

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(3年間のまとめ)

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(脊髄小脳変性症・多系統萎縮症)患者の実態調査

～近畿SCD友の会会員へのアンケートを通じて～

分担研究者	二村直伸	国立病院機構	兵庫中央病院	神経内科
研究協力者	松村隆介	国立病院機構	奈良医療センター	神経内科
	中馬孝容	滋賀県立成人病センター		リハビリテーション科
	高柳哲也	奈良県立医科大学	名誉教授	本郷眼科・神経内科

研究要旨

運動失調患者の生活状況やリハビリテーション状況を調べることは、患者さんに効率よくリハビリテーションを応用していくための問題点を提起することができるので重要である。そこで運動失調症の患者団体(近畿SCD友の会)患者会員に対してアンケートを実施し233名(回収率73.0%)から回答を得た。その結果を分析し以下のようなことがわかった。①多くの患者で日常生活に介助を必要としているにもかかわらず、リハビリテーションを行っている患者は61%にとどまっていた。SCD患者でのリハビリ実施とMSA患者での自主訓練指導の必要性が示唆された。②リハビリをしている患者では、リハビリへの満足度が高かったが、実施していない患者ではリハビリ提供機会に対する不満が多く、適切なリハビリの質、量を提供していく必要性が示唆された。患者が最も希望する週2～3回、1回40分(2単位)での有効性も確かめる必要がある。③リハビリテーションの有効性、必要性を患者のみならず医療従事者にも示すことが必要と考えられた。

A. 研究目的

現在、本邦には2007年3月末時点で、特定疾患申請患者数ベースで脊髄小脳変性症患者(以下SCD)が19,948人、多系統萎縮症(以下MSA)患者が9,779人存在し、増加傾向にある。申請時・更新時の臨床調査個人票は患者背景を知る上で有効であるが、日常生活動作能力やリハビリテーションの実態を把握するのは困難である。また本研究班では小脳性運動失調患者に対する短期集中リハビリの研究がおこなわれ、本邦においても小脳失調に対するリハビリテーションの有効性が確認されたと聞いている。運動失調患者の現状を調べることは、患者さんに効率よくリハビリテーションを応用していくための問題点を提起することができるので重要である。

そこで我々は、2008年度に「近畿SCD

友の会」の患者会員を対象に患者さんの疾患に対して、無記名、郵送形式のアンケートを実施し、病型、日常生活動作における介助量、リハビリテーションと自主訓練の実施状況、リハビリテーションへの希望を検討した。

B. 研究方法

近畿SCD友の会に入会している患者会員またはその家族319名にアンケートを2008年11月上旬に送付した。アンケートは、無記名を条件に性別、年齢層、居住地、罹病期間、療養環境、病名の認知度、家族歴の有無、遺伝子解析の有無、日常生活動作能力、リハビリテーションの実態と希望などについて尋ねた。

(倫理面への配慮)

無記名を条件にアンケートをおこなった。

C. 研究結果

2010年12月1日時点で233名(回収率73.0%) (男性115名、女性118名)から回答を得た。

罹病期間は平均133ヶ月(最低12ヶ月、最大40年2ヶ月)であった。

特定疾患の病名を尋ねたところSCDが151名、MSAが70名、よくわからないが12名であった。細分類を尋ねると、SCA2が2名、SCA3が22名、SCA6が20名、SCA8が1名、皮質性小脳萎縮症(以下CCA)が16名、DRPLAが3名、HSPが3名、AOA1が1名、AOA2が1名、OPCAが65名、SNDが4名、シャイドレガー症候群が4名と答え、特定疾患名しか知らない患者さんも多くいた(91名)。

日常生活動作能力については、80%の患者が移動に介助を要し、55%の患者が移乗に介助を要し、50%の患者が入浴に介助を要し、更衣(36%)、食事(34%)、トイレ(32%)、洗面(28%)が続いた。47~49%の患者が移動に手すりや車いすを必要とし、杖や歩行器の利用は17%~19%にとどまった。多くの患者さんで日常生活に介助を必要としていた。

リハビリテーションの実施状況は233名中142名(61%)が病院、施設、または訪問リハビリのいずれか一ヶ所以上を利用していった。病型別に解析するとMSA患者70名中54名(77%)がリハビリしていたが、SCD患者では151名中82名(54%)にとどまっていた。リハビリへの満足度は実施している患者さんの67%が現在のリハビリに「満足」、「大体満足」、していたが、リハビリを受けていない患者さんでは、「リハビリをしてくれる施設が近くにない」、「リハビリ時間が短いのでやめた」、「医師やスタッフにリハビリは効果がないと言われた。」といった不満が多く聞かれた。患者さんが最も希望するリハビリは週2.6回、1回当たり43分であった。

また、体操や散歩などの自主訓練の実施状況は233名中131名(56%)が行っていた。病型別に解析するとMSA患者では自主訓練は70名中21名(30%)にとどまったが、SCD患者では151名中101名(67%)であ

った。

まとめると、①多くの患者で日常生活に介助を必要としているにもかかわらず、リハビリテーションを行っている患者は61%にとどまっていた。SCD患者でのリハビリ実施とMSA患者での自主訓練指導の必要性が示唆された。②リハビリをしている患者では、リハビリへの満足度が高かったが、実施していない患者ではリハビリ提供機会に対する不満が多く、適切なリハビリの質、量を提供していく必要性が示唆された。患者が最も希望する週2~3回、1回40分(2単位)での有効性も確かめる必要がある。③リハビリテーションの有効性、必要性を患者のみならず医療従事者にも示すことが必要と考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

二村直伸：難病ヘルスノート 平成19年度版 脊髄小脳変性症・多系統萎縮症 (神戸市) 神戸市保健福祉局健康部地域保健課編集 兵庫身体障害者定期刊行物協会出版 2008年 P1-24

2. 学会発表

中馬孝容、二村直伸、松村隆介、高柳哲也
近畿地方在住の脊髄小脳変性症および多系統萎縮症患者へのアンケート調査について

第47回日本リハビリテーション医学術集会学会

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

該当するものなし。

F. 健康危険情報

該当するものなし。

運動失調症患者の実態調査 ～近畿SCD友の会会員へのアンケート～

- ・ 運動失調症患者の日常生活動作能力やリハビリの実施状況や患者さんのリハビリへの希望を調査することは患者さんに効率よくリハビリを普及していくために重要である。
- ・ 運動失調症の患者団体（近畿SCD友の会）患者会員に対してアンケートを実施し、233名（回収率73.0%）から回答を得た。
- ・ 多くの患者で日常生活に介助を必要としているにもかかわらず、リハビリテーションを行っている患者は61%にとどまっていた。SCD患者でのリハビリ実施率の向上とMSA患者での自主訓練指導の必要性が示唆された。
- ・ リハビリをしている患者では、リハビリへの満足度が高かったが、実施していない患者ではリハビリ提供機会に対する不満が多く、適切なリハビリの質、量を提供していく必要性が示唆された。患者が最も希望する週2～3回、1回40分（2単位）での有効性も確かめる必要がある。
- ・ リハビリテーションの有効性、必要性を患者のみならず医療従事者にも示すことが必要と考えられた。

