

蓄積が認められた。P62 body に関する FRAP(光褪色後蛍光回復法)解析を行ったところ、S403E 変異体(リン酸化類似体)は sequestosome において安定化していることが示唆された。

P62 は選択的オートファジーの制御分子であり、我々はポリグルタミン病の核内封入体に結合していることを報告している。今回の研究で p62 はリン酸化修飾をいくつかの部位において受けており、特に S403 のリン酸化がプロテアソーム阻害によって増強されることが示された。P62 を含む封入体は p62body と呼ばれるが、これには周辺を膜によって囲まれていない sequestosome と膜に囲まれた autophagosome が存在する。オートファジー阻害によって autophagosome 形成を阻害すると S403 リン酸化 p62 が増加することから S403 リン酸化によって、p62 に結合したタンパク質がオートファジーによって分解される選択的オートファジーが亢進する可能性を考えた。そこでリン酸化類似体である S403E 変異体とリン酸化抵抗性の S403A 変異体を発現した p62 について FRAP 解析を行ったところ、S403E 変異体を発現した細胞では p62body(この場合膜のない sequestosome)が安定している(p62 の入れ替わりが少ないという意味で)ことが示されるとともに、S403E 自体の量は減少していることが示された。このことから S403 リン酸化により安定化した sequestosome がオートファジーで分解されることが示唆された。今後このリン酸化を制御しているリン酸化酵素、脱リン酸化酵素を同定し、その異常タンパク質除去への影響を明らかにすることでポリグルタミン病の病態制御につながる可能性がある。

D. 研究発表

1. 論文発表

Higo, T., Hamada, K., Hisatsune, C., Nukina, N., Hashikawa, T., Hattori, M., Nakamura, T. & Mikoshiba, K. Mechanism of ER Stress-Induced Brain Damage by IP(3) Receptor. *Neuron* **68**, 865-878 (2010).

Kino, Y., Washizu, C., Aquilanti, E., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Doi, H. & Nukina, N. Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations. *Nucleic Acids Res* (2010) in press.

Li, B., Hu, Q., Wang, H., Man, N., Ren, H., Wen, L., Nukina, N., Fei, E. & Wang, G. Omi/HtrA2 is a positive regulator of autophagy that facilitates the degradation of mutant proteins involved in neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* **17**, 1773-1784 (2010).

Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y. & Nukina, N. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol* **28**, 256-263 (2010).

Yamanaka, T., Tosaki, A., Miyazaki, H., Kurosawa, M., Furukawa, Y., Yamada, M. & Nukina, N. Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction. *Hum Mol Genet* **19**, 2099-2112 (2010).

2. 学会発表

Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M. and Nukina, N. Requirement of phosphorylation of p62/SQSTM1 for autophagic degradation of polyubiquitinated proteins. *The 3rd International Symposium on Protein Community*, Nara, Japan (September 13-16, 2010).

Nukina, N. Using chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. 第33回日本分子生物学会・第83回生化学会大会合同大会, 神戸 (2010年12月).

Nukina, N., Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y. and Nagai, Y. Novel gene therapy for polyglutamine diseases to selectively degrade the pathogenic protein. [OR-52] *Japan society of Gene Therapy The 16th Annual Meeting 2010 (第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会)*, Utsunomiya (July 1-3, 2010).

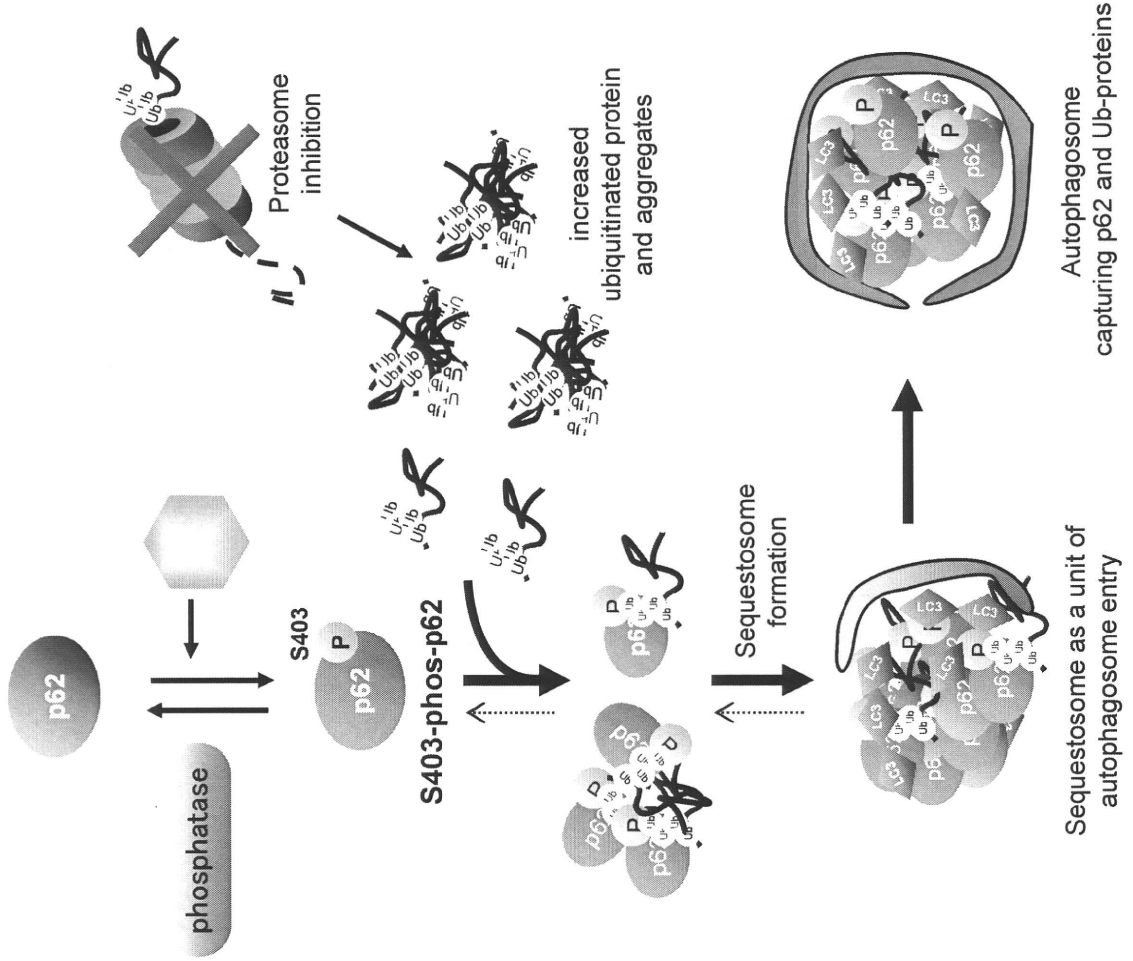
E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

