

CDK の kinase 活性を調節することが明らかとなった。このように、今回我々は UCH-L1 の新たな分子機能を見いだした。

またショウジョウバエ UCH のノックダウンにより MJD モデルの複眼変性が悪化した。この結果から、UCH-L1 は薄束神経細胞の保護だけでなく、ポリグルタミン病においても神経保護的に機能している可能性が考えられた。

MJD モデルマウスやアルツハイマー病剖検脳において Cdk5 の調節因子である p39 や p25 の上昇が報告されるなど (Patrick et al. Nature. 1999. Chou et al. Neurobiol. Dis. 2008)、CDK の活性異常が神経変性に関わるという報告が多数あることから、今回見いだした UCH-L1 の CDK 活性調節機能は、UCH-L1 の神経保護作用に関与することが示唆された。

D. 研究発表

1. 論文発表

Goto A, Wang YL, 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. 2009; 54 (5-6): 330-338.

Setsuie R, Sakurai M, Sakaguchi Y, Wada K. Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3. Neurochem. Int. 2009; 54 (5-6): 314-321.

Kabuta T, Kinugawa A, Tsuchiya Y, Kabuta C, Setsuie R, Tateno M, Araki T, Wada K. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 aberrantly interacts with tubulin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009; 387 (1): 121-126.

Mitsui T, Hirayama K, Aoki S, Nishikawa K, Uchida K, Matsumoto T, Kabuta T, Wada K. Identification of a novel chemical potentiator and inhibitors of UCH-L1 by in silico drug screening. Neurochem. Int. In press.

2. 学会発表

株田智弘: パーキンソン病関連変異型 UCH-L1 の異常な分子的性質. Cell Biology Summer Meeting 2009, つくば, 7. 11, 2009

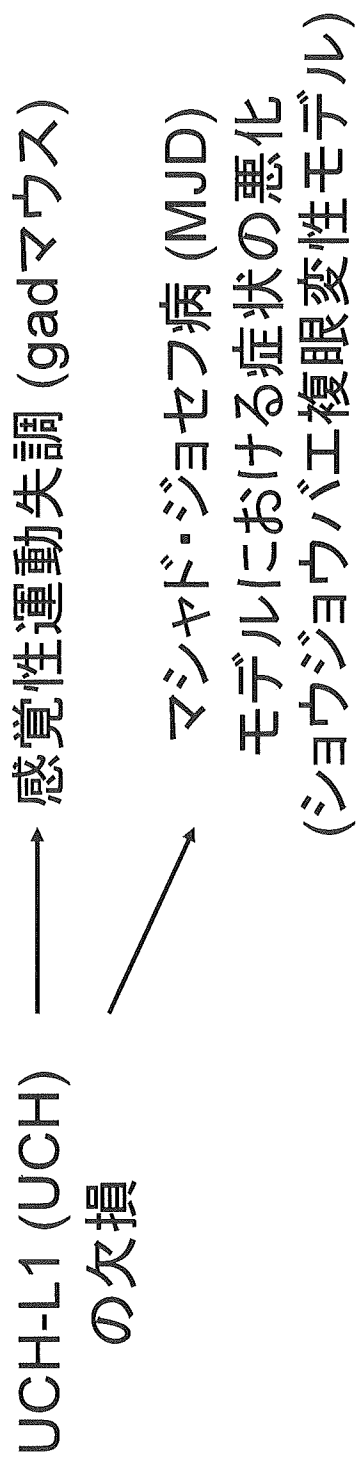
和田圭司: 脱ユビキチン化酵素と axonal dystrophy: gad マウス研究からの教訓. 第 41 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 神戸, 9. 4, 2009

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

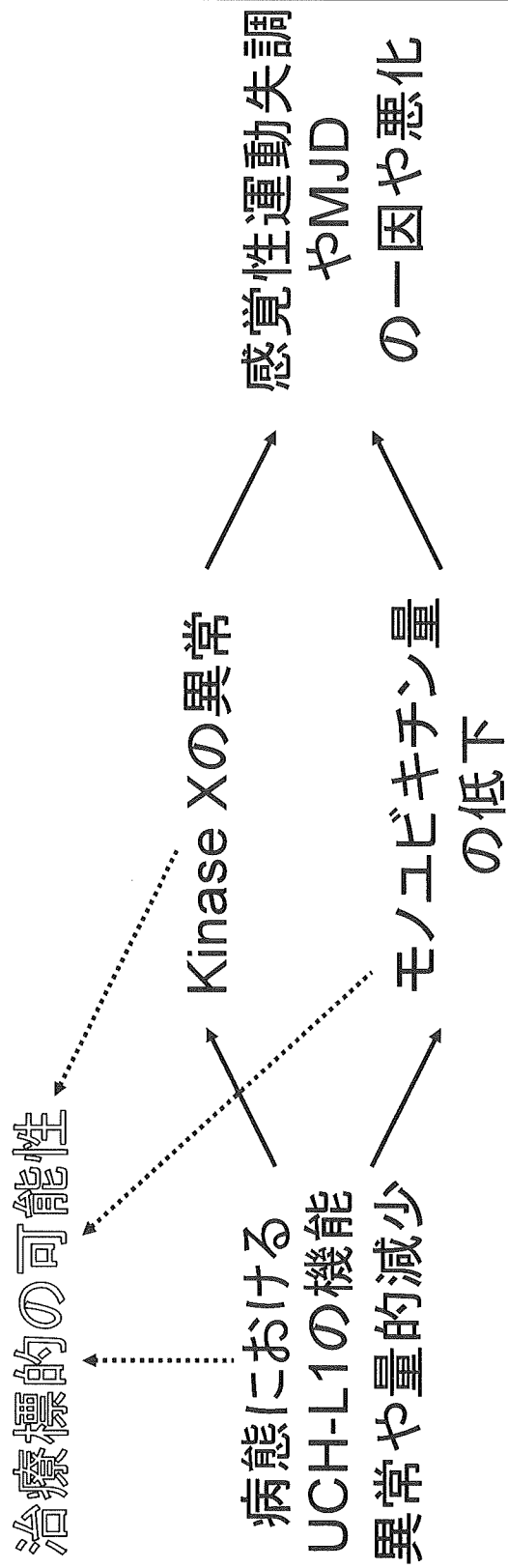
なし

F. 健康危険情報

なし



UCH-L1は感覚神経の保護だけでなく、
 ポリグルタミン病においても神経保護的に働く可能性がある。



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

遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝子治療法開発

分担研究者	平井 宏和	群馬大学大学院医学系研究科
研究協力者	飯塚 朗	群馬大学大学院医学系研究科
	高山 清彦	群馬大学大学院医学系研究科

研究要旨

遺伝性脊髄小脳変性症は根本的な治療法が確立していない。しかし、近年の研究により分子レベルから病態解明が急速に進み、それに基づく治療への道筋も明らかになりつつある。とくに、培養細胞に原因遺伝子を発現させた実験系により、分子シャペロンやユビキチンプロテアソーム系を促進する遺伝子を発現させることで、原因遺伝子産物の毒性及び細胞死を抑制できることが報告され、治療への応用が期待されている。本研究ではレンチウイルスベクターを用いて、自然発生運動失調モデルマウスの運動失調が改善するのかを検討した。また、毒性がない緑色蛍光たんぱく質を発現する高力価のレンチウイルスベクターを生直後のラット小脳に接種することで、レンチウイルスベクターが小脳プルキンエ細胞に及ぼす毒性の有無について検討した。

