

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

小脳失調症に対するリハビリテーションに関する研究

分担研究者 宮井一郎 特定医療法人大道会森之宮病院院長代理
祖父江元 名古屋大学神経内科
研究協力者 服部憲明、矢倉一、畠中めぐみ、田中尚（森之宮病院神経リハ研）
伊藤瑞規 名古屋大学神経内科

研究要旨 ①小脳失調患者のトレッドミル歩行時の大脳活動を functional near-infrared spectroscopy (fNIRS)で測定した。健常人ではトレッドミルの加速相に内側感覚運動野、運動前野、前頭前野活動が増加したが、歩行継続と共に低下した。運動失調患者では定速歩行時にも、特に前頭前野の活動が持続した。天幕下病変による失調性歩行は大脳皮質の代償的調節で維持されていることが示唆された。②小脳変性症患者に対する短期集中型の入院リハビリテーション(リハ)が、小脳失調や日常生活動作(ADL)能力に改善に有効かを検証するための多施設無作為比較研究を開始した。対象は小脳失調を徴候とする SCA6,16qADCA および LCCA 患者。介入として一日に60分の理学療法および作業療法を4週間行い、リハの短期効果はクロスオーバーデザインの RCTmその後は両群で介入終了後6カ月までのキャリーオーバーを検証する観察研究とした。今後、患者登録を順次行っていく予定である。

A. 研究目的

近年、課題指向型練習の繰り返しが運動機能回復や運動学習成立に寄与すること、脳卒中などの単相性の脳損傷後の機能回復がリハビリテーション(リハ)介入量に依存することが明らかになってきた。一方、小脳変性症に対するリハでは、運動学習の首座の一つである小脳が障害された状態でこのような原則が成立するかは不明であること、介入による機能改善と病変の拡大や病状の進行による機能低下とのトレードの上に成立することに留意する必要がある。しかし、現状では小脳変性症に対して、練習量依存型の効果があるかどうか検討されていない。①そこでまず失調性歩行の神経機構を調べる目的で、小脳に損傷や機能障害が存在する場合は大脳皮質の役割が代償的に増加するという仮説を検証した。②次に小脳変性症

者に対する短期集中型の入院リハが、小脳失調や日常生活動作(ADL)能力の改善に有効かを検証するための多施設無作為比較研究の患者登録を開始した。

B. 研究方法

①小脳失調患者の歩行時の大脳活動を fNIRS で測定し健常人と比較した。対象は天幕下の初回脳卒中により失調を呈した右利き患者8例(53±10才; 出血4例,梗塞4例; 小脳半球6,脳幹2,延髄1; 男7,女1)と健常右利き対照8例(45±13才; 男7,女1)である。課題構成はトレッドミル上で歩行と休憩を交互に3回繰り返すブロックデザインとした。大脳皮質活動の指標には酸素化ヘモグロビン(oxyHb)の濃度変化を用いた。

②対象は小脳失調を主徴候とする脊髄小脳変性症(SCA6,16qADCA および LCCA)のうち、

介助者が1人以下で歩行可能で、認知機能障害がない患者を対象とした。リハ介入として一日に60分の理学療法および60分の作業療法による基本動作、ADL練習を4週間入院しておこなうものとした。介入のまったくない対照群をおくことが事実上、困難であるため、①4週間の経過観察後、4週間のリハを行う群と4週間のリハ後、経過観察をおこなう群に無作為に割り付けをして短期効果を検証し、②その後は両群で介入終了後6カ月までのキャリーオーバーを検証するデザインとした。基礎データは特定疾患申請書の内容、アウトカムとして主要項目はSARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia)、FIM (Functional Independence Measure)、副次項目は歩行速度、ケーデンス、Functional Ambulation Category、過去4週間の転倒回数を設定した。患者紹介は近畿地区の神経学会認定施設を中心に協力依頼した。評価は協力病院の担当者で行い、入院リハは森之宮病院で行うものとした。目標症例50例、最終登録2009年8月末、最終対象者観察完了2010年2月末を予定している。

(倫理面への配慮)

研究協力がえられた各施設の倫理委員会で承認後、被検者に介入・評価方法や安全性について説明し、書面でInformed consentを得た。

C. 研究結果

①健常者・失調患者ともに加速中は内側一次運動野、補足運動野を中心に運動前野、前頭前野にoxyHb上昇が認められた。健常者では定常歩行時に脳活動が低下したが、失調患者では定常歩行時にもこれらの領域の脳活動が持続した。天幕下病変による失調性歩行は大脳皮質の代償的調節で維持されていることが示唆された。②本研究に対し、近畿地区の神経学会認定施設51施設を中心に協力依頼し、17施設の協力を得た。今後、患者登録を順次行っていく予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyai I, Suzuki M, Hatakenaka M, Kubota K. Effect of body weight support on cortical activation during gait in patients with stroke. *Exp Brain Res* 2006; 169(1):85-91.
2. Yagura H, Hatakenaka M, Miyai I. Does therapeutic facilitation add to locomotor outcome of BWSTT in nonambulatory patients with stroke? A randomized controlled trial, *Arch Phys Med Rehab* 2006;87(4):529-535.
3. Hatakenaka M, Miyai I, Mihara M, Sakoda S, Kubota K. Frontal regions involved in learning of motor skill -A functional NIRS study-. *NeuroImage* 2007;34(1):109-116.
4. Hatakenaka M, Miyai I, Sakoda S, Yanagihara T. Proximal paresis of the upper extremity in patients with stroke. *Neurology* 2007;69:348-355.
5. Yagura H, Miyai I, Hatakenaka M, Yanagihara T. Inferior olivary hypertrophy is associated with lower functional state after pontine hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:369-374.
6. Mihara M, Miyai I, Hatakenaka M, Sakoda S, Kubota K. Sustained prefrontal activation during ataxic gait: A compensatory mechanism for ataxic stroke? *Neuroimage* 2007;37:1338-45.
7. Kohno S, Miyai I, Seiyama A, Oda I, Ishikawa A, Tsuneishi S, Amita T, Shimizu K. Removal of the skin blood flow artifact in functional near-infrared spectroscopic imaging data through independent component analysis. *Biomedical Optics* 2007;12:062111-1-9.
8. Suzuki M, Miyai I, Ono T, Kubota K. Activities in the frontal cortex and gait performance are modulated by preparation. An fNIRS study. *NeuroImage* 2008;39:600-607.
9. Miyai I. Longitudinal optical imaging study for locomotor recovery after ischemic stroke. State-of-the-art-imaging in stroke. The present state and implication on future. Schaller B ed., Nova Science Publisher, New York, 2008, in press.

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危険情報

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)

総合研究報告書

運動失調症に関する調査研究班

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 研究資源有効利用室
研究協力者 鈴木康予、中山貴美子 国立長寿医療センター 研究資源有効利用室

研究要旨

今日、脊髄小脳変性症の神経変性に対する根本的な治療法は確立していない。脊髄小脳変性症は遺伝性と非遺伝性の2つの疾患群があり、本研究では両者を併行して研究することにより運動失調の病態を解明する。遺伝性脊髄小脳変性症であるポリグルタミン病の治療を開発する上で、原因遺伝子産物である蛋白の構造や機能の解析は重要である。本研究では歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)について DRPLA 蛋白の解析を行った。非遺伝性の脊髄小脳変性症である多系統萎縮症(MSA)では、 α -synuclein (Syn)が蓄積する。MSA の発病機序を解明するために、MSA の病理を備えたモデルマウスが得られ神経細胞の変性機序を検討し、神経細胞の変性には Syn の蓄積が関与することを示した。MSA の発病機序の解明のためにモデルマウスを使ってマウス脳から初代培養系を確立し、MSA の治療開発の研究の準備が整った。今後、細胞レベルの治療、モデル動物の治療、さらにヒトへの応用と治療に関する研究を段階的に進め、治療法の開発をめざす。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症は運動失調を主徴とする疾患群で、大部分が発病の機序が解明されていない難治性疾患である。今日、症状を緩和する治療は存在するが、神経変性に対する根本的な治療法は確立していない。本研究は、脊髄小脳変性症に起こる長期臥床状態を予防し発病を遅らせるための方法を開発することを目的とする。脊髄小脳変性症には遺伝性と非遺伝性の2つの疾患群があり、アルツハイマー病等の他の神経変性疾患と同様に遺伝性脊髄小脳変性症から発病機序に関する研究は進んだ。代表的疾患はポリグルタミン病とよばれる疾患で、原因遺伝子に伸長する3つの繰り返しコドンをもつ。ポリグルタミン病では、神経細胞の核内で伸長ポリグルタミンが毒性を有し、神経細胞の変性を起こすことが示されたが、神経変性の機序は解明されていない。一方、非遺伝性の脊髄小脳変性症では遺伝子変異などの重要な原因究明の手がかりがなく、発病機序の研究は遅れているのが現状である。そこで本研