該当なし

F. 健康危険情報

該当なし

オートファジーによって異常蛋白質蓄積を制御するための標的探索



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

重合体形成阻害を標的としたポリグルタミン病の新規治療法開発

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	他田 正義	新潟大学脳研究所神経内科
	高橋 俊昭	新潟大学医学部保健学科
	Henry L. Paulson	ミシガン大学神経内科

研究要旨

ポリグルタミン病において、変異蛋白の二量体形成は初期の中核的な病態イベントであり、二量体形成阻害を標的とした治療はポリグルタミン病全般に応用できる優れた治療戦略である。本研究では、本症の新規治療薬の開発を目的として、変異蛋白の二量体形成を阻害する化合物のスクリーニングを可能とする新たな細胞系を確立した。本法を用いて、FDA 承認済み化合物ライブラリーの大規模スクリーニングから複数の化合物を選定し、今後、動物モデルを用いてその有効性を検証する。

A. 研究目的

ポリグルタミン (polyQ) 病では、伸長 polyQ 鎖を持つ変異蛋白が構造変化 (conformational change) を生じて自己重合し、その結果、難溶性のアミロイド様凝集体を形成し、神経細胞内に封入体として認められる。この封入体形成は細胞の防御的反応の結果であり、初期に生じる可溶性の重合体(二量体や多量体)に強い細胞障害性があると考えられ(図 1)、我々もそれを明らかにしてきた (Takahashi T, *et al. Human Mol Genet* 17:345-356, 2008)。この polyQ 鎖の重合特性と細胞障害性の関係から、本症において重合体形成(とくに二量体形成)を阻害するような分子標的治療の開発が期待できる。本研究では、変異蛋白の重合体形成阻害を標的とした polyQ 病の新規治療薬開発の基盤研究を確立する。

B. 研究方法

Protein-fragment complementation assay (PCA) 法を応用し、本邦で最も多い polyQ 病である脊髄小脳変性症 3 型 (SCA3) の原因蛋白 ataxin-3 (AT3) の二量体形成のモニタリングを可能とする新たな細胞系を確立した。

PCA 法は、生細胞内で蛋白質間結合を鋭敏な感度で検出できる優れた手法で、近年様々な研究領域で応用されている。二つに断片化された N 末側と C 末側のリポーター蛋白質(例えば、黄色蛍光蛋白質:YFP)を各々融合した AT3 蛋白を一つの細胞内で共発現させ、AT3 が結合すると、不活性な断片型リポーター蛋白質が会合して活性型となり、AT3 の二量体形成を検出できるという原理に基づいている(図 2)。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験、動物実験は、新潟大学当該委員会に研究計画を提出の上、実験の承認を得た上で、法令を遵守して実施した。

C. 研究結果

YFP 断片をリポーターとして用いた PCA 法 (YFP-PCA 法) において、(1) 異常伸長したポリグルタミン鎖を有する変異 AT3 蛋白は野生型 AT3 に比べ二量体を形成しやすいこと、(2) ポリグルタミン鎖を含むドメインが二量体形成に重要であることを確認した。さらに、(3) ポリグルタミン病の動物モデルで神経変性を抑制することが報告されている既知化合物が、AT3 の総蛋白量に影響することなく、分子シャ

ペロンの発現誘導を介して二量体形成を阻害した (図 3)。(4) ルシフェラーゼ断片をリポーターとして用いた第二の PCA 法 (ルシフェラーゼ-PCA 法) においても同様の結果が確認された。

以上の結果から, PCA 法は, 生細胞内での AT3 の二量体形成のモニタリングと二量体形成を阻害する薬剤のスクリーニングに有用な方法であると考えられた。本法を用いて, FDA 承認済み化合物ライブラリーの大規模スクリーニングを行い, 二量体形成阻害効果を示す複数の候補化合物を選定した。今後, 培養神経細胞や動物モデルを用いて候補化合物の有効性を検証する。

D. 研究発表

1. 論文発表

Tada M, Kerppola TK, Decker SJ, Gestwicki J, Costa MC, Paulson HL. Detection of polyglutamine protein oligomers in living cells using protein-fragment complementation analyses. (in preparation)

2. 学会発表

Tada M, McQuade T, Decker SJ, Kerppola TK, Paulson HL. A screen with protein-fragment complementation assays for drugs that reduce polyglutamine protein dimmers. AAN meeting 2010, in Toronto

Tada M, Kerppola TK, Decker SJ, Costa MC, Todi SV, Paulson HL. Detection of polyglutamine protein oligomers in living cells using protein-fragment complementation assays. Ataxia Investigator Meeting 2010, in Chicago

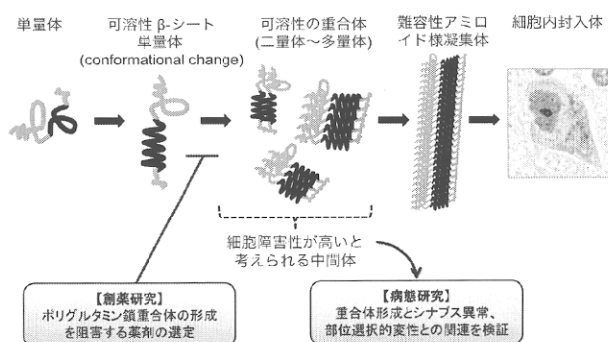
E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

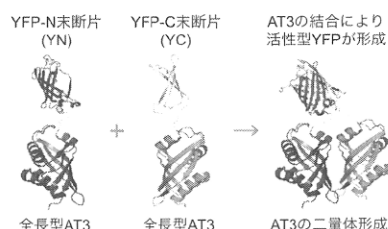
とくになし

F. 健康危険情報

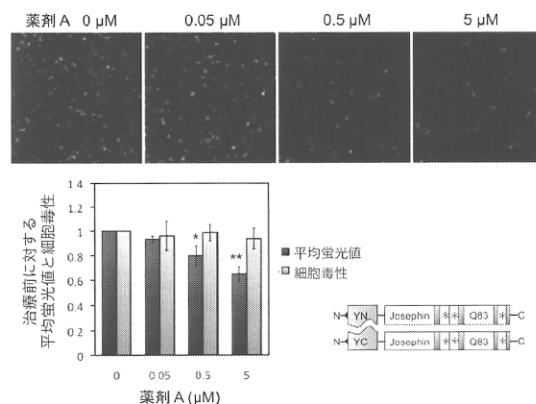
(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)



