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

プロジェクト名:臨床応用　運動失調症に対する Cybernics(サイバニクス)技術の展開

分担研究者　　筑波大学大学院　システム情報工学研究科　教授　山海嘉之

研究要旨

人間・機械・情報系を融合複合した新技術領域「サイバニクス」を駆使してロボットスーツ HAL の研究開発を行ってきた。世界に先駆けて人間の意思通りに身体運動機能を拡張し増幅する「ロボットスーツ HAL」の研究開発・実用化に成功し、福祉/医療分野への展開のための研究開発を推進している。本研究では運動失調症に対するサイバニクス技術の展開について研究することを目的としている。

A. 研究目的

人間・機械・情報系を融合複合した新技術領域「サイバニクス」を駆使してロボットスーツ HAL の研究開発を行ってきた。世界に先駆けて人間の意思通りに身体運動機能を拡張し増幅する「ロボットスーツ HAL」の研究開発・実用化に成功し、福祉/医療分野への展開のための研究開発を推進している。運動失調/運動機能障害のような難病を抱える方々へ HAL を中心としたサイバニクス技術がどのように活用できるか、あるいは、どのような課題を解決しなければならないかを検討することで当該分野の開拓が加速するため、医学系、工学系、人文社会学系等が一体となって当該研究開拓に注力することが望まれる。本研究では運動失調症に対するサイバニクス技術の展開について研究することを目的としている。

B. 研究方法

サイバニクスの研究成果として、全身型ロボットスーツ HAL-5 の基盤技術(大別すると、電子制御システム、機構構造システム、統合システム、及び、各種コア技術、運用・運営技術など)について、運動失調/運動機能障害への展開のための技術更新をすすめ、次世代技術へと発展させること、ならびに、当該分野の症状を有する方々へ適用することを試みる。下肢バージョンについては量産化を推進しているが、基本技術を活用しながら運動機能障害/運動失調に焦点をあて、当該分野で活用可能なモニタリング/解析機能を強化することで、サイバニクス技術を更に展開する。

(倫理面への配慮)

人支援技術の研究開発の推進には、被験者に対する適切な対応が求められるため、当該研究では、厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

運動機能障害/運動失調の方への HAL(試験システム)の適用を通して、様々な知見を得ることができた。実際での活用を通して、装着時においては、症状に応じてモニタリングをしながらスタッフ側も各種情報を捉えておくことが、システム全体の改良加える点で重要であることが確認できた。

D. 研究発表
(これまでの関連研究の成果を含む)

1. 関連する論文発表

(これまでの関連研究の成果を含む)

1) K.Suzuki, G.Mito, H.Kawamoto, Y.Hasegawa, Y.Sankai:Intention-Based Walking Support for Paraplegia Patients with Robot Suit HAL, Advanced Robotics, Vol.21, pp. 1441 - 1469, No.13, 2007

2. 関連する学会発表

(これまでの関連研究の成果を含む)

1) HAL(Hybrid Assistive Limb)based on Cybernics, Yoshiyuki Sankai, 日本小児神経学会 50 回記念国際シンポジウム,ホテル日航東京, 2008.5.28
2) 神経内科治療と工学の接点-ロボットスーツの医療への応用-, 山海嘉之, 第 26 回日本神経治療学会総会, 新横浜プリンスホテル, 2008.6.27
3) サイバニクス:人・機械・情報系の融合複合, 山海嘉之, 日本神経回路学会, 第18回全国大会, 産業技術総合研究所, 2008.9.24
4) サイバニクスと神経難病分野への展開, 山海嘉之, 第 12 回新潟神経内科シンポジウム, 東北大学有壬記念会館, 2008.9.27
5) 次世代の動作補助ロボット・HAL, 山海嘉之, リハビリテーションケア合同研究大会, フェニックスプラザ福井, 2008.11.7
6) Leading Edge of Cybernics and Future Robotics, Yoshiyuki Sankai, IEEE-RAS International Conference on Humanoids 2008, 韓国, 2008.12.13

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)
(これまでの関連研究の成果を含む)
(特許取得・実用新案登録・その他)

1)発 明 者 : 山海嘉之
発明の名称 : 装着式動作補助装置、基準パラメータデータベース構築装置、装着式動作補助装置における駆動制御方法、基準パラメータデータベース構築方法及びそのプログラム
出 願 人 : 筑波大学
出 願 番 号 : 2008-181472

2) 発 明 者 : 山海嘉之
発明の名称 : 装着式動作補助装置、装着式動作補助装置のキャリブレーション装置、及びキャリブレーション用プログラム
出 願 人 : 筑波大学
出 願 番 号 : 2008-200028

3) 発 明 者 : 山海嘉之
発明の名称 : 装着式動作補助装置の動作補助システム及び装着式動作補助装置及び装着式動作補助装置の動作補助システム
出 願 人 : 筑波大学
出 願 番 号 : 2008-208027

4) 発 明 者 : 山海嘉之
発明の名称 : 装着式動作補助装置の同示唆補助システム及び装着式動作補助装置及び装着式動作補助装置の動作補助方法
出 願 人 : 筑波大学
出願番号 : PCT/JP2008/064700

5) 発 明 者 : 山海嘉之
発明の名称 : 生体信号計測装着具及び装着式動作補助装置
出 願 人 : 筑波大学
出 願 番 号 : 2008-232091

6) 発 明 者 : 山海嘉之
発明の名称 : 装着式動作補助装置のフレーム構造
出 願 人 : 筑波大学
出 願 番 号 : 2008-248774

F. 健康危険情報

該当なし。

基礎研究グループ　総括報告

プロジェクトリーダー　和田　圭司（国立精神神経センター疾病研究第4部）

発症機序の解明ならびに予防・治療法の確立に向けた基礎研究を行った。病因遺伝子機能に影響するゲノム要因についてSCA8を題材に池田班員がリピート内に挿入されるエレメントの関与のあり方を明らかにした。蛋白質要因については蛋白質分解系に焦点を当てた研究が行われ、和田が脱ユビキチン化酵素、吉良班員がユビキチン伸長促進因子の面から研究を進めた。病因遺伝子産物に対する直接的研究としては岡澤班員が異常ハンチンチンによるDNA損傷修復能低下について新たな成果を生み出し、小野寺班員、永井班員がポリグルタミン蛋白質重合、凝集と細胞毒性との関連について研究を展開し、創薬に向けた標的の同定など基盤成果を上げた。平井班員は遺伝子導入による治療法開発に向けた研究で期待度の高い成果を示し、貫名班員はin vivo における初期病変の検出を目指して新規トランスジェニックマウスの作製を行った。このように、今後が期待できる初年度成果が各班員から報告された。それぞれの詳細については個々の班員の報告を参照されたい。

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

SCA8 リピートの生物学的特性と病原性に関する研究

分担研究者　池田佳生　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　脳神経内科学

研究協力者　宮崎一徳、森本展年、倉田智子、永井真貴子、永田哲也、武久康、阿部康二
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　脳神経内科学

研究要旨

SCA8 における低浸透率の原因解明および延長 SCA8 リピートの病態への関与を明らかにするため、SCA8 家系におけるリピート領域の DNA 構造を比較・検討し、SCA8 の浸透率と関係する可能性のある遺伝的因子として、延長 SCA8-CTG・CAG リピート内の CCG・CGG 挿入を見出した。培養細胞モデルを用いた検討では、この CCG・CGG 挿入は形態学的・生化学的に特異的な変化をもたらしたことより、延長 SCA8 リピートの病原性にはその発現様式や病態への関与を修飾する、これらの遺伝的因子の存在が関係している可能性が考えられた。