究では、脊髄小脳変性症の治療法を開発するために、遺伝性の脊髄小脳変性症として歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、非遺伝性の脊髄小脳変性症として多系統萎縮症(MSA)の発病機構に関する研究を行った。2つの脊髄小脳変性症の研究を並行して行うことにより、共通する機序や運動失調の病態に対する治療法の開発をめざした。

B. 研究方法

ポリグルタミン病では神経細胞に起こる核内封入体の発見と、伸長ポリグルタミンと核内転写因子の結合による転写障害の解明により、RNA 干渉法を用いた原因遺伝子の発現調節による治療法が検討されている。ポリグルタミン病の1つである DRPLA でも同様の治療アプローチが考えられるが、DRPLA 遺伝子産物である DRPLA 蛋白は性質や機能が解明されていない未知の蛋白であり、発現調節等の治療法を開発するためには DRPLA 蛋白の解析は欠かせない。DRPLA 蛋白は、1995年矢澤らにより同定された蛋白で DRPLA 遺伝子が転写・翻訳され、ヒト中枢神経等に広く分布する

蛋白である(*Nature Genet.*, 1995)。DRPLA 蛋白は伸長するポリグルタミンを有するが、特異な電気泳動移動度を示し神経細胞内の局在など不明な点が多い。本研究では、DRPLA 蛋白の構造を明らかにするために、*E. coli* や COS-7 細胞で発現したリコンビナント DRPLA 蛋白に関する検討を行った。ヒト cDNA ライブラリーから DRPLA 蛋白遺伝子をクローニングし、*E. coli* と COS-7 を用いた発現系の構築を行った。

MSA では小脳や脊髄、大脳など中枢神経の障害は多岐に及ぶ。オリゴデンドロサイトに α -synuclein (Syn) が蓄積し、神経細胞にも Syn が蓄積する。本研究では MSA の発病機序を解明するために、MSA の病理を備えたモデルマウスを使って神経細胞に起こる Syn 蓄積の機序を検討した。MSA に起こる Syn 蓄積を予防する方法を開発し、MSA の治療法を開発することをめざした。

C. 研究結果

ヒト DRPLA 遺伝子を *E. coli* と COS-7 を使って発現すると、リコンビナント DRPLA 蛋白は各々異なる蛋白切断を受けた。*E. coli* ではリコンビナント DRPLA 蛋白の N 端側のフラグメントにポリグルタミンが含まれるが、COS-7 では C 端側に含まれ異なる切断が示された。

MSA モデルマウスの神経細胞の変性には Syn の蓄積が関与する。矢澤らは、マウス脳のオリゴデンドロサイトに特異的にヒト野生型 Syn を強制発現するトランスジェニック(TG)マウスを作製し、マウスに起こる中枢神経病理の分布や病理所見が MSA に類似することから疾患モデルマウスとして報告した(*Neuron*, 2005)。さらに、TG マウスでは加齢とともに中枢神経系に進行性の神経細胞の変性が起こり、神経細胞の変性にはマウス内因性 Syn の蓄積が関与した。TG マウス脳由来の初代培養を確立し、TG マウスに起こる Syn 蓄積の機序を検討した。ヒト組織と同様に、Syn の不溶化を明らかにした。

D. 考察

遺伝性及び非遺伝性の脊髄小脳変性症の治療法の開発に向けた基礎的研究をおこなった。今後、細胞レベルの治療、モデル動物の治療、さらにヒトへの応用と治療に関する研究

を段階的に進める。

E. 結論

- DRPLA の治療法を開発するためには、DRPLA 蛋白の詳細な検討が必要である。
- MSA の治療法を開発するために有用な疾患モデル動物及び細胞を作製した。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

Uryu, K., Richter-Landberg, C., Welch, W., Sun, E., Goldbaum, O., Norris, E.H., Pham, C.-T., Yazawa, I., Hilburger, K., Giasson, B.I., Bonini, N., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. Convergence of Hsp90 with ubiquitin in filamentous alpha-synuclein inclusions of alpha-synucleinopathy. *Am. J. Pathol.* 168, 947-961, 2006.

矢澤生. 脳バンク 日本における現状と問題点. 医学のあゆみ. 220 巻, 820-823 頁, 2007 年

2. 学会発表

Suzuki, Y., Nakayama, K., and Yazawa, I. Overexpression of human DRPLA protein by *E. coli*. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOPMP Congress, Kyoto, June 2006

中山貴美子, 鈴木康予, 矢澤生. 多系統萎縮症モデルマウスにおける神経細胞内 α -synuclein 複合体の動態解析. 第 30 回日本神経科学大会, 横浜, 2007 年 9 月 11 日

鈴木康予, 中山貴美子, 矢澤生. 異なる発現系で産生される DRPLA 原因遺伝子産物の比較. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(BMB2007), 横浜, 2007 年 12 月 13 日

G. 知的財産権の出願・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）

分担研究年度終了報告書（3年度分まとめ）

運動失調症に関する調査研究

SCA10の病態機構・ATXN1遺伝子のCAGリピート分子進化

分担研究者	松浦 徹	名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学講座
研究協力者	黒崎 辰昭 大野 欽司 芦澤 哲夫 植田 信太郎	名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学講座 名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学講座 Dept Neurol, University of Texas Medical Branch 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

研究要旨

1. 優性遺伝性非翻訳領域リピート病である脊髄小脳変性症 10 型 (SCA10) の病態メカニズムを解析した。その遺伝子変異である ATTCT expansion は AUUCU を含む pre-mRNA に転写されることから、AUUCU RNA gain-of-function が、その本態である可能性が高い。また SCA10 expansion は必ずしも pure ATTCT repeat stretch ではなく、高頻度に interruption をもつ事が明らかになった。その有無は表現型や不安定性に影響を与える。
2. 霊長類 *ATXN1* における CAG リピート比較解析を行い、系統特異的な差を明らかにした。CAG リピートは新世界ザル分岐後の共通祖先段階に出現し、類人猿、ヒトにおいて比較的長いリピートが見られた。*ATXN1* において、ヒトや類人猿は神経疾患の危険性を増大させる方向に進化したと考えられる。リピート伸長に伴う機能的優位性の有無や、他のリピート病原因遺伝子における分子進化は今後さらに解明されるべき課題である。

A. 研究目的

1. SCA10 の原因遺伝子変異は *ATXN10* 遺伝子イントロン 9 の ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である。ATTCT expansion が、どのような機序で SCA10 を発症させるのか、更にその不安定性メカニズムについて解析する。
2. SCA1 の CAG リピートはげっ歯類において存在しないが、ヒト正常コントロールにおいて 6-44 の範囲に分布を見せる。その不安定性機構に関する知見を得るため霊長類内でリピート配列の比較解析を行い、ヒト進化におけるリピート配列の起源と分子進化様式を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. *Sca10* ノックアウトマウスの作製と神経行動学・神経病理学解析を施行した。さらに *ATXN10* 異常スプライシング解析と *ATXN10*

転写物やその周辺遺伝子の定量化を行なった。FISH 法を用いて AUUCU 凝集物の同定を試みた。更に SCA10 expansion のシーケンス解析を試みた。

2. 霊長類 26 種の *ATXN1* CAG リピート配列を決定した。更にその DNA 二次構造比較解析を行った (DNA mfold プログラム)。CAG リピート伸長に伴う分子間相互作用変化を解析するため、大腸菌内で組み替えタンパク質を発現後カラムクロマトグラフィーで精製し、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) にて解析した。

C. 研究結果

1. *Sca10*-null heterozygous は WT と比べ異常行動などを認めず、8 か月齢での RotaRod テスト、神経組織所見も WT と比べて差がなかった。つまり、SCA10 病態を考える上で、*ATXN10* 遺伝子ハプロ不全を支持する結果を