A. 研究目的

(1)我々はこれまでに、レンチウイルスベクターを用いてマウス小脳のプルキンエ細胞に効率的に外来遺伝子を導入する方法を開発した。また、その技術を用いて、プルキンエ細胞に異常伸長したポリグルタミンを発現するマウスの運動失調を改善させることに成功した。しかし、これは人工的に作成したマウスであるため、自然発生の運動失調マウスにも効果があるのかは不明である。そこで、小脳に異常がある自然発生運動失調マウスを、レンチウイルスベクターを用いて治療し、運動失調改善が可能であるのかを検討した。

(2)第3世代レンチウイルスベクターは安全性が高く、細胞障害性もほとんどないと言われているが、本当に何の毒性もないのかは詳細に検討されていない。そこで、GFPを発現する高力価レンチウイルスベクターを、生直後のマウス小脳に接種し、プルキンエ細胞の樹状突起の伸長及び、シナプス機能の成熟への影響を観察し、レンチウイルスベクターが本当に神経

細胞への毒性をもたないのかを検討した。

B. 研究方法

(1)小脳プルキンエ細胞に特異的に発現する $\delta 2$ グルタミン酸受容体($\delta 2$ 受容体)にミスマッチ変異をもち、 $\delta 2$ 受容体を欠損する自然発生ミュータントマウスを用いた。 $\delta 2$ 受容体欠損マウスは生後2週間程度すると顕著な運動失調を示した。生後6日の $\delta 2$ 受容体欠損マウスに野生型 $\delta 2$ 受容体遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを接種し、運動失調の程度、プルキンエ細胞の電気生理学的機能を生後30日の時点で検討した。

(2) 1×10^{10} TU(Transduction unit)/mlのGFP発現レンチウイルスベクター $5 \mu\text{l}$ を、生後0日のラットの小脳皮質に接種した。生後21日の時点で、小脳スライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法にてウイルス感染プルキンエ細胞を解析した。このときにLucifer yellowを加えた記録電極を用いることで、プルキンエ細胞を蛍光標識し、電気生理解析後に固定した。次に、GFP発現プルキンエ細胞の形態を共焦点

レーザー顕微鏡で撮像し、プルキンエ細胞の樹状突起の発達に変化がないかを 3 次元形態解析ソフト NeuroLucida/Neuroexplorer を用いて解析した。

C. 研究結果

(1) レンチウイルスベクターを用いて野生型 $\delta 2$ 受容体遺伝子を導入したマウスの運動能力を生後 30 日の時点でロータロッドを用いて測定したところ、GFP だけを発現させたマウス、未接種マウスより、有意に運動能力が高かった。小脳スライスを作成し、プルキンエ細胞のシナプス伝達を調べたところ、 $\delta 2$ 受容体発現により平行線維-プルキンエ細胞シナプス、登上線維-プルキンエ細胞シナプスともに異常が回復していた。小脳スライスを活性化マイクログリアの指標である Iba-1 の抗体で免疫染色を行ったが、レンチウイルスベクターの接種による免疫反応は観察されなかった。

(2) 生後 0 日でレンチウイルスベクターの接種を受けたラットのプルキンエ細胞を生後 21 日の時点で観察した。樹状突起はよく発達していたが、全体的な樹状突起の形態は不規則であった。NeuroLucida/Neuroexplorer により詳細に解析したところ、ウイルス感染したプルキンエ細胞の樹状突起の長さは約 10% 短かった。次にウイルス感染したプルキンエ細胞をパッチクランプ法で調べたところ、平行線維-プルキンエ細胞、登上線維-プルキンエ細胞シナプスの両方のシナプスの成熟に有意な異常が見られた。これらの異常はウイルス感染による直接的な影響以外に、プルキンエ細胞の発達期に GFP を過剰発現させた結果である可能性もある。これら 2 つを見分けるために、極めて弱い L7 プロモーターを組み込んだレンチウイルスベクターを用いて同様の実験を行った。その結果、シナプスの成熟異常は認められなかった。樹状突起の成長以上も大幅に改善した。ただ、樹状突起の枝分かれや全体的な形態に軽度ではあるが有意な異常が観察されたことから、レンチウイルスベクターの感染自体が、わずかではあるが毒性をもつことが示唆された。しかしながら、接種ラットの運動能力には全く影響がなかったことから、レンチウイルスベクター使用の副作用は実質的には無視できるレベルと考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

Iizuka A, Takayama K, Torashima T, Yamasaki M, Koyama C, Mitsumura K, Watanabe M, Hirai H, akayama K, Torashima T, Horiuchi H, Hirai H: Rescue of abnormal phenotypes in delta2 glutamate receptor-deficient mice by the extracellular N-terminal and intracellular C-terminal domains of the delta2 glutamate receptor. *Neurobiol Dis*, 35(3): 457-65, 2009.

Torashima T, Iizuka A, Horiuchi H, Mitsumura K, Yamasaki M, Koyama C, Takayama K, Iino M, Watanabe M, Hirai H: Rescue of abnormal phenotypes in delta2 glutamate receptor-deficient mice by the extracellular N-terminal and intracellular C-terminal domains of the delta2 glutamate receptor. *Eur J Neurosci*, 30(3): 355-65, 2009.

Sawada Y, Kajiwara G, Iizuka A, Takayama K, Shuvaev A, Koyama C, Hirai H: High transgene expression by lentiviral vectors causes maldevelopment of Purkinje cells in vivo. *Cerebellum* 2010 (In press).

2. 学会発表

飯塚 朗, 寅嶋 崇, 三ツ村 一浩, 小山 知穂, 飯野 昌枝, 平井 宏和. レンチウイルスベクターを用いた遺伝性運動失調マウスの機能回復. 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009 年 9 月 16 日

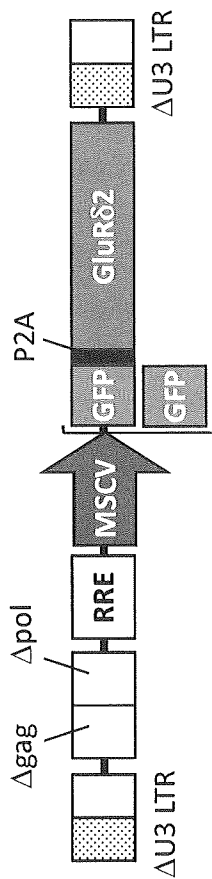
E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