A. 研究目的

SCA8 リピート延長は当初、ほぼ純粋な小脳失調型の表現型を示す大家系で認められ、この家系構成員における SCA8 リピート延長は小脳失調症と有意な連鎖を示したが (lod score=6.8)、その後世界中から報告のあった SCA8 リピート延長陽性家系においてはしばしば小脳失調症の低浸透率が観察された。また、低頻度ながら非小脳失調症コントロール群においてもリピート延長が散見されることから、SCA8 リピート延長の病原性については不明な点が多く、臨床面では遺伝子診断・遺伝カウンセリングにおける問題点も指摘されている。また、近年 SCA8 リピート領域は CUG リピート方向および CAG リピート方向のいずれにも転写されていることが示され、それぞれの転写産物と病原性の関連が注目されている。本研究では SCA8 リピートの生物学的特性および、その病態との関連を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

岡山大学神経内科および米国ミネソタ大学の遺伝性小脳失調症家系のうち、SCA8 リピート延長陽性の 37 家系を対象として、SCA8 リピート周辺の DNA 構造を比較・検討することにより、小脳失調症の浸透率と関連する遺伝的因子を解析した。さらに、家系内発症者数の多い SCA8 家系に共通して認めた遺伝的因子を培養細胞に導入し、形態学的・生化学的に解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は 3 省指針を遵守し、文書による同意を得て行われている。

C. 研究結果

孤発性 SCA8 に比べて家系内発症者数の多い SCA8 家系においては、延長 SCA8-CTG・CAG リピート内に複数の CCG・CGG の三塩基挿入を共通して認めたが、他のタイプの SCA とは対照的に、非延長アリルにおいては挿入を認めなかった。この CCG・CGG 挿入を持つ延長 SCA8 リピートを CAG の方向に発現させるとアルギニン挿入を伴ったポリグルタミンへ翻訳されるが、これを強

制発現させた培養細胞においてはポリグルタミンの細胞内分布が変化し、核内に集積する像を認めた。また、これとは対照的に、アルギニン挿入を持たない純粋ポリグルタミンを発現する培養細胞においては目立った核内集積は認めなかった。さらに *in vitro* 翻訳からのポリグルタミン蛋白とトランスフェクトした培養細胞由来のポリグルタミン蛋白の生化学的解析の結果からは、アルギニン挿入を伴ったポリグルタミンは純粋ポリグルタミンに比べて、その凝集性が抑制されていることが示唆され、アルギニン挿入に伴うこのような生化学的な変化が、培養細胞におけるポリグルタミン蛋白の細胞内局在の違いとも関連がある可能性が考えられた。

D. 結論

延長した SCA8-CTG・CAG リピート内の CCG･CGG 挿入は SCA8 の浸透率と関係している可能性があり、延長 SCA8 リピートの病原性にはその発現様式や病態への関与を修飾する、これらの遺伝的因子の存在が関係している可能性がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

Ikeda Y, Daughters RS, and Ranum LP. Bidirectional expression of the SCA8 expansion mutation: one mutation, two genes. Cerebellum 7 (2008) 150-158.

Watanabe M, Monai N, Jackson M, Yamamoto-Watanabe Y, Ikeda Y, Suzuki C, Tomiyama M, Kawarabayashi T, Kimura T, Seino Y, Wakasaya Y, Miki Y, Matsubara E, and Shoji M. A small trinucleotide expansion in the TBP gene gives rise to a sporadic case of SCA17 with abnormal putaminal findings on MRI. Intern. Med. 47 (2008) 2179-2182.

2. 学会発表

池田佳生ら. SCA8 の浸透率と関連する遺伝的因子の解析. 第 49 回日本神経学会総会, 2008 年 5 月 16 日, 横浜.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 健康危険情報

なし

SCA8リピートの生物学的特性と病原性に関する研究

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
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　脳神経内科学　池田佳生

SCA8リピートは両方向性に発現している

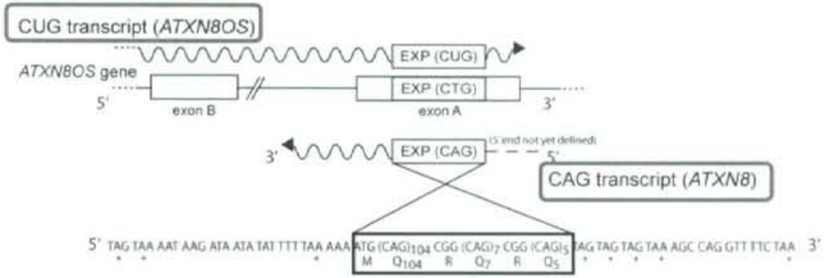
延長CUGリピートおよび延長CAGリピート由来の転写産物のいずれかもしくは両者が病態に関係している可能性がある。

SCA8家系における低浸透率の理由やコントロール群におけるSCA8リピート延長の意義は未だ明らかでない。

異常なRNAを介した病態 ？

- CUGリピート結合タンパクの変化？
- CNS特異的遺伝子のスプライシング異常？
- $(CUG)_{exp}$ RNA 凝集体の形成？

蛋白へは翻訳されない



ほぼ純粋なポリグルタミン蛋白へ翻訳される

ポリグルタミン毒性？

本研究での検討

SCA8の浸透率および病態への関与を修飾する遺伝的因子の検討

延長SCA8リピートの病原性に関係する遺伝的因子として、延長SCA8-CTG・CAGリピート内のCCG・CGG挿入を見出した。

CCG・CGG挿入あり

CCG・CGG挿入なし

すべての延長SCA8リピート・キャリアーが小脳失調症を呈さない理由としては、SCA8の発症には延長SCA8リピートの発現様式や病態への関与を修飾する遺伝的因子の存在が関係している可能性がある。

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

基礎研究　神経軸索変性を示す *gad* マウスの原因遺伝子 UCH-L1 の機能解析 に関する研究

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
研究協力者　長嶺 聖史　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

UCH-L1 (Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1) が欠損した変異マウス *gad* (gracile axonal dystrophy) は、薄束の軸索変性により感覚失調を呈するが、その発症機序は不明である。軸索変性への脂質酸化の関与が報告されているので、我々は *gad* マウスの脂質酸化に対する感受性を調べた。個体レベルでは軸索変性の増悪が、細胞レベルでは培養神経細胞の細胞死増加が観察され、*gad* マウスは脂質酸化に対して脆弱であることが明らかになった。さらに、UCH-L1 は細胞膜のリン脂質と結合してその安定化に関与することで、細胞を脂質酸化から保護している可能性が示唆された。

A. 研究目的

自然発生変異体 *gad* (gracile axonal dystrophy) マウスは後肢の進行性感覚失調を呈し、組織学的には腰部 DRG の中枢枝である延髄薄束において軸索の逆行性変性が観察されることから、運動失調における神経軸索変性の関与を解明するのに有用なモデルマウスであると考えられる。我々は *gad* マウスにおける軸索変性の原因が脱ユビキチン化酵素と言われている UCH-L1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase -L1) の遺伝的欠損によるものであることを既に報告しているが、この酵素の欠損が軸索変性を引き起こすメカニズムについてはほとんど解明されていない。本研究では *gad* マウスの病態を解析することで、UCH-L1 の生理的機能とその軸索変性への関与を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

gad マウスの延髄の組織学的解析を免疫染色や電子顕微鏡を用いて行った。そして、*gad* マウスにビタミン E 欠乏餌を与え、Rota-rod 試験による運動能力評価及び組織学的解析を行った。次に、*gad* マウスの DRG ニューロンの初代培養を行い、UCH-L1 の細胞内局在を免疫染色にて確認した。そして、ニューロンに脂質酸化ストレスや低浸透圧ストレスを与え、死細胞を計数した。更に、種々の薬剤をニューロンに投与し、死細胞数の変化を観察した。また、UCH-L1 蛋白を用いてリン脂質との結合について解析した。