得なかった。*ATXN10* スプライシングは正常で、*ATXN10* 転写物や周辺遺伝子発現にも異常はなく、AUUCU 核内凝集物を認めるので、AUUCU RNA gain-of-function が SCA10 病態である可能性が高い。また、SCA10 expansion は高頻度に interruption をもつ事が明らかになり、その有無は表現型や不安定性に影響を及ぼすことを明らかにした。

2. CAG リピートは旧世界ザル・類人猿・ヒト共通の遺伝的形質であり、新世界ザル・原猿のモザイク状リピートに比べリピート数多様性が大きく、霊長類進化の過程で伸長する傾向にある。また比較的リピートの長い類人猿において interruption が配列内に出現してくる。CAG リピートはヘアピン構造を形成し、リピート長依存的にその構造は安定化するが interruption の存在で不安定化する。SPR 法により、ATXN1 は CAG リピート伸長獲得に伴い polyQ binding protein 1 (PQBP1) との相互作用を得たと考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuura T, Fang P, Pearson CE, Jayakar P, Ashizawa T, Roa BB, Nelson DL. Interruptions in the expanded ATTCT repeat of spinocerebellar ataxia type 10. Repeat purity as a disease modifier? *Am J Hum Genet* 2006; 78:125-129.

2) Wakamiya M, Matsuura T, Liu Y, Shuster GC, Gao R, Xu W, Sarkar P, Lin X, Ashizawa T. The role of ataxin 10 in spinocerebellar ataxia type 10 pathogenesis. *Neurology* 2006; 67: 607-613.

3) Alonso I, Jardim LB, Artigas O, Saraiva-Pereira ML, Matsuura T, Ashizawa T, Sequeiros J, Silveira I.

Reduced penetrance of intermediate size alleles in spinocerebellar ataxia type 10. *Neurology* 2006; 66: 1602-1604.

4) Gao R, Matsuura T, Coolbaugh M, et al. Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur J Hum Genet* 16: 215-222, 2008

5) Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Long-range PCR for the diagnosis of spinocerebellar ataxia type 10. *Neurogenetics* in press.

2. 学会発表

1) 松浦 徹、大野 欽司、David L. Nelson. SCA10 ATTCT 異常伸長の interruption は disease-modifier か? 第 47 回日本神経学会総会 5月 2006 東京

2) Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Comparative analysis of the SCA10 ATTCT pentanucleotide repeat indicates the repeat sequence originates from retrotransposons. American Society of Human Genetics, 56th Annual Meeting, New Orleans, USA, 2006, October 9-13.

3) Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Comparative analysis of the ATTCT pentanucleotide repeat in *ATXN10* gene reveals that the pathogenic repeat derived from *A/u*. Society for Molecular Biology and Evolution 2007 Annual Meeting, Halifax, Nova Scotia, Canada, 2007, July 24-28.

E. 知的財産権の出願・登録状況

Title: DNA TEST FOR SCA-10

USPTO#6,885,497; issued February 15, 2005, date of license May 25, 2006.

増大ポリグルタミン鎖の細胞障害性をもつ構造の探索

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

菊地信矢 (新潟大学脳研究所神経内科学分野)、堅田慎一 (新潟大学脳研究所神経内科学分野)、
高橋俊昭 (新潟大学医学部生体情報学講座) 西澤正豊 (新潟大学脳研究所神経内科学分野)

研究要旨

ポリグルタミン病は、原因遺伝子内のグルタミン繰り返し配列の異常伸長による一連の神経変性疾患群であるが、増大したポリグルタミン鎖による細胞障害性の機序については解明されていない。本研究では、FRET (fluorescence resonance energy transfer) 技術を用いて、増大ポリグルタミン鎖のオリゴマーを可視化することに成功し、オリゴマーが細胞障害性を持つことを明らかにした。一方、封入体は、細胞障害性に対し防御的であることを示した。オリゴマーの形成は、本疾患の分子病態の解明や治療ターゲットとしても重要な意義をもつと考えた。

A. 研究目的

ポリグルタミン病では核内封入体の形成が病理学的に特徴とされ、細胞死を引き起こすとされてきた。しかし、近年、核内封入体は、細胞死に対しむしろ抑制的、予防的に働いており、封入体の形成前に生じる増大ポリグルタミン鎖によるオリゴマーが細胞障害性を獲得する可能性が示唆されている¹⁾²⁾。

本研究は、蛋白質相互作用の解析に広く用いられるFRET法(fluorescence resonance energy transfer)を応用し³⁾、封入体形成に先行するポリグルタミンオリゴマーを可視化し、ポリグルタミンオリゴマーの細胞障害性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

ポリグルタミン鎖(部分DRPLA蛋白およびハンチンチン exon1)に mCFP (donor), mYFP (acceptor) を付加したプラスミドを作成し parallel および anti-parallel の組み合わせの下で培養細胞(COS7)に一過性導入し共焦点レーザー顕微鏡 (CSU10) を用いFRET解析を行った⁴⁾。

さらに増大ポリグルタミン鎖を安定発現する SH-SY5Y 細胞株を確立し、レチノイン酸、BDNF 添加により神経細胞に分化誘導後、FRET 陽性細胞群、FRET 陰性細胞群、封入体形成群の 3 群において、各群の細胞生存期間を観察した。

C. 結果

ポリグルタミン鎖は parallel の組合せの時のみ蛋白間相互作用を示した。すなわち、FRET は蛍光蛋白 (donor, acceptor) がポリグルタミン鎖の同じサイドに結合された construct 同士の組み合わせにおいてのみ観察された。ポリグルタミン鎖によるダイマーは、parallel に配置(互いに N 末、C 末をそろえて蛋白間結合)、あるいは cylindrical β -sheet 構造をとっている可能性が示唆された。

ポリグルタミン鎖は、グルタミン伸長数依存性に FRET 陽性細胞の出現頻度が増加し、かつ FRET 値も増加し正の相関を認めた。

この手法を用い、生細胞内でポリグルタミン鎖発現細胞を 1) FRET 陽性細胞(オリゴマー形成細胞) 2) FRET 陰性細胞(オリゴマー非形成細胞) 3) 封入体陽性細胞の 3 群に判別しえた。

オリゴマーの細胞毒性を検討するために、ポリグルタミン鎖安定発現 SH-SY5Y 細胞でこれらの 3 群間 (FRET 陽性細胞、FRET 陰性細胞、封入体形成細胞) において生存日数を検討した。

その結果、生存日数はそれぞれ 3.0 日、4.0 日、6.0 日であった。すなわち、オリゴマーが形成されている FRET 陽性細胞群では生存期間が有意に短縮し、封入体を形成した細胞群では生存期間が延長していた ($p < 0.0001$)。活性型 Caspase 3 の免疫染色陽性率も、FRET 陽性細胞群では封入体形成群に比べ有意に増加した。

さらに、封入体形成とオリゴマー形成の関連を検

討した。封入体形成がはじまると、封入体の FRET 値が急速に増大するとともに、細胞質の FRET 値および蛍光値は急速に減少した。

D. 考察

従来、ポリグルタミン病は、増大ポリグルタミン鎖による封入体が細胞障害性を持つと考えられてきた。そのため、それをメルクマールに細胞障害機序や治療候補薬剤の検討がなされてきた。

しかし、近年、封入体は細胞毒性を持たないとする知見が集積されつつある。Arrasate らは封入体形成細胞の生存率が、封入体非形成細胞より高いという結果を示し、細胞障害性は封入体を形成しないポリグルタミン鎖にあることを明らかとした²⁾。すなわち、封入体形成前の可溶性のオリゴマーもしくはモノマーの状態のポリグルタミン鎖に細胞障害性があると想定されるに至った。しかし、従来、オリゴマーとモノマーを生細胞下で区別することは困難であり、十分な検証がなされてはいなかった。

我々は、この3年間で、FRET解析法を応用し増大ポリグルタミン鎖によるオリゴマーを生細胞下で可視化する方法を確立した。

さらに、本手法を用い、オリゴマーが形成された細胞ではモノマーや封入体形成細胞に比して、細胞死リスクがより高いことを示した。一方、封入体形成に伴い細胞内オリゴマーは減少し、封入体形成は結果として細胞死に対して防御的に働くことを示した。

今後、オリゴマー形成を阻害する薬剤をスクリーニングすること、また、オリゴマー形成による細胞障害機序が明らかにされることにより、本症の新たな治療方法が開発されることが期待される。

E. 結論

FRET解析を用いて、ポリグルタミン鎖のオリゴマー形成を可視化することに成功した。

ポリグルタミンオリゴマー形成が重要な細胞障害因子であることを示した。

引用文献

1) Ross CA et al. (2003) Proc Natl Acad Sci U S A.