班員 二村直伸（国立病院機構 兵庫中央病院 神経内科）
共同研究者 松村隆介 中馬孝容 高柳哲也

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

多系統萎縮症における消化管蠕動障害の病態に関する研究

<p>分担研究者</p> <p>研究協力者</p>	<p>西澤正豊</p> <p>小澤鉄太郎</p> <p>佐治越爾</p> <p>矢島隆二</p> <p>徳永純</p> <p>荒川武蔵</p> <p>竹内亮子</p> <p>小野寺 理</p>	<p>新潟大学脳研究所神経内科</p> <p>新潟大学脳研究所神経内科</p> <p>新潟大学脳研究所神経内科</p> <p>新潟大学脳研究所神経内科</p> <p>新潟大学脳研究所神経内科</p> <p>新潟大学脳研究所神経内科</p> <p>新潟大学脳研究所神経内科</p> <p>新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター</p>
---	--	---

研究要旨

臨床的に消化器症状が問題となる多系統萎縮症 (MSA) の患者において、消化管蠕動低下の病態を評価するためデジタル聴診システムを用いた腸音解析を行い、消化管蠕動ホルモンである「グレリン」の分泌機能を評価した。MSA (n=12) とパーキンソン病 (PD) (n=10) での分時腸音数と%腸音時間は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) (n=11) とコントロール (n=18) よりも有意に低下していた。この結果から、腸音発生頻度の低下はアルファシヌクレイン異常症である MSA と PD に共通する症状である可能性が示唆された。グレリンの分泌動態については MSA (n=13)、進行性核上性麻痺/大脳皮質基底核変性症 (PSP/CBD) (n=6)、ALS (n=5)、コントロール (n=8) において、早朝空腹時の血漿アクティブグレリンとデアシルグレリンを ELISA 法にて定量し、アクティブグレリン/総グレリン比 (%) を解析した。MSA 患者のアクティブグレリン/総グレリン比は、PSP/CBD、ALS、コントロールと比較し明らかに低下していた。アクティブグレリンは消化管蠕動を促進し、一方でデアシルグレリンは消化管蠕動を抑制するため、アクティブグレリン/総グレリン比の低下は、MSA 患者の消化管蠕動低下の要因である。今後は MSA におけるグレリン分泌異常のメカニズムをさらに検討し、消化管-中枢神経系クロストークの病的変化を明らかにする必要がある。また、グレリン分泌異常が PD を含めたアルファシヌクレイン異常症に共通した病態かを検討する必要がある。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) の患者では、消化管蠕動障害が臨床的に問題となる。消化管蠕動の指標である腸音発生頻度は、デジタル聴診システムを用いた腸音解析によって非侵襲的に評価できる。また、消化管蠕動ホルモンである「グレリン」の分泌動態を評価することにより、消化管蠕動に関与する消化管-中枢神経系クロストークの病的変化を見ることができ、グレリンは主に胃体部に分布する内分泌細胞から循環血液中に放出される

アミノ酸 28 個からなるペプチドで、3 番目のセリン残基が脂肪酸 (n-オクタン酸) でアシル化修飾されたアクティブグレリンは、消化管の蠕動促進作用と食欲増進などの生理活性を示す。一方、循環血液中のグレリンの多くはアシル化修飾のないデアシルグレリンであり、これは消化管蠕動を抑制する。我々は、MSA 患者の消化管蠕動障害の病態を評価するために、デジタル聴診システムを用いた腸音解析と、グレリン分泌機能の評価を行った。

B. 研究方法

研究 1. 腸音解析

MSA12例, PD10例, 疾患対照として年齢を合わせた進行性核上性麻痺と皮質基底核変性症 (PSP・CBD) 7例, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 11例, 対照 18例 (健康人 8例, 非変性疾患 8例) において, 電子聴診器とデジタルレコーダーを用いた腸音解析システム (Enterotachogram Analysis System, Western Research Company, Inc., USA.) を用いた定量的腸音解析を行った。評価に用いた指標は 1 分間に発生する腸音数 (分時腸音数) と全評価時間に占める腸音時間の割合 (%腸音時間) であり, これらを午前中の食間の時間帯 (午前 10 時～11 時) において 10 分間連続測定した。これは腹部聴診と同様の非侵襲的検査であり, 電子聴診器を当てる部位は臍の右約 5 cm 外側とした。測定は静粛な個室で安静仰臥位にて行った。パーキンソン症状を有する MSA 症例, PD および PSP・CBD 症例においては, 抗パーキンソン病薬の開始前に評価を行った。

研究 2. グレリン分泌機能評価

MSA13 例 (probable MSA-C: 10 例, probable MSA-P: 3 例), PSP/CBD 6 例, ALS 5 例, コントロール 8 例 (健康人 6 例, 非変性疾患 2 例) において, 早朝空腹時採血にて血漿中のアクティブグレリンとデスアシルグレリンをサンドイッチ ELISA 法にて定量した。アクティブグレリン値とデスアシルグレリン値の和 (総グレリン値) に対するアクティブグレリン値の比率 (アクティブグレリン/総グレリン比) を用いて検討した。グレリンの分泌機能に影響を与える因子として血清レプチン値と body mass index の測定を合わせて行った。

統計学的処理は分散分析と Bonferroni の多重比較にて行った。

(倫理面への配慮)

この研究は新潟大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

研究 1. 腸音解析

MSA と PD での分時腸音数と %腸音時間は ALS と対照よりも有意に低下していた。これらのマーカーは PSP・CBD と他の群との間に有意差はなかった。アルファシヌクレイン異常症である MSA と PD では, 腸音発生頻度の低下が共通して見られた。

研究 2. グレリン分泌機能評価

MSA におけるアクティブグレリン/総グレリン比は $7.0 \pm 1.4\%$ であり, PSP/CBD ($15.4 \pm 2.3\%$), ALS ($14.7 \pm 1.8\%$), コントロール ($13.6 \pm 1.3\%$) よりも明らかに低下していた ($P < 0.05$)。血清レプチン値と body mass index は全てのグループ間で有意差はなかった。アクティブグレリンは迷走神経求心路を介して自律神経中枢に作用し消化管蠕動を強力に促進するホルモンであり, 一方でデスアシルグレリンは血流を介して視床下部に到達し消化管蠕動を抑制することが知られている。我々の研究で発見された MSA でのアクティブグレリン/総グレリン比の低下は, MSA における消化管蠕動低下に強く関与する因子である。

D. 研究発表

1. 論文発表

Ozawa T, Saji E, Yajima R, Onodera O, Nishizawa M. Reduced bowel sounds in Parkinson's disease and multiple system atrophy patients. Clin Auton Res 2010 Dec 23. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

○小澤鉄太郎, 佐治越爾, 矢島隆二, 小野寺理, 西澤正豊. 多系統萎縮症とパーキンソン病に共通して見られる腸音発生頻度の低下. 第 51 回日本神経学会総会 (東京)

