregates. *Neurosci Lett* (2005) **378**, 171-175.
  - 7) Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K. & Nukina, N. Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem* (2005) **280**, 11635-11640.
  - 8) Ikeda, T., Kurosawa, M., Uchikawa, C., Kitayama, S. & Nukina, N. Modulation of monoamine transporter expression and function by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **327**, 218-224.
2. 学会発表
- 1) Doi, H., Okamura, K., Bauer, P.O., Kuroiwa, Y. & Nukina, N. Novel polyglutamine aggregate interacting protein and its effect on amyloid formation. [Program Number: 1008.16] The Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual Meeting (Neuroscience 2005), Washington, DC, USA (November 2005).
  - 2) Wong, H., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P. & Nukina, N. Beta-Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of BACE1 and gamma-secretase. [Program Number: 326.2] The Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual Meeting (Neuroscience 2005), Washington, DC, USA (November 2005).
  - 3) Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P. & Nukina, N. Beta subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of BACE1 and gamma-secretase. *Neurosci Res* **52** Suppl, P1-249 (2005) 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2005), 横浜 (2005年7月).
  - 4) 宮崎晴子, 小山文隆, 町田陽子, 金子貢巳, 黒沢大, 玉岡晃, 櫻井隆, 貫名信行. ナトリウムチャネル $\beta$ 4サブユニット:ハンチントン病モデルマウスにおける発現低下に関



する研究. [Sodium channel beta 4 subunit: downregulation and possible involvement of neuritic degeneration in huntington disease transgenic mice. *Neurosci Res* 52 Suppl, P1-269 (2005)] 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2005), 横浜 (2005 年 7 月).

- 5) 櫻井隆, 奥野弥佐子, 金子貢巳, 和田浩司, 貫名信行. BACE1 を含むマウス脳由来膜ラフトのプロテオーム解析. [Proteomic analysis of mouse brain lipid rafts containing BACE1. *Neurosci Res* 52 Suppl, 2-273 (2005)] 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2005), 横浜 (2005 年 7 月).
- 6) 貫名信行. ポリグルタミン凝集体の構造異常とその病体における意義. [Structural features and pathological roles of polyglutamine aggregates. *Neurosci Res* 52 Suppl, SY3-06-5 (2005)] 第 28 回日本神経科学大会 (Neuroscience 2005), 横浜 (2005 年 7 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

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  
ハンチントン病モデルマウスを用いた試み

分担研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所部長

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' 側近傍領域の配列を元に設定した shRNA 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 shRNA 発現プラスミド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。この進行抑制効果は昨年度報告した裸二重鎖 siRNA 投与の効果を上回った。以上より、RNAi 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 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 shRNA 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 5' 側近傍領域の特異配列を標的に二重鎖干渉 RNA (siRNA-HDexon1) を合成した。さらにその配列をもとに U6 プロモーターの制御下で当該配列を含む siRNA をヘアピンタイ

プの二重鎖 RNA (shRNA) として発現する 3 種のプラスミドベクターを作成した。それぞれの shRNA 発現プラスミド DNA 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 HEK293 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 shRNA 発現プラスミド (U6-shHD-3) を生後 2 日の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。プラスミド DNA は細胞実験の場合は 2 ng から 2 µg を Lipofectamine 2000 を用いた transfection で、個体実験の場合は ExGen 500 と混合し 200 ng を直接注入した。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。さらに当

該 shRNA を発現する AAV ベクターを開発し、ハンチンチン遺伝子に対する抑制効果を前述の融合蛋白質（但し GFP に代わり DsRed を使用）を一過性に発現する HEK293 細胞と、R6/2 マウスで検討した。

（倫理面への配慮）

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

### C. 結果

3 種類の shRNA プラスミドはその投与により HEK293 細胞においてそれぞれハンチンチン+GFP 融合タンパク質の発現を抑制したが、そのうち U6 プロモーター下流に標的配列に対するアンチセンス配列が最初に位置するように挿入された発現プラスミド U6-shHD-3 が最も効果を示した。すなわち、U6-shHD-3 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、プラスミド量において 2 ng から有効性を示した。U6-shHD-3 を投与した R6/2 個体はコントロールプラスミド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。その効果は昨年度報告した合成 siRNA (HDexon1) の直接投与よりも優れていた。また、尾吊り下げ試験、rotarod 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。また AAV-shRNA-HD3 ( $1.2 \times 10^{11}$  pfu/ml)

はハンチンチン+蛍光蛋白質の融合蛋白質の発現を抑制し、R6/2 マウス線条体(6 から 8 週令)への直接投与では神経細胞核内におけるハンチンチン凝集体形成を抑制した。

### D. 考察

以上の結果は、我々が開発したヒトハンチンチン遺伝子に対する shRNA が培養細胞においても動物個体においてもヒトハンチンチン遺伝子の発現抑制に有効性を持つことを示す。さらに、生後二日のモデルマウス R6/2 への投与において症状進行の抑制が認められたことから、我々の実験系において当該 shRNA は治療効果を持つと考える。成体投与に対する更なる検討が今後必要であるが、少なくとも今回の結果は生後二日という早期の治療がモデルマウスの場合有効であることを示している。当該 shRNA を発現する AAV ベクターも開発でき、ハンチンチン遺伝子に対する発現抑制効果が成体モデルマウスで確認できたので、今後は AAV ベクター投与による治療実験を生直後のマウスはもとより成体のモデルマウスにおいても行う予定である。

### E. 結論

ヒトハンチンチン遺伝子発現抑制に効果的な shRNA を開発した。当該 shRNA を用いた RNAi はハンチントン病治療の有効なツールになる可能性が高いと考える。

### F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Wang, Y.L., Liu, W., Wada, E.,  
Murata, M., Wada, K. Kanazawa, I.,  
Clinico-pathological rescue of a model  
mouse of Huntington's disease by siRNA.  
**Neurosci. Res.**, 53, 241-249, 2005

### 2. 学会発表

Liu, W., Wang, Y.L., Wada, K.,  
Murata, M., Mochizuki, H., Wada, K.,  
Kanazawa, I. RNAi treatments at early  
development stages yield significant  
beneficial effects in Huntingtons disease  
model mice. 35<sup>Th</sup> Annual Meeting of Society  
for Neuroscience, Washington DC, USA,  
11.12, 2005

## H. 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