100(1), 1-3.

2) Arrasate M et al. (2004) Nature. 431, 805-810.

3) Xia Z. and Liu Y. (2001) Biophys. J. 81, 2395-2402.

4) Zacharias DA et al. (2002) Science. 296, 913-916.

F. 研究発表

Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. (2007 Nov.) Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. Takahashi et al.

1. 論文発表

Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2008). Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. Hum Mol Genet 17, 345-356.

G. 知的財産権の出願・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)

運動失調症に関する調査研究班

ポリグルタミン病の治療を目的とした基礎研究

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
 研究協力者 ポピエル明子¹、藤掛伸宏¹、岡本佑馬¹、乾 隆²、高橋保夫³、金城政孝⁴、後藤祐児⁵、
 内木宏延⁶、戸田達史¹
¹大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学、²大阪府立大学大学院環境生命科学研究科蛋白質科学、
³㈱オリンパス研究開発センター、北海道大学、⁴北海道大学電子科学研究所超分子分光研究分野、
⁵大阪大学蛋白質研究所蛋白質構造形成、⁶福井大学医学部分子病理学

研究要旨

ポリグルタミン(PolyQ)病では異常伸長 PolyQ 蛋白質がミスフォールディングを起こし、その結果難溶性の凝集体を形成して神経細胞内に封入体として蓄積し、最終的に神経変性を引き起こすと考えられている。我々は PolyQ 病の治療標的解明を目指して蛋白質構造解析を行い、その結果異常伸長 PolyQ 蛋白質モノマーは β シート構造への異常コンフォメーション変移を経て細胞毒性を獲得することを見出し、また FCS 解析により細胞内での PolyQ 蛋白質のオリゴマー形成を明らかにした。そして治療法確立を目指して、低分子化合物ライブラリーからのハイスループットスクリーニングにより約 100 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定し、さらに PTD-QBP1、分子シャペロン誘導剤 17-AAG 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した。本研究により PolyQ 病の治療法の確立へ向けた基礎が築かれた。

A. 研究目的

ポリグルタミン(PolyQ)病はハンチントン病、種々の脊髄小脳失調症など9疾患の総称であり、PolyQ 鎖の異常伸長(>40)により原因蛋白質がミスフォールディングを起こして異常コンフォメーション変移を獲得し、その結果難溶性の凝集体を形成して神経細胞内に封入体として蓄積し、最終的に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 鎖結合ペプチド QBP1 (SNKWVWPGIFD)を同定し、QBP1 が異常伸長 PolyQ 蛋白質の凝集体形成を阻害し、遺伝子発現により PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性が抑制されることを明らかにした。本研究班では PolyQ 病の治療標的解明、治療法確立を目指して、以下の研究を行った。

B&C. 研究方法および結果

①異常伸長 PolyQ 蛋白質の構造異常解明: Thioredoxin-PolyQ 融合蛋白質(Thio-PolyQ)の *in vitro*での構造変化について、様々な構造生物学的解析を行った。その結果、異常伸長 PolyQ 蛋白質はモノマーレベルで β シート構造への異常コンフォメーション変移を生じて、その結果不溶性のアミロイド線維状凝集体を形成し、可溶性 β シートモノマーが細胞毒性を発揮することを見出した。さらに QBP1 は、異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性 β シート変移を阻害して神経変性を抑制

することを明らかにした。また COS-7 細胞に発現する PolyQ-GFP 蛋白質について、蛍光相関分光法(FCS)解析を行った。その結果、異常伸長 PolyQ 蛋白質は、細胞内で経時的かつ PolyQ 鎖長依存的にオリゴマーを形成し、QBP1 はオリゴマー形成を有意に抑制することを示した。

②細胞膜透過性 PTD-QBP1 による PolyQ 病モデルの分子治療:細胞膜透過性シグナル(PTD)を付加した PTD-QBP1 を PolyQ 病モデルショウジョウバエに経口投与したところ、封入体形成の有意な抑制と寿命短縮の改善を認めた。

③PolyQ 凝集阻害化合物のハイスループットスクリーニング: *In vitro*での Thio-PolyQ 凝集濁度アッセイを用いて、大規模な低分子化合物ライブラリー(46,000 個)からハイスループットスクリーニングを行い、約 100 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。

④分子シャペロン誘導剤を用いた PolyQ 病モデルの治療:蛋白質ミスフォールディングを補正する分子シャペロンの発現誘導剤を PolyQ 病モデルショウジョウバエに経口投与したところ、geldanamycin およびその誘導体 17-AAG が濃度依存的に分子シャペロン Hsp70/40 の発現を誘導し、封入体形成・複眼変性を有意に抑制した。

(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。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O. Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 17, 345-356 (2008)
- 2) Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, Fujikake N, Toda T, Kinjo M, *Nagai Y. Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 282, 24039-24048 (2007)
- 3) *Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, et al. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nature Struct Mol Biol* 14, 332-340 (2007)
- 4) Popiel HA, *Nagai Y (equal contribution), Fujikake N, Toda T. Protein transduction domain-mediated delivery of QBP1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration *in vivo*. *Mol Ther* 15, 303-309 (2007)
- 5) Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, et al. Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15, 1151-1158 (2006)
- 6) Xiong H, Kobayashi K, Tachikawa M, Many A, Takeda S, Chiyonobu T, Fujikake N, Wang F, Nishimoto A, Morris GE, Nagai Y, Kanagawa M, Endo T, Toda T. Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of α -dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 935-941 (2006)
- 7) Kariya S, Hirano M, Uesato S, Nagai Y, Nagaoka Y, Furiya Y, Asai H, et al. Cytoprotective effect of novel histone deacetylase inhibitors against polyglutamine toxicity. *Neurosci Lett* 392, 213-215 (2006)
- 8) Fujikake N, *Nagai Y, Popiel HA, et al. Alternative splicing regulates the transcriptional activity of *Drosophila* heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. *FEBS Lett* 579, 3842-3848 (2005)
- 9) Chiyonobu T, Sasaki J, Nagai Y, Takeda S, Funakoshi H, et al. Effects of fukutin deficiency in the developing mouse brain. *Neuromuscul Disord* 15, 416-426 (2005)
- 10) 永井義隆 ポリグルタミン蛋白質の毒性構造体の発見 *蛋白質核酸酵素* (in press)
- 11) 永井義隆 神経変性疾患治療戦略としての低分子による蛋白質凝集阻害 *神経変性疾患のサイエンス* (南山堂) 181-197 (2007)
- 12) 永井義隆, ポピエル明子, 藤掛伸宏, 戸田達史 ポリグルタミン病に対する治療戦略 *BRAIN and NERVE* 59, 393-404 (2007)
- 13) 永井義隆 ポリグルタミンタンパク質のアミロイド線維形成機構と細胞毒性: 露出 β シート仮説の提唱 *細胞工学* 26, 168-172 (2007)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)

17) 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)

18) 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)