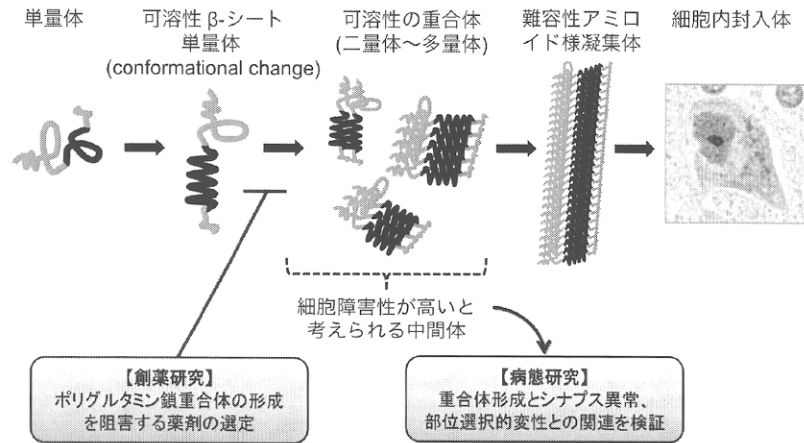
【図1】変異ポリグルタミン蛋白の凝集体形成カスケード
変異蛋白の conformational change により, 凝集性が高まり, 可溶性の重合体、難溶性のアミロイド様凝集体が蓄積し、最終的に細胞内封入体が形成される。



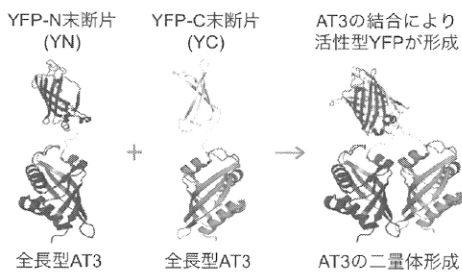
【図2】PCA法の原理。図は YFP-PCA法を示す。AT3の二量体形成により YFPの N末および C末断片が会合して活性型 YFPとなり、蛍光を発する



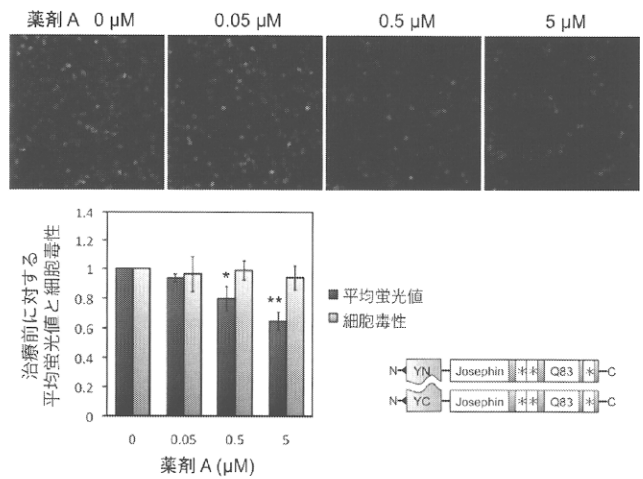
【図3】 YFP-PCA法を用いた二量体形成阻害効果の検討。
YN-AT3(Q83) および YC-AT3(Q83) を発現した細胞は二量体形成により蛍光を発する。薬剤Aによる二量体形成阻害効果を示す。



【図1】変異ポリグルタミン蛋白の凝集体形成カスケード
 変異蛋白の conformational change により、凝集性が高まり、可溶性の重合体、難溶性のアミロイド様凝集体が蓄積し、最終的に細胞内封入体が形成される。



【図2】PCA法の原理 図は YFP-PCA法を示す。AT3の二量体形成により YFP の N 末および C 末断片が会合して活性型 YFP となり、蛍光を発する



【図3】 YFP-PCA法を用いた二量体形成阻害効果の検討。
 YN-AT3(Q83) および YC-AT3(Q83) を発現した細胞は二量体形成により蛍光を発する。薬剤Aによる二量体形成阻害効果を示す。

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

ポリグルタミン病モデルマウスに対する凝集阻害分子の遺伝子治療による治療効果

分担研究者	永井 義隆	国立精神・神経医療研究センター 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・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
	平井 宏和	群馬大学 大学院医学系研究科 神経生理学
	村松 慎一	自治医科大学 神経内科
	戸田 達史	神戸大学 神経内科/分子脳科学
	和田 圭司	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部

研究要旨

ポリグルタミン(PolyQ)病を含む多くの神経変性疾患では、異常蛋白質のミスフォールディング・凝集が共通して神経変性を引き起こすと考えられている。我々はこれまでに異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 や、Hsp40、Hsp70 などの分子シャペロンが PolyQ 蛋白質の凝集を阻害し、遺伝学的交配により PolyQ 病モデル動物の神経変性を抑制することを示している。本研究では、体外からの投与による治療法確立を目指し、ウイルスベクターを用いた凝集阻害分子の遺伝子治療を検討した。ハンチントン病モデルマウス R6/2 の線条体に QBP1 を発現するアデノ随伴ウイルス 5 型ベクター(AAV5)を注射したところ、封入体形成は著明に抑制されたが、症状に対する治療効果は認めなかった。一方 AAV5-Hsp40 でも封入体形成は著明に抑制され、さらに神経症状に対する治療効果も認めた。驚くべきことに AAV5-Hsp40 の注射では、ウイルス非感染細胞でも封入体形成抑制効果を認め、non-cell autonomous な治療効果が示唆された。本研究の結果から、PolyQ 病に対する凝集阻害分子を用いた遺伝子治療の可能性が示された。さらに、Hsp40 の non-cell autonomous な治療効果から PolyQ 蛋白質あるいは Hsp40 の細胞間感染が示唆され、今後その感染性の分子メカニズムの解明が期待される。

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・凝集が共通して神経変性を引き起こすと考えられている。PolyQ 病は、種々の脊髄小脳失調症やハンチントン病などを含む 9 疾患の総称で、PolyQ 鎖の異常伸長により原因蛋白質がミスフォールディング・凝集を生じ、その結果神経細胞内に封入体を形成して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 蛋白質の凝集を阻害し、遺伝学的交配により QBP1 の発現が PolyQ 病モデル動物の神経変性を抑制することを示している。また、蛋白質のミスフォールディングを補正する Hsp40、Hsp70 などの分子シャペロンの治療効果も、遺伝学的交配により示されている。本研究では体外からの投与による治療法の開発を目指し、ウイルスベクターを用いた凝集阻害分子の遺伝子治療を検討した。

B. & C. 研究方法、結果および考察

①AAV5-QBP1/Hsp40 の PolyQ 病モデルマウスの封入体形成に対する効果の検討:1 週齢のハンチントン病モデルマウス R6/2 の片側線条体に QBP1 もしくは Hsp40 を発現するアデノ随伴ウイルス 5 型ベクター(AAV5)、反対側にコントロールの AAV5-GFP を注射し、免疫染色にて封入体形成率を検討した。その結果、AAV5-QBP1 感染細胞ではハンチンチン陽性封入体形成率が著明に抑制された(8 週齢、線条体:QBP1 33.7% vs GFP 68.5%、大脳皮質:QBP1 27.4% vs GFP 49.3%)。一方、AAV5-Hsp40 でも大脳皮質の封入体形成率は著明に抑制され(Hsp40 11.3% vs GFP 54.1%)、線条体では有意な抑制は認めなかったが(Hsp40 46.6% vs GFP 45.4%)、凝集体の形状変化を認めた。以上の結果から、AAV5-QBP1 および AAV5-Hsp40 を用いた遺伝子治療による PolyQ 病モデルマウスの封入体形成に対する抑制効果が明らかになった。