該当なし

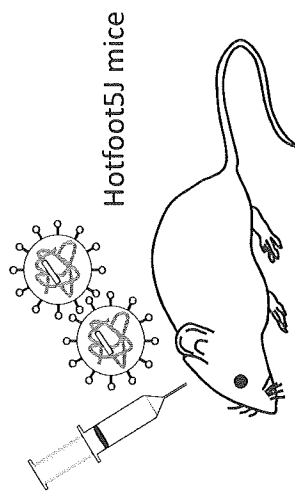
F. 健康危険情報

該当なし

A レンチウイルスベクターの構造



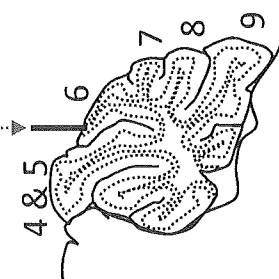
B ウイルスを運動失調マウスの小脳へ接種



Inject at P6-7

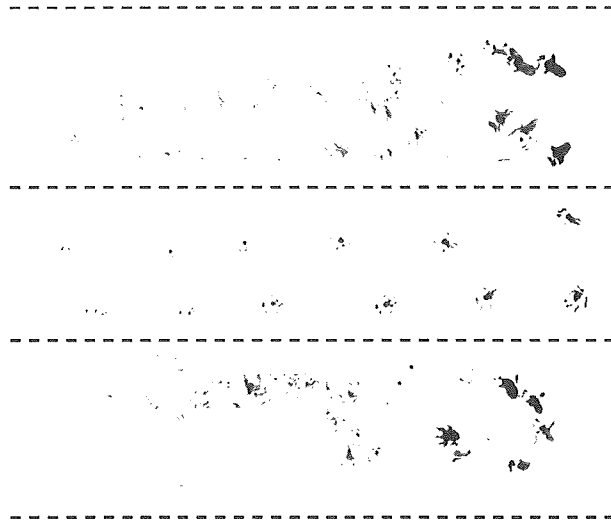
➡ Analyze at P30-P35

ウイルスの接種



D マウスの足跡

ウイルス未接種 ウイルス接種2ヶ月後
GFPと $\delta 2$ 遺伝子を発現 GFPのみを発現



レンチウイルスベクターを用いた運動失調マウスの機能回復。A. 使用したレンチウイルスベクターの構造。GFPと $\delta 2$ 遺伝子を発現するウイルスと、GFPだけを発現するウイルスを準備した。B. 生後6~7日の自然発生運動失調マウス (Hotfoot5J) の小脳にウイルスベクターを接種した。C. ウイルス接種部位を示すマウス小脳の矢状断。ウイルスは小脳の第6小葉表面に接種した。D. 運動失調マウスの足跡。生後30日で検討した。ウイルス未接種のマウス、及びGFPのみを発現させたマウスは強い失調歩行を示した。これに対し、GFPと $\delta 2$ 受容体を発現するマウスの歩行は大幅に改善した。

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は解明が進むに従って更に複雑化の様相を示している。基本的には神経細胞における毒性が主体と考えられているが、非神経細胞における発現がヒト個体の症状にかなり影響を与える可能性も示唆されている。このような領域の進展を鑑みて、非神経細胞におけるポリグルタミン病タンパク発現ショウジョウバエモデルを網羅的に作製することを開始している。本年度の途中経過を報告する。

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。近年、SCA7を含む変性疾患の中樞神経系において非神経細胞(グリア細胞、バーグマングリア細胞)の異常タンパク発現を介した神経細胞への毒性が指摘されるとともに(1, 2)、非脳組織(心筋、骨格筋、骨、膵臓、精巣)における封入体の存在が示され(3, 4)、視床下部-下垂体系の異常も再確認されている(5)。ポリグルタミン病の概念自体が神経細胞変性疾患から全身病へ変化しつつある。そこで私たちは、研究領域の今後の多様な展開に備えて、ショウジョウバエを用いた多様な非神経細胞発現モデルの作成を進行させている。この中で、本年はグリア細胞発現モデルを報告した。

B. 研究方法

グリア細胞特異的ドライバー:repo-Gal4 及びグリア芽細胞特異的 Gal4 ドライバー: gcm-Gal4 を用い、Htt-103Q (Exon 1)または Atx1-82Q を異なった発生段階のグリア細胞に発現するショウジョウバエを新たに作成し、その形態と行動を解析した。Gcm はニューログリオブラストに一過的に発現しグリア細胞の分化

に必要な転写因子であり、Repo の発現を誘導する。Repo はグリオブラストから発現し始めるグリア細胞特異的な転写因子であり、グリア細胞の維持に必要である。そのため、gcm-Gal4 と repo-Gal4 は同じ細胞に異なったタイミングで導入遺伝子を発現させる。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

gcm-Gal4 による誘導(gcm-Atx1)でも、repo-Gal4 で誘導(repo-Atx1)でも Atx1-82Q 発現ハエは成虫にはならず、蛹までに死亡した。そこで、蛹において脳の形態観察及び免疫染色解析を行った結果、gcm-Atx1 では脳サイズの減少が明らかになった。repo-Atx1 においてのみグリア細胞に強い Atx1-82Q のシグナルが見られ、神経変性を示唆する変化も repo-Atx1 でより強かった。gcm-Gal4 で Htt-103Q (Exon 1)を誘導したハエでは、repo-Gal4 で誘導した場合(repo-Htt)より、様々な面でより強い病態を示した。repo-Htt は成虫まで発生したのに対し、gcm-Htt では蛹までにほとんどが死亡した。また、repo-Htt

の寿命は短縮したが *gcm-Htt* ではさらに短く一週間以内にすべて死亡した。*repo-Htt* では進行性の運動能力、自発性活動の低下がみられた、*gcm-Htt* はこれらを観察する前の非常に早い時期に死亡した。一方、*repo-Htt* のみでグリア細胞に強い *Htt-103Q* のシグナルが見られ、空胞変性変化も *repo-Htt* でより強かった(Tamura et al., *PLoS One* 2009)。

両疾患遺伝子に共通して発達期におけるグリア系細胞での異常タンパク発現が、成熟グリア細胞発現より強い神経障害につながる。一方で、*repo-Atx1-82Q* では、遺伝型が同一にも関わらず一部のショウジョウバエが survive することが分かった。このメカニズムを追求することは疾患治療の上で何らかのヒントになるかもしれない。また、ショウジョウバエモデルは細胞モデルより COMPLEXITY が高く、スクリーニングの中間的指標としてベンチャー企業・アカデミアをはじめ国際的にも頻用されている。私たちの多様なモデルを含む網羅的システムが、グリア障害あるいは全身病としてのポリグルタミン病に対応できる簡易モデルとして、そして薬剤の簡易スクリーニング系として、今後役立つことを期待している。

(参考文献)

1. Llieva H, Polymenidou M and Cleveland D (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187, 761-772.
2. Custer SK, Garden GA, Gill N, Rueb U, Libby RT, Schultz C, Guyenet SJ, Deller T, Westrum LE, Sopher BL, La Spada AR. (2006) Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat Neurosci.* 9, 1302-1311.
3. Moffitt H et al. (2009) Formation of Polyglutamine Inclusions in a Wide Range of Non-CNS Tissues in the HdhQ150 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS One* 4 (11), e8025.
4. van der Burg, JMM et al. (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurology* 8, 765-774.
5. Saleh N, Moutereau S, Durr A, Krystkowiak P, Azulay JP, Tranchant C,

Broussolle E, Morin F, Bachoud-Lévi AC, Maison P. (2009) Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease. *PLoS One.* 2009;4(3):e4962.

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi M, Mizuguchi M, Shinoda H, Aizawa T, Demura M, Okazawa H, Kawano K. (2009) Polyglutamine tract binding protein-1 is an intrinsically unstructured protein. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1794, 936-43
2. Ito H, Yoshimura N, Kurosawa M, Ishii S, Nukina N, Okazawa H. (2009) Knock down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse. *Human Molecular Genetics.* 18, 4539-54
3. Chin JH, Shiwaku H, Goda O, Komuro A, Okazawa H. (2009) Neural stem cells express Oct-3/4. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 388, 247-51
4. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, Sone M, Foulle R, Sawada H, Ishiguro H, Ono T, Murata M, Kanazawa I, Tomilin N, Tagawa K, Wanker EE, and Okazawa H. (2010) Mutant Huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *Journal of Cell Biology.* 2010 in press

2. 学会発表

岡澤 均 「変異 ataxin-1 および huntingtin の non-cell autonomous 毒性」平成21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21年度 研究班会議、東京、2010.1.14-15