C. 研究結果

組織学的解析では、*gad* マウスの延髄薄束において脂質酸化マーカー(4HNE)陽性で自家蛍光を発する凝集体が観察され、電子顕微鏡観察でも高電子密度の凝集体が認められたことから、*gad* マウスの薄束で脂質酸化が亢進している可能性が考えられた。*gad* マウスにビタミン E 欠乏餌を与えると、Rota-rod 試験にて運動能力の低下が観察され、薄束での凝集体も増加した。初代培養ニューロンの免疫染色では、UCH-L1 は細胞膜近傍に局在していた。更に、*gad* マウス由来の培養ニューロンに脂質酸化ストレス及び低浸透圧ストレスを加えると死細胞の増加が認められた。*in vitro* では、UCH-L1 蛋白はホスファチジン酸との結合が認められ、その結合は溶液の酸化還元状態及びユビキチンの有無により変化した。

従って、UCH-L1 は細胞膜近傍でリン脂質に何らかの作用を及ぼすことで細胞膜の安定化に寄与していると推測された。

D. 研究発表

1. 論文発表

- Kabuta, T., Setsuie, R., Mitsui, T., Kinugawa, A., Sakurai, M., Aoki, S., Uchida, K., Wada, K. Aberrant molecular properties shared by familial Parkinson's disease-aasociated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. **Hum. Mol. Genet**., 17, 1482-1496, 2008. 2008 Feb 4; [Epub ahead of print]
- Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K. Aberrant interaction between Parkinson's disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. **J. Biol. Chem.,** 283 23731-23738 2008 2008 June 12; [Epub ahead of print]
- Kabuta T. Wada, K. Insighs into links between familial and sporadic Parkinson's disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. **Autophagy**, 4, 827-829, 2008 2008 Jul 8;4(6). [Epub ahead of print]
- Goto, A., Wang, Y.L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., Wada, K. Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (*gad*) mouse. **Neurochem. Int.**, in press
- Setsuie, R., Sakurai, M., Sakaguchi, Y., Wada, K. Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. **Neurochem. Int.**, in press

2. 学会発表

- 日本神経化学会大会
（平成 20 年9月 11〜13 日、富山）
「脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 と脂質酸化ストレス」 口頭発表
- 日本生化学会大会
（平成 20 年 12 月9〜12 日、神戸）
「脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 と脂質酸化ストレス」 ポスター発表

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

なし

F. 健康危険情報

なし

UCH-L1 が欠損した
***gad* (gracile axonal dystrophy) マウスは**
軸索が変性して感覚失調を呈する

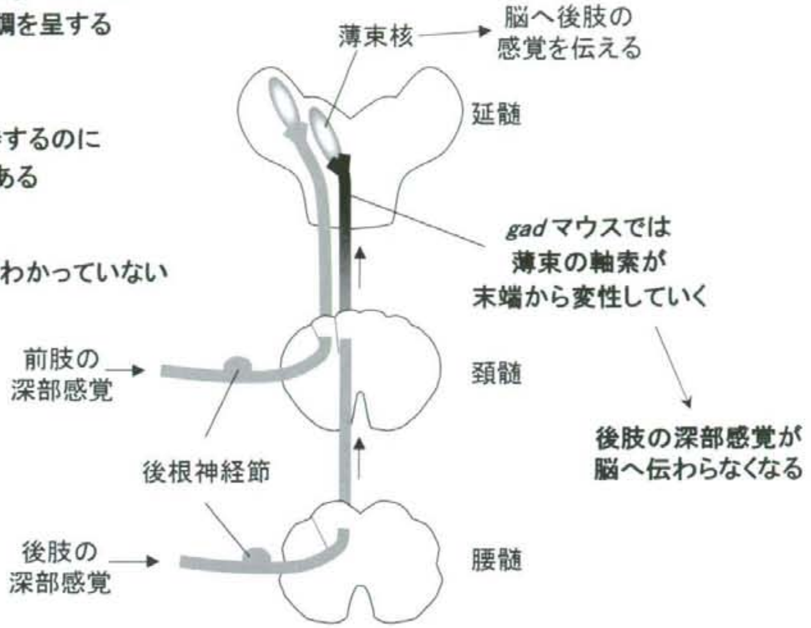
↓

UCH-L1 は軸索を維持するのに
重要な蛋白質である

⋮

しかし UCH-L1 の機能はよくわかっていない

深部感覚の伝導路



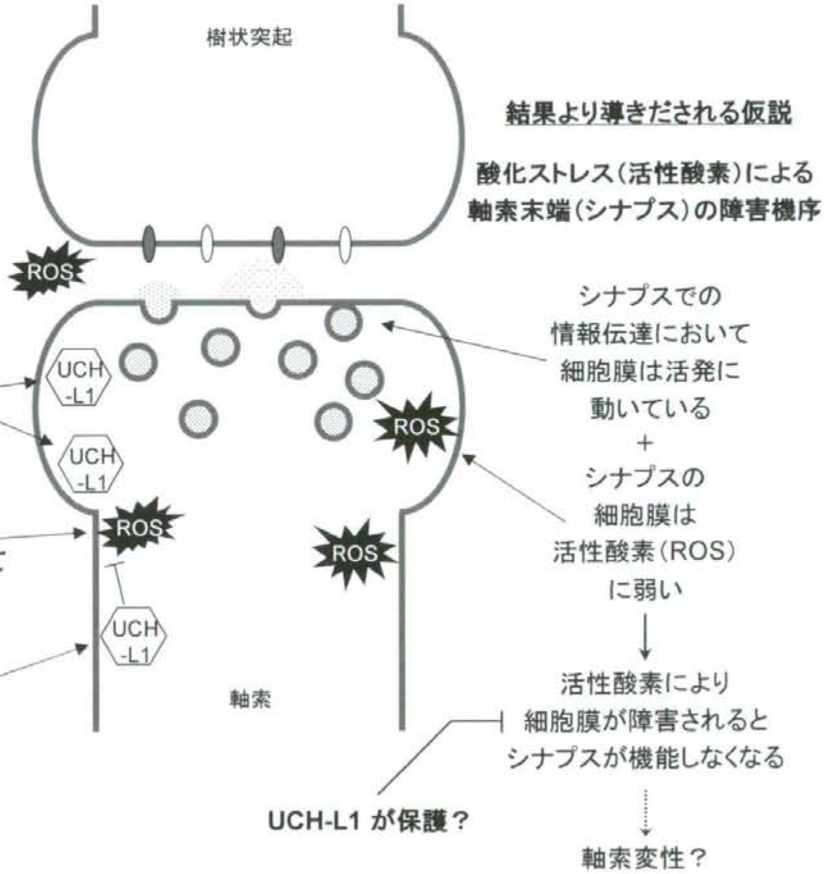
今年度の成果

UCH-L1 の新たな役割を発見した

発見(1)
UCH-L1 は細胞膜の
近傍に局在する
＋
発見(2)
UCH-L1 が欠損すると
酸化ストレス(ROS)に対して
弱くなる

↓

UCH-L1 は細胞膜を
酸化ストレスから
守っている？



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

運動失調症の病態機序における細胞内輸送機能に関する研究

分担研究者　吉良潤一　九州大学大学院医学系研究院神経内科
研究協力者　栄信孝　同上
副島直子　同上
大八木保政　同上
洲崎悦生　九州大学生体防御医学研究所　分子発現制御学分野
押川清孝　同上
中山敬一　同上