②AAV5-QBP1/Hsp40 の PolyQ 病モデルマウスの表現型に対する治療効果の検討:次に 1

週齢の R6/2 マウスの両側線条体にそれぞれ AAV5-QBP1、AAV5-Hsp40 もしくは AAV5-GFP を注射し、表現型に対する治療効果を検討した。AAV5-QBP1 注射群では、いずれの表現型に対しても有意な治療効果を認めなかった。一方、AAV5-Hsp40 注射群では AAV5-GFP 群に比べて、体重減少が有意に改善し(11~14 週齢)、寿命も有意に延長した(平均値: Hsp40 111.4 日 vs GFP 95.6 日)。また、AAV5-Hsp40 注射群では自発運動量(8 週齢、Hsp40 196.43 vs GFP 134.76 カウント/分)、立ち上がり回数(8 週齢、Hsp40 6.29 vs GFP 2.02 回/分)、握力(12 週齢、Hsp40 0.165 vs GFP 0.145 kg)などの神経症状も有意に改善された。以上の結果から、AAV5-Hsp40 を用いた遺伝子治療による PolyQ 病モデルマウスの表現型に対する治療効果が明らかになった。

③AAV5-QBP1 と AAV5-Hsp40 の治療効果の比較: 次に 1 週齢の R6/2 マウスの片側線条体に AAV5-QBP1、反対側に AAV5-Hsp40 を注射し、封入体形成抑制効果を直接比較した。その結果、大脳皮質での封入体形成率は AAV5-QBP1 感染細胞と比べ AAV5-Hsp40 感染細胞では有意に低かった(8 週齢、QBP1 26.9% vs Hsp40 8.4%)。さらに驚くべくことに、AAV5-Hsp40 注射側ではウイルス非感染細胞においても封入体形成率の著明な低下を認め(QBP1 71.0% vs Hsp40 37.7%)、non-cell autonomous な効果から異常伸長 PolyQ 蛋白質あるいは Hsp40 の細胞間感染が示唆された。今後 Hsp40 の non-cell autonomous な治療効果の研究から、異常伸長 PolyQ 蛋白質や Hsp40 の感染メカニズム解明が期待される。

(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いない。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・神経医療研究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) Popiel HA, Burke JR, Strittmatter WJ, Oishi S, Fujii N, Toda T, Wada K, *Nagai Y. The aggregation inhibitor peptide QBP1 as a therapeutic molecule for the polyglutamine neurodegenerative diseases. *J Amino Acids* (in press)
- 2) Mizuno H, Fujikake N, Wada K, *Nagai Y. α -Synuclein transgenic *Drosophila* as a model of Parkinson's Disease and related synucleinopathies. *Parkinsons Dis* 2011; 212706 (2011)

- 3) 永井義隆、藤掛伸宏. TDP-43 プロテインパチーの動物モデル. *最新医学* 65 (7): 1603-1613 (2010)
- 4) 永井義隆. 脊髄小脳変性症. *ドクターサロン* 54 (10): 729-732 (2010)

2. 学会発表

- 1) Nagai Y. Modeling human neurodegenerative diseases using *Drosophila* for elucidating the pathomechanisms and therapeutic strategies. Memorial Symp for Foundation of IBRC in KIT (Mar, 2010, Kyoto, Japan)
- 2) Popiel HA, Fujita H, Yamamoto K, Yamane H, Fujikake N, Muramatsu S, Wada K, Nagai Y. Molecular chaperone gene therapy ameliorates neurological phenotypes and protein aggregation in polyglutamine neurodegenerative disease mice. 3rd Int Symp on Protein Community (Sep, 2010, Nara, Japan)
- 3) Fujikake N, Saitoh Y, Yokoseki A, Onodera O, Wada K, Nagai Y. Abnormal accumulation of TDP-43 proteins causes neurodegeneration in novel *Drosophila* models of ALS. 3rd Int Symp on Protein Community (Sep, 2010, Nara, Japan)
- 4) Fujikake N, Saitoh Y, Yokoseki A, Onodera O, Wada K, Nagai Y. Expression of FALS-linked TDP-43 mutants causes severe motor dysfunction in *Drosophila*. Niigata Univ BRI Int Symp on Current Understandings and Future Directions for ALS (Nov, 2010, Niigata, Japan)
- 5) 永井義隆、藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司. TDP-43 を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエを用いた病態解析. 第 51 回日本神経学会(2010.5、東京)
- 6) 永井義隆. 神経変性疾患の発症分子メカニズムに基づいた治療法開発-目的指向型研究の進め方-. 第 53 回日本神経化学会(2010.8、兵庫)
- 7) ポピエル明子、藤田寛美、山本和弘、藤掛伸宏、村松慎一、戸田達史、和田圭司、永井義隆. 凝集阻害分子を用いた遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスの神経症状と封入体形成の抑制. 第 33 回日本神経科学会・第 53 回日本神経化学会(2010.9、兵庫)
- 8) 藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、永井義隆. TDP-43 を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立とその病態解析. 第 33 回日本神経科学会・第 53 回日本神経化学会(2010.9、兵庫)
- 9) 永井義隆. ショウジョウバエモデルを用いた TDP-43 プロテインパチーの病態解析. 第 29 回日本認知症学会学術集会(2010.11、愛知)
- 10) 永井義隆、ポピエル明子、藤田寛美、山本和弘、藤掛伸宏、村松慎一、戸田達史、和田圭司. AAV5 を用いた分子シャペロンの遺伝子治療によるポリグルタミン病モデルマウスの封入体形成と神経症状の抑制効果. 第 5 回臨床ストレス応答学会(2010.11、徳島)