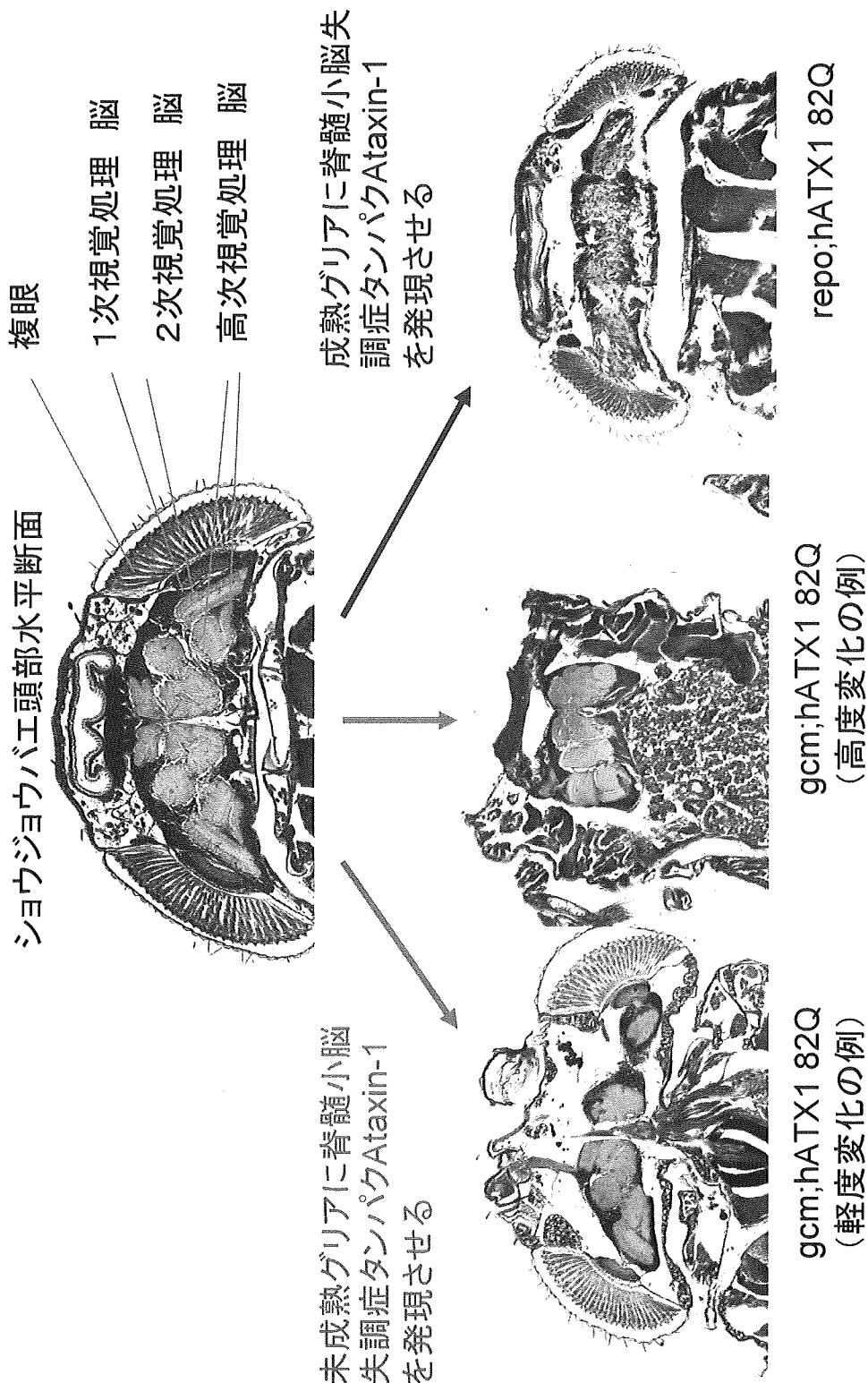
その他 20 件

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(国際特許) US-20090280488 Prophylactic/therapeutic agent for neurodegenerative disease. 発明者 岡澤均 出願人 東京医科歯科大学(公開日: 11/12/2009)

F. 健康危険情報 なし。

グリア細胞の異常タンパク発現に由来する神経細胞変性



いずれも高度の脳形態変化と神経細胞脱落を来す。

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

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

運動失調症の病態機序における細胞内輸送機能の検討

分担研究者	吉良潤一	九州大学大学院医学研究院神経内科学
研究協力者	大八木保政	同上
	栄信孝	同上
	本村今日子	同上
	洲崎悦男	九州大学生体防御医学研究所 分子発現制御学分野
	中山敬一	九州大学生体防御医学研究所 分子発現制御学分野
	近藤久雄	九州大学大学院医学研究院 分子生命科学系部門 細胞工学

研究要旨

我々は MJD/SCA3 の病態における神経機能障害に着目し、神経機能障害の基盤として細胞内輸送機能障害が存在すると仮説し、MJD 155polyQ を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを用いた解析を行っている。特に細胞内輸送に重要とされる Rab family と細胞内輸送に中心的な役割をもつゴルジ体について主に検討した。今回解析したかぎりでは、Rab6 は 10ヶ月齢 Tg マウス脊髄で増加していることが示唆されたが、免疫染色では Rab1, 6, 8 いずれでも明らかな染色性の違いは NTg および Tg 間で認めなかった。一方、10ヶ月齢 Tg マウス脊髄前角細胞ではゴルジ体の断片化を認め、6-7ヶ月齢の発症早期におけるゴルジ体構造に重要と考えられる VCIP135 分子は Tg マウス脊髄のウェスタンブロット解析で増加を認めた。現在他の Rab タンパクおよびゴルジ体構造異常およびゴルジ体を構成する因子についてさらに検討し、運動異常と細胞内輸送機能障害との相関について解析をすすめている。また発症早期の変化を免疫学的、生化学的解析などにより明らかにすることで神経機能異常の分子基盤を明らかにしていく必要がある

A. 研究目的

ポリグルタミン病の病態機序には神経機能障害が重要とされるが、その詳細は明らかとはなっていない。神経機能障害を分子レベルで解明することは、新規治療薬や診断・治療のバイオマーカーを探索する上でも重要と考える。従って、脊髄小脳変性症の神経機能異常について、分子レベルでの検討を行うために、ポリグルタミンを過剰発現する Tg マウスの脳、脊髄の詳細かつ経時的検討が有用であると思われる。新たに作製した MJD155polyQTg マウスを用いて、MJD/SCA3 における神経機能異常と細胞内輸送機能異常との関連について検討を加えた。

B. 研究方法

MJD 155polyQ 遺伝子を mPrP promotor 下で過剰発現するオスのトランスジェニックマウス (Tg) および、その同胞である非トランスジェニックマウス (NTg) において、行動学的検討などを行い、運動異常を発症前、早期から後期にわけた。また、経時的な免疫組織学的解析および生化学的解析を 5ヶ月、7ヶ月、10ヶ月齢 NTg および Tg マウス脳および脊髄において比較検討を行った。特に、細胞内輸送機能において重要とされる Rab family については、抗 Rab1, 4, 5, 6, 8 抗体を用いて免疫染色およびウェスタンブロットにより比較検討した。また、細胞内

輸送に中心的な役割をもつゴルジ体に着目し、その関連タンパクについて免疫染色およびタンパク発現解析も試みた。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたマウスの飼育および研究手順については、九州大学の動物実験指針ならびに動物倫理委員会の承認を受け、規定にのっとり行った。