研究要旨

Machado-Joseph 病(MJD)の病態にはポリグルタミンが関与することが明らかとなったが、いまだ病態機序の詳細は不明である。最近、神経変性の過程における神経機能異常が注目されている。一方、ハエの系や培養細胞において、ユビキチン伸長因子である E4B は MJD ポリグルタミンによる毒性を抑制することが知られるが、E4B の機能の一つとして、ミトコンドリア輸送などの細胞内輸送機能への関与も示唆されている。そこで、MJD の神経機能異常を検討するために、MJD モデルマウスの臨床経過を詳細に検討し、その病初期における病理学的・生化学的異常を解明するため、特に細胞内輸送蛋白の解析を行っている。我々が作成した MJD ポリグルタミン鎖を過剰発現するトランスジェニックマウス(Tg)は約6ヶ月齢ころから進行性に増悪する歩行障害を認めた。病理学的には約7ヶ月齢ころから核内封入体を形成するが、その月齢では明らかな神経形態異常や細胞死はみとめなかったことから、運動異常の発症機序に神経機能異常が関与することが示唆された。Non-Tg および Tg マウスにおける Western blot 解析により、Tg における細胞内小胞輸送に関わる Rab5 の発現上昇傾向や、後シナプスタンパクである NR2B の発現低下が示唆された。また、Tg における E4B の発現亢進傾向が示唆された。しかし、まだ少数頭数の検討であり、今後はマウス頭数を増やす必要がある。また、E4B 遺伝子改変マウスとの比較検討、交配実験も行っていく予定である。

A. 研究目的

ポリグルタミン病は、その病態機序においてポリグルタミン鎖による細胞毒性が重要と考えられるが、その毒性の分子機序については様々な報告がある。我々はポリグルタミンによる細胞毒性の獲得において、細胞内輸送機能障害が関与する可能性を考え、その病態機序における輸送機能異常を個体レベルで解析するために、MJD Tg マウスを作成した。

一方、遺伝学的に MJD polyQ による細胞毒性はユビキチン伸長因子である E4B による抑制をうけることが報告されていることより、MJD Tg および E4B 遺伝子改変マウスを対象として、生化学的および病理学的検討を行う。病初期における変化を解析することで、新規治療標的の探索を目的とする。MJD をはじめとする脊髄小脳変性症の多くは、若年から中年に発症し、進行性に増悪する経過であり、細胞毒性の獲得に比較的長い経過をたどることが考えられるため、その生化学的、病理学的変化を検討するには、我々が今回作成した MJD155Q Tg マウスのような比較的発症が遅く、経過が長いマウスでの病前期または病初期からの経時的な検討が有用であると思われる。

B. 研究方法

MJD polyQ155 遺伝子を pPrP 発現ベクターに組み込み、トランスジェニックマウスを既に作成した(未発表)。このマウスは約6-7ヶ月齢から歩行障害を発症することが確認された。今回は5ヶ月齢、7ヶ月齢同胞オスマウス Non-Tg および Tg マウスの脳組織について、病初期を中心に経時的に、各2頭の解析をおこなった。

病理学的には1)抗ユビキチン抗体による核内封入体の検討、2)抗リン酸化ニューロフィラメント抗体(NF11)による神経軸索形態の検討、3)抗カルビンジン抗体によるプルキンエ細胞樹状突起形態を検討するため免疫染色、4)神経障害の検討のため抗 GFAP 抗体によるアストロサイトの活性化、抗 Iba1 抗体による活性化ミクログリアの検討、5)神経細胞死評価のために TUNEL 染色をおこなった。

また、平行してマウス脳組織を用いて Western blotting によるタンパク発現の比較検討を、シナプス関連タンパクについては前シナプスタンパクであるシナプトフィシン、後シナプスタンパクである PSD95、NMDA 受容体サブユニットである NR2B について検討した。また、細胞内輸送タンパクとして Rab ファミリーの一部である Rab1, Rab4, Rab5 について検討した。E4B タンパク量の比較検討のため抗 E4B 抗体による検討も行った。

(倫理面への配慮)

九州大学の動物実験倫理規定に従って、動物は愛護的に扱った。九州大学動物実験承認番号 A20-159-0

C. 研究結果

MJD 155Q Tg マウスでは、5ヶ月齢までは Non-Tg と運動機能上も変わらないが、7ヶ月齢頃には歩行障害がみられた。病理所見では各2頭ずつの初期検討ではあるが、7 ヵ月齢のマウスにおいて脳全体の約10%程度にユビキチンに対する免疫染色にて核内封入体の出現が確認された。検索する限り光顕レベルでの検討では神経軸索やプルキンエ細胞樹状突起の形態に明らかな異常は認めなかった。またミクログリア活性化やグリオーシスの出現も認めず、TUNEL 染色でも明らかな神経細胞死の所見もみられなかった。さらに、Non-Tg および 155Q Tg マウスにおける Western blot 解析の比較では、E4B が Tg マウス脳皮質において発現が増加していた。また、155Q Tg マウスでは NR2B は減少傾向であった。Rab1, 4, 5 ついては一定の傾向がなかったため、今後頭数を増やすとともに、さらに他の Rab family 蛋白についても解析中である。現在九州大学生体防御医学研究所から E4B 遺伝子欠損マウスの譲渡を受け、交配して仔を得ている。今後、このマウスについても同様の解析を行う。

D. 研究発表

1. 論文発表

Sakae N. et al. : Hum Mol Genet. 17(20) 3191-3203, 2008

Iwaki A. et al. : J Med Genet. 45(1) 32-5, 2008

Miura S. et al.: Neurology 67(7) 1236-41, 2006

2. 学会発表

なし

(発表誌名・巻号・頁・発行年等も記入)

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

特許取得　なし

実用新案登録　なし

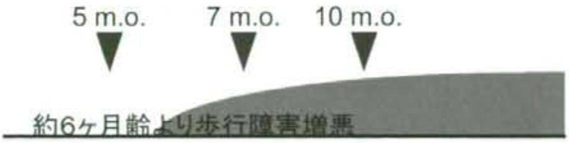
その他　なし

F. 健康危険情報

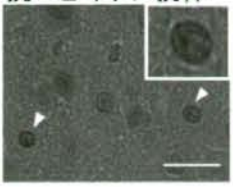
(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)

なし

MJD155Q Tgマウス



抗ユビキチン抗体

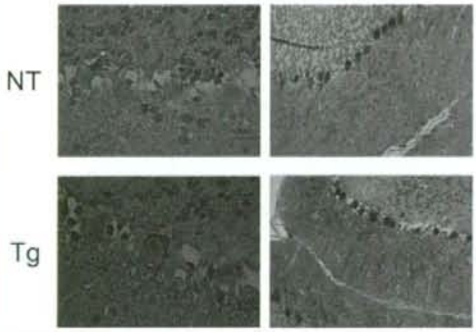


6−7ヶ月齢から
核内封入体出現

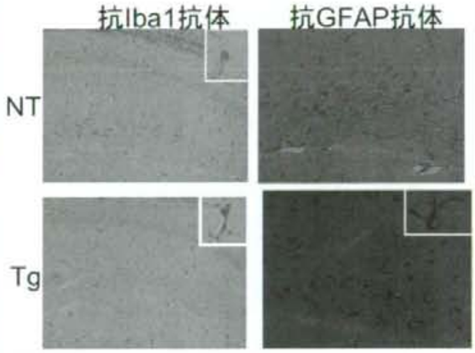
免疫染色による病理学的解析

神経形態では差はない(7ヶ月齢、小脳)