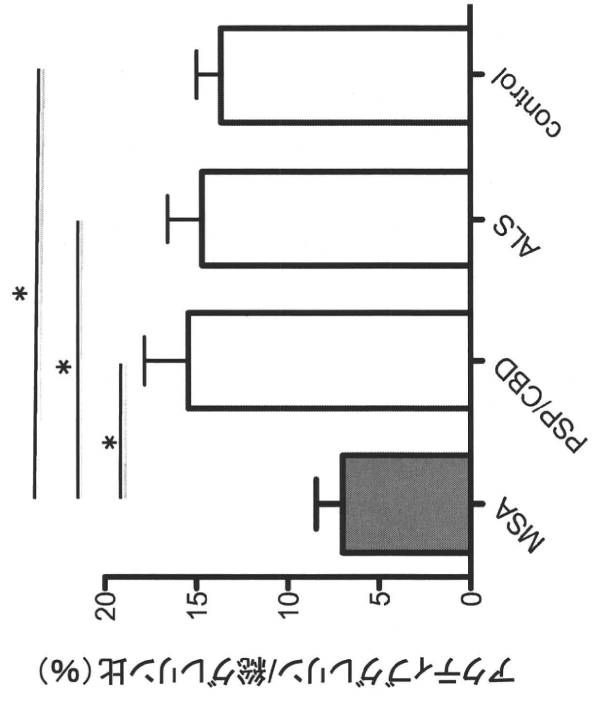
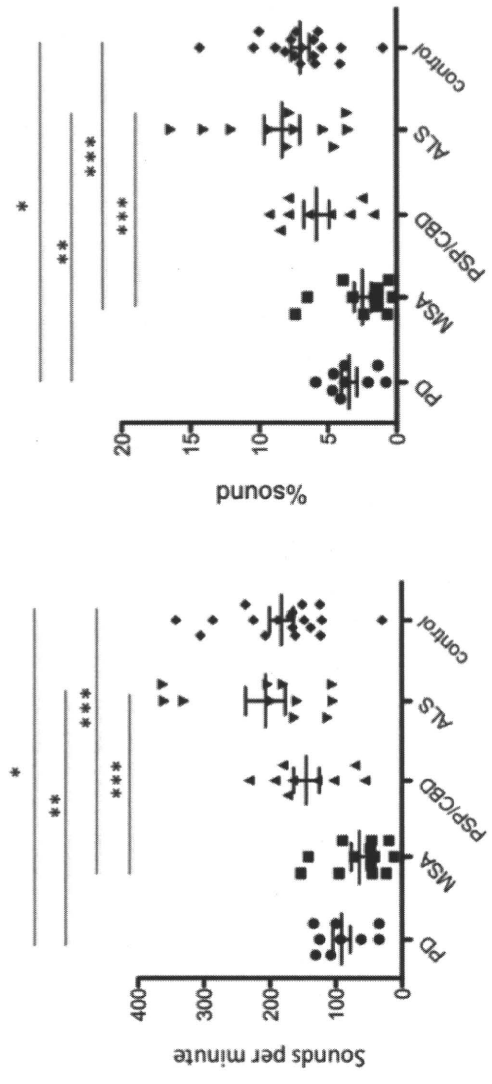
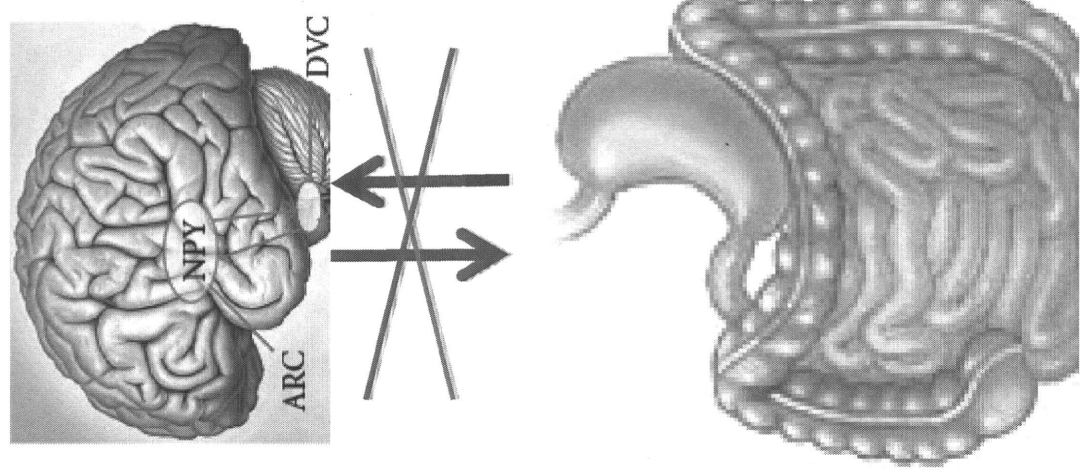
E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

特記事項無し。

F. 健康危険情報

特記事項無し。

シヌクレイン異常症における消化管—中枢神経系クロストークの病的変化



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

神経変性関連蛋白質 UCH-L1 の機能解明と Machado-Joseph 病の治療薬開発に関する研究

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
	長嶺 聖史	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

UCH-L1 の欠損マウスである gad マウスは主に延髄薄束における逆行性軸索変性を呈し、進行性感覚失調を示すことから、UCH-L1 研究は感覚性運動失調の病態機序を解明する上で有用であると考えられる。本研究では UCH-L1 の新たな機能として、UCH-L1 がリン脂質と結合すること、酸化ストレスに対する抵抗性に関与することを示した。また UCH-L1 が CDK と結合しその kinase 活性を調節することを明らかにした。これら UCH-L1 の新規機能は UCH-L1 の神経保護作用に関与する可能性がある。さらに MJD モデルショウジョウバエの複眼変性は UCH のノックダウンにより悪化したことから、UCH-L1 は MJD の病態にも関与していることが示唆された。一方我々は脊髄小脳変性症の治療薬開発研究として、アミノ酸の一種であるエクトインに着目した。MJD モデルショウジョウバエにエクトインを投与したところ、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

脱ユビキチン化酵素の一つ ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) は神経細胞において高い発現を示す蛋白質である。UCH-L1 の欠損マウスである gad マウスは主に延髄薄束における逆行性軸索変性を呈し、進行性感覚失調を示すことから、UCH-L1 研究は感覚性運動失調の病態機序を解明する上で有用であると考えられる。また UCH-L1 はパーキンソン病やハンチントン病など様々な神経変性疾患への関与も報告されている。しかし現在のところ UCH-L1 の分子機能に関しては不明な点が多く残されている。そこで本研究では UCH-L1 の新たな分子機能を明らかにすることを目的とした。

また脊髄小脳変性症の治療薬開発研究として、アミノ酸の一種であるエクトインに着目した。

以前共同研究者の吉澤らは、エクトインにより MJD 培養細胞モデルの細胞死が減少することを示した (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