C. 研究結果

MJD 155polyQ Tg マウスは約 6 ヶ月齢ころから進行性の運動障害を呈し、約 10 ヶ月齢頃には死亡することが確認された。少なくとも約 7 ヶ月齢頃には軽度から中等度の運動障害を認め、この時期を運動異常の発症早期と考えた。組織学的検討では 7 ヶ月齢の Tg マウス脳においては NTg マウスと比較して明らかな神経細胞形態変化、アストロサイトの集簇、ミクログリアの活性化、アポトーシスなどは認めず、神経機能障害が運動異常に関わることが示唆された。Tg マウス脳および脊髄ともに、ユビキチン陽性核内封入体については少なくとも 5 ヶ月齢では認めず、約 7 ヶ月齢から確認できた。神経機能障害を検討するために検討した今回の Rab family については、免疫組織学的検討では明らかな違いは認めなかったが、ウェスタンブロット解析では、Rab6 タンパクは 10 ヶ月齢の Tg マウス脊髄で NTg マウスと比較して増加していることが示唆された。一方、ゴルジ体の検討では、ゴルジ体のマーカーである抗 GM130 抗体による蛍光免疫染色で、10 ヶ月齢の Tg マウスの脊髄前角細胞において、ゴルジ体の断片化を認めた。また、ゴルジ体の構造維持に関与する VCIP135 について、ウェスタンブロット解析を行ったところ、6-7 ヶ月齢の Tg マウス脊髄および脳幹において NTg と比較して増加を認めた。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 50 回日本神経学会総会

2009 Neuroscience meeting

(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・実用新案登録・その他)

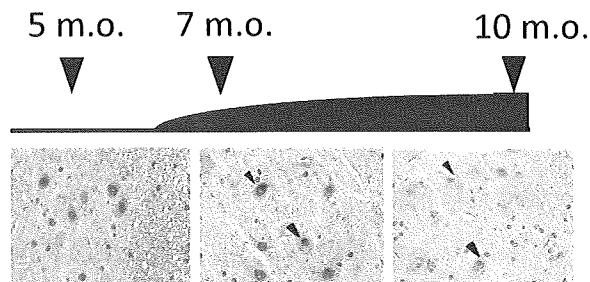
なし

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

MJD 155polyQ Tgマウスの臨床経過

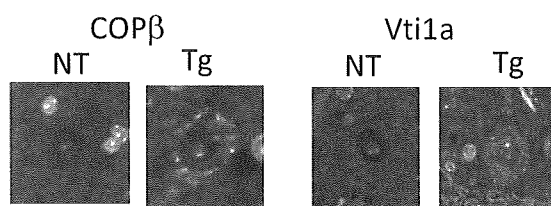


核内封入体は7ヶ月頃から認められる

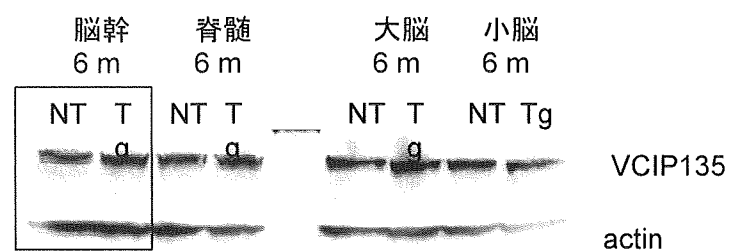
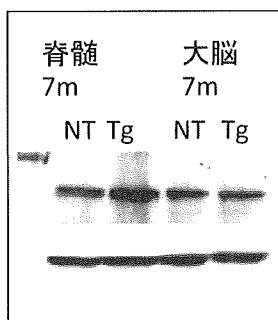
GM130



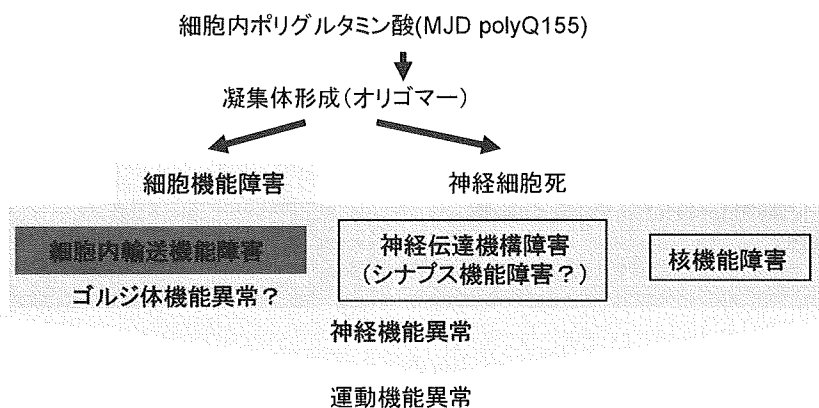
Rab6は10ヶ月脊髄で増加



脊髄前角細胞に認められるゴルジ体の断片化



VCIP135は6-7ヶ月齢の脊髄で増加



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

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

SCA10 AUUCU RNA foci の解析

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	松浦 徹	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学
	黒崎辰昭	名古屋大学神経遺伝情報学、University of Rochester
	大野欽司	名古屋大学神経遺伝情報学
	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

遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝子変異としてはマイクロサテライトリピートの異常伸長に起因する病型が多いことが判明している。イントロンに存在する ATTCT の 5 塩基リピートの異常伸長により発症する脊髄小脳失調症 10 型 (SCA10) においては、伸長 AUUCU リピート転写産物が RNA レベルで分子病態に関与しているものと考え、検討を行った。SCA10 患者由来リンパ芽球を用いて伸長 AUUCU リピートの核内凝集体 (AUUCU foci) を確認し、さらに AUUCU foci の核内局在について解析を加え、傍核小体/エクソソームとの共局在を認めた。また、伸長 AUUCU リピート結合タンパクの検索を行い、4 種の核タンパクを同定した。これらのタンパクはいずれも AUUCU foci との共局在を認め、その中の 1 つである PTBP1 においては、その転写調節因子としての機能に障害が生じていることを示す結果を得て、SCA10 における神経細胞変性との関連が示唆された。

A. 研究目的

SCA10 の原因遺伝子変異は chr. 22q13.3 上の *ATXN10* イントロン 9 に存在する ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である (280 ~ 4500 リピート)。この非翻訳領域リピート伸長が、何故どのように優性遺伝様式で病気を発症させるのかは十分に解明されていない。近年、同じく非翻訳領域に CTG リピート異常伸長をもつ筋強直性ジストロフィー (DM) の RNA 病態が明らかになってきた。すなわち、伸長 CTG リピートが RNA に転写され、CUG リピート転写産物とその凝集体 (foci) と核内蛋白との複合体を形成することがトリガーとなり、核内 RNA 蛋白制御不全をもたらすというものである。我々は、SCA10 にお

いても伸長 ATTCT リピートが RNA レベルで転写され、AUUCU foci を形成することを既に示している。そこで、本研究では AUUCU foci の核内局在を明らかにすると共に AUUCU リピート結合タンパクを同定し、その機能不全を解析することで SCA10 RNA 病態を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) AUUCU foci 核内局在の解析

SCA10 リンパ芽球を用いて RNA-FISH で核内 AUUCU foci 検出後、その核内局在を明らかにするために免疫蛍光法 (IF) を組み合わせ、核膜 (抗 Lamin B1 抗体)、核小体 (抗

nucleolin 抗体)、PML 小体 (抗 PML 抗体)、Cajal 小体 (抗 Coilin 抗体)、スペックル (抗 SC35 抗体)、傍核小体 (抗 CUGBP1 抗体) 等との共局在を FISH-IF により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。一般的にイントロン RNA 分解は、スプライシング後、核内エクソソームで行なわれるとされるが、スプライソソーム・エクソソーム等の機能的分子複合体との共局在も検討した。更に RNA foci に含まれる pre-mRNA 代謝とその成分を明らかにする目的で、SCA10 リピートと同じイントロンにある他の部位と両側エクソンにプローブ設定し、AUUCU foci との共局在も検討した。疾患コントロールとして DM1、DM2 を用いた。