抗リン酸化ニューロフィラメント抗体(2F11)　抗カルビンジン抗体



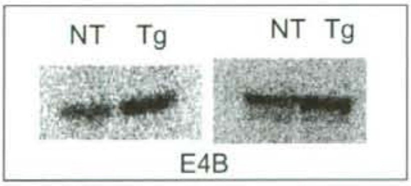
ミクログリア活性化およびアストロサイトの活性化もない(7ヶ月齢、海馬)



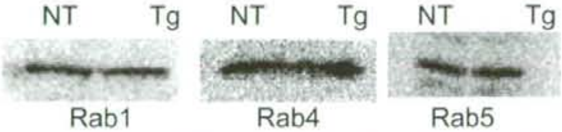
Western blotによるタンパク発現解析

シナプス関連タンパクの検討(7ヶ月齢)
NR2BはTg脳で低下

E4BはTg脳で発現増加(7ヶ月齢)



細胞内輸送関連タンパクの検討(7ヶ月齢)
Rab1, 4, 5



E4B遺伝子改変マウスとの比較検討および交配実験による生化学・病理学的検討を行っていく

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

ポリグルタミン病の核機能病態に基づく治療開発 に関する研究

分担研究者 岡澤 均 東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野

研究協力者 田村拓也 東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野

榎戸 靖 東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野

伊藤日加瑠 東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野

研究要旨

ポリグルタミン病態において、異常ハンチンチンは Ku70 と結合して DNA 損傷修復機能を阻害し、病態の悪化につながることが示された。先に報告した、HMGBとの結合と考え合わせると、異常ハンチンチンタンパクは複数の DNA 修復タンパクをターゲットとして結合し、DNA 損傷修復機能低下を介して DNA ダメージを引き起こしていることが想定される。

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特徴である。私たちは核に移行したポリグルタミン病タンパクが如何なる機能障害を起こすかについて研究を行って来た。これまでに、異常ポリグルタミンタンパクを発現する初代培養神経細胞の可溶性核タンパクの量的変動をプロテオーム解析し、網羅的手法で核機能障害の実態を把握する試みを行った。この結果、HMGB タンパク群の減少がアタキシン1感受性神経細胞とハンチンチン感受性神経細胞の両者において認め、さらに HMGB 減少に伴うDNA 損傷修復機能低下を示唆する結果を得た(Qi ML et al., Nature Cell Biology 2007)。今回は、さらに DNA 修復障害仮説を検証するために、インタラクトームから示唆される他の DNA 修復タンパクの病態への関与を検討した。

B. 研究方法

インタラクトームデータから Ku70 とハンチンチンとの結合が示唆された。そこで、免疫沈降により異常ハンチンチンとKu70 の結合を確認し、さらに、異常ハンチンチン(HttExon1)発現培養神経細胞および R6/2 マウス線条体組織を用いて免疫沈降および免疫組織化学を行った。また、同様のサンプルから Htt 存在／非存在下の DNA-PK complex 形成と DNA 修復機能の検討を行った。続いて、elav/GAL4 などを用いた Ku70 発現トランスジェニックショウジョウバエ、NSE エンハンサー／プロモーターを用いた Ku70 発現トランスジェニックマウスを作製し、これと異常ハンチンチン発現ショウジョウバエ、および異常ハンチンチン発現マウス(R6/2)を交配させ、病理学的変化ならびに行動学異常に対する効果を検証した。

(倫理面への配慮)

動物実験および組み替え DNA 実験は所轄官庁の指針に従って行い、また東京医科歯科大学の承認を得て行った。

C. 研究結果

免疫沈降により異常ハンチンチンと Ku70 の結合を確認し、さらに、異常ハンチンチン発現培養神経細胞および R6/2 マウスの線条体神経細胞において両者の凝集体における共局

在を観察した。また、Ku70 と異常ハンチンチンの結合が DNA-PK complex の DNA 修復機能低下につながることを前述の in vitro 実験系で確認した。同様な修復機能低下はマウス脳組織の核抽出物でも認められた。続いて、elav/GAL4 などを用いた Ku70 発現トランスジェニックショウジョウバエ、NSE エンハンサー／プロモーターを用いた Ku70 発現トランスジェニックマウスを作製し、これと異常ハンチンチン発現ショウジョウバエ、および異常ハンチンチン発現マウス(R6/2)を交配させ、病理学的変化ならびに行動学異常に対する効果を検証した。この結果、Ku70 の補足的発現は形態学的にも、また、行動解析（寿命解析を含む）においても病態を改善させることが示された。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Inagaki R, Tagawa K, Qi ML, Enokido Y, Ito H, Tamura T, Shimizu S, Oyanagi K, Arai N, Kanazawa I, Wanker EE, and *Okazawa H. (2008) Omi / HtrA2 is relevant to the selective vulnerability of striatal neurons in Huntington's disease. ***Eur. J. Neurosci*** 28, 30-40.

2. Enokido Y, Yoshitake A, Ito H, and *Okazawa H. (2008) Age-dependent change of HMGB1 and DNA double-strand break accumulation in mouse brain. ***Biochem Biophys Res Commun***. 376, 128-133 (2008).

3. Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Kamiya T, Okazawa H, and Abe K. (2008) Progressive decrease in the level of YAPdeltaCs, pro-survival isoforms of YAP, in the spinal cord of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. ***Journal of Neuroscience Research.*** Oct 24. [Epub ahead of print]

4. Takahashi K, Yoshina S, Maekawa M, Ito W, Inoue T, Shiwaku H, Arai H, Mitani S, and *Okazawa H (2009) Nematode Homologue of PQBP1, a Mental Retardation Causative Gene, Is Involved in Lipid Metabolism. ***PLoS One*** 4(1), e4104.

5. Tamura T, Sone M, Yamashita M, Wanker EE, and *Okazawa H (2009) Glial cell lineage expression of mutant ataxin-1 and huntingtin induces developmental and late-onset neuronal pathologies in Drosophila models. ***PLoS One*** *in press*

6. Sone M, Uchida A, Komatsu A, Suzuki E, Ibuki I, Asada M, Shiwaku H, Tamura T, Hoshino M, Okazawa H, and Nabeshima Y (2009) Loss of *yata*, a novel gene regulating the subcellular localization of APPL, induces deterioration of neural tissues and lifespan shortening. ***PLoS One*** *in press*

2. 学会発表

岡澤 均「ポリグルタミン病における DNA 損傷修復機能低下」 平成２０年度厚生労働省科学研究費補助金「運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究」平成２０年度 研究班会議、東京、2009.1.15-16