2. 学会発表

- 1) Nagai Y, et al. Detection of polyglutamine protein oligomer formation in cells by fluorescence correlation spectroscopy. 5th Water&Biomolecules WS (Jan, 2008, Nara)
- 2) Nagai Y, et al. Toxic conformers of the soluble polyglutamine protein formed *in vitro* and *in vivo*. 4th Gordon Conf CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2007, France)
- 3) Nagai Y, et al. Molecular therapy for the polyglutamine neurodegenerative diseases using the inhibitor peptide QBP1 and its delivery by protein transduction domain. Int Symp Membrane-permeable peptides (Nov, 2006, Kyoto)
- 4) Nagai Y, et al. Evidence for the soluble β -sheet monomer of the polyglutamine protein as a cytotoxic conformer. HDF Meeting; HD2006 (Aug, 2006, USA)
- 5) Nagai Y, et al. Evidence for a toxic monomeric β -sheet conformer of the polyglutamine protein. 20th IUBMB (Jun, 2006, Kyoto)
- 6) Nagai Y, et al. Protein structural abnormalities and therapeutic targets of the polyglutamine expansion neurodegenerative disorders. Int Symp Life of Proteins (Oct, 2005, Hyogo)
- 7) Nagai Y, et al. The soluble polyglutamine protein acquires cytotoxicity through a conformational transition to a β -sheet-rich structure. 3rd Gordon Conf CAG Triplet Repeat Disorders (July, 2005, USA)
- 8) 永井義隆 他 蛍光相関分光法を用いたポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出とその阻害 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 (2007.12, 横浜)
- 9) 永井義隆 他 蛍光相関分光法による細胞内ポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出 第30回日本神経科学会・第50回日本神経化学会 (2007.9, 横浜)
- 10) 永井義隆 他 Polyglutamine protein monomer gains cytotoxicity via a conformational transition to a β -sheet 第49回日本神経化学会 (2006.9, 名古屋)
- 11) 永井義隆 他 熱ショック転写因子(HSF)活性化によるポリグルタミン病治療の試み 第47回日本神経学会総会 (2006.5 東京)
- 12) 永井義隆 他 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 (2005.5, 鹿児島)

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危険情報

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)

分担研究終了報告書

運動失調症に関する調査研究班

ポリグルタミン病の予防および治療に関する基礎研究

分担研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部

研究要旨

ポリグルタミン病の予防および治療戦略として、RNAi による異常伸長した CAG リピートを持つ変異遺伝子の発現抑制と分子シャペロン誘導薬によるポリグルタミンタンパク質毒性の減弱に着目し研究を行った。その結果、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。このことから、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。また、あるタンパク質に分子シャペロン誘導薬の標的となる熱ショック転写因子 1 (HSF1) の分解を促進する活性があることを発見した。最後に、分子シャペロン誘導薬の一種、Hsp90 阻害剤の新たな細胞保護作用を示唆する結果を得た。

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、その根本的治療法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、ポリグルタミン病の一つであるハンチントン病の培養モデル細胞ならびに疾患モデルマウスを用いて効果的な siRNA および shRNA の開発とその効果の検証を行うことを目的とした。また、分子シャペロン誘導薬に着目し、新たな創薬標的分子を探索することを目的とした。

B. 研究方法

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 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、HEK293 細胞でハンチンチン遺伝子発現の knock down 効果を検討し、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、ハンチンチン遺伝子の発現抑制と病態の改善程度を検討した。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を一過性に発現する HEK293 細胞と、R6/2 マウスで検討した。

HeLa 細胞および Flp-In TREx HEK293 細胞を用

いて、HSF1 活性阻害候補因子を一過性に導入した場合あるいは doxycycline により誘導した場合の HSF1 タンパク質発現に与える影響を免疫ブロットングにより検討した。また、同時に HSP 誘導剤刺激時の Hsp70 発現誘導に及ぼす効果を検討した。さらに免疫沈降法により、この因子と HSF1 の結合を検討し、同因子の作用機序の解析を行った。

神経細胞は熱ストレスなどのストレス応答の閾値が高いことから、ヒト、ラット、およびマウス神経系培養細胞から、HSF1 および Hsp70 の発現を指標にストレス応答の閾値が高い細胞を探索した。この細胞に分子シャペロン誘導薬として geldanamycin (GA) を前処理し、24 時間経過後、酸化ストレスを与え、さらに 24 時間後の細胞の生存活性を測定した。

C. 研究結果

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 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 (1.2×10^{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。

一過性の場合においても doxycycline による誘導の場合においても HSF1 タンパク質発現はこの因子の導入により低下した。また、このとき HSP 誘導剤刺激時の Hsp70 発現誘導も顕著に抑制された。また、免疫沈降法により、この因子は HSF1 と結合することが確認された。この因子と HSF1 はお互いにタンパク質レベルで発現を抑制しあう関係にあることから、両者の複合体は不安定化し、分解されると考えられた。さらに、この分解にはプロテアソームが関与することが明らかとなった。

Hsp70 発現誘導の閾値が高い神経系培養細胞を同定した。この細胞を GA により前処理すると、酸化ストレスに対して著明な細胞保護作用を示した。また、この細胞において、GA は Hsp70 だけでなく Hsp25 の発現も誘導しなかった。

D. 考察

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。

我々が同定した HSF1 分解促進因子は神経系組織で mRNA 発現が認められることから、神経細胞で HSF1 活性が低いことに関係している可能性が示唆される。今後は、この可能性の検証をさらに詳細に行うとともに、その生理・病態生理機能の解析を通して薬剤標的分子としての有用性について検討する必要がある。

分子シャペロン誘導薬の一種である Hsp90 阻害剤は、様々な神経変性疾患モデル動物においてその症状を回復させることが報告されている。今回我々は、Hsp70 および Hsp25 の発現誘導の閾値が高い神経系培養細胞においても、Hsp90 阻害剤が酸化ストレス耐性を誘導するという結果を得た。Hsp90 阻害剤の作用については 2 つの機序が想定されており、一つ目は HSF1 の活性化に

よる Hsp70 などの HSP の誘導によるもので、二つ目は球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) 遺伝子産物などの毒性を持つ Hsp90 クライアントタンパク質の分解促進によるものである。今回我々が用いた細胞では GA による Hsp70 および Hsp25 の発現誘導が認められず、毒性を持つ Hsp90 クライアントタンパク質も用いていない。以上より、GA による酸化ストレス耐性の誘導作用は、既知の 2 つの機序によらない、新たな作用機序によるものと考えられる。

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 はハンチンチン病治療の有効なツールになる可能性が高いと考える。

我々は、HSF1 タンパク質の分解を促進し、HSF1 活性を抑制する因子を見出した。同因子は、HSF1 タンパク質に結合し、不安定な複合体を形成することが示唆された。さらに、同因子と HSF1 のタンパク質分解はプロテアソーム依存的であった。以上より、同因子に結合し、HSF1 との結合を阻害する薬剤が新規 HSP 誘導剤となりうる可能性が示唆された。

Hsp90 阻害剤の細胞保護作用について新たな作用機序の存在が示唆された。

F. 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

Kabuta, T., Suzuki, Y., Wada, K. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* (2006) 281, 30524-30533

Sun, Y.J., Nishikawa, K., Yuda, H., Wang, Y.L., Osaka, H., Fukazawa, N., Naito, A., Kudo, Y., Wada, K., Aoki, S. Solo/Trio8, a membrane-associated short isoform of Trio, modulates endosome dynamics and neurite elongation. *Mol. Cell. Biol.* (2006) 26, 6923-6935

Sano, Y., Furuta, A., Setsuie, R., Kikuchi, H., Wang, Y.L., Sakurai, M., Kwon, J., Noda, M., Wada, K. Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. *Am. J. Pathol.* (2006) 169, 132-141

Setsuie, R., Wang, Y.L., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Li, H., Furuta, A., Sano, Y., Sun, Y.J., Kwon, J., Kabuta, T., Yoshimi, K., Aoki, S., Mizuno, Y., Noda, M., Wada, K. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 193M mutant. *Neurochem. Int.* (2007) 50, 119-129

Noda, M., Kariura, Y., Pannasch, U., Nishikawa, K., Wang, L., Seike, T., Ifuku, M., Kosai, Y., Wang, B., Nolte, C., Aoki, S., Kettenmann, H. Wada, K. Neuroprotective role of bradykinin due to the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. *J. Neurochem.* (2007) 101, 397-410

Tanabe, K., Gamo, K., Aoki, S., Wada, K., Kiyama, H. Melanocortin receptor 4 is induced in

nerve-injured motor and sensory neurons of mouse.

J. Neurochem. (2007) 101, 1145-1152

Setsuie, R. Wada, K. The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* (2007) 52, 105-111, Review.