2) AUUCU リピート結合タンパク同定

ヒトリンパ芽球と神経芽腫細胞から核抽出物を精製し、AUUCU-pull down 法で質量分析により同定した。更にウエスタン法 (WB) で確認した。

3) SCA10 細胞における AUUCU リピート結合因子の発現解析

SCA10 リンパ芽球を用いて、2) で同定された AUUCU リピート結合タンパクと AUUCU foci との共局在を FISH-IF で検討した。更にそれらの発現量・スプライシングパターンを WB と RT-PCR でそれぞれ対照と比較検討した。

(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

1) AUUCU foci は傍核小体/エクソソームに局在していた。疾患コントロールの DM1、DM2 における CUG foci、CCUG foci とはその局在が異なった。

2) AUUCU リピート結合タンパクとして MATRN3、PSF、p54nrb、PTBP1 の 4 種を確認した。

3) FISH-IF の結果、SCA10 リンパ芽球において上記の 4 因子は、AUUCU foci と共局在していた。SCA10 リンパ芽球の核抽出物を用いた WB 法では、対照と比較して発現レベルに差を認めなかった。しかしながら、PTBP1 と相互に発現調節をしているタンパクの発現が著明に上昇していた。

D. 研究発表

1. 論文発表

RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. Daughters RS, Tuttle DL, Gao W, Ikeda Y, Moseley ML, Ebner TJ, Swanson MS, Ranum LP. *PLoS Genet.* 5(8): e1000600 (2009).

2. 学会発表

池田佳生ら. SCD における上肢協調運動障害の数量化測定装置の開発. 第 50 回日本神経学会総会, 2009 年 5 月 20 日~22 日, 仙台.

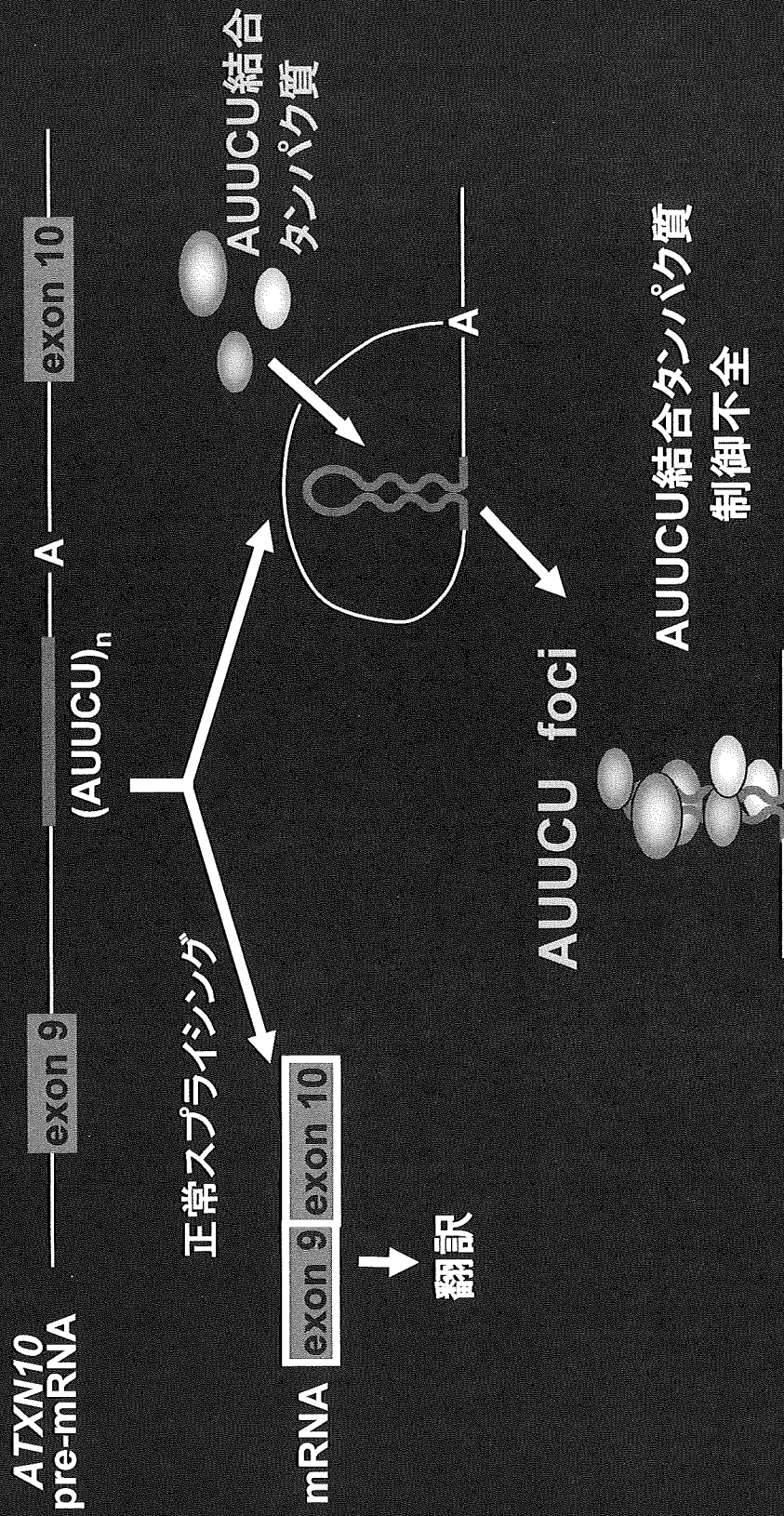
E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

なし

F. 健康危険情報

なし

想定されるSCA10病態機構



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

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

DRPLA 治療薬探索を目指した FDA 承認化合物を使った Cell-based high throughput screening

分担研究者	辻 省次	東京大学附属病院神経内科
研究協力者	伊達 英俊	東京大学附属病院神経内科
	後藤 順	東京大学附属病院神経内科

研究要旨

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)治療薬探索を目指したFDA承認化合物を使ったCell-based high throughput screeningを実施し、GFP-DRPLAタンパク質の細胞内局在を変化させる化合物を34種見出した。今後はDRPLAトランスジェニックマウスを用いた治療研究に発展させる。

A. 研究目的

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(以下DRPLA)は常染色体優性遺伝形式をとる進行性の神経変性疾患で、翻訳領域内にあるCAG繰り返し配列の伸長によって引き起こされるポリグルタミン病の一病型である。DRPLAタンパクは、近年その機能が転写調節に関わっているデータが蓄積しつつあるが、その機能はいまだ十分には解明されていない。われわれは、これまでの研究で、DRPLAタンパクの機能部位が細胞核であること、さらにこれまでの研究で伸長ポリグルタミン鎖を有する変異タンパクが時間依存性に、部位特異的に核内集積することが、病態機序として重要であることを見出している。従って、DRPLAタンパクの核移行阻害が本疾患の治療法の一つになるという考えから、本疾患の治療候補薬剤を探索する目的で、アメリカ食品医薬品局(FDA)によりUSAで臨床試験にまで到達した化合物のライブラリー1040(US-drug Collection. MicroSource Discovery Systems, Inc)を用いてGFP-DRPLA proteinの定常発現株に添加し、

DRPLAタンパクの局在変化とGFP蛍光強度を指標としてscreeningを進めている。

B. 研究方法

N末にGFPを付加したポリグルタミン鎖の長さが異なる全長DRPLA GFP-DRPLA/Q18(正常型)、GFP-DRPLA/Q82(変異型)の2系統を作成した。この細胞株は正常型、変異型共にGFP-DRPLAは細胞核にびまん性に局在し、凝集体等は観察されない。本アッセイでは変異型GFP-DRPLA/Q82を用いて96well plateに 5×10^5 個/mlの密度でplatingして、翌日、一化合物につき4つの濃度(500uM, 167uM, 56uM, 19uM)で、1ug/mlテトラサイクリン含有のDMEMと交換。観察30分前にアッセイ用培養液(Hoechst33342(5ug/ml)in OptiMEM)に交換し核染色を行う。実際の検鏡はGE社のIN Cell Analyzer1000を用いて1wellに対してオートフォーカスでHoechst画像とGFP画像を5point取得する。