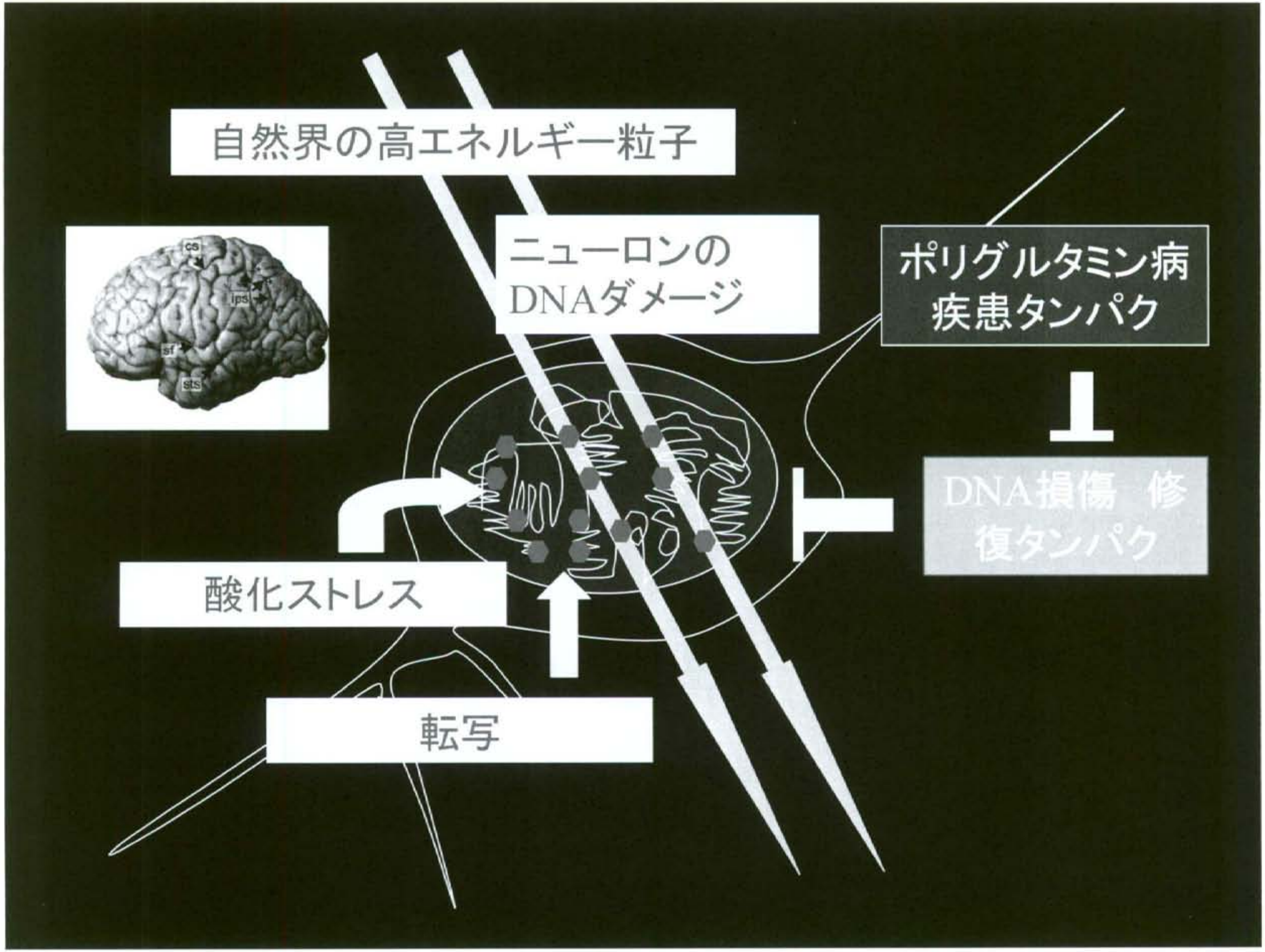
その他 20 件

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

（国際特許）US-2008-0188408 Protein and Preventive/Remedy for Neurodegnerative Diseases such as Polyglutamine Diseases by Using the Same. 発明者 岡澤 均 出願人 東京医科歯科大学（出願日：2008/8/7）

F. 健康危険情報

なし。


自然界の高エネルギー粒子
cs
ips
sf
sts
ニューロンの
DNAダメージ
ポリグルタミン病
疾患タンパク
DNA損傷 修
復タンパク
酸化ストレス
転写

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2008年度終了報告書
運動失調症に関する調査研究

伸長ポリグルタミン蛋白は重合により細胞毒性を獲得する

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センター
研究協力者	高橋 俊昭	新潟大学医学部保健学科
	堅田 慎一	新潟大学脳研究所神経内科
	西澤 正豊	新潟大学脳研究所神経内科

研究要旨

ポリグルタミン病における伸長ポリグルタミン蛋白は、単量体から二量体、多量体へと重合し，不溶性の封入体を形成する性質をもつ。病態の詳細な理解と治療研究のために、伸長ポリグルタミン蛋白が、どの段階で細胞毒性を獲得するか詳細な検証が望まれている。本研究は、伸長ポリグルタミン蛋白の細胞傷害獲得起点を明らかにすることを目的にポリグルタミン蛋白の単量体と多量体の細胞毒性の比較検討を行った。単量体構造を保持する伸長ポリグルタミン蛋白を作成し、分化誘導した安定発現細胞(SH-SY5Y)の生存時間解析にて細胞毒性を検討した。単量体のポリグルタミン蛋白を安定発現する細胞株は、ポリグルタミン蛋白非発現細胞に比し、有意な細胞毒性は認めず、多量体を形成するポリグルタミン蛋白を安定発現する細胞株においてのみ有意な細胞毒性が得られた。本研究は、伸長ポリグルタミン蛋白の細胞毒性獲得にはその重合が、重要な起点となることを示した。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の病態には、封入体形成前の可溶性の伸長ポリグルタミン蛋白による細胞毒性の知見が蓄積されている。伸長ポリグルタミン蛋白は、単量体から多量体形成、フィブリル、ファイバー形成へと進展する自己重合特性を有するため、どの段階で毒性を獲得するかの検証が望まれている。 本研究では、単量体の状態を保ち重合形成へ進展しないコンストラクトを作成し、単量体と重合体との細胞毒性の違いを検討することで、細胞毒性の獲得が二量体形成以降であるかどうかを検証した。

B. 研究方法

単量体構造を保持するポリグルタミン蛋白はN末およびC末に蛍光蛋白を融合し作成した(図1上段)。このコンストラクトについて蛍光顕微鏡観察(TE-2000U; Nikon)での封入体形成率の評価、二分子 FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)解析(AQUACOSMOS 画像解析システム;浜松ホトニクス)による蛋白-蛋白相互作用がないことの確認を行った。一方、ポリグルタミン蛋白のC末のみに蛍光蛋白を融合したコンストラクトは重合状態へ進展する。各々のコンストラクトを安定発現する SH-SY5Y 細胞株を樹立し、レチノイン酸と脳由来神経栄養因子処理にて神経分化誘導し、それぞれの細胞が細胞死に至る過程を直視下に観察し、生存時間解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で対象とするヒト由来試料については、試料, DNA の保存・管理、解析について患者様およびそのご家族に説明し、研究目的に使用することへの同意を得ている。また個人のプライバシーについても十分に保護をしている。

C. 研究結果

蛍光顕微鏡観察では、単量体コンストラクト(Q56)は封入体形成を認めなかった。二分子FRET 解析で、単量体コントロール(monomeric CFP & monomeric YFP) と同様の

FRET 値を呈し、二量体形成をきたさないことを確認した(図1下段)。これらの結果より、作成した単量体コンストラクトは重合形成しないといえた。続いて、単量体および重合形成するポリグルタミン蛋白の安定発現細胞株(SH-SY5Y)を樹立し、神経分化誘導ののち、生存時間解析をおこなった。重合形成コストラクト群、単量体コンストラクト群、non-transfected SH-SY5Y 細胞群 (control)の生存時間解析を行い、それぞれの群で平均生存日数は 3.0 日、5.0 日、6.0 日であり、log-rank 検定で重合形成コストラクト群は単量体コンストラクト群に比して有為な生存時間の延長を認めた(p<0.001)。一方、単量体コンストラクトと control の SH-SY5Y 細胞群間では有意差はなかった(図2)。以上の結果から、ポリグルタミン蛋白の重合が細胞毒性の獲得に重要な要因であると考察した。