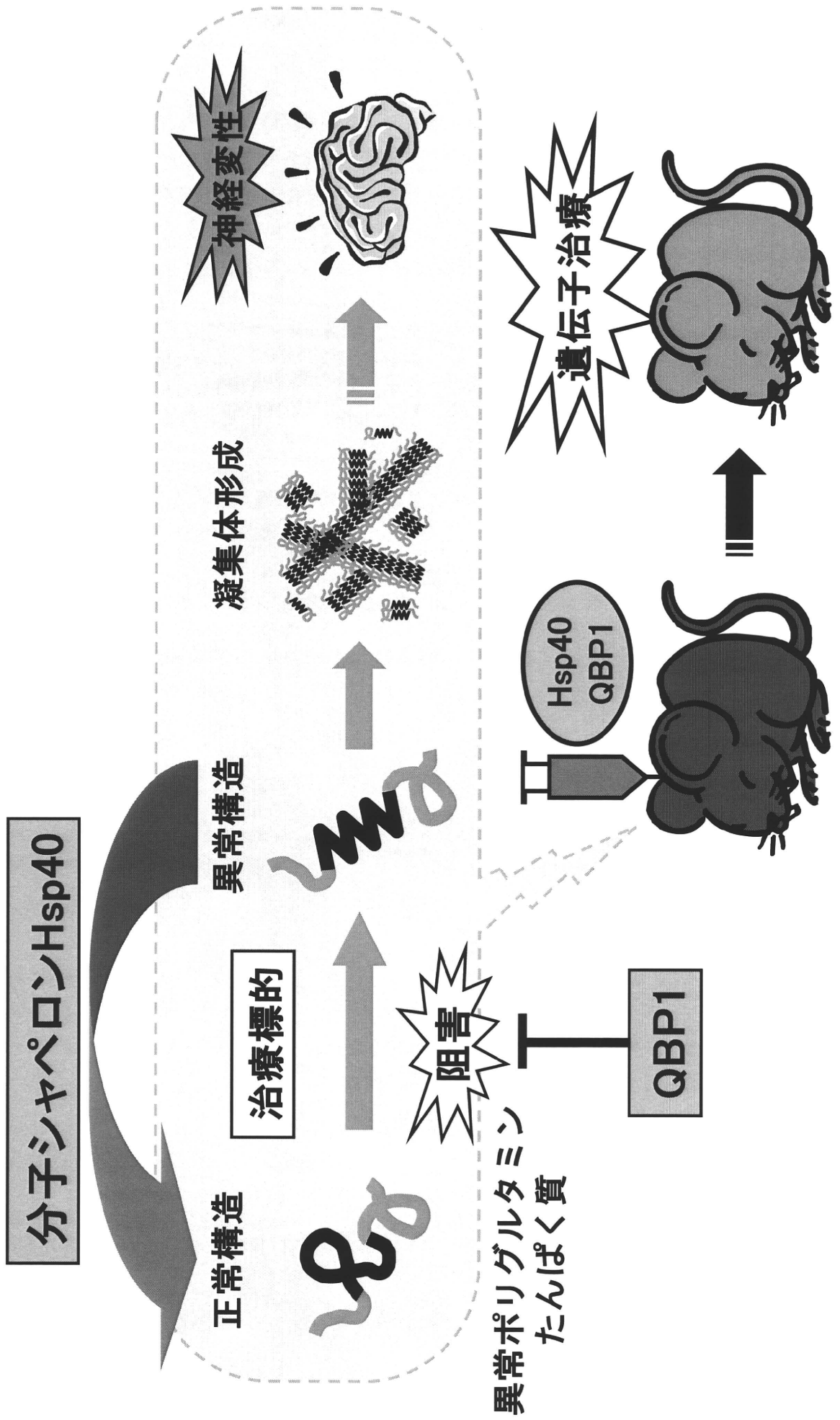
E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危険情報

なし

ポリグルタミン病に対する凝集阻害分子の遺伝子治療



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

遺伝性脊髄小脳変性症の病態解明と遺伝子治療に関する研究

分担研究者	平井 宏和	群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野
研究協力者	飯塚 朗	群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野
	高山 清彦	群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野
	Anton N. Shuvaev	群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野

研究要旨

遺伝性脊髄小脳変性症1型(SCA1)は原因遺伝子 ATXN1 の翻訳領域内に存在する CAG リピートの異常伸長が病因であることが知られている。SCA1 では小脳プルキンエ細胞が障害を受けることが知られているが、SCA1 ノックインマウスを用いた研究では、プルキンエ細胞に形態的及び電気生理学的異常が明らかではない時期から顕著な運動失調が観察される。SCA1 モデルマウスの運動失調がプルキンエ細胞の異常に起因するのであれば、詳細に解析することでプルキンエ細胞の機能異常が捉えられると考えられる。本研究では、小脳スライスパッチ法を用いて SCA1 の運動失調の原因となるプルキンエ細胞の機能異常を解明することを目的とした。その結果、mGluR1 機能に顕著な異常があることを見出した。

A. 研究目的

遺伝性脊髄小脳変性症1型(SCA1)のモデルマウスを用いた研究から、小脳の形態異常がない時期から運動失調が見られることが報告されている。そこで、小脳皮質からの唯一の出力ニューロンであるプルキンエ細胞における機能異常について、スライスパッチ法を用いて明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

Staggerer マウスの解析

50年以上前から知られている Staggerer マウスは、転写因子である ROR α のリガンド結合ドメインの欠損による転写障害が原因である。ROR α は脳内ではプルキンエ細胞に豊富に発現している。ataxin-1 は Tip60 を介して ROR α と結合するが、異常伸長ポリグルタミン鎖をもつ ataxin-1 は Tip60、ROR α と複合体を形成できず、ROR α を介する転写障害を引き起こす。したがって、SCA1 プルキンエ細胞と Staggerer マウスのプルキンエ細胞は共通す

る障害機構を有すると考えられている。そこでまず Staggerer マウスの小脳スライスをパッチクランプ法で詳細に解析し、そこで見られた異常が変異 ataxin-1 を発現させたプルキンエ細胞でも見られるのか、さらに SCA1 ノックインマウスのプルキンエ細胞でも見られるのかを検討した。

野生型マウスへの SCA1 原因遺伝子の発現

野生型マウスの小脳に、レンチウイルスベクターを用いて変異した SCA1 原因遺伝子を発現させ、3週間後にスライスパッチを行うことでプルキンエ細胞のシナプス伝達を解析した。

レンチウイルスベクター感染の細胞毒性

高力価のレンチウイルスベクターが幼弱ラットのプルキンエ細胞に感染した場合の毒性を評価した。生直後のラットの脳に GFP 発現レンチウイルスベクターを注射し、3週間後にウイルス感染と遺伝子発現の影響を、形態的及び、スライスパッチを用いて機能的に評

価した。

(倫理面への配慮)

動物愛護の観点からできるかぎり使用するマウスの数を抑えるように実験プロトコルを工夫した。

C. 研究結果

変異 SCA1 原因遺伝子発現の機能障害

Staggerer マウスのプルキンエ細胞では mGluR1 を介する slow EPSC 及び、mGluR1 を介するシナプス前抑制が全く観察されなかった。

異常伸長したポリグルタミン鎖(Q76)をもつ ataxin-1 を発現するプルキンエ細胞においても、mGluR1 を介する slow EPSC 振幅の有意な減弱が観察された。さらにシナプス可塑性(LTD 誘導)の障害も見られた。

これまで得られた結果から、SCA1 プルキンエ細胞では形態的及び通常のシナプス伝達に障害が見られる前に、mGluR1 機能が障害され、これにより小脳失調を引き起こす可能性が考えられた。今後、mGluR1 機能障害が運動失調の進行及び、遺伝子治療による運動失調改善と関連するのを調べる予定である。

レンチウイルスベクター感染の細胞毒性

高力価の GFP 発現レンチウイルスベクターが感染したプルキンエ細胞では、樹状突起の発達が有意に阻害されていた。また、平行線維-プルキンエ細胞シナプス及び、登上線維-プルキンエ細胞シナプスで観察される短期シナプス可塑性にも影響が見られた。

これらの障害は、GFP 発現が約 10 分の 1 になる弱いプロモーターに変更することでほとんど見られなくなった。このことから、高力価のレンチウイルスベクターの感染自体では、ほとんど毒性はないものの、急激に樹状突起を伸ばす時期における GFP 産生が樹状突起伸長と短期シナプス可塑性を障害したものと考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

Sawada Y et al.: High transgene expression by

lentiviral vectors causes maldevelopment of Purkinje cells in vivo. *Cerebellum* 9(3):291-302. 2010.