C. 研究結果

現在までに900以上の薬剤について実施。細胞核にGFP-DRPLAの局在が見られる化合

物 22 種。核内の局在を変化させる化合物 12 種を見出した。今後、ライブラリー化合物の Screening を完了するとともに、作用を詳細に解析し、DRPLA トランスジェニックマウスを用いた治療研究に発展させていく。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

F. 健康危険情報

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する調査研究班

細胞膜透過性 PTD-QBP1 ペプチドを用いたポリグルタミン病に対する分子治療法の開発

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	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
	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
	戸田 達史	大阪大学 大学院医学系研究科 臨床遺伝学
	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、QBP1 の遺伝子発現により PolyQ 病モデルショウジョウバエの神経変性を抑制することを明らかにした。本研究では、QBP1 に細胞膜透過性ペプチド(PTD)を付加し、体外からの投与による PolyQ 病モデル動物に対する治療効果を検討した。その結果、PTD-QBP1 は高効率で培養細胞内に導入され、PolyQ-GFP の封入体形成、細胞毒性を有意に抑制した。続いて PolyQ 病モデルショウジョウバエ MJDtr-Q78 Fly に Antp-QBP1 を経口投与した結果、PolyQ 封入体形成、寿命短縮の有意な抑制を認めた。さらにハンチントン病モデルマウス R6/2 に Antp-QBP1 を腹腔内投与したところ、体重減少の有意な改善を認めたが、PolyQ 封入体形成、運動障害、寿命短縮には有意な治療効果が得られず、Antp-QBP1 の血液脳関門(BBB)透過効率が低いことが示唆された。本研究の結果から、PTD-QBP1 を用いた PolyQ 病に対する分子治療法の可能性が示され、今後 BBB 透過効率の高い PTD の開発が期待される。

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。私達は発症カスケードの最も上流に位置する異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディング・凝集が治療標的として最適であると考えて、これまでに異常伸長 PolyQ 鎖特異的結合ペプチド QBP1 (SNWKWPGIFD)を同定し、QBP1 が試験管内で異常伸長 PolyQ 蛋白質の毒性βシート構造変移・凝集を阻害し、QBP1 の遺伝子発現により 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。QBP1 を応用した治療法開発へ向けて、遺伝子改変動物との交配ではなく、体外からの投与による治療法を開発することが必須であるが、QBP1 は 11 アミノ酸のペプチドであるため、細胞膜透過性が極めて低いという問題がある。

そこで私達は、QBP1 の細胞膜透過効率を改善するために、細胞膜透過性ペプチド(PTD)に着目した。PTD とは HIV-1 TAT、Antennapedia (Antp)、HSV VP22、polyarginine などの細胞膜透過性を持つペプチド配列の総称で、最近 siRNA などの核酸やペプチド、蛋白質など様々な生理活性分子の細胞内デリバリーに広く応用されている。本研究では、PTD を付加した PTD-QBP1 をデザインし、その PolyQ 病モデル培養細胞、動物に対する治療効果を明らかにすることを目的とした。

B. & C. 研究方法、結果および考察

- ①PTD-QBP1 のデザインと細胞内導入効率の検討:まず、QBP1 に様々な PTD 配列を付加した PTD-QBP1 ペプチドを合成した。これらの PTD-QBP1 ペプチドを COS-7 細胞の培養液中に添加し、免疫染色およびウェスタンブロットにより細胞内導入効率を検討した結果、Antp-QBP1 (2-20 μM)では濃度依存的に高効率での細胞内導入を認めた。TAT-QBP1 は 1 μM では有意な細胞内導入を認めたが、10 μM で細胞毒性を認めた。PTD を付加していない QBP1 単独では有意な細胞内導入を認めなかった。以上の結果から、PTD の付加により QBP1 の細胞内導入が可能となることが明らかになった。
- ②PTD-QBP1 の PolyQ 凝集阻害活性と培養細

胞モデルに対する治療効果の検討:まず、様々な PTD-QBP1 ペプチドを Thioredoxin-Q62 蛋白質と共にインキュベートし、濁度測定法により凝集体形成を検討した結果、いずれのPTD配列の付加もQBP1のPolyQ凝集阻害活性には有意な影響を与えないことが確認された。次にPTD-QBP1ペプチドを、PolyQ-GFP蛋白質を発現するCOS-7細胞の培養液中に添加したところ、Antp-QBP1 (20 μM)はQ81-GFPの封入体形成を有意に抑制した。TAT-QBP1 (1 μM)はQ57-GFPの封入体形成、細胞毒性を有意に抑制した。以上の結果から、PTD-QBP1はPolyQ凝集阻害活性を保持し、PolyQ病モデル培養細胞に対する治療効果が確認された。

③PTD-QBP1のPolyQ病モデル動物に対する治療効果の検討:次にPTD-QBP1の*in vivo*での治療効果を明らかにするために、まずMJDtr-Q78蛋白質を神経系に発現するPolyQ病モデルショウジョウバエMJDtr-Q78 Flyを用いて、Antp-QBP1 (200 μM)を経口投与した。その結果、羽化14日後の生存率はコントロールの7.9%に比べて50.0%と著明に改善し、神経変性による寿命短縮が有意に抑制された。複眼原基の免疫染色では、Antp-QBP1投与によりMJDtr-Q78蛋白質封入体形成の有意な抑制を認めた。次にHttEx1-Q150を発現するハンチントン病モデルマウスR6/2の腹腔内にAntp-QBP1を隔日投与(0.5 mg/週)したところ、コントロールと比べてAntp-QBP1投与群では体重減少が有意に改善した。しかし、運動障害や寿命短縮には有意な治療効果が得られなかった。脳切片の免疫染色でもHttEx1-Q150蛋白質の封入体形成には有意な抑制効果は認めなかった。マウス頸動脈への投与実験から、Antp-QBP1の血液脳関門(BBB)透過効率が低いことが示唆され、その結果十分な治療効果が得られなかったと考えられた。今後、BBB透過効率の高いPTDの開発が望まれる。

(倫理面への配慮)

本研究では直接ヒトを対象とした研究は行ってない。実験動物の取扱いにあたっては国の法律・指針および国立精神・神経センター動物実験倫理指針を遵守した。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) Bauer PO, Goswami A, Wong HK, Okuno M, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Matsumoto G, Kino Y, Nagai Y, Nukina N. Novel gene therapy for polyglutamine diseases to degrade selectively the pathogenic protein. *Nature Biotechnol* (in press)

2) *Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Wada K. Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. *Curr Pharm Biotechnol* (in press)

3) Naiki H, *Nagai Y. Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: Pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins. *J Biochem* 146(6): 751-756 (2009)

4) 永井義隆. ポリグルタミン病に対する蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした分子治療. *臨床神経学* 49 (11): 913-916 (2009)

2. 学会発表

1) Nagai Y, Okamoto Y, Fujikake N, et al. Surface plasmon resonance as a useful technique for screening for specific polyglutamine aggregation inhibitors. 5th Gordon Res Conf CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2009, NH, USA)

2) Popiel HA, Tomita K, ..., Nagai Y. Towards designing chemical analogues of the polyglutamine aggregation inhibitor peptide QBP1: a structure-activity relationship study on QBP1. 5th Gordon Res Conf CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2009, NH, USA)