Hirayama, K., Aoki, S., Nishikawa, K., Matsumoto, T., Wada, K. Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening. *Bioorgan. Med. Chem.* (2007) 15, 6810-6818

Ohashi, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Nishimoto, M., Kudo, Y., Abe, T., Aoki, S., Wada, K. Alpha 1-adrenoceptor agonists protect against stress-induced death of neural progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.* (2007) 573, 20-28

Ifuku, M., Färber, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Miyamoto, T., Nolte, C., Merrino, V.F., Kita, S., Iwamoto, T., Komuro, I., Wang, B., Cheung, G., Ishikawa, E., Ooboshi, H., Bader, M., Wada, K., Kettenmann, H., Noda, M. Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca²⁺ influx via reverse-mode activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J. Neurosci.* (2007) 27, 13065-13073

Sakurai, M., Sekiguchi, M., Zushida, K., Yamada, K., Nagamine, S., Kabuta, T. Wada, K. Reduction of memory in passive avoidance learning, exploratory behavior and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene. *Eur. J. Neurosci.*, in press

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. 35th Annual

Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11.12, 2005

Goto A, Wang YL, Setsuie R, Osaka H, Kabuta T, Sakurai M, Sawa A, Ishiura S, Wada K: The role of gapdh in sciatic nerve of gracile axonal dystrophy mouse. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006

Sano Y, Furuta A, Setsuie R, Wada K: Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3 deficient mice. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 6.20, 2006

Liu W, Wang Y, Wada K, Murata M, Mochizuki H, Wada K, Kanazawa I: Rescue of Huntington's disease in model mice by RNAi: shRNA treatments at early development stages yield significantly beneficial effects. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, 7.9, 2006

Aoki S, Sun Y, Nishikawa K, Yuda H, Osaka H, Wang Y, Fukazawa N, Wada K: Solo/trio8, A membrane-associated short isoform of trio modulates endosome dynamics and neurite elongation. The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting. San Diego, California, U.S., 12.10, 2006

内藤幸男, 望月秀樹, 安田徹, 水野美邦, 古坂道弘, 池田進, 清水裕彦, 安達智宏, 鈴木淳市, 藤原悟, 岡田知子, 西川香里, 青木俊介, 和田圭司: 中性子散乱法によるユビキチン加水分解酵素 (UCH-L1) の水溶液構造とパーキンソン病, 第47回日本神経学会総会, 東京, 5.11, 2006.

佐野野衣, 古田晶子, 節家理恵子, 和田圭司: UCH-L3 遺伝子欠損マウスにおける網膜変性の機序, 第47回日本神経病理学会総会学術研究会, 岡山, 5.26, 2006.

櫻井省花子, 圖子田康, 関口正幸, 和田圭司: Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) -L1 欠損 gad マウスの行動とシナプス可塑性の異常. Alteration of behavior and impairment of synaptic plasticity in Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) - L1- deficient gad mice. 第29回日本神経科学学会大会, 京都, 7.19, 2006.

株田智弘, 鈴木泰行, 和田圭司: Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 proteins by macroautophagy. 日本分子生物学会 2006 フォーラム『分子生物学の未来』, 愛知, 12.8, 2006.

和田圭司, 青木俊介: マウス神経系前駆細胞における GPCR の機能解析. 神経組織の成長・再生・移植研究会第22回学術集会, 岡山, 5.26, 2007

Noda M, Wang B, Ishikawa E, Ooboshi H, Kido M. A, Wada K: Up-regulation of KCNQ channels in activated microglia. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. San Diego, California, U.S.A., 11.5, 2007

Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Matsumoto T, Wada K: Identification of novel UCH-L1-potentiating compounds by in silico drug screening. Neuro 2007. Yokohama, 9.10, 2007

Kimiwada T, Sakurai M, Ohashi H, Aoki S, Tominaga T, Wada K: Clock genes regulate neurogenic transcription factors and the neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells. Neuro2007. Yokohama, 9.11, 2007

Naito S, Ikeda S, Shimizu H, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Fujiwara S, Suzuki J, Wada K: Small-angle neutron scattering (SANS) and dynamic light scattering (DLS) analyses of the initial aggregation process of tau by oxidative stress. Neuro2007. Yokohama. 9.11, 2007

Nishimoto M, Furuta A, Wada K: The functional regulatory mechanism in reactive astrocytes via VIP/VPAC2 system. Neuro2007. Yokohama, 9.12, 2007

G. 知的財産権の出願・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)

分担研究年度終了報告書

運動失調症に関する調査研究班

ポリグルタミン病の治療を目的とした基礎的研究

分担研究者 貫名 信行
(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)

研究要旨

ポリグルタミン病の治療を目的としてアデノ随伴ウイルスを用いたモデルマウスの治療研究、線虫を用いたオートファジー遺伝子のノックダウンによる凝集体形成や症状への影響、Amiloride derivative による proteasome 活性制御による治療の可能性の検討を行った。これらの結果ポリグルタミン病の治療の方向性がでてきた。

A. 研究目的

CAG リピート病はハンチントン病や遺伝性脊髄小脳失調症の多くを含む疾患群であり、病因遺伝子の CAG リピートの伸長とその翻訳産物である伸長ポリグルタミンがその病態に強く関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治療は球脊髄性筋萎縮症を除くとまだ効果的なものが少ない。そこで治療ターゲットの検討としては線虫系を用いてオートファジー系の凝集体形成、症状への影響を検討した。また治療に関しては RNAi の有効性について検討、さらに我々は伸長ポリグルタミン-GFP 発現 Neuro2a 細胞を用いて薬物の効果を判定する系を確立し、神経細胞保護作用のある薬剤の凝集体形成抑制効果を判定した。この過程で Amiloride およびその derivative に凝集体形成抑制効果を認めため、細胞レベル、マウスレベルでその効果を評価し、その標的分子を検討した。

B. 研究方法

1) 線虫ポリグルタミン病モデル系として、異なる長さのポリグルタミン鎖を含む ataxin-3 の truncated form を EGFP に融合して発現する線虫を作成した。線虫のオートファジーに関連する遺伝子のミュータントとして、ATG-1(UNC-51), CeTOR(11let-363)のノックアウト線虫を用いた。ATG-6, 7-8, 9, 10, 16, 23, 28 の線虫ホモログについては RNAi を用いてノックダウンしてそのポリグルタミン毒性(筋肉に発現したもの)に対する影響を検討した。

2) 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 を作成した。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を用いて線虫系に導入し、凝集体形成に対する影響を検討した。

3) 細胞レベルでは Htt-pQ-EGFP を発現した Neuro2a 細胞 (60Q, 150Q) をもちいて伸長ポリグルタミンに伴う凝集体形成を自動的に定量する系を ArrayScan を用いて確立した。Amiloride とその derivative である Benzamil の凝集体形成に対する効果を検討した。さらに細胞レベルで Benzamil の作用機序について分解過程などを検討した。個体レベルでは Benzamil の効果をハンチントン病モデルマウスである R6/2 によって検討した。

(倫理面への配慮)

特に配慮を必要とする動物の使用はない。

C. 結果及び考察

1) オートファジー系をノックダウンすると凝集体形成は増強し、症状として運動異常などが増悪した。オートファジーを促進する変異は逆の効果が認められ、凝集体形成とそれによる毒性にオートファジー系が抑制効果を持つことが示され、オートファジーが治療ターゲットとなることが示された。

- 2) RNAi によって伸長ハンチンチンの発現を抑制するとモデルマウスに認められる凝集体形成が減少し、DARPP-32 の発現の低下も改善することが示され、RNAi による治療の可能性が示された。
- 3) Amiloride derivative は ubiquitin-proteasome 系 (UPS) の異常蛋白分解を増強して、凝集体形成を抑制する。この薬物の分子標的は ASIC (acid-sensing ion channel) であり、この分子が治療ターゲットになりうることを示唆される。

D. 結論

ポリグルタミン病の治療法として RNAi, Amiloride derivative が有効である可能性が示された。治療の分子標的としてはオートファジー系、UPS, ASIC が可能性として示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Khan, L. A., Yamanaka, T., & Nukina, N. Genetic impairment of autophagy intensifies expanded polyglutamine toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) in press.

Doi, H., Okamura, K., Bauer, P.O., Furukawa, Y., Shimizu, H., Kurosawa, M., Machida, Y., Miyazaki, H., Mitsui, K., Kuroiwa, Y. & Nukina, N. RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in Huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *J Biol Chem* (2007) in press.

Khan, L.A., Bauer, P.O., Miyazaki, H., Lindenberg, K.S., Landwehrmeyer, B.G. & Nukina, N. Expanded polyglutamines impair synaptic transmission and ubiquitin-proteasome system in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem* 98, 576-87 (2006).