Sasaki J et al.: The PtdIns(3,4)P2-phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death.

Nature 465:497-501, 2010.

2. 学会発表

平井宏和、澤田悠輔、梶原剛. レンチウイルスベクターを用いた小脳の発達・再生研究. 第 33 回日本神経科学大会, 神戸, 2010 年 9 月 2 日

(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)

平井宏和: 目的遺伝子を脳で小脳プルキンエ細胞、脳幹および嗅球特異的に過剰発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物. 特許出願人: 群馬大学 出願日: 平成 22 年 6 月 4 日(特願 2010-129021).



野生型マウスの
小脳プルキンエ細胞

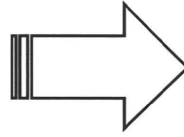
転写因子ROR α の変異



脊髄小脳変性症1型
にも共通する障害



Staggererマウスの
小脳プルキンエ細胞
(変性・脱落)



Staggererマウスを脊髄小脳変性症1型の
病態解明と治療法開発に利用

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

Machado-Joseph 病モデル動物を用いたエクトインによる治療効果に関する研究

分担研究者	和田 圭司	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
研究協力者	株田 智弘	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
	藤原 悠紀	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
	藤掛 伸宏	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
	内田 健康	早稲田大学大学院 先進理工学研究科
	永井 義隆	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部
	吉澤 利弘	NTT 東日本関東病院 神経内科

研究要旨

エクトインは好塩性細菌により浸透圧保持の安定化溶質として合成されるアミノ酸である。熱ショックや凍結／溶解、凍結／乾燥に対し酵素活性を保持する効果を持ち、PCRの安定化試薬のほか化粧品などにも使用されている。以前共同研究者の吉澤らは、Machado-Joseph 病 (MJD)の培養細胞モデルを用いてエクトインが Ataxin3-Q77 による細胞死を減少させることを示した。しかしながら in vivo におけるエクトインの神経変性に対する効果は不明であった。そこで本研究では、MJD モデルショウジョウバエを用いてエクトインによる治療効果を検討した。その結果エクトインの投与によりMJD モデルショウジョウバエの複眼変性や運動機能障害の改善がみられたことから、エクトインは MJD の治療薬候補となる可能性がある。

A. 研究目的

エクトインは好塩性細菌により浸透圧保持の安定化溶質として合成されるアミノ酸である。水溶性アミノ酸であることから、血液脳関門を通過する可能性がある。また熱ショックや凍結／溶解、凍結／乾燥に対し酵素活性を保持する効果を持ち、PCR の安定化試薬に使用されている。その他にも化粧品にも使用されていることから、ある程度人体への安全性があると考えられる。以前共同研究者の吉澤らは、Machado-Joseph 病 (MJD)の培養細胞モデルを用いてエクトインが Ataxin3tr-Q77 による細胞死を減少させることを示した (Neurobiol. Dis. 20: 170-178, 2005)。しかしながら in vivo におけるエクトインの神経変性に対する効果は不明であった。そこで本研究では、MJD モデルショウジョウバエを用いてエクトインによる治療

効果を検討した。

B. 研究方法

神経変性への効果

gmr-Gal4 ドライバーにより Ataxin3tr-Q78 を複眼に発現させると複眼変性が観察される (Cell. 93: 939-949, 1998)。これらのモデルを用い、色素細胞の脱落やネクロティックパッチの形成を指標にエクトインの神経変性への効果を検討した。ショウジョウバエは 0, 50 または 100 mMのエクトインを含む餌で発生期(卵、幼虫)より飼育し、羽化1日後に複眼の解析を行った。

運動能力、寿命への効果

ニューロン特異的ドライバである elav-Gal4 を用いて Ataxin3tr-Q78 を神経細胞に発現させた。これらのショウジョウバエは運

動能力の低下・寿命の短縮を示した。ショウジョウバエは 0 または 100 mM エクトインを含む餌で発生期より羽化後 2 週齢まで飼育した。羽化後 2 週齢において運動能力を climbing assay により測定した。

C. 研究結果

神経変性への効果

エクトイン投与群ではコントロール群 (vehicle 投与) と比較して複眼色素細胞の脱落が改善され、またネクロティックパッチ形成が減少した。以上のようにエクトイン投与により複眼変性が改善した。

運動能力、寿命への効果

発生期からのエクトイン投与により運動能力が改善した。一方エクトイン投与により寿命には変化はなかった。GFP を神経細胞に発現するショウジョウバエでは、エクトイン投与による運動能力の差はみられなかった。さらに Ataxin3tr-Q78 発現ショウジョウバエに羽化後のみエクトイン投与を行った際にも、羽化後 2 週齢において運動能力が改善する傾向がみられた。

以上の結果から、エクトインは MJD の治療薬候補となる可能性があるが、今後マウスモデルを用いてエクトインによる治療効果を検討する必要がある。

D. 研究発表

1. 論文発表

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.* 2010; 56 (5): 679-686.

Nagamine S, Kabuta T, Furuta A, Yamamoto K, Takahashi A, Wada K. Deficiency of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) leads to vulnerability to lipid peroxidation. *Neurochem. Int.* 2010; 57 (2): 102-110.

Higashi S, Iseki E, Minegishi M, Togo T, Kabuta T, Wada K. GIGYF2 is present in endosomal compartments in the mammalian brains and

enhances IGF-1-induced ERK1/2 activation. *J. Neurochem.* 2010; 115 (2): 423-437.

Higashi S, Tsuchiya Y, Araki T, Wada K, Kabuta T. TDP-43 Physically Interacts with Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked Mutant CuZn Superoxide Dismutase. *Neurochem. Int.* 2010; 57 (8): 906-913.

Takahashi M, Watanabe S, Murata M, Furuya H, Kanazawa I, Wada K, Hohjoh H. Tailor-made RNAi knockdown against triplet repeat disease-causing alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* in press.