3) Fujikake N, Popiel HA, ..., Nagai Y. Pharmacological activation of heat shock transcription factor 1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. 5th Gordon Res Conf CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2009, NH, USA)

4) Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, et al. 17-AAG, an HSF1-activator, suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration via induction of molecular chaperones. 4th Int Cong Stress Responses in Biology and Medicine (October, 2009, Sapporo, Japan)

5) Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, et al. Opposing effects of HSF1 expression on tau- and polyglutamine-induced neurodegeneration *in vivo*. 4th Int Cong Stress Responses in Biology and Medicine (October, 2009, Sapporo, Japan)

6) 永井義隆. ポリグルタミン病に対する蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした分子治療. 第50回日本神経学会(2009.5, 仙台)

7) 永井義隆. 神経変性疾患克服への挑戦-目的指向型研究の進め方-. 第52回日本神経学会(2009.6, 群馬)

9) 永井義隆、他. 凝集阻害ペプチドQBP1を用いたポリグルタミン病に対する分子標的治療法の開発. 第54回日本人類遺伝学会(2009.9, 東京)

10) 永井義隆. ポリグルタミン蛋白質のアミロイド線維形成と細胞毒性獲得メカニズム-露出βシート仮説の提唱-. 第82回日本生化学会(2009.10, 神戸)

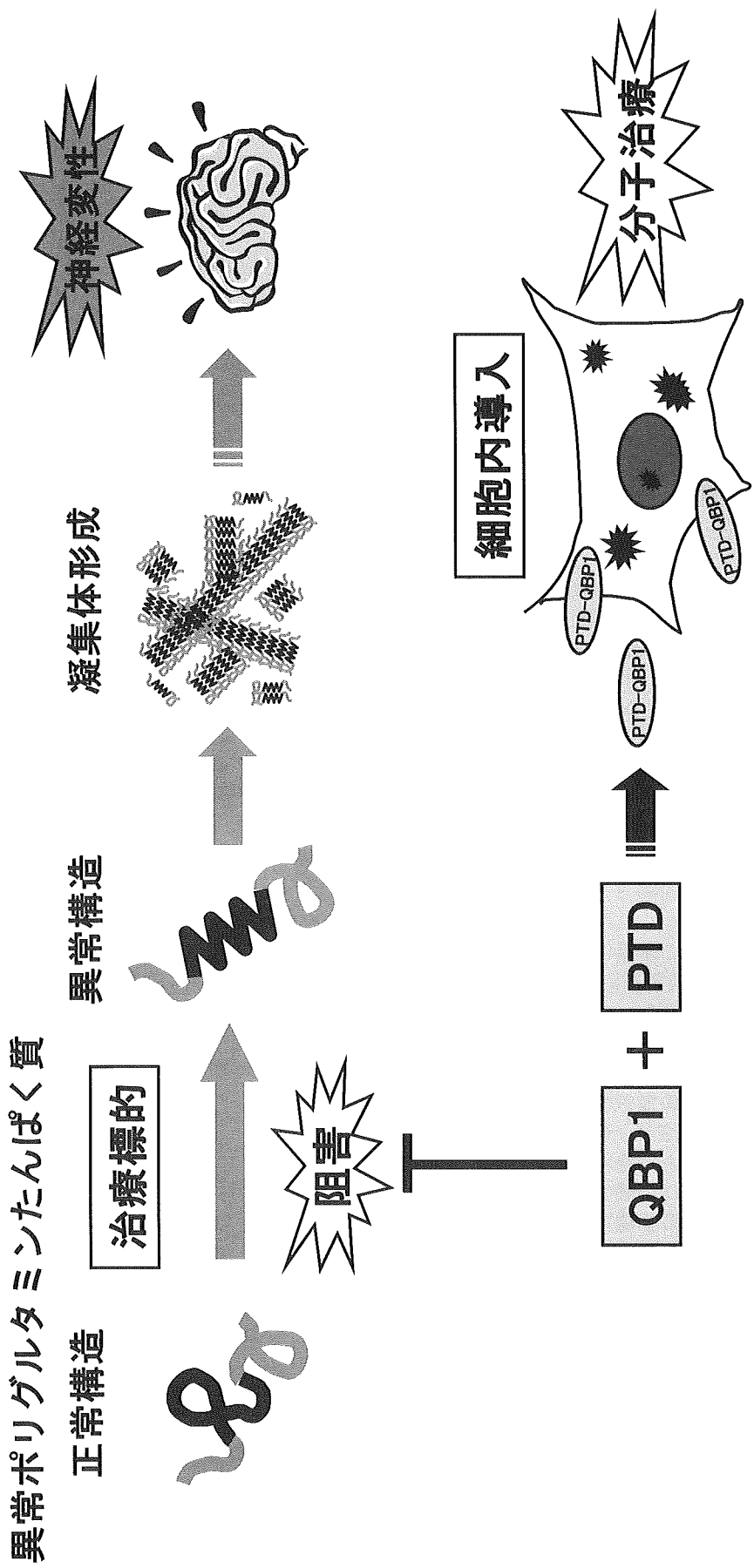
E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危険情報

なし

細胞膜透過性PTD-QBP1ペプチドを用いた ポリグルタミン病の分子治療法



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

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

「ポリグルタミン病の治療ターゲット探索研究」

シャペロン介在オートファジーを用いた新規ポリグルタミン病治療戦略

分担研究者	貫名 信行	独)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
研究協力者	BAUER, Peter	同上
	GOSWAMI, Anand	同上
	WONG, Hon Kit	同上
	奥野 弥佐子	同上
	黒沢 大	同上
	山田 みず樹	同上
	宮崎 晴子	同上
	松本 弦	同上
	紀 嘉浩	同上
	永井 義隆	国立精神・神経センター

研究要旨

異常伸長ポリグルタミンの分解を促進するため、異常伸長ポリグルタミンと特異的に結合する QBP1 と Hsc70 結合ドメインからなるペプチドを発現する遺伝子治療を開発した。このペプチドの発現により異常伸長ポリグルタミンはシャペロン介在オートファジーにより分解されることが確認された。さらにハンチントン病モデルマウス R6/2 線条体へのアデノ随伴ウイルスによるこのペプチド遺伝子導入によって、異常ハンチンチンの凝集減少を認め、寿命を含めて病態への効果を認めた。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の病態は、病因遺伝子の CAG の伸長に基づくその遺伝子産物のポリグルタミンの伸長と凝集、核内封入体の形成、神経細胞変性、神経細胞死の過程が考えられており、それぞれの段階で病態の進展を阻止することで、発症の予防や疾患の進展を抑制できると考えられる。本研究ではシャペロン介在オートファジー(CMA)を用いて伸長ポリグルタミン特異的に分解を促進する方法を検討した。

B. 研究方法

1)CMAにより huntingtin N 末断片(Nhtt)が分解されるかについて Nhtt に Hsc70 結合モチーフ(Hsc70bm)のペプチドを導入してその分解をみた。2)伸長ポリグルタミンと結合するペプ

チド QBP1(Q)と Hsc70bm からなるペプチド(HQ)が伸長ポリグルタミンをライソゾームにおける分解を促進するかどうかについて検討した。この効果について Hsc70,Lamp2a に対する shRNA の影響を検討した。3)RFP と融合した HQ および Q を発現するアデノ随伴ウイルスを線条体に導入して、その影響を RFP のみの場合と比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組み換え、実験動物を用いる実験に該当する。独立行政法人理化学研究所の遺伝子組み換えおよび動物実験計画の承認を受け、研究所の実験動物指針に基づいてきける限り実験動物に苦痛を与えないように配慮した。