図1 単量体コンストラクトの作成

上段は作成した単量体コンストラクトを示す。下段は、同コンストラクト発現細胞の FRET 観察像を示す。

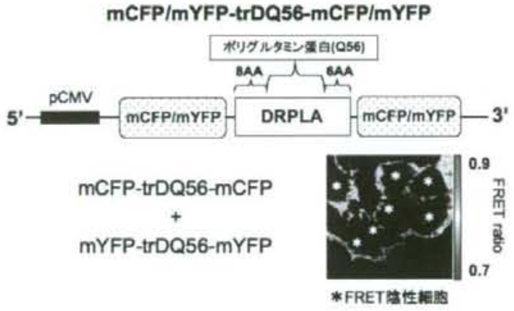
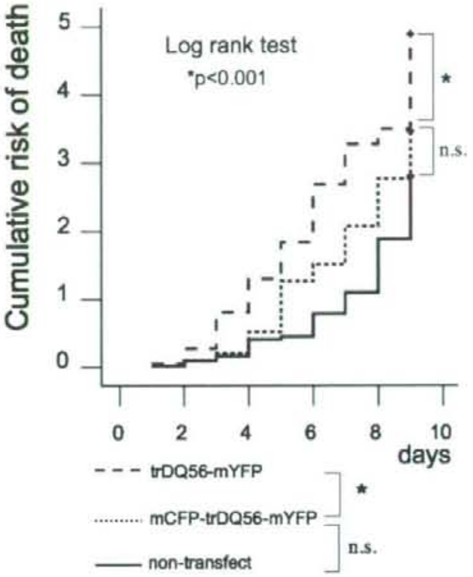


図2 細胞毒性の比較検討。

細胞死の累積リスクを縦軸に示し、横軸は神経分化誘導後の観察期間を示す。



D. 研究発表

1. 論文発表

堅田慎一. 細胞障害性獲得における伸長ポリグルタミン鎖の重合形成の重要性. 新潟医学会雑誌(投稿中)

2. 学会発表

The American Society for Cell Biology 48th meeting (San Francisco, CA, Dec.14. 2008) にて発表。

title: Expanded polyglutamine proteins have little cytotoxic effect in the monomeric state but induce the cytotoxicity in the oligomeric states. auther: S. KATADA, T. TAKAHASHI, M. NISHIZAWA, O. ONODERA

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

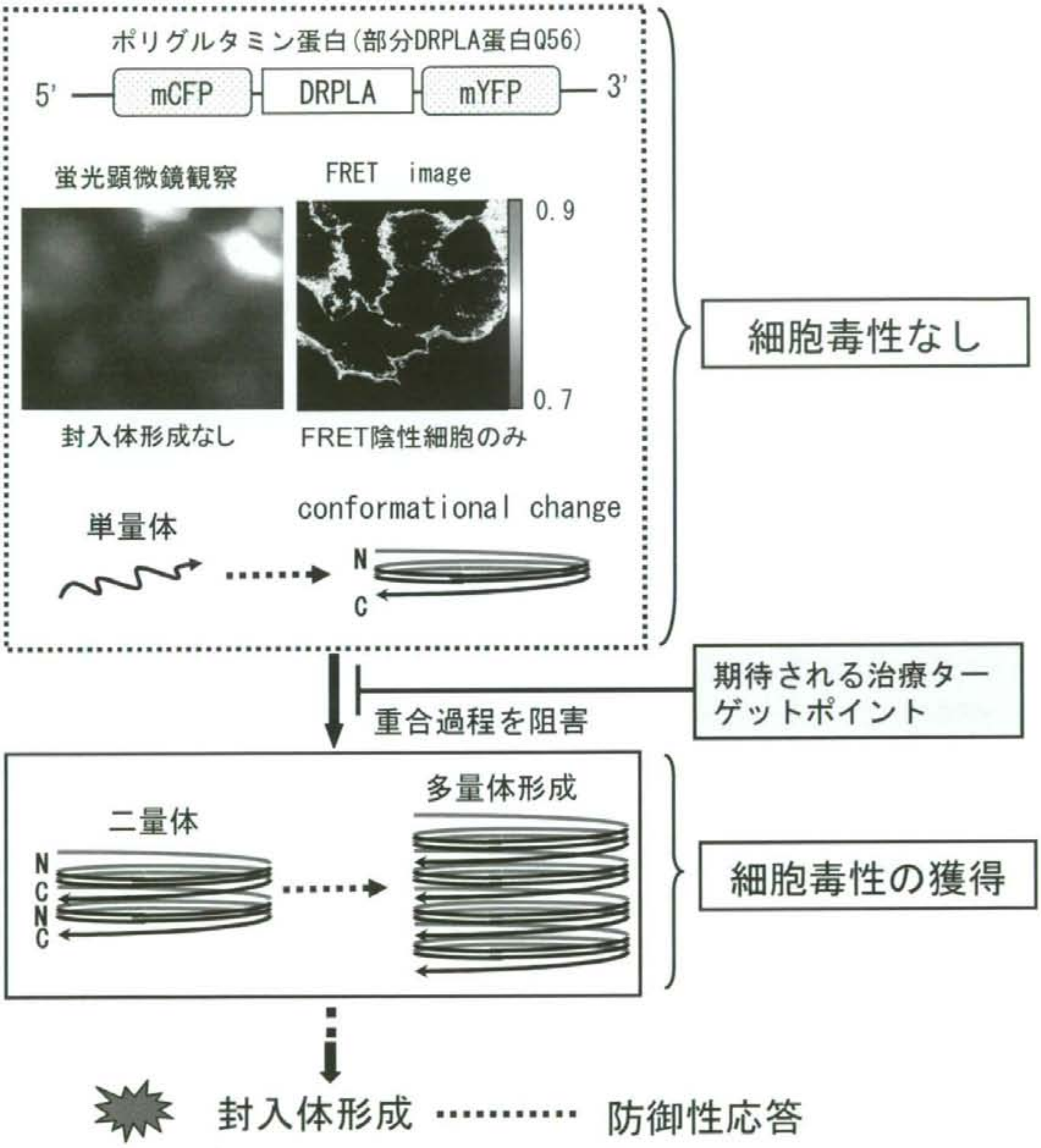
特にありません。

F. 健康危険情報

特にありません。

● 2008年度 運動失調症に関する調査研究報告書

研究名 「伸長ポリグルタミン蛋白は重合により細胞毒性を獲得する」



両端を蛍光蛋白標識したポリグルタミン蛋白(Q56)は封入体を形成せず、すべてFRET陰性を示し、単量体構造を保持していた。この単量体の安定発現細胞株(SH-SY5Y)は、明らかな細胞毒性を発揮せず、通常の重合形成するポリグルタミン蛋白の安定発現細胞株(SH-SY5Y)において、細胞毒性を確認した。本研究は、伸長ポリグルタミン蛋白の細胞毒性獲得にはその重合が、重要な起点となることを示した。

単量体からの重合を抑制する薬剤は候補治療薬として期待される。

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

表面プラズモン共鳴法を用いた異常伸長ポリグルタミン鎖特異的凝集阻害化合物の スクリーニング系の樹立

分担研究者	永井 義隆	国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部
研究協力者	岡本 佑馬	国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部
	藤掛 伸宏	国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部
	ポピエル 明子	国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部
	戸田 達史	大阪大学 大学院医学系研究科 臨床遺伝学
	乾 隆	大阪府立大学 大学院環境生命科学研究科 蛋白質科学
	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