2. 学会発表

Higashi S, Iseki E, Minegishi M, Togo T, Kabuta T, Wada K: GIGYF2 is present in endosomal compartments in the mammalian brains and enhances IGF-1-induced ERK1/2 activation. 14th European Federation of Neurological Societies (EFNS) Congress. Geneva, Switzerland. 9. 26, 2010

紺谷千穂、藤原悠紀、永井義隆、内田健康、和田圭司、株田智弘: 家族性パーキンソン病変異による UCH-L1 の分泌減少. BMB2010, 神戸, 12. 7, 2010

Takahashi M, Watanabe S, Murata M, Furuya H, Kanazawa I, Wada K, Hohjoh H: Identification of triplet repeat disease-causing alleles by a novel pull-down method and disease-causing allele specific silencing by RNAi. BMB2010, 神戸, 12. 10, 2010

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

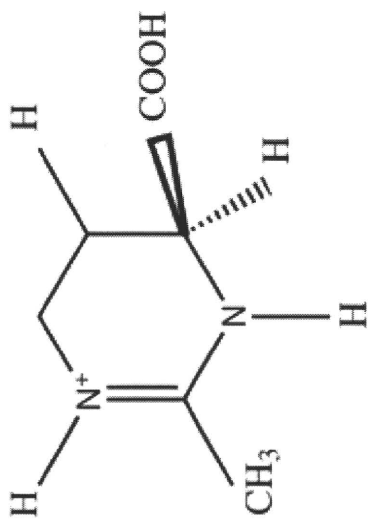
なし

F. 健康危険情報

なし

エクトイン

- ・好塩性細菌により浸透圧保持のための安定化溶質として合成されるアミノ酸

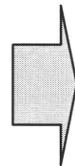


エクトイン

エクトインの投与



マシヤド・シヨセフ病 (MJD)
シヨウジヨウバエモデル
の複眼変性・運動障害の改善



治療候補の可能性

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 に対する分子標的治療役の探索

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
	鈴木 一詩	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。見出された化合物について、DRPLA トランスジェニックマウスを用いた治療研究を行った。

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、その N 末に核移行シグナルを持ち細胞核に局在するタンパクである。また、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。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）により米国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, FDA 承認化合物 1040 個）を用いて、GFP-DRPLA protein を定常発現する培養細胞を用いたスクリーニングを実施した。そのうち DRPLA タンパクが核外に局在変化する化合物として 22 種見出したこれらの化合物の中で、経口投与により脳に到達すると期待できる化合物を混餌し、DRPLA トランスジェニックマウスに与え、候補治療薬になるかどうか検討をした。

B. 研究方法

DRPLA トランスジェニックマウス Q129 および non-Tg マウスに対し該当化合物を一定の濃度(0, 3, 10, 30, 60, 120ppm)で含有する飼料を 6 週齢から与え、各群の体重、餌の摂取量および生存期間を記録した。

C. 研究結果

Q129 マウスは 8 週齢前後から体重及び食事

摂取量の減少傾向を示すが、化合物濃度 30ppm 投与群はコントロール群に対し体重低下、食事摂取量低下の抑制効果が最も顕著であった。また、軽度ではあるが、生存期間の中間値も 30ppm 投与群が長くなった。

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)

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

変異ハンチンタンパクは核内移行後に種々の核タンパクと結合することが今日では知られている。私たちは、このような核タンパクとして PQBP1 を最も早い時期に同定して報告した(Waragai et al., Hum Mol Genet 1999)。さらに、変異ハンチンタンパクは、PQBP1 の転写及びスプライシング機能の障害を引き起こすことを明らかにして来た。本年度は昨年度に報告したノックダウンマウスにおける学習機能障害(Ito et al., Hum Mol Genet 2009)に引き続き、発現消失を示すショウジョウバエ変異体を用いて遺伝学的な検討を行い、1)学習障害の基盤にグルタミン酸受容体 NR1 サブユニットの発現低下があること、2) HDAC 阻害剤が学習障害を改善すること、を明らかにした。

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特徴であり、異常ポリグルタミン病タンパクの核移行は病態発現上で必須と考えられている。私たちは、既に同定していたターゲットタンパク PQBP1 を介した病態の解明と、治療応用について検討することを、本年度の分担研究の目的とした。この際、昨年度に公表した PQBP1 ノックダウンマウスモデルにおいて得た結果を、ショウジョウバエの遺伝学的解析で、より詳細に検討し、確実なメカニズム解明を目指すことにした。

B. 研究方法

ショウジョウバエ PQBP1 ホモログ(dPQBP1)の変異体に対し、匂いと電気ショックを連合学習させる古典的条件付けを行い、記憶の保持曲線の変化を解析した。また、脳部位特異的な RNAi 実験により、dPQBP1 依存的記憶に関わる領域を検討した。また、時期

特異的なレスキュー実験により、発生における影響を検討した。さらに、この変異体における学習関連遺伝子の発現変化を解析した。加えて、HDAC 阻害剤による遺伝子発現変化と学習障害への改善効果を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組み換え実験、およびヒトサンプルを用いた実験については、監督官庁の指針に準拠し、学内倫理委員会の承認を経て、これを行った。

C. 研究結果

ショウジョウバエ dPQBP1 変異体では、学習直後ですでに記憶スコアが低下していたがその後野生型との差は広がらず、学習獲得に障害があるが記憶の保持は正常であることが示された。また、従来記憶の中核と考えられているキノコ体での RNAi は学習獲得を阻害せず、キノコ体に匂い情報を伝達する Projection neuron(PN)での RNAi が学習獲得を阻害したことから、dPQBP1 が従来知れているものとは

異なった新規の学習メカニズムに関与していることが明らかとなった。また、dPQBP1 変異体の PN では学習遺伝子の 1 つ、NR1 の発現が低下しており、これを回復させることにより、学習異常が改善された。また、成虫特異的なレスキューがこの学習獲得異常を回復するのに十分であり、発生期でのレスキューでは回復が見られなかった。これらの結果より、dPQBP1 が PN での NR1 発現を介して、学習獲得を制御するという新たなメカニズムが明らかとなった。さらに HDAC 阻害剤による dPQBP1 変異体における NR1 の発現回復と学習障害の改善が認められた(Tamura et al., J Neurosci 2010)。

これらの成果は、PQBP1 機能が阻害されることが既に明らかになっているハンチントン病などの認知障害の機序と治療を考える上で、重要な情報となることが考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, E. E., and Okazawa, H. (2010). Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol.* 189, 425-443. doi: 10.1083/jcb.200905138

2. Shiwaku, H., Yoshimura, N., Tamura, T., Sone, M., Ogishima, S., Watase, K., Tagawa, K., and Okazawa, H. (2010). Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. *EMBO J.* 29, 2446-2460. doi:10.1038/emboj.2010.116

3. Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y. C., Sone, M., Miyashita, T., Saito, M., Yoshimura, N., Chiang, A. S., and Okazawa, H. (2010). Drosophila PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J Neurosci.* 30, 14091-14101. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1319-10.2010