UCH-L1 の新規機能の解明

Gad マウス個体や gad マウスの DRG ニューロンの初代培養を用いて酸化ストレスなどに対する脆弱性を検討した。また生化学的実験により、UCH-L1 と脂質の結合や他の蛋白質との結合やその役割を解析した。さらに、MJD モデルショウジョウバエを用いて UCH のノックダウンの効果を検討した。

エクトインによる治療効果の検討

MJD モデルショウジョウバエにエクトインを混入した餌を投与し、複眼変性や運動障害を指標にエクトインの効果を解析した。

C. 研究結果

UCH-L1 の新規機能の解明

gad マウスにビタミン E 欠乏食を与えると、運動能力低下が観察された。同条件では野生型マウスの運動能力に影響はなかった。gad マウス由来培養ニューロンは脂質酸化ストレス及び低浸透圧ストレスに対して脆弱であった。In vitro で UCH-L1 はリン脂質と結合した。以上から UCH-L1 は細胞膜の安定化に寄与していると推測された。

また UCH-L1 が cyclin dependent kinases (CDKs) と結合し kinase 活性を増強することを明らかにした。CDKs に関しては神経変性への関与が多数報告されており、これら UCH-L1 の新規機能は UCH-L1 の神経保護作用に関与する可能性がある。

さらに MJD モデルショウジョウバエの複眼変性は UCH のノックダウンにより悪化し、UCH-L1 は MJD の病態にも関与していることが示唆された。

エクトインによる治療効果の検討

MJD モデルショウジョウバエにおいて、エクトイン投与群ではコントロール群 (vehicle 投与) と比較して複眼変性や運動障害の改善がみられた。今後は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

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-associated mutant UCH-L1 and carbonyl-modified UCH-L1. *Hum. Mol. Genet.* 2008; 17 (10): 1482-1496.

Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (35):

23731-23738.

Kabuta T, Wada K. Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.* 2008; 4 (6): 827-829.

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.

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.

2. 学会発表

長嶺聖史、株田智弘、山本和広、高橋明男、和田圭司: 脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 と脂質酸化ストレス. 第 51 回日本神経化学会大会, 富山, 9. 11, 2008

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

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

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

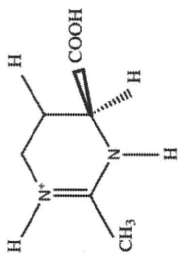
なし

UCH-L1 (UCH)
の欠損 → 感覚性運動失調
(gadマウス)

マシヤド・ジヨセフ病 (MJD)
モデルにおける症状の悪化
(シヨウジヨウバエ複眼変性モデル)

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。

エクトインの投与



MJDシヨウジヨウバエ
モデルの複眼変性・
運動障害の改善

治療薬候補の可能性

治療標的の可能性

病態における
UCH-L1の機能
異常や量的減少

Kinase Xの異常

感覚性運動失調
やMJD

の一因や悪化

細胞膜安定性
の低下

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に関する研究

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

研究要旨

ポリグルタミン病の治療ターゲットの探索のために、ポリグルタミン病病態をモニターできる蛍光タンパク質発現マウスを作製した。シャペロン介在性オートファジーを利用する遺伝子治療を開発し、このシステムが治療ターゲットとなり得ることを示した。さらに選択的オートファジーの制御に関与する p62 のリン酸化を同定し、この修飾がポリグルタミン病の治療ターゲットとなりうる可能性を示した。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の病態としては、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。われわれは本研究においてこの病態を制御する治療ターゲットを同定するために、初期変化をモニターするシステムの構築と分解系を制御するシステムの解析・開発を行った。

B. 研究方法

1) H20年度:我々はハンチントン病の早期遺伝子発現変化を来すものとしてナトリウムチャンネル B4 サブユニット (B4) を同定した(Oyama et al J Neurochem 2006)。このプロモーターをクローニングし、その下流に Venus cDNA を挿入したトランスジェニックマウスを作製した。このマウスから FACS を用いて神経細胞の採取を試みた。

2) H21年度:シャペロン介在性オートファジー 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。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の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。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ハンチントン病モデルマウス R6/2 の線条体に導入して、その影響を RFP のみの場合と比較検討した。

3) H22年度:我々がすでにポリグルタミン封入体と結合していることを報告している p62(Nagaoka et al J Neurochem 2004)について、最近この分子が選択的オートファジーの制御分子と考えられていることから、本分子による選択的オートファジー制御メカニズムの解析を行った。プロテアソーム阻害剤処理の際に p62 の電気泳動上の移動度が変化することから、翻訳後修飾の存在を想定し、p62 を精製し、質量分析により、翻訳後修飾を同定した。翻訳後修飾として同定したリン酸化部位に対する抗体を作製した。作製した抗体により、プロテアソーム処理や、オートファジー処理によるリン酸化 p62 の変化を検討した。

(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できる限り実験動物に苦痛を与えない

ように配慮した。

C. 研究結果

1) 線条体に強い蛍光を示すトランスジェニックマウスを得た。このマウスはハンチントン病のモデルマウス R6/2 と掛け合わせることにより、病態の進行とともに蛍光の減弱を見、ポリグルタミン毒性のプロモーターへの影響をモニターできることがわかった。さらに蛍光を発する細胞を FACS で採取し、解析する手法を確立しつつある。

2) CMA を用いて伸長ポリグルタミンを選択的に分解できることを示した(Bauer et al Nat Biotech 2010)。この結果、異常タンパク質の分解除去が疾患の発症、進行の抑制に効果があり、病態制御のターゲットであることを *in vivo* ではっきり示した。

3) p62 のリン酸化部位を同定し、その中でも S403 が選択的オートファジーの制御に重要であることを明らかにした。このリン酸化の制御機構を明らかにすることにより、異常タンパク質の分解促進の可能性が出てきた。

以上の結果ポリグルタミン病の異常タンパク質分解制御のためのターゲットを同定し、その制御効果を判定するモデルマウスを作製することが出来た。

D. 研究発表

1. 論文発表

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.

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).

Doi, H., Koyano, S., Suzuki, Y., Nukina, N. & Kuroiwa, Y. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. *Neurosci Res* **66**, 131-133 (2010).

Doumanis, J., Wada, K., Kino, Y., Moore, A.W. & Nukina, N. RNAi screening in Drosophila cells identifies new modifiers of mutant huntingtin aggregation. *PLoS One* **4**, e7275 (2009).

Furukawa, Y., Kaneko, K., Matsumoto, G., Kurosawa, M. & Nukina, N. Cross-seeding fibrillation of Q/N-rich proteins offers new pathomechanism of polyglutamine diseases. *J Neurosci* **29**, 5153-5162 (2009).

Bauer, P.O., Wong, H.K., Oyama, F., Goswami, A., Okuno, M., Kino, Y., Miyazaki, H. & Nukina, N. Inhibition of rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *J Biol Chem* **284**, 13153-13164 (2009).

Yamanaka, T., Miyazaki, H., Oyama, F., Kurosawa, M., Washizu, C., Doi, H. & Nukina, N. Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF- κ B transcription factor. *EMBO J* **27**, 827-839 (2008).

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* **283**, 6489-6500 (2008).

2. 学会発表

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. 第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会, 宇都宮 (2010年7月).

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

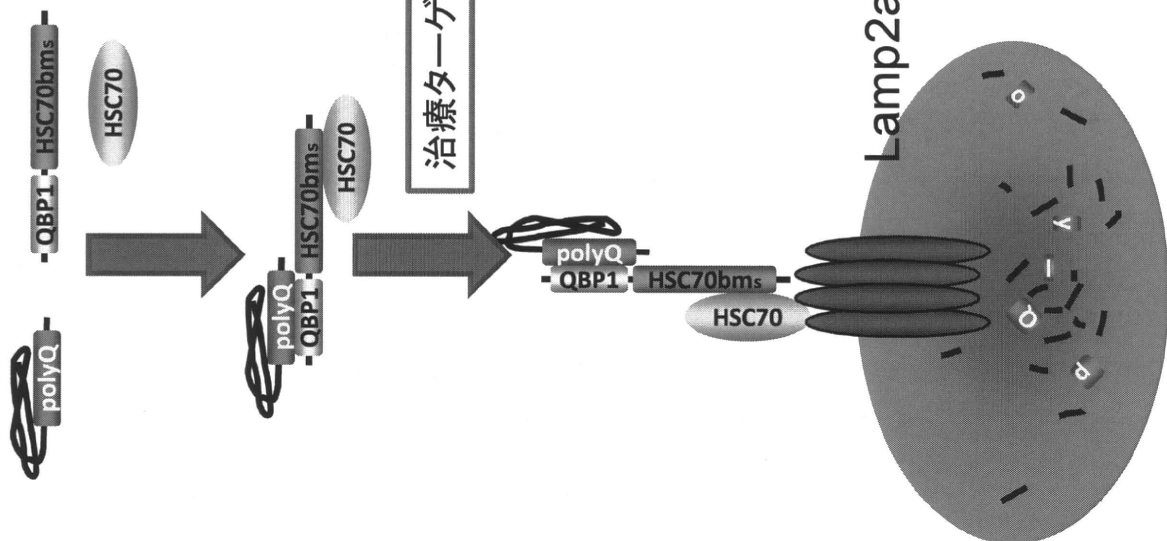
該当なし

F. 健康危険情報

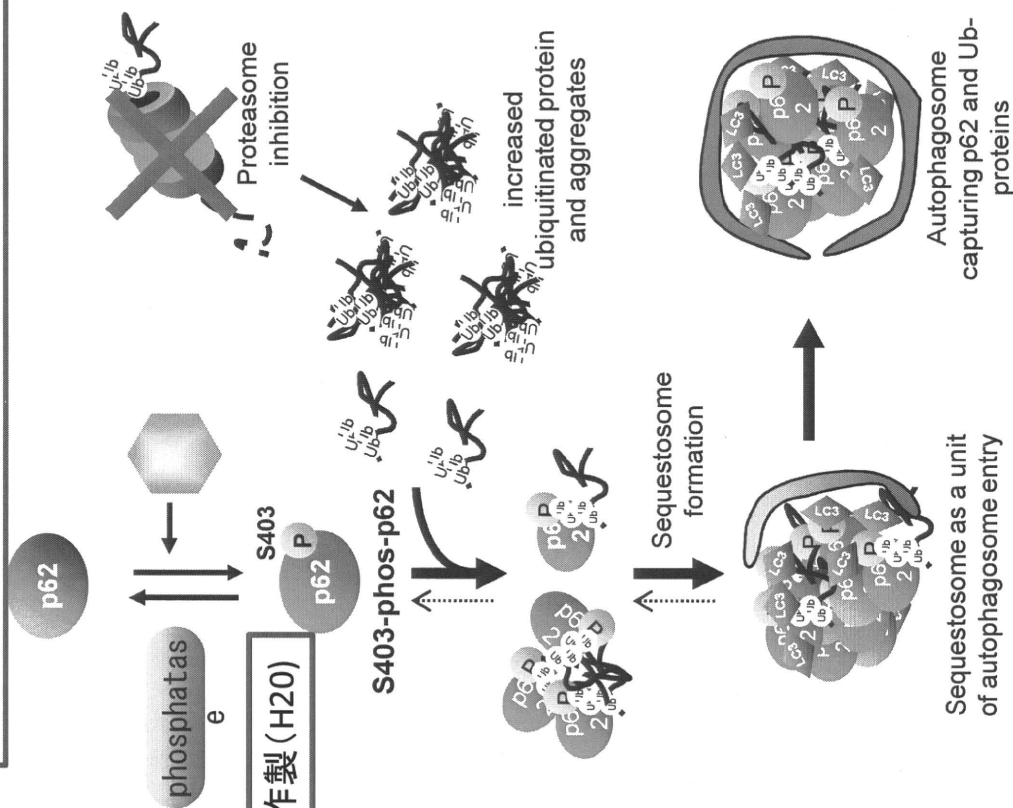
該当なし

ポリグルタミン病の治療ターゲット探索 (H20-22)

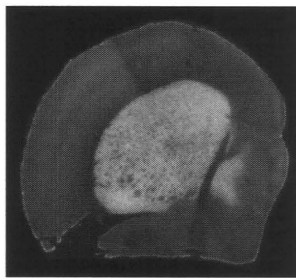
シャペロン介在性オートファジーによる分解促進 (H21)



P62による選択的オートファジーによる分解制御 (H22)



治療ターゲット評価のためのマウス作製 (H20)



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

ポリグルタミン病の病態解明・治療法開発

分担研究者 永井 義隆 大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝学(H20.9 まで)
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(H20.10 以降)

研究協力者 ポピエル明子^{1,2}、岡本佑馬²、藤掛伸宏^{1,2}、乾隆³、村松慎一⁴、戸田達史^{2,5}、和田圭司¹
¹ 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、² 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学、³ 大阪府立大学大学院環境生命科学研究科蛋白質科学、⁴ 自治医科大学神経内科、⁵ 神戸大学神経内科/分子脳科学

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・凝集を生じ、最終的に神経変性を引き起こすと考えられている。本研究では、蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした治療法開発を目指して、①PolyQ 凝集阻害分子の異常伸長 PolyQ 鎖結合特異性・親和性について、SPR法を用いた評価系を確立した。②ウイルスベクターを用いた異常伸長 PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1、分子シャペロン Hsp40 の遺伝子治療について、PolyQ 病モデルマウスに対する治療効果を明らかにした。③細胞膜透過性 PTD-QBP1 を用いた分子治療について、PolyQ 病モデルショウジョウバエ、マウス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、種々の脊髄小脳失調症、ハンチントン病など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・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。本研究班では、異常伸長 PolyQ 蛋白質のミスフォールディング・凝集を標的として、PolyQ 鎖結合ペプチド QBP1 や PolyQ 凝集阻害化合物スクリーニング、あるいは分子シャペロン Hsp40、Hsp70などを応用した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、結果および考察

①PolyQ 凝集阻害分子と異常伸長 PolyQ 鎖との結合解析: 様々な PolyQ 凝集阻害分子と異常伸長 PolyQ 鎖との分子間相互作用について、SPR解析を行った結果、QBP1 は Thio-Q62 に特異的な結合活性($K_d = 5.7 \mu\text{M}$)を示したが、Thio-Q0/Q19 には有意な結合を認めなかった。一方、コンゴールレッドは 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。次に様々な QBP1 変異体と Thio-Q62 との SPR 解析を行った結果、結合親和性と凝集阻害活性が強く相関することが明らかとなった。

②AAV5-QBP1/Hsp40 による PolyQ 病モデルマウスの遺伝子治療: ハンチントン病モデルマウス R6/2 の線条体に 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)を注射したところ、AAV5-QBP1 では封入体形成は著明に抑制されたが、表現型に対する有意な治療効果は認めなかった。一方、AAV5-Hsp40 ではウイルス非感染細胞も含め封入体形成抑制効果、神経症状に対する治療効果を認め、non-cell autonomous な治療効果が示唆された。

③細胞膜透過性 PTD-QBP1 による PolyQ 病モデル動物の分子治療: 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、封入体形成抑制、寿命短縮の改善を認めた。次にハンチントン病モデルマウス R6/2 に PTD-QBP1 を腹腔内投与したところ、体重減少の改善を認めたが、運動障害や寿命短縮、封入体形成には有意な治療効果を認めなかった。

(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, et al, *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) Bauer PO, et al, *Nagai Y, Nukina N. Novel gene therapy for polyglutamine diseases to degrade selectively the pathogenic protein. *Nature Biotechnol* 28: 256-263 (2010)
- 4) *Nagai Y, et al. Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. *Curr Pharm Biotechnol* 11: 188-197 (2010)
- 5) Naiki H, *Nagai Y. Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: Pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins. *J Biochem* 146: 751-756 (2009)
- 6) Tomita K, Popiel HA, *Nagai Y, et al. Structure-activity relationship study on polyglutamine binding peptide QBP1. *Bioorg Med Chem* 17: 1259-1263 (2009)
- 7) Okamoto Y, *Nagai Y, et al. Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregate inhibitors to the expanded polyglutamine stretch. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 634-639 (2009)
- 8) Kanagawa M, et al. Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum Mol Genet* 18: 621-631 (2009)
- 9) Popiel HA, *Nagai Y, et al. 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)
- 10) *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)
- 11) Nakayama H, et al. ER stress is the initial response to polyglutamine toxicity in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 550-555 (2008)
- 12) Fujikake N, *Nagai Y, et al. 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)
- 13) Kaminosono S, et al. Suppression of mutant huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability. *J Neurosci* 28, 8747-8755 (2008)
- 14) 永井義隆. 脊髄小脳変性症. *ドクターサロン* 54:

729-732 (2010)

- 15) 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: 913-916 (2009)
- 16) 永井義隆, 藤掛伸宏. 神経疾患と分子シャペロン. *Clinical Neuroscience* 27: 368-369 (2009)
- 17) 永井義隆, ポピエル明子. 脊髄小脳変性症 - What's new? 「遺伝子治療」. *Clinical Neuroscience* 27: 95-98 (2009)
- 18) 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) Nagai Y. Modeling human neurodegenerative diseases using *Drosophila* for elucidating the pathomechanisms and therapeutic strategies. Memorial Symp IBRC KIT (Mar, 2010, Kyoto, Japan)
- 2) Nagai Y, et al. 17-AAG, an HSF1-activator, suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration via induction of molecular chaperones. 4th Int Cong Stress Responses Biology & Medicine (Oct, 2009, Sapporo, Japan)
- 3) Nagai Y, et al. Surface plasmon resonance as a useful technique for screening for specific polyglutamine aggregation inhibitors. 5th Gordon Conf CAG Triplet Repeat Disorders (May, 2009, NH, USA)
- 4) 永井義隆, 他. 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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回日本神経化学会 (2009.6, 群馬)
- 9) 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)
- 10) 永井義隆, 他. ポリグルタミン蛋白質の毒性構造変移の捕捉-露出 β シート仮説の提唱-. 第31回日本神経科学会 (2008.7, 東京)
- 11) 永井義隆, 他. 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)

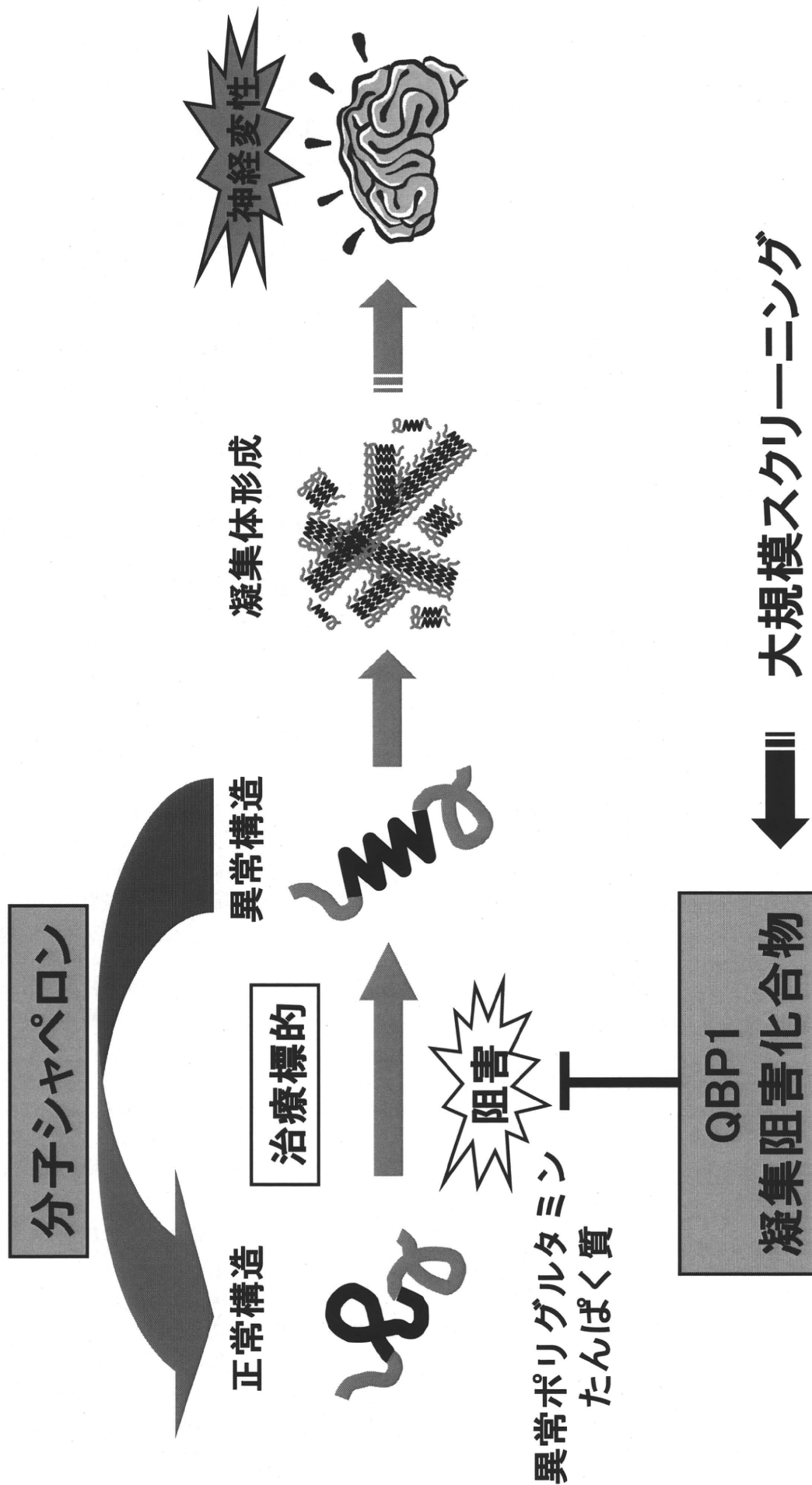
E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危険情報

なし

ポリグルタミン病に対する
たんぱく質の構造異常・凝集を標的とした治療法開発



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

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。この中で、私たちは核機能障害が主要な病態であることを示して来た。本分担研究を通じて、1)核タンパク Ku70 とハンチンチンタンパクの結合がハンチンチン病における DNA 修復障害を引き起こし、その補正は大きな治療効果を示すこと、2)核タンパク PQBP1 とハンチンチンの結合がグルタミン酸受容体 NR1 サブユニットの発現低下を来し、認知学習障害の原因となること、3)HDAC 阻害剤がマウス疾患モデルおよびショウジョウバエ疾患モデルの認知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。したがって、核に移行した異常タンパクの結合相手の同定と、それによって引き起こされる核機能障害は、病態解明と治療開発の上で極めて重要と考えられる。私たちは、開始時に既に同定していた二つのターゲットタンパク(Ku70 と 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、本分担研究の目的とした。

B. 研究方法

私たちはプロテオーム解析の結果から、ハンチンチン病と SCA1 に共通して脆弱神経細胞の核タンパク HMGB1/2 が異常ポリグルタミンタンパクとの結合を介して減少し、これが DNA 損傷修復障害につながることを明らかにした(Qi et al., Nature Cell Biology 2007)。DNA 修復障害にさらに別の核タンパクが関与する可能

性について検討を行っていたが、共同研究者のインタラクトーム解析により、DNA 修復核タンパクである Ku70 がハンチンチンと結合する可能性が示唆された。そこで、免疫沈降法、プルダウン法により両者の結合を検討し、Ku70 の機能を *in vitro* 活性でハンチンチンタンパクの DNA 修復阻害を検討し、トランスジェニックマウスを用いて機能的 Ku70 補充の治療効果を検討した。

一方、PQBP1 との結合の機能的解析としては、PQBP1 のノックダウンマウスおよび欠損ショウジョウバエを作成し、その学習障害と病態機序を検討した後、薬剤による治療効果を検討した。

(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へてこれを行った。

C. 研究結果

免疫沈降法とブルダウン法により、異常ハンチンタンパクのみが Ku70 に強く結合することが分かった。In vivo の培養神経細胞ならびにハンチントン病患者脳／ハンチンチンノックインマウス／トランスジェニックの全てにおいて、Ku70 とハンチンチンは共局在を示した。また、可溶性 GST-Htt 融合タンパクは DNA-PK 活性を阻害することが分かった。さらに Ku70 トランスジェニックマウスと R6/2 ハンチンチン exon1 トランスジェニックマウスを交配すると、R6/2 マウスの寿命短縮を顕著に改善することが明らかになった (Enokido et al., JCB 2010)。

一方、PQBP1 のノックダウンマウスおよび欠損ショウジョウバエにおいては、いずれも学習機能の障害を示し、マウスでは不安関連認知障害が特に目立っていた。ショウジョウバエの学習障害の基盤には投射ニューロン (projection neuron) の遺伝子発現異常が背景に有ることが示され、学習障害メカニズムとしても新規のものであることが明らかになった。いずれのモデルでも NR1 の低下が見られ、ショウジョウバエでは遺伝学的に NR1 低下を回復させると、学習障害はほぼ完全に正常化した。さらに HDAC 阻害剤を用いると、NR1 の発現回復と学習障害の改善がマウス・ショウジョウバエのいずれにおいても認められた (Ito et al., Hum Mol Genet 2009; Tamura et al., J Neurosci 2010)。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito, H., Yoshimura, N., Kurosawa, M., Ishii, S., Nukina, N., and Okazawa, H. (2009). Knock-down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse. *Hum Mol Genet.* 18, 4239-4254.

doi: 10.1093/hmg/ddp378

2. 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

3. 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

4. Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y. C., Sone, M., Miyashita, T., Saitoe, 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 12 編。

2. 学会発表

70 件。

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)

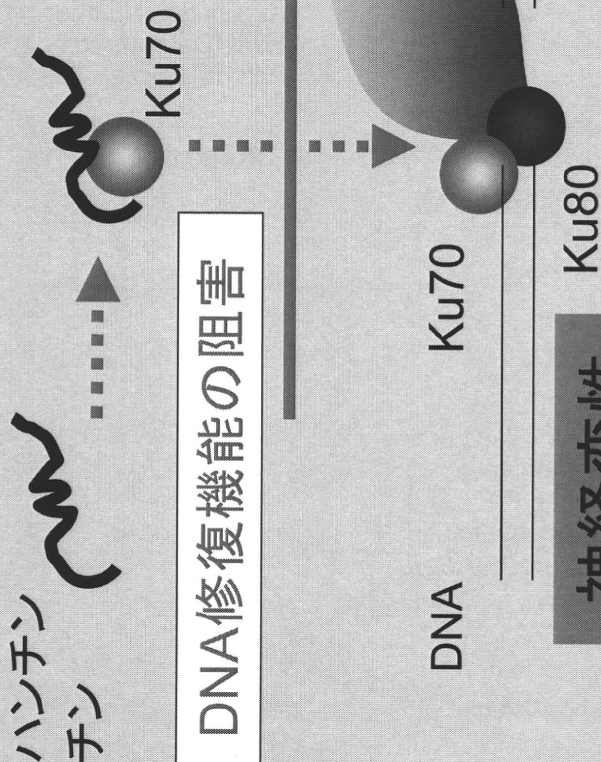
特許許可 (US Patent and Trade Office)
Prophylactic/Therapeutic Agent for Neurodegenerative Disease.
Inventor : Hitoshi Okazawa
Application: National Corporation Tokyo Medical and Dental University
Date : September 17, 2010
Application Number : 12/313,837
Issue Date: November 16, 2010
Patent Number: 7833975

F. 健康危険情報

なし。

ポリグルタミン病の核機能病態に基づく治療開発

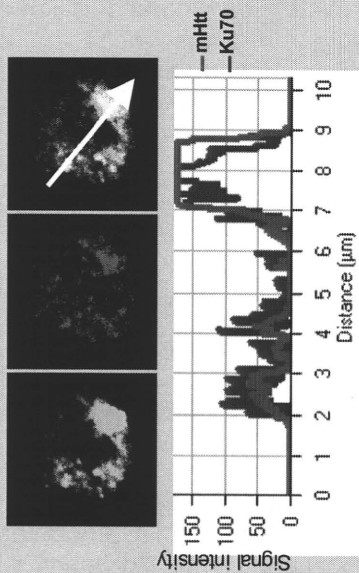
ハンチントン病タンパクとDNA修復タンパクとの核内部での結合



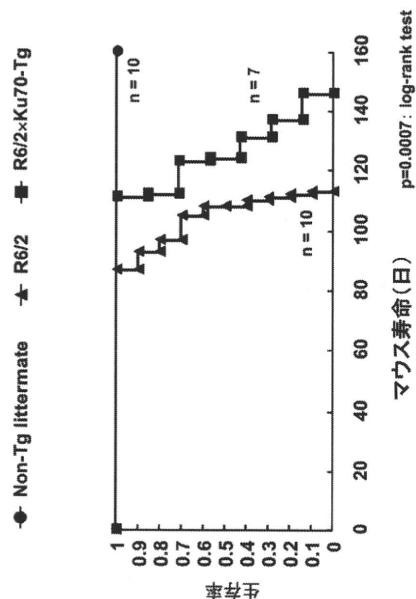
DNA修復機能の阻害

20-22年度

mHtt Ku70 Merge



寿命延長(過去最大の効果)



DNA修復タンパクの補充・機能回復

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

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

脊髄小脳変性症の病態解明と治療法開発に関する研究

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

脊髄小脳変性症は未だ根治的な治療法が開発されていない難病である。私たちは原因遺伝子産物の分解を促進する治療分子を、変性に陥っている小脳プルキンエ細胞に導入することで治療できる可能性があることをモデルマウスを用いた実験で示した(EMBO Rep 2008)。しかしこのとき用いたレンチウイルスベクターは挿入変異を起こす可能性があり、またモデルマウスも患者の病態を十分に反映しているものではなかった。本研究では、これらの点を解決し、根治に向けた脊髄小脳変性症の遺伝子治療法開発と検証を目的とした。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症(SCA)の治療法確立には、患者の病態をできるかぎり正確に反映する動物モデルが不可欠である。モデル動物を解析して病態を明らかにすることで、それに基づく治療法を考案することが可能となり、さらに考案した治療法の効果と副作用を検証することが可能となる。本研究では、レンチウイルスベクターを用いたSCAモデルマウスの作成とレンチウイルスベクターを用いた治療法の開発を目的とした。

B. 研究方法

モデルマウスの作成

1. マウス受精卵に変異したSCA原因遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを感染させることで、変異原因遺伝子をマウス染色体に組み込んだ。
2. 生後25日前後のマウス小脳に、レンチウイルスベクターを感染させてプルキンエ細胞にSCA原因遺伝子を発現させた。

モデルマウスの解析

作成したモデルマウスを形態的、生化学的、行動学的及び電気生理学的に解析した。

レンチウイルスベクターの改良

レンチウイルスベクターはプロウイルスをホストの染色体に組み込む性質(挿入変異)をもつ。これによりホストの重要な遺伝子を壊したり、がん化を誘発したりする可能性も否定できない。ホスト染色体への組み込みはウイルスのインテグレーションにより起こる。そこでインテグレーションに変異を導入し、染色体への組み込みが能力を著しく落としたベクター(Non-integrating vector: NIベクター)を作成した。そのベクターを用いてモデルマウスを遺伝子治療し、その効果を野生型ベクターを用いた場合と比較した。

遺伝子治療の効果検討

レンチウイルスベクターを用いて自然発生小脳失調マウスに治療用遺伝子を発現させて、運動失調が回復するかどうかをロータロッドを用いて経時的に観察した。

(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ールを工夫した。

C. 研究結果

モデルマウスの作成と解析

受精卵に PKC γ (S119P)-GFP 遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを感染させ、仮親に戻すことで SCA14 型のモデルマウスを作成した。得られたマウスを免疫組織学的に調べたところ、小脳プルキンエ細胞に PKC γ (S119P)-GFP を発現していることが確認された。しかし、1 年余り観察したが明らかな運動失調は見られていない。

レンチウイルスベクターを用いて成熟マウスの小脳に PKC γ (S119P)-GFP あるいは野生型 PKC γ -GFP 遺伝子を発現させた。3 週間後にロータロッドを行ったところ、PKC γ (S119P)-GFP を発現させたマウスにかぎって有意な成績の低下が認められた。そこで、個のマウスの解析を行った。

PKC γ (S119P)-GFP はプルキンエ細胞内で内在性の PKC とともに凝集体を形成しており、ドミナントネガティブに作用しているもとと考えられた。電気生理学的に解析したところ、代謝型グルタミン酸を介する TRPC3(陽イオンチャネル)の活性化が高進しており、平行線維-プルキンエ細胞シナプスの長期抑圧現象(LTD)も惹起されなかった。これらの結果も、変異型 PKC がドミナントネガティブ体として働いていると考えたと矛盾なく説明できる。

レンチウイルスベクターの改良

インテグラーゼ遺伝子に変異を導入して NI ベクターを作成した。NI ベクターが感染細胞の染色体にプロウイルスを組み込む確率は野生型ベクターのおよそ 100 分の 1 であった。次に治療用遺伝子(CRAG)を発現する NI ベクターを SCA モデルマウス(polyQ マウス)に注射し、運動失調の程度をロータロッドを用いて経時的に観察した。これまでに観察を行った 6 か月間では、野生型ベクターを用いた場合とロータロッドの成績には差が見られなかった。このことは、染色体にプロウイルスを組み込む能力が極めて低い、すなわち安全な NI ベクターを用いても、野生型ベクターと同程度の治療成績が得られる可能性があることを示している。

遺伝子治療の効果検討

$\delta 2$ 型グルタミン酸受容体($\delta 2$ 受容体)遺伝子に点変異があり、 $\delta 2$ 受容体タンパク質を欠損する運動失調マウス(生後 6 日)の小脳に、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。その結果、プルキンエ細胞樹状突起に $\delta 2$ 受容体が挿入され、運動失調の有意な回復がみられた。

SCA モデルマウスの遺伝子治療による運動失調改善効果については、現在、複数の治療用遺伝子の効果を比較しながら、解析を行っている。

D. 研究発表

1. 論文発表

Iizuka A et al.: 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 et al.: 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 et al.: High transgene expression by lentiviral vectors causes maldevelopment of Purkinje cells in vivo. *Cerebellum* 9(3):291-302. 2010.

2. 学会発表

堀内始、寅嶋崇、高山清彦、飯塚朗、三ツ村一浩、飯野昌枝、小山知穂、平井宏和. レンチウイルスベクターを用いたマウス小脳核神経細胞への遺伝子導入. 第 31 回日本神経科学大会, 東京, 2008 年 7 月 9 日

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

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).