Machida, Y., Okada, T., Kurosawa, M., Oyama, F., Ozawa, K. & Nukina, N. rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 190-7 (2006).

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* 93, 641-53 (2005).

F. 知的財産権の出願・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)
運動失調症に関する調査研究班

多系統萎縮症の臨床および分子遺伝学的研究

分担研究者
研究協力者

辻 省次 ¹				
松川 敬志 ¹	中原 康雄 ¹	百瀬 義雄 ¹	福田 陽子 ¹	
石浦 浩之 ¹	出岡 顕 ¹	伊達 英俊 ¹	高橋 祐二 ¹	
後藤 順 ¹	西田 奈央 ²	徳永 勝士 ²	鈴木 康之 ³	
下澤 伸行 ⁴	原 賢寿 ⁵	高野 弘基 ⁵	西澤 正豊 ⁵	
小野寺 理 ⁶	中村 英二 ⁷	安達 宏紀 ⁷		

- 1) 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科, 2) 人類遺伝学,
3) 岐阜大学医学部医学教育研究センター, 4) 生命科学総合実験センターゲノム
研究分野, 5) 新潟大学脳研究所神経内科分野, 6) 脳疾患リソース解析分野,
7) ダイナコム

研究要旨

1. 副腎白質ジストロフィー(ALD)の DNA マイクロアレイによる遺伝子診断システムを構築し、さらに ALD の多彩な臨床表現型を規定する因子の検討を行った。
2. 本研究班を母体とする JAMSAC により多系統萎縮症(MSA) の臨床情報及びゲノムリソースを収集し、全ゲノム関連解析を開始した。同時に、MSA 多発家系を 11 家系同定し、一部の家系について連鎖解析を進めている。連鎖解析に関連して、大規模 SNP タイピングを用いたハイスループット連鎖解析システムを構築した。
3. 遺伝性痙性対麻痺(HSP)についての DNA マイクロアレイを用いた網羅的原因遺伝子解析システムを構築した。本研究班を母体とする JASPAC で収集したゲノムリソースの解析を開始した。
4. 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)タンパクの核移行シグナルの同定と核移行機序について検討した。

A. 研究目的

1. ALD の DNA マイクロアレイによる遺伝子診断システムを確立する。多彩な臨床表現型を規定する因子を検討する。
2. MSA の遺伝的要因を解明するため、全ゲノム関連解析および多発家系の同定とその連鎖解析を進める。
3. HSP についての DNA マイクロアレイを用いた網羅的原因遺伝子解析システムを構築し、本邦における分子疫学等を明らかにする。
4. DRPLA タンパクの核移行機序を明らかにする。

の解析を行う。他施設症例を合わせた計 40 例について、*ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* と臨床表現型との相関を検討する。

2. JAMSAC にて収集した MSA230 例と正常対照 294 例について DNA Analysis Mapping 500K (Affymetrix^R)を用いて全ゲノム関連解析を施行する。多発家系について、連鎖解析を行う。連鎖解析のために、大規模 SNP タイピングを用いたハイスループット連鎖解析システムを構築する。
3. HSP について、DNA マイクロアレイを用いた網羅的原因遺伝子解析システムを構築する。当科収集 93 例、JASPAC 収集 31 例について、網羅的解析を行う。
4. DRPLA タンパクの核移行シグナルを PSORTII による検討および部位特異的突

B. 研究方法

1. ALD 診断用 DNA マイクロアレイを設計し、実用性を検証し、新規症例(計 24 例)

然変異導入法により同定する。核移行機序について Importin β super family 依存的核輸送について検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は3省指針を遵守し、東京大学医学部研究倫理委員会の承認のもと遂行した。

C. 研究結果および考察

1. ALD 新規 24 全例で *ABCD1* 変異を同定し、15 例は新規変異であった。*ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* の解析から、臨床表現型に関与しうる SNPs を見出した。大規模な検討が必要である。
2. JAMSAC 収集の MSA の臨床型の内訳は、MSA-C が約 70%、MSA-P が約 30% であった。関連解析にて、 χ^2 検定で有意差を認める SNPs は、総数 230,360 中、 $p < 0.01$ で 2,932, $p < 0.00001$ で 102, $p < 0.0000001$ で 83 であった。独立症例群での再検等が必要である。これまでに MSA 多発家系 11 家系を同定し、さらなる家系収集が必要ではあるが、7 家系について連鎖解析を行っている。
3. HSP についての DNA マイクロアレイを用いた網羅的原因遺伝子解析システムを構築した。常染色体性優性遺伝が疑われる症例の 47% は *spastin* (SPG4) の変異であった。*Atlastin* (SPG3A), *REEP1* (SPG31), *spastacsin* (SPG11) の変異も少数例ながら同定された。
4. DRPLA タンパクの核移行シグナルを同定した。DRPLA タンパクの核移行シグナルは、importin $\alpha 3$, $\alpha 5$, さらに $\beta 1$ とヘテロマーを形成し、核移行が行われると示唆された。

D. 結論

1. ALD の DNA マイクロアレイによる遺伝子診断システムを確立し、多彩な臨床表現型を規定する可能性の示唆される SNPs を見出した。
2. 本研究班を母体とする JAMSAC で収集した MSA ゲノムリソースを用いた全ゲノム関連解析を開始した。
3. HSP についての DNA マイクロアレイを用いた網羅的原因遺伝子解析システムを構築し、本研究班を母体とする

JASPAC により収集した HSP ゲノム検体の網羅的解析を開始した。

4. DRPLA タンパクの核移行機序を明らかにした。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Hara K, Momose Y, Tokiguchi S, Shimohata M, Terajima K, Onodera O, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Hirasawa M, Mizuno Y, Ogata K, Goto J, Kanazawa I, Nishizawa M, Tsuji S. Multiplex families with multiple system atrophy. *Arch Neurol*. 64:545-551, 2007
2. Tsuji S, Onodera O, Goto J, Nishizawa M; Sporadic ataxias in Japan - a population-based epidemiological study. *Cerebellum*. 2007 Aug 7;1-9 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. Momose Y, Hara K, Goto J, Tsuji S: Nation-wide survey for familial cases of Multiple System Atrophy in Japan. XVIIIth World Congress of Neurology, 2005, Sydney
2. Matsukawa T, Takahashi Y, Onodera O, Shimozawa N, Suzuki Y, Nishizawa M, Goto J, Tsuji S; Development of microarray-based rapid gene analysis system for X-linked adrenoleukodystrophy - application for genotype-phenotype correlation analysis and search for genes modifying clinical presentations of ALD. The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting, 2005.10, Salt Lake City
3. JAMSAC, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S: Neuroepidemiology of multiple system atrophy (MSA) from Japan MSA consortium. American Academy of Neurology 59th Annual Meeting, 2007.4, Boston, *Neurology* 68(Suppl.1):A223
4. Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S: A comprehensive mutational analysis system using resequencing microarray delineates molecular epidemiology of hereditary spastic paraplegias in the Japanese population. The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting, 2007.10, San Diego, California
5. Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S: Genome-wide association studies on multiple system atrophy (MSA). The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting, 2007.10, San Diego, California
6. Fukuda Y, Nakahara Y, Momose Y, Date H, Takahashi Y, Goto J, Hara K, Nishizawa M, Nakamura E, Adachi H, Tsuji S: Development of a high-throughput linkage analysis system employing 100K/500K SNP data. The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting, 2007.10, San Diego, California

F. 知的財産権の出願・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)

運動失調症に関する調査研究班

3年間の研究のまとめ

分担研究者 瀧山嘉久
研究協力者 嶋崎晴雄, 迫江公己, 欧陽 嶷, 滑川道人, 中野今治
(自治医科大学内科学講座神経内科学部門)

研究要旨 本邦とベルギーの痙性失調症家系の臨床・分子遺伝学的検討を行い, SACS 遺伝子の新規変異の同定とともに日本人とベルギー人に ARSACS 家系が存在することをはじめ報告した. さらに ARSACS では臨床像の多様性があることを示した. SPG4 の原因蛋白である spastin については, 微小管の切断, 神経突起の伸長・安定性に関与することを示し, 相互作用する微小管関連蛋白の検討を行った. 微小管の安定や神経突起の形成を正常化する物質のスクリーニングが SPG4 の治療法開発の戦略となると考えられた. 本邦の痙性対麻痺に関して, 臨床・研究のリソース基盤を構築して原因究明と治療法開発を行うために JASPAC を組織した. 全国アンケート調査では全症例 691 例(遺伝性 321 例, 孤発性 370 例)であった. 現在, 28 都道府県 65 施設から遺伝性痙性対麻痺 148 家系の登録があり, 東大の DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析システムにより, 従来では考えられなかった規模で high-throughput な遺伝子解析が行われている.