近年、ポリグルタミン(PolyQ)病など多くの神経変性疾患において、異常蛋白質のミスフォールディング・凝集が共通に神経変性を引き起こすと考えられるようになった。我々はこれまでに異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 が PolyQ 蛋白質の凝集を阻害し、PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを明らかにし、さらにハイスループットスクリーニングにより約 100 種類の PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。本研究では、PolyQ 凝集阻害化合物の異常伸長 PolyQ 蛋白質に対する結合特異性・親和性の評価系樹立を目的とし、表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いた解析を行った。その結果、QBP1 は Thio-Q62 に特異的に結合(K_d = 5.7 μM)し、Congo red は Thio-Q0、-Q19、-Q62 いずれにも非特異的に結合することが明らかになった。Native PAGE/CD から QBP1 は Thio-Q62 の毒性 β シート構造変移を阻害するが、Congo red はその阻害活性は弱く、凝集過程を阻害することが示された。さらに、様々な QBP1 変異体を用いた解析から、Thio-Q62 への結合親和性と凝集阻害活性が有意に相関することが明らかとなった。以上の結果から、SPR は PolyQ 病の治療薬開発に向けた PolyQ 凝集阻害化合物の結合特異性・親和性の評価に有用であると考えられた。

A. 研究目的

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン(PolyQ)病などの多くの神経変性疾患において、異常蛋白質のミスフォールディング・凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが示唆されるようになった。このうち PolyQ 病は種々の脊髄小脳失調症、ハンチントン病などの9疾患の総称で、PolyQ 鎖の異常伸長(>Q40)により変異蛋白質がβシート構造への異常コンフォメーション変移を獲得して難溶性凝集体を形成し、その結果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。我々は異常伸長PolyQ 蛋白質のミスフォールディング・凝集を治療標的と考えて、これまでに異常伸長 PolyQ 鎖特異的結合ペプチド QBP1 (SNWKWWPGIFD)が異常伸長 PolyQ 蛋白質の異常βシート変移・凝集を阻害し、PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを明らかにした。さらにより高い細胞膜透過性・脳内移行性が期待される低分子化合物に着目し、大規模化合物ライブラリー(約 46,000 個)からのハイスループットスクリーニングを行い、これまでに約 100 種類の新規 PolyQ 凝集阻害化合物を同定した。

しかしながら、一般的に化合物スクリーニングにおいて偽陽性ヒットとなり易い非特異的結合化合物群が知られており、最近多くのアミロイド凝集阻害化合物が非特異的結合化合物である可能性が示された(Feng et al., *Nat Chem Biol*, 2008)。したがって、凝集阻害化合物の異常伸長 PolyQ 鎖特異的結合活性を効率良く評価することが重要であると考えられる。そこで本研究では、分子間結合を迅速・簡便に高感度で解析できる表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いて、異常伸長 PolyQ 蛋白質に対する結合特異性・結合親和性を評価し、特異的な PolyQ 凝集阻害化合物のスクリーニング系を樹立することを目的とした。

B. & C. 研究方法、結果および考察

①PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長 PolyQ 鎖結合特異性の SPR 解析:まず、様々な PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長鎖結合特異性を明らかにするために、SPR 解析装置 Biacore 1000 を用いて分子間相互作用を検討した。様々な PolyQ 鎖長の Thioredoxin-PolyQ 融合蛋白質(Thio-Q0、-Q19、-Q62)をセンサーチップ(CM-5)上に固定化して SPR 解析を行った結果、QBP1 は Thio-Q0/Q19 には有意な結合を認めなかったが、

Thio-Q62 に特異的な結合活性(K_d = 5.7 μM)を示すことが明らかになった。一方、Congo red は Thio-Q0、-Q19、-Q62 いずれにも非特異的に結合することが明らかになった。以上の結果から、SPR は PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長鎖結合特異性の評価に有用であると考えられた。

②異常伸長PolyQ蛋白質のβシート構造変移に対する PolyQ 凝集阻害分子の影響:一方、PolyQ 凝集阻害分子の結合特異性の意義を明らかにするために、Native PAGE、円偏光二色性分散(CD)を用いて、異常伸長 PolyQ 蛋白質のβシート構造変移に対する影響を検討した。その結果、QBP1 は Thio-Q62 モノマーの毒性βシート構造変移を阻害する一方で、Congo red はβシート構造変移の阻害活性は弱く、凝集過程を阻害することが明らかになった。以上の結果から、異常伸長PolyQ鎖への結合特異性が毒性βシート構造変移の阻害に重要であることが示唆された。

③PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長 PolyQ 鎖結合親和性と凝集阻害活性との関連:次に異常伸長 PolyQ 鎖結合親和性と凝集阻害活性との関連性を明らかにするために、様々な QBP1 変異体を作製し、Thio-Q62 への結合親和性および凝集阻害活性を検討した。その結果、$(QBP1)_2$、QBP1-M8 (—WKWWPGIF-)、QBP1-N9 (—WKWWPGIFD)の順に強い結合親和性を示し(K_d = 0.6、4.6、24.0 μM)、凝集阻害活性も強いことが明らかになった。以上の結果から、Thio-Q62 への結合親和性と凝集阻害活性が有意に相関することが明らかとなった。

(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) Tomita K, Popiel HA, *Nagai Y, Toda T, Yoshimitsu Y, Ohno H, Oishi S, Fujii N. Structure-activity relationship study on polyglutamine binding peptide QBP1. *Bioorg Med Chem* 17, 1259-1263 (2009)

2) Okamoto Y, *Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Yoshioka T, Toda T, Inui T. Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregate inhibitors to the expanded polyglutamine stretch. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 634-639 (2009)

3) Kanagawa M, Nishimoto A, Chiyonobu T, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Wang F, Fujikake N, Taniguchi M, Lu Z, Tachikawa M, Nagai Y, Tashiro F, Miyazaki J, Tajima Y, Takeda S, Endo T, Kobayashi K, Campbell KP, Toda T. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet* 18, 621-631 (2009)

4) Popiel HA, *Nagai Y, Fujikake N, Toda T. Delivery of the aggregate inhibitor peptide QBP1 into the mouse brain using PTDs and its therapeutic effects on polyglutamine disease mice. *Neurosci Lett* 449, 87-92 (2009)

5) *Nagai Y, Popiel HA. Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: Exposed β-sheet hypothesis. *Curr Pharm Des* 14, 3267-3279 (2008)

6) Nakayama H, Hamada M, Fujikake N, Nagai Y, Zhao J, Hatano O, Shimoke K, Isosaki M, Yoshizumi M, Ikeuchi T. ER stress is the initial response to polyglutamine toxicity in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 550-555 (2008)

7) Fujikake N, *Nagai Y, Popiel HA, Okamoto Y, Yamaguchi M, Toda T. Heat shock transcription factor 1 (HSF1)-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* 283, 26188-26197 (2008)

8) Kaminosono S, Saito T, Oyama F, Ohshima T, Asada A, Nagai Y, Nukina N, Hisanaga S. Suppression of mutant huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability. *J Neurosci* 28, 8747-8755 (2008)

9) 永井義隆、藤掛伸宏 神経疾患と分子シャペロン *Clinical Neuroscience* (in press)

10) 永井義隆、ポピエル明子 脊髄小脳変性症ー What's new?「遺伝子治療」 *Clinical Neuroscience* 27, 95-98 (2009)

11) 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* 53, 235-241 (2008)

2. 学会発表

1) 岡本佑馬、永井義隆、藤掛伸宏、ポピエル明子、戸田達史、乾隆 表面プラズモン共鳴法を用いた異常伸長ポリグルタミンタンパク質に対する凝集阻害分子の結合特異性の解析 第 51 回日本神経化学会 (2008.9、富山)

2) 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 ポリグルタミン蛋白質の毒性構造変移の捕捉ー露出βシート仮説の提唱ー 第 31 回日本神経科学会 (2008.7、東京)

3) 永井義隆、高橋保夫、岡本佑馬、ポピエル明子、藤掛伸宏、金城政孝、戸田達史 蛍光相関分光法を用いた細胞内ポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出とその阻害 第 49 回日本神経学会 (2008.5、横浜)

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危険情報

なし