他 4 編。

2. 学会発表

1. Ito, H., Enokido, Y., Tamura, T., Okazawa, H. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. The First International Conference of Neural Cell Culture, Seoul, South Korea, 2010.6.25

2. Shiwaku, H., Okazawa, H. Suppression of the novel ER protein MAXER by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell autonomous toxicity. The First International Conference of Neural Cell Culture, Seoul, South Korea, 2010.6.25

3. Enokido, Y., Tamura, T., Ito, H., Komuro, A., Shiwaku, H., Wanker, E. E., Okazawa, H. Mutant Huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. Neuro 2010, Kobe, Japan, 2010.9.2-4

4. Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y. C., Sone, M., Miyashita, T., Saito, M., Yoshimura, N., Chiang, A. S., Okazawa, H. dPQBP1 is involved in a memory trace at projection neurons. Neuro 2010, Kobe, Japan, 2010.9.2-4

5. Okazawa, H. Molecular Mechanisms of PQBP1-linked Developmental Disorders. Seminar, Henry Hood Research Program, Weis Center for Research, Geisinger Clinic, Danville, USA, 2010.9.30

6. Okazawa, H. Dynamic change of synapse molecule in developmental disorder. Kick off symposium of Scientific Research on Innovative Area "Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology", Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 2010.10.27

他 19 件。

(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

特許許可 (US Patent and Trade Office)
Prophylactic/Therapeutic Agent for Neurodegenerative Disease.

Inventor: Hitoshi Okazawa

Application: National Corporation Tokyo Medical and Dental University

Date: September 17, 2010

Application Number: 12/313,837

Issue Date: November 16, 2010

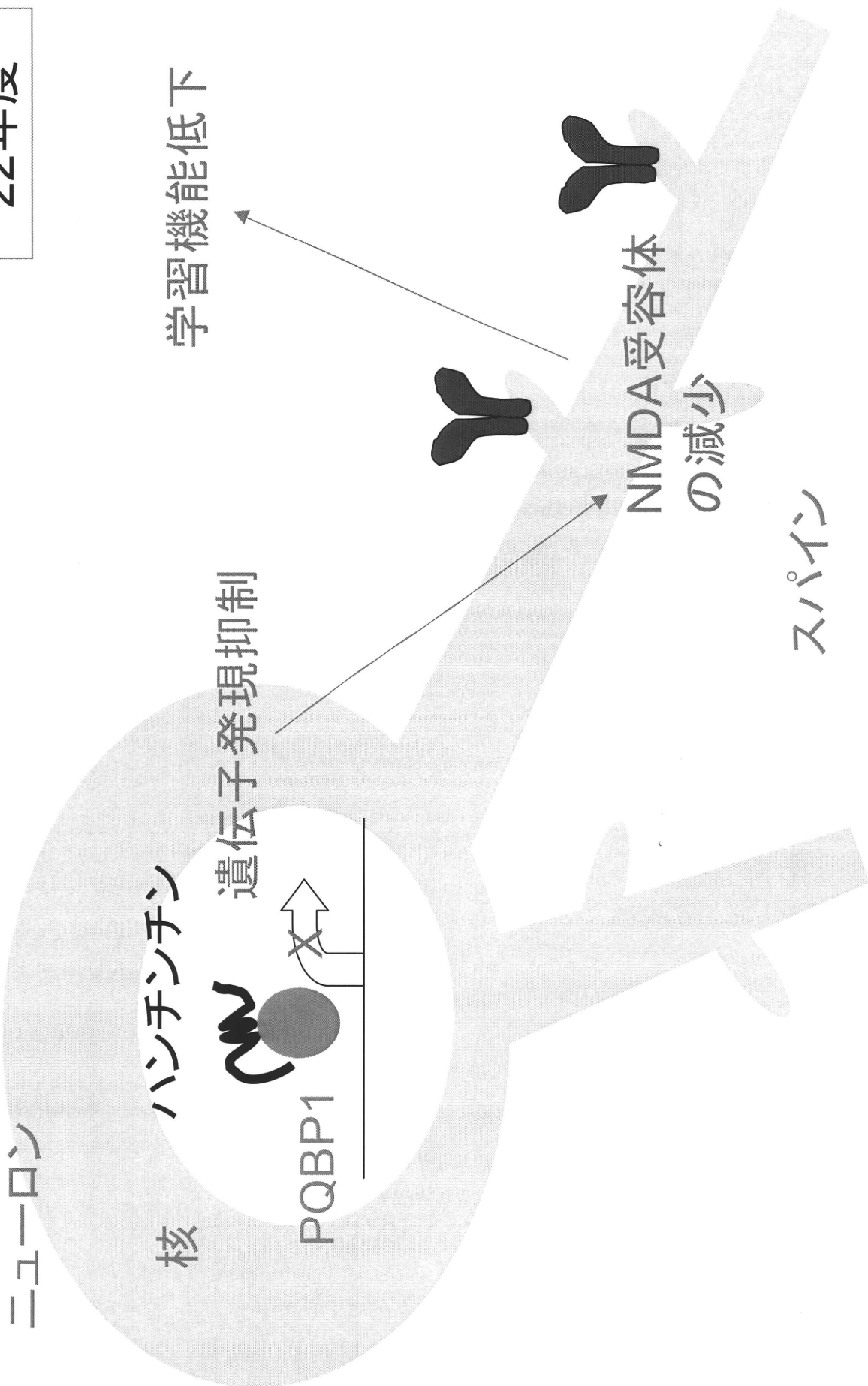
Patent Number: 7833975

F. 健康危険情報

なし。

ハンチントン病の認知機能障害メカニズムの解明

22年度



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 栄 信孝 同上

大八木保政 同上

研究の要旨

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。昨年度は10ヶ月齢MJD 155Q Tgマウス脊髄前角細胞におけるゴルジ体断片化を認め、ゴルジ体関連分子であるVCIP135分子はTgマウス脊髄のウェスタンブロット解析が示唆されたことを報告した。ゴルジ体断片化およびゴルジ体の機能異常について、さらにその他のゴルジ体関連分子について検討を加えた。ゴルジ体断片化は発症早期の6-7ヶ月においても認められた。蛍光免疫染色にて、VCIP135の局在変化を認めた。すでに知られているVCIP135と相関する分子についても検討したが、明らかな変化は認めなかったが、Grasp65に関しては10ヶ月齢脊髄前角細胞において、局在の変化が示唆された。現在ゴルジ体関連分子を中心に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分子レベルで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

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を検討する。

B. 研究方法

我々が作成した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)を用いて発症早期から晩期まで経時的に組織学的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。特に細胞内輸送に中心的な役割をもつゴルジ体に着目し、NTgマウスとの比較により、Tgマウスにおいて免疫染色およびタンパク発現解析を行い、Tgマウスにおいて変化するゴルジ体機能に関連する分子