A. 研究目的

- (1) ARSACS: 国内・国外からの SACS 遺伝子解析依頼を受けて, ARSACS の臨床・分子遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした.
- (2) Spastin: SPG4 の原因蛋白である spastin の機能を解析することにより, 遺伝性痙性対麻痺の病態機序を解明し, 治療に向けての方向性を確立することを目的とした.
- (3) JASPAC: 本邦の痙性対麻痺について多施設共同研究体制により臨床・研究のリソース基盤を構築して, その自然史やゲノム解析研究を行い, 原因究明と治療法の開発を目指すことを目的として JASPAC を組織した.

B. 研究対象と方法

- (1) ARSACS: 本邦の 7 家系 10 症例とベルギーの 2 家系 5 症例について SACS 遺伝子解析を行い, 臨床像を検討した.
- (2) Spastin: spastin に特異的な抗体や培養細胞を用いた過剰発現および knock-down の系を作成して spastin の機能解析を行った. DNA chip を用いて spastin 遺伝子の減少に伴い減少する遺伝子群からモーター蛋白と神経突起形成に関与する遺伝子を解析した.
- (3) JASPAC: 全国の 1231 施設に対して痙性対麻痺症例のアンケート調査を行い, それを基に遺伝子解析を希望する施設に症例の登録を依頼した. 遺伝子解析については自治医大で ARSACS を, 東大で DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子

解析を行った.

C. 研究結果

- (1) ARSACS: 本邦とベルギー一家系に新規変異を含むミスセンス, ナンセンス, 欠失変異を同定した. 特に巨大エクソンの上流エクソンのナンセンス変異と巨大エクソンの 1.42-1.49bp 欠失変異をはじめで見出した. 発症年齢が遅い例, 網膜有髄線維増生を欠く例, 下肢痙縮を欠く例, 知能低下を認める例があることなど ARSACS の臨床像に多様性を認めた.
- (2) Spastin: spastin は分裂細胞では核の分配と細胞分裂後期の微小管切断に関与し, 神経系細胞では突起の伸長に関与することが判明した. また spastin の減少によって微小管が不安定となり, 核分配の異常やミトコンドリアをはじめとする細胞内物質輸送に異常を生じることが示された. Spastin の variant form の解析では, long form は分裂期の紡錘体微小管に, short form は細胞質分裂時の細胞間橋に, それぞれ局在して, 微小管の切断に関与することを見いだした. 神経系細胞における spastin は突起の先端部および分岐部に集積し, 微小管の切断を行いながら微小管の伸長と太さや配向を整えることが示唆された. 神経突起形成に関与する蛋白において, spastin の減少に伴い減少する蛋白を見出した. この蛋白は突起の先端で spastin と共局在し, 野生型 spastin とは共局在するが, 変異 spastin とは共局在しないことが判明した.
- (3) JASPAC: 全国アンケートで 204 施設, 691 例(遺伝性 321 例, 孤発 370 例)の痙性対麻痺症例が

集計された。遺伝性 209 家系のうち常染色体優性は 141 家系、常染色体劣性は 63 家系、X 連鎖性劣性は 3 家系であった。平成 20 年 1 月 25 日現在、28 都道府県 65 施設から遺伝性痙性対麻痺 148 家系の登録があり、採血済み 74 家系、解析中 65 家系である。既に SPG4 7 家系、SPG3A 4 家系の新規変異を含めた遺伝子変異が同定されている。

D. 考察と結論

(1) ARSACS: ARSACS は元来カナダ、ケベック州に伝わるまれな痙性失調症であり、SACS 遺伝子の巨大エクソンの変異が原因であるとされていたが、今回の研究により、本邦とベルギーにも存在することが判明した。ARSACS は臨床的に多様性があり、非典型例でも SACS 遺伝子の解析が必要であると思われた。また、巨大エクソンの上流エクソンの検討も必要であることが判明した。今後、世界各地で ARSACS が報告される可能性があると思われる。

(2) Spastin:spstin の knock-down 系は微小管の安定や神経突起の痙性を正常化する治療薬のスクリーニング系として有効であると思われる。また、未知の遺伝性痙性対麻痺の候補遺伝子として、微小管切断機能を持つ蛋白やモーター蛋白などが関与している可能性があると思われる。

(3) JASPAC: 東大で開発された DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析システムは画期的であり、今後、JASPAC の活動を継続することにより、臨床および研究の基盤が着実に構築されると思われる。また、痙性対麻痺の自然史やゲノム解析研究を詳細に行うことが可能であり、遺伝性痙性対麻痺の新規遺伝子の特定や、新規遺伝子座の同定もなされると思われる。JASPAC から世界に向けての情報発信がなされ、治療法開発に向けての大きな礎となることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimazaki H, et al: A phenotype without spasticity in saccin-related ataxia. *Neurology* 64: 2129-31, 2005.
- 2) Yamamoto Y, et al: Novel compound heterozygous mutations in saccin-related ataxia. *J Neurol Sci* 239: 101-4, 2005.
- 3) Takiyama Y: Saccin-related ataxia: the SACS gene mutations. In: R.M. Mohan, ed. *Research Advances in Neurology 3*. Kerala, Global Research Network, 2006: 1-6.
- 4) Takiyama Y: Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Neuropathology* 26: 368-75, 2006.

- 5) Ouyang Y, et al: Saccin-related ataxia (ARSACS): Expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 66: 1103-4, 2006.
- 6) Yamamoto Y, et al: Saccin-related ataxia caused by the novel nonsense mutation Arg4325X. *J Neurol* 253:1372-3, 2006.
- 7) Ouyang Y, et al: 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia: a clinical and genetic study. *J Neurol Sci* 247: 180-6, 2006.
- 8) 瀧山嘉久: 脊髄小脳変性症研究の最近の進歩: シャルルヴォア・サグネ型痙性失調症. *神経研究の進歩* 50: 387-395, 2006.
- 9) Ouyang Y and Takiyama Y: 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia in Japan. In: R.M. Mohan, ed. *Research Advances in Neurology 4*. Kerala, Global Research Network, 2007: 1-7.
- 10) Shimazaki H, et al: An unusual case of a spasticity-lacking phenotype with a novel SACS mutation. *J Neurol Sci* 255: 87-9, 2007.
- 11) Takiyama Y: Saccinopathies: saccin-related ataxia. *Cerebellum* 6: 353-9, 2007.
- 12) Ouyang Y, et al: Novel SACS mutation in a Belgian family with saccin-related ataxia. *J Neurol Sci* 264: 73-6, 2008.

2. 学会発表

- 1) 瀧山嘉久: Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会シンポジウム, 2005 年 5 月, 栃木.
- 2) 嶋崎晴雄ら: 本邦 ARSACS 症例の臨床・遺伝学的検討. 日本人類遺伝学会第 50 回大会, 2005 年 9 月, 倉敷.
- 3) 嶋崎晴雄ら: 下肢痙性を認めなかった ARSACS の 1 家系. 第 46 回日本神経学会総会, 2005 年 5 月, 鹿児島.
- 4) 迫江公己ら: Spastin の機能解析. 第 46 回日本神経学会総会, 2005 年 5 月, 鹿児島.
- 5) 嶋崎晴雄ら: 本邦 ARSACS 7 家系 10 症例の臨床・遺伝学的検討. 第 47 回日本神経学会総会, 2006 年 5 月, 東京.
- 6) 迫江公己ら: Spastin の機能解析. 第 47 回日本神経学会総会, 2006 年 5 月, 東京.
- 7) 嶋崎晴雄ら: 新規遺伝子変異を認めたベルギーの ARSACS 家系. 第 48 回日本神経学会総会, 2007 年 5 月, 名古屋.
- 8) 迫江公己ら: Spastin 蛋白の機能解析. 第 48 回日本神経学会総会, 2007 年 5 月, 東京.

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし