

図1. 特徴的な広汎な褐色顆粒の出現。小脳プルキンエ細胞層に多数の粗大な褐色顆粒を認める (A. HE染色), 褐色顆粒は嗜銀性で (B. Masson-Fontana 銀染色), 自家蛍光を示し (C. 蛍光顕微鏡), PAS陽性である (D. PAS染色)。

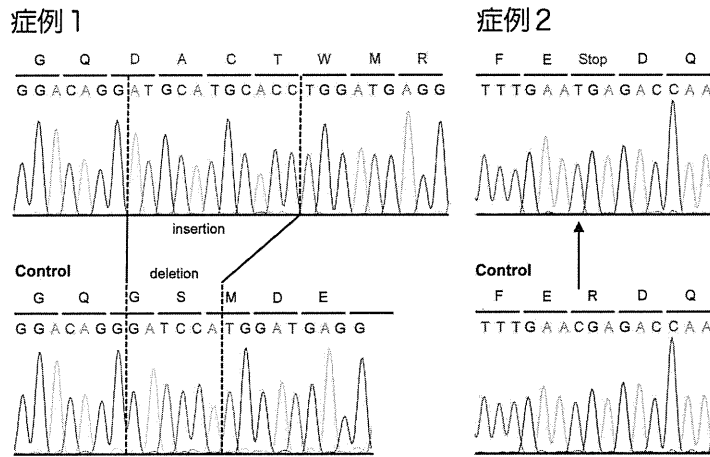


図2. *SCARB2*遺伝子の遺伝子解析結果。症例1において新規フレームシフト変異 (c.1385_1390del6insATGCATGCACC) をホモ接合性に, 症例2において新規ナンセンス変異 (c.361C>T, p.R121X) をホモ接合性に認めた。

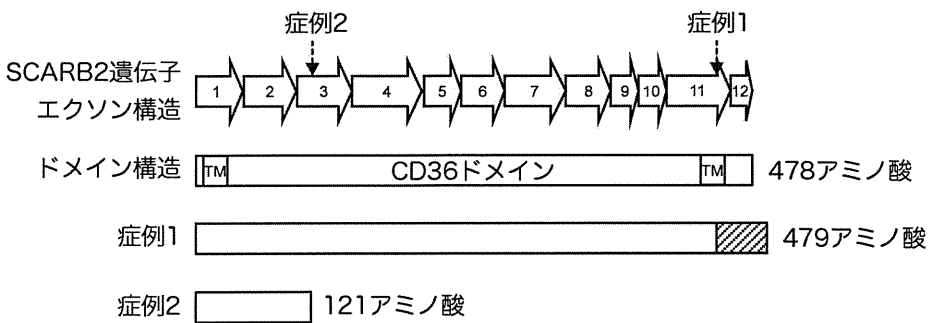


図3. *SCARB2*のエクソン構造と蛋白ドメイン構造。症例1はエクソン11にフレームシフト変異を, 症例2はエクソン3にナンセンス変異を各々認めた。

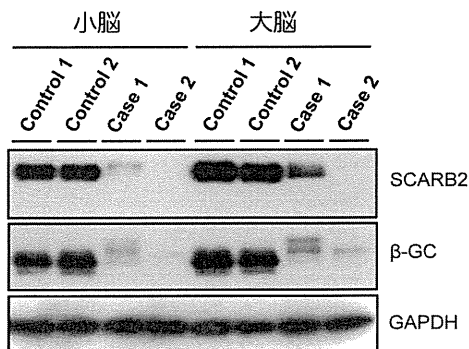


図4. 脳組織における *SCARB2* および β -GC の蛋白発現。症例1で *SCARB2* 蛋白の中等度の減少, 症例2で高度の減少を認める。 *SCARB2* 蛋白量に一致して, β -glucocerebrosidase (β -GC) 蛋白量は症例1で中等度に, 症例2で高度に減少している。さらに, 両症例で β -GC 糖鎖修飾の異常を反映し, β -GC のバンドの出現様式に違いがみられる。

カロリー制限によりプロテオスターシスが改善し、 ポリグルタミン病モデルの神経変性は抑制される

研究分担者 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）
共同研究者 鈴木 マリ、藤掛 伸宏、和田 圭司（同上）

研究要旨

アルツハイマー病（AD）、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・凝集がかかわる共通の発症分子メカニズムが示唆されているが、患者の大部分を占める孤発性疾患で野生型蛋白質がミスフォールディングを生じる遺伝・環境要因は未解明である。近年、糖尿病などの栄養・エネルギー代謝異常が AD 発症の重要な環境要因であることが示され、一方でカロリー制限により寿命が延長することが様々な生物種において明らかにされた。以上のことから、私たちはカロリー制限により神経変性を予防できる可能性を考え、ショウジョウバエモデルを用いて本仮説を検証し、その分子メカニズムを検討した。その結果、カロリー制限により PolyQ 病や AD モデルショウジョウバエの運動障害、寿命短縮、複眼変性が抑制されることを明らかにした。この時、PolyQ 蛋白質の封入体形成も抑制された。このカロリー制限による変性抑制効果は、insulin receptor substrate（IRS）遺伝子の変異により消失した。以上の結果から、カロリー制限はインスリンシグナルを介してプロテオスターシスを改善し、神経変性を抑制すると考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病（AD）、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、蛋白質のミスフォールディング・凝集がかかわる共通の発症分子メカニズムが考えられている。一部の遺伝性神経変性疾患では変異蛋白質が原因となるが、患者の大部分を占める孤発性神経変性疾患では、野生型蛋白質が何らかの遺伝・環境要因によりミスフォールディングを生じて脳神経細胞内に凝集・蓄積すると考えられる。し

たがって、蛋白質のミスフォールディング・凝集を誘発する遺伝要因のみならず、環境要因の特定とその分子メカニズムの解明が神経変性疾患の予防法および治療法確立へ向けて必須であると考えられる。

近年の疫学調査から、糖尿病が AD の発症リスクとなること（Ott et al. Neurology 1999、Matsuzaki et al. Neurology 2010）や、コレステロール降下薬が AD 予防に有効であること（Wolozin et al. Arch Neurol 2000）が明らかにされ、栄養・エネルギー代謝異常が神経変

性発症の環境要因として重要である可能性が示唆された。一方、カロリー制限により様々な生物種において寿命が延長し、注目すべきことに、老化関連疾患や脳萎縮が抑制されることが明らかにされている (Kenyon et al. Nature 1993, Colman et al. Science 2009)。

以上のことから、私たちはカロリー制限により脳老化が抑制され神経変性疾患を予防できる可能性を考え、老化・寿命研究のモデル生物として実績があり様々な神経変性疾患モデルが樹立されているショウジョウバエを用いて、食環境が神経変性に及ぼす影響とその分子メカニズムを検討した。

B&C&D. 研究方法・結果および考察

①カロリー制限により PolyQ 病/AD モデルショウジョウバエの運動障害、寿命短縮は改善する

MJDtr-Q78 蛋白質を神経系に発現する PolyQ 病モデルあるいは Arctic 変異型 (Glu22Gly)A β 1-42 ペプチドを神経系に発現する AD モデル、および野生型ショウジョウバエについて、高栄養餌 (20% sucrose, 20% yeast) もしくは低栄養餌 (5% sucrose, 5% yeast extract) 条件にて飼育したところ、PolyQ 病、AD モデルの運動障害、寿命短縮が低栄養餌によりいずれも有意に改善した。この時、野生型ショウジョウバエの寿命も低栄養餌により有意に延長した。以上のことから、カロリー制限により PolyQ 病、AD モデルショウジョウバエの運動障害、寿命短縮は改善すると結論した。

②カロリー制限により PolyQ 病/AD モデ

ルショウジョウバエの複眼変性は改善する

MJDtr-Q78 あるいは Arctic 変異型 A β 1-42 を複眼に発現する PolyQ 病モデル、AD モデルショウジョウバエを高栄養餌もしくは低栄養餌条件にて飼育したところ、PolyQ 病、AD モデルの複眼変性が低栄養餌によりいずれも有意に改善した。一方、アポトーシス誘導蛋白質 Grim の発現による複眼変性は栄養条件の影響を受けなかった。以上のことから、カロリー制限による複眼変性改善効果はミスフォールド蛋白質による変性に特異的であると考えられた。

③カロリー制限により PolyQ 蛋白質の封入体形成は抑制される

MJDtr-Q78 を複眼に発現する PolyQ 病モデルショウジョウバエを高栄養餌もしくは低栄養餌条件にて飼育し、3 齢幼虫の複眼原基の免疫染色を行なった。その結果、MJDtr-Q78 蛋白質の封入体が低栄養餌により有意に減少していた。一方、可溶性分画を用いてウェスタンブロットを行なったところ、MJDtr-Q78 蛋白質の発現量は栄養条件により大きな影響を受けなかった。以上のことから、カロリー制限によりプロテオスターシス (蛋白質恒常性) が改善し、PolyQ 蛋白質のミスフォールディング・凝集が軽減したことが示唆された。

④カロリー制限による PolyQ 病/AD モデルショウジョウバエの複眼変性改善効果はインスリンシグナルを介する

PolyQ 病モデル、AD モデルショウジョウバエのカロリー制限による神経変性改善効果の分子メカニズムを解明するため

に、寿命関連遺伝子の影響を検討した。その結果、PolyQ 病モデル、AD モデルショウジョウバエの複眼変性は哺乳類 insulin receptor substrate (IRS) のホモログである chico 遺伝子の変異により低栄養餌と同様に抑制され、カロリー制限による複眼変性改善効果が消失することが明らかになった。以上のことから、カロリー制限による PolyQ 病、AD モデルショウジョウバエの複眼変性改善効果はインスリンシグナルを介すると考えられた。

(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。

E. 結論

本研究の結果から、カロリー制限はインスリンシグナルを介してプロテオスタシスを改善し、PolyQ 病および AD モデルショウジョウバエの神経変性を抑制すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Popiel H.A, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Ito C, Yamane H, Muramatsu S, Toda T, Wada K, *Nagai Y: Hsp40 exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. PLoS One, 2012; 7(11): e51069

- 2) Suzuki M, Nagai Y, Wada K, Koike T: Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. Biochem Biophys Res Commun, 2012; 429(1-2): 18-23
- 3) Sasayama H, Shimamura M, Tokuda T, Azuma Y, Yoshida T, Mizuno T, Nakagawa M, Fujikake N, Nagai Y, Yamaguchi M: Knockdown of the *Drosophila* Fused in Sarcoma (FUS) homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches. PLoS One, 2012; 7(6): e39483
- 4) 永井義隆: 神経変性疾患病態研究のキーワード. 臨床神経学, 2012; 52 (11): 874-876
- 5) 藤掛伸宏、長野清一、永井義隆: ショウジョウバエなど小動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル. 神経内科, 2012; 76 (3): 266-274

2. 学会発表

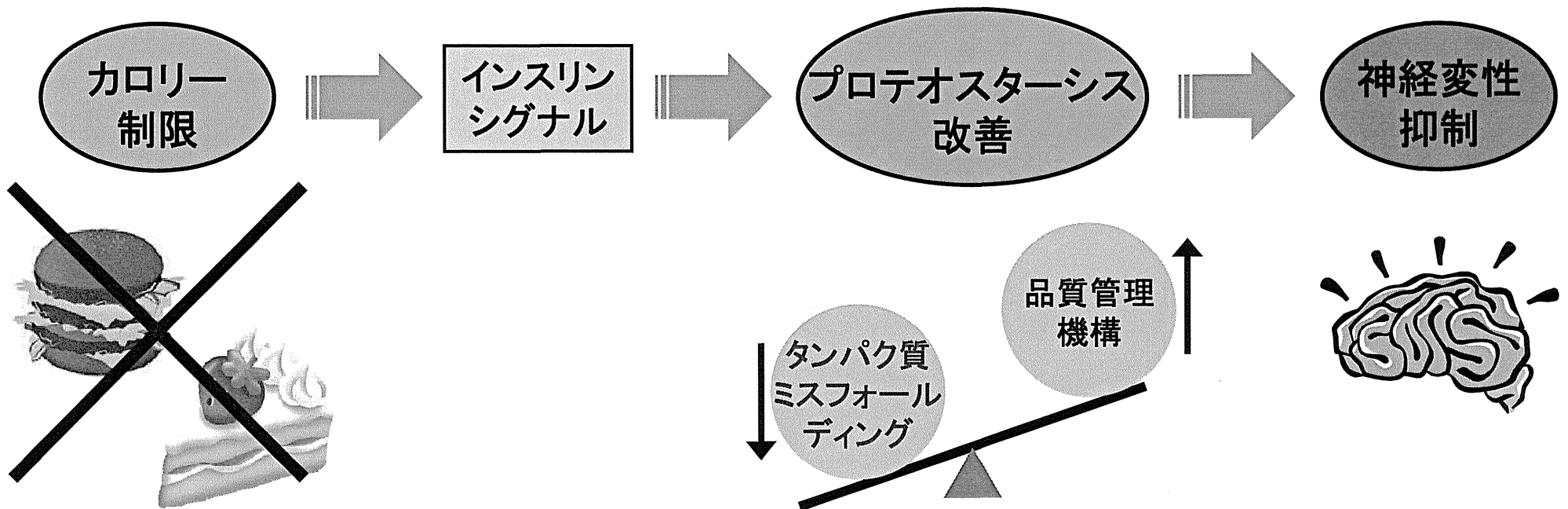
- 1) Nagai Y: Toxic protein conformational transition and amyloid fibril formation in the polyglutamine diseases. International Symposium on Amyloidosis, 2013.1.24, Tokyo, Japan
- 2) Nagai Y: Molecular targeted therapy against the toxic protein conformation and aggregation for the polyglutamine neurodegenerative disorders. Max

- Planck Institute & National Center of Neurology and Psychiatry Joint Symposium, 2012.10.3-6, Munich, Germany
- 3) Nagai Y, Takeuchi T, Popiel H. A, Wada K: Non-cell autonomous therapeutic effects of Hsp40 on polyglutamine disease models via its exosome-mediated secretion. 2nd International Conference of Neural Cell Culture, 2012.6.16, Tokyo
 - 4) 永井義隆: 微小管依存的輸送の障害により TDP-43 の細胞質蓄積が促進され、ALS モデルショウジョウバエの神経変性を増悪する. 第 35 回 日本神経科学学会, 2012 年 9 月 18 日~21 日, 名古屋
 - 5) 永井義隆: 神経変性疾患病態研究のキーワード. 第 53 回 日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 22 日~25 日, 東京
 - 6) Hatanaka Y, Wada K, Nagai Y: Increased dendritic spine dynamics is an early feature in a SCA1 model mouse. 2012 CSH Asia meeting: Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders, 2012.11.5-9, Suzhou, China
 - 7) Suzuki M, Fujikake N, Wada K, Nagai Y: Aggravation of neurodegeneration by high-nutrient diet in *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. Keystone Symposia on Aging and Diseases of Aging, 2012.10.22-27, Tokyo, Japan
 - 8) Takeuchi T, Fujikake N, Wada K, Nagai Y: Exosome-mediated cell-to-cell transmission of heat shock proteins contributes to the maintenance of protein homeostasis. EMBO Symposium on Quality Control, 2012.9.19-22, Heidelberg, Germany
 - 9) 藤掛伸宏、他: 微小管依存的輸送の障害は TDP-43 の細胞質蓄積、オリゴマー形成を促進し、ALS における神経変性を惹き起こす. 第 35 回日本神経科学学会, 2012 年 9 月 18 日~21 日, 名古屋
 - 10) 鈴木マリ、他: パーキンソン病モデルショウジョウバエにおける α -synuclein 毒性は glucocerebrosidase の機能喪失により増悪する. 第 35 回 日本神経科学学会, 2012 年 9 月 18 日~21 日, 名古屋
 - 11) 古田晶子、他: SCA1 モデルマウスにおけるプルキンエ細胞の樹状突起の初期変化とアストロサイト病変の検討. 第 53 回 日本神経病理学会総会, 2012 年 6 月 28 日~30 日, 新潟
 - 12) 斉藤勇二、他: ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの病態において p62 は保護的に機能している. 第 53 回 日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 22 日~25 日, 東京
 - 13) 藤掛伸宏、他: TDP-43 と FUS はショウジョウバエモデルにおいて相乗的に神経変性を惹き起こす. 第 53 回 日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 22 日~25 日, 東京
 - 14) 石黒太郎、他: SCA6 トランスジェニックショウジョウバエによる Cav2.1 の CTF 毒性の検証. 第 53 回 日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 22 日~25 日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

カロリー制限によりプロテオスターシスが改善し、 ポリグルタミン病モデルの神経変性は抑制される



異常タンパク質蓄積をオートファジーによって制御するための標的探索

研究分担者 貫名 信行

(順天堂大学大学院医学研究科 神経変性疾患病態治療探索講座、
理化学研究所構造神経病理研究チーム)

共同研究者 黒澤 大、松本 弦 (理化学研究所構造神経病理研究チーム)

研究要旨

ポリグルタミン病の病態制御には異常伸長ポリグルタミン産物の量を減少させることが必要である。そのために我々は分解系に注目し、選択的オートファジーを亢進することにより、異常ポリグルタミンの分解を促進できないかと考えている。我々は昨年度選択的オートファジーの制御因子として p62 の S403 のリン酸化を報告した。本年度は S403 リン酸化 p62 特異抗体 (pS403) を用い、ヒト神経変性疾患の封入体の染色性について検討した。アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS 等の封入体の染色性はユビキチン > p62 > pS403 の順であった。Atg5 ノックアウトマウスの脳の検討から、pS403 の染色性は死後変化の影響が著明であることがわかった。また Atg5 ノックアウトの背景でハンチントン病モデルマウス R6/2 への影響を検討したところ、細胞質封入体の増加が認められた。

A. 研究目的

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、p62 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い、昨年 p62 S403 のリン酸化が選択的オートファジーを促進することを報告した (Matsumoto et al Mol Cell 2011)。本年度は本研究で作製したモノクローナル S403 リン酸化 p62 抗体を用いた様々な封入体形成老化関連神経変性疾患の染色結果とその問題点を

明らかにした。またオートファジー阻害のポリグルタミン病への影響をマウスモデルによって検討した。

B. 研究方法

1) モノクローナル S403 リン酸化 p62 抗体、抗 p62 抗体、抗ユビキチン抗体を用いて老化関連神経変性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病脳、ALS など) の剖検脳 (パラフィン包埋切片) を染色した。
2) Atg5 ノックアウトマウス脳を死後室温に置き、その後パラフォルムアルデヒド固定、パラフィン包埋後、上記抗体の染色性を検討した。

3) Atg5 ノックアウトの背景でハンチントン病モデルマウス R6/2 への影響がどうなるかをそれぞれのマウスを掛け合わせて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組み換えに該当する。独立行政法人理化学研究所の遺伝子組み換え実験計画の承認を受けた。

C. 研究結果

1) アルツハイマー病では神経原線維変化が、パーキンソン病ではレビー小体の封入体が、ユビキチン染色>p62 染色>pS403 染色の順の染色性で染色された。pS403 抗体の染色性はばらつきが大きかった。

2) 上記の結果から、リン酸化部位はタンパク質によっては死後急速に脱リン酸化することが報告されているので死後変化の検討しやすい、p62 の集積が確認されている Atg5 ノックアウトマウスの染色性を、死後時間を追って上記抗体で検討した。灌流固定に比べ、死後直後に固定液にいれても変化は著明であり、pS403 による染色は減少しており、急速に脱リン酸化されることが示唆された。

3) ALS では pS403 によって thread 様、顆粒状の染色が認められ、顆粒状の染色については LC3 によっても染色されるため、autophagosome と思われた。このような染色性の顆粒は Ad, Pick 等でも認められた。

3) Atg5 を背景とした R6/2 の病理は、細胞質封入体の増加を認め、核内封入体の減少していた。

D. 考察

各種神経変性疾患のユビキチン化されており、またこれが p62 に対する抗体で染色されることも報告されているが、今回の検討では p62 の染色はユビキチン染色によって同定される封入体の一部であった。P62 はそのユビキチン結合ドメインによってユビキチン化タンパク質と結合しているため、封入体においてはユビキチン、p62 の比は 1 : 1 ではないため、感度的にも p62 の検出が落ちていると考えられる。一方 pS403 の染色に関しては Atg5 ノックアウトマウスの検討においても死後時間の変化が著明であることから、生体内ではリン酸化、脱リン酸化が平衡していると想定されていたが、死後は脱リン酸化が有意となってしまうものと考えられた。Oka T (PLoS One2011) らによるリン酸化プロテオーム解析においても、タンパク質の種類によって、死後変化は様々であり、組織におけるリン酸化状態の解析は慎重に行う必要がある。このような封入体以外に pS403 と LC3 に対する抗体で染まる顆粒が ALS, AD, Pick で認められた。これらは autophagosome と思われ、膜に覆われているため、死後変化が少なかったと想定される。

オートファジーを阻害した状態 (Atg5 ノックアウト) でポリグルタミン凝集に対する影響を解析したが、細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少した。オートファジーは細胞質における異常タンパク質のクリアランスに関わっているため、オートファジーの阻害が細胞質封入体の増加を来たしたものを考えられる。またそのために核内移行するポリグルタミン

が少なくなり、核内封入体が減少したものと考えられた。

E. 結論

リン酸化タンパク質の抗リン酸化部位特異的抗体による染色はタンパク質の種類にもよると思われるが、p62S403のように染色性が死後変化の影響を受けやすいものがあり、解析に注意を要する。オートファジーが阻害されると伸長ポリグルタミンによる細胞質封入体の増加を認める。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nguyen H.M, Miyazaki H, Hoshi N, Smith B.J, Nukina N, Goldin A.L & Chandy K.G: Modulation of voltage-gated K⁺ channels by the sodium channel beta1 subunit. Proc Natl Acad Sci USA, 2012; 109: 18577-82
- 2) Bauer P.O, Hudec R, Goswami A, Kurosawa M, Matsumoto G, Mikoshiba K & Nukina N: ROCK-phosphorylated vimentin modifies mutant huntingtin aggregation via sequestration of IRBIT. Mol Neurodegener, 2012; 7: 43
- 3) Mitomi Y, Nomura T, Kurosawa M, Nukina N & Furukawa Y: Post-aggregation oxidation of mutant huntingtin controls the

interactions between aggregates. J Biol Chem, 2012; 287: 34764-75

2. 学会発表

- 1) Nukina N: Autophagic machinery for degrading the misfolded proteins. in The 6th International Symposium of Autophagy 2012, 2012.10.28-11.1, Nago, Japan
- 2) Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Koike M, Uchiyama Y, Maity S & Nukina N: Role of NF-Y transcription factor in neuronal cell maintenance and chaperone gene expression. in EMBO | EMBL Symposia 2012: Quality Control - From Molecules to Organelles, 2012.9.19-22, Heiderberg, Germany

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

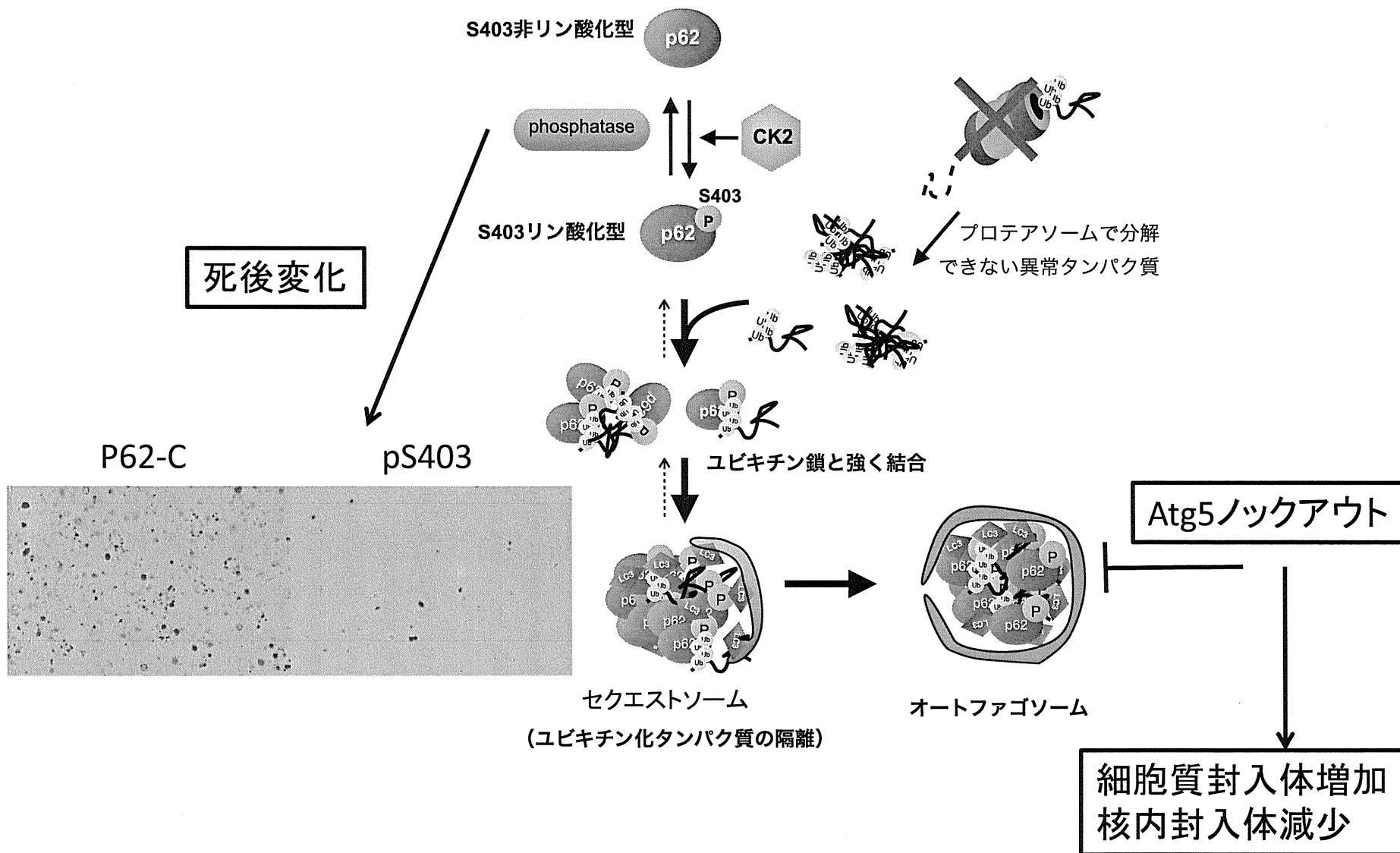
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

オートファジー制御と凝集体



遺伝性脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスにおける末梢神経障害

研究分担者 中村 和裕 （群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野）
共同研究者 平井 宏和 （群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野）

研究要旨

遺伝性脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウス中枢神経においては、小脳プルキンエ細胞の樹状突起発達、協調運動に異常が報告されている。一方、遺伝性脊髄小脳変性症 1 型患者では末梢神経機能の異常も報告されているにもかかわらず、ノックインマウスの末梢神経機能は解析されていない。本研究では、遺伝性脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスの末梢神経機能を解析することを目的とした。

老齢遺伝性脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスの脊髄前角細胞の密度には大きな違いはなかったが、前角運動神経核内にポリグルタミン凝集体を認めた。また、前根神経線維に脱髄が見られ、電気生理学的に、腰髄刺激時の下肢筋肉収縮の振幅が小さく、収縮開始時間遅延および収縮持続時間延長が認められた。行動解析では立ち上がり回数と時間が減少していた。

したがって、中枢のみならず末梢神経においても、ノックインマウスは遺伝性脊髄小脳変性症 1 型患者の病態を反映するモデルマウスであるといえる。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症（Spinocerebellar ataxia: SCA）は根治療法がない難病であり、現在日本には約 2 万人の登録患者がいる。そのうち約 3 割が遺伝性である。遺伝性脊髄小脳変性症 1 型（SCA1）は常染色体優性遺伝性疾患で原因蛋白は異常伸長ポリグルタミン鎖を持つアタキシン 1 である。四肢運動失調、構音障害、筆記障害のみならず、痴呆、錘体路兆候など、多彩な症状、兆候を示す。実際に SCA1 患者脳の広範な領域にわたって神経細胞の変性が認められる。

脊髄小脳変性症 1 型に対する遺伝子お

よび幹細胞治療研究を行うにあたってそのモデルマウスは有用な実験材料である。複数の脊髄小脳変性症 1 型モデルマウスの中で、脳部位特異的に異常伸長ポリグルタミン鎖を持つアタキシン 1 を発現するトランスジェニックマウスと違い、ノックインマウスの遺伝子異常は脊髄小脳変性症 1 型患者の遺伝子異常を反映し、それ故に異常アタキシン 1 の発現領域は内因性のアタキシン 1 蛋白の発現と同一である。したがって、我々はノックインマウスに注目した。

ノックインマウスの脳の形態、機能に関しては解析がなされており、神経変性、

電気生理学的異常、運動機能異常が報告されている。一方、脊髄小脳変性症 1 型患者では末梢神経機能の異常も報告されているが、ノックインマウスの末梢神経機能は解析されていない。本研究では、脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスの末梢神経機能を解析することを目的とした。

B. 研究方法

今回、25 週齢以上の老齢脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスおよびコントロールマウスを研究に使用した。

腰髄神経細胞の細胞体および軸索の形態、髄鞘形成、凝集体形成を Klüver-Barrera 染色および免疫染色により評価した。免疫染色の際使用した抗体は MAP2, choline acetyltransferase, polyglutamine, myelin basic protein に対する抗体である。運動神経伝達速度は MEB9404 Neuropack S1 により腰髄を刺激し、マウス大腿部の筋肉に記録電極を設置することにより計測した。行動解析ではオープンフィールドテストにより立ち上がり運動を解析した。

C. 研究結果

老齢脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスの下部腰髄は全体的に軽度委縮が見られた。脊髄前角細胞の数には大きな違いはなかったが、前角運動神経細胞の核内にポリグルタミン凝集体を認めた。その運動神経の軸索の径には大小不同が見られ、径の小さいものが多数認められた。また、前根において運動神経軸索に脱髄が見られた。電気生理学的に、腰髄刺激

時の下肢筋肉収縮の振幅が小さく、収縮開始時間遅延および収縮持続時間延長が認められた。行動解析では立ち上がり回数と時間が減少していた。

D. 考察

脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスにおいて神経伝達速度の低下が観察されたが、(1) 神経線維の径が小さい事および (2) 脱髄により跳躍伝導が行われないう事、これら 2 点の原因として考えられる。前角運動神経の核内にポリグルタミン凝集体が認められたことより、運動神経の変性の結果としてその軸索の径が小さくなっているものと思われる。脱髄については、運動神経軸索の変性に引き続いて二次的に髄鞘が破壊されたという仮説が一つの可能性として上げられる。

脊髄小脳変性症 1 型患者では、脊髄において広範な脱髄が報告されている。また、末梢神経の電気生理学的な異常も報告されている。したがって、ノックインマウスは脊髄小脳変性症 1 型患者の末梢神経異常を反映するマウスであるといえる。

ノックインマウスの中枢神経機能については既に病態のメカニズムが詳細に解析されている。末梢神経異常についても中枢と同様な病態メカニズムであるのか、あるいは末梢神経特異的なメカニズムが存在するのかについて調べる事が今後の課題である。

E. 結論

脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスで末梢神経機能異常が認められた。

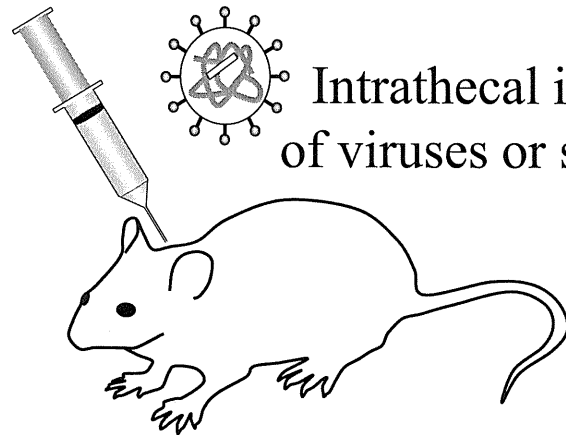
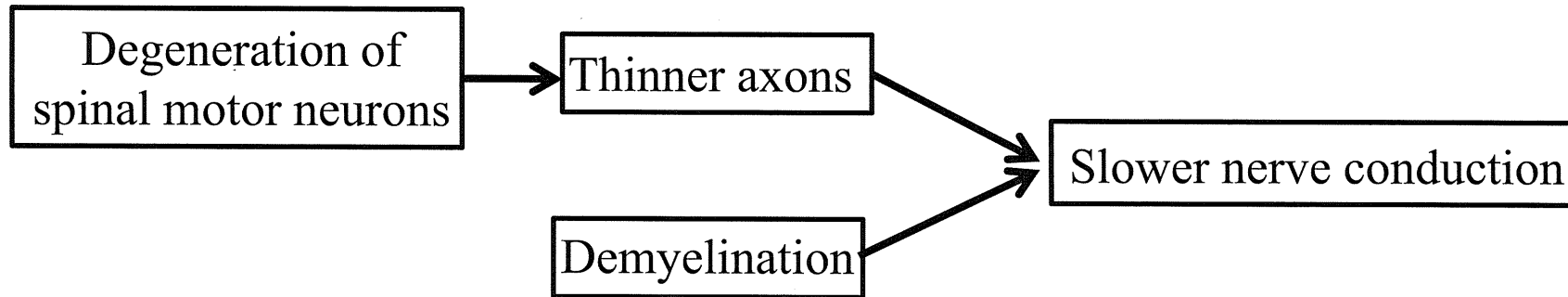
したがって、脊髄小脳変性症1型に対する治療実験の末梢神経に対する効果を調べるための実験動物としてノックインマウスは有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takechi Y, Mieda T, Iizuka A, Toya S, Suto N, Takagishi K, Nakazato Y, Nakamura K and Hirai H: Impairment of spinal motor neurons in spinocerebellar ataxia type 1-knock-in mice. *Neurosci Lett*, 2013; 535: 67-72

SCA1-KI is a useful model mouse to test recovery of peripheral nervous system



Intrathecal injection
of viruses or stem cells

SCA1-KI mouse

Histology

Compound Muscle Action Potential
Behavior

『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

研究分担者 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）
共同研究者 田川一彦 （東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野）
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）
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

私たちは脊髄小脳変性症 1 型の病態機序について、核可溶性タンパクの網羅的プロテオームを行って異常 Ataxin-1 タンパクを発現する小脳神経細胞では正常 Ataxin-1 タンパクを発現するそれに比較して HMGB1 が減少することを以前に報告した。治療的観点からは、HMGB1 を脊髄小脳変性症 1 型モデルショウジョウバエに過剰発現することで、視神経細胞変性の抑制が観察された。これを受けて本研究ではマウスレベルの治療実験を試みた。まず、8 2 CAG リピートを含む Ataxin-1 のノックインマウス (KI マウス) と HMGB1 トランスジェニックマウス (HMGB1 マウス) を交配し、運動機能、寿命、病理の改善を確認した。次に、アデノ随伴ウイルスを KI マウス後頭蓋窩に注入して HMGB1 を小脳に発現させた。これにより、明らかな運動機能および病理像の改善を認めた。

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る。また、SCA1, 2, 7, 17 などの原因タンパク質は正常な機能として転写、スプライシングなどの核機能に関与することが知られている。私たちは、疾患タンパクを発現する神経細胞のプロテオームあるいはインタラクトームの解析から、疾患タンパクの病態上のターゲット分子として HMGB および Ku70 を発見し、これら分子の機能障害を介した DNA 損傷修復不全がポリグルタミン病の主要病態である可能性を示してきた。したがって、HMGB あるいは Ku70 の機能補充によって病態を改善できる可能性

があり、本研究班においても病態関連分子を用いて核機能病態を改善させて治療に結びつけることを目指している。Ku70 のハンチントン病に対する効果については、先にモデルマウス R6/2 に対する Ku70 のトランスジーンレベルでの効果 (Enokido et al., JCB 2010)、およびモデルショウジョウバエに対する効果 (Tamura et al., PLoS ONE 2011) を報告して来た。また、HMGB の SCA1 モデルショウジョウバエおよびハンチントン病モデルショウジョウバエに対するトランスジーンレベル効果も先に報告した (Qi et al., Nature Cell Biol 2007)。これらの治療効果については既に国際特許・国内

特許も取得済みであるが、今回はさらにヒト応用の可能性を増すことを目的に、HMGB を用いた SCA1 モデルマウスに対する治療を試みた。

B. 研究方法

neuron-specific enolase (NSE) エンハンサー／プロモーター の下流にラット *hmgb1* 遺伝子を組み込んだプラスミド (pIRES-hrGFP) を C57BL6 由来の ES 細胞にトランスフェクションし恒常発現株を得た後に、これを受精卵に注入したのち子宮移植してキメラマウスを得た。さらにこれを交配して F3 を得て、ラット *hmgb1* トランスジーン の発現をタンパクレベルで確認した後に、SCA1 モデルマウス (Atxn1-154Q KI マウス) と交配してダブルトランスジェニックマウスを得た。一方、AAV1 ベクターは自治医大・村松教授より供与押されたプラスミド (pAAV-1) にラット *hmgb1* 遺伝子を組み込みウィルス化した。

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

Hmgb1 トランスジェニックマウス (HMGB1 マウス) において *hmgb1* タグ付きタンパクの発現を免疫組織学的およびウェスタンブロットで確認した。ウェスタンブロットでは、外来遺伝子由来の発現は内在性の数 10% に過ぎなかったが、NSE エンハンサー／プロモーターによって神経細胞特異的発現が保たれているので、神経細胞ではおそらくこの数倍から

10 倍程度の発現量があるものと考えられる。小脳プルキンエ細胞に於いても明確な発現が認められた。

次に HMGB1 マウスを KI マウスに交配してダブルトランスジェニックマウスを得た。HMGB1 マウス、KI マウス、ダブルトランスジェニックマウスについて、行動解析、病理学的解析、生化学的解析を行った。ロタロッド解析では、KI マウスに対してダブルトランスジェニックマウスに発症時 (9 週齢) から 21 週齢まで有意な運動機能改善を認めた。一方、平均および最長寿命については、KI マウス (平均 224 日齢、最長 274 日齢) に対してダブルトランスジェニックマウス (平均 278 日齢、最長 360 日齢) であり、log-rank テストで顕著かつ有意な改善を確認した。

また、病理像では発症初期の KI マウスにおける分子層の菲薄化が改善し、DNA 損傷マーカー H2AX, 53BP1 シグナルおよびフォーカス形成も明瞭に改善した。これらの所見は、ウェスタンブロットでも確認された。

一方、遺伝子治療を目指した実験も行った。標的となる神経細胞に遺伝子導入を効率よく行うために、小脳プルキンエ細胞、線条体神経細胞に特異的発現を示す遺伝子のエンハンサー／プロモーターをクローニングし、下流に Ku70, HMGB などを組み込んだレンチウイルスベクターを作製して、発現量と特異性を *in vivo* で確認することを行った。しかし、レンチウイルスベクターによる遺伝子発現量は十分でなく、さらにレンチウイルスベクターでのエンハンサー／プロモーターの変更を行ったが、やはり十分な発現を

標的神経細胞に示すことはできなかった。

そこでアデノ随伴ウイルス(AAV1)への切り替えを行い、HMGB および Ku70 の AAV ベクターも併せて作成しマウス脳内投与による治療実験を開始した。この結果、プルキンエ細胞に強い発現をしめす HMGB1-AAV1 を作成することに成功し、さらに、プルキンエ細胞の DNA 損傷軽減およびロタロッド試験での運動機能改善を示すことが出来た。これらの治療効果は、併せて行って来た HMBG1-Tg マウスと Ataxin-1-KI マウスの成果とも良く対応しており、極めて信頼性の高い結果と考えられる。

(参考文献)

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ress M, Gorba C, Gorba C, de Chiara C, Bui T.T.T, Garcia-Maya M, Drake A.F, Okazawa H, Pastre A, Svergun D and Chen Y.W: The solution model of the intrinsically disordered polyglutamine tract binding protein-1 (PQBP-1). *Biophys J*, 2012; 102:1608 - 1616. doi: 10.1016/j.bpj.2012.02.047
- 2) Tamura T, Sone M, Nakamura Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S and Okazawa H: A restricted level of PQBP1 is needed for the best longevity of *Drosophila*. *Neurobiology of Aging*, 2013 Jan; 34(1): 356.e11-20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.

015

2. 学会発表

[国際学会]

- 1) Okazawa H: Pathomechanisms of PQBP1 in neurons and neural stem cells causing learning defect and microcephaly. The 2nd Japan-Korea Neural Tissue culture seminar, 2012.6.16, Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, Tokyo
- 2) Ito H, Kurosu K, Okazawa H: HMGB1 as a therapeutic molecule candidate for spinocerebellar ataxia typel. The 2nd Japan-Korea Neural Tissue culture seminar, 2012.6.16, Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, Tokyo
- 3) Okazawa H: Pathomechanisms of Intellectual Disabilities linked to a new RNA splicing protein, PQBP1, Tokyo Medical and Dental University International Summer Program 2012, 2012.8.27-29, Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, Tokyo
- 4) Okazawa H: Pathomechanisms of Intellectual Disability (ID) linked to a new RNA splicing protein, PQBP1” Cell Symposia Functional RNAs, 2012.12.2-4, Hotel Melia, Sitges, Spain

[国内学会]

- 1) 田村 拓也、曾根 雅紀、岩坪 威、田川 一彦、Erich Wanker、岡澤 均：DNA 修復タンパク質・Ku70 はハンチントン病の神経変性を抑制する。第 53 回日本神経学会学術大会，2012 年 5 月 25 日，東京国際フォーラム，東京
- 2) 田村 拓也：SCA1 病態における DNA 損傷修復異常。第五回分子高次機能研究会，2012 年 8 月 27 日～29 日，KKR ホテルびわこ，滋賀
- 3) Sam S. Barclay、田村 拓也、伊藤 日加瑠、島村 徹平、勝田 明寿香、曾根 雅紀、塩飽 裕紀、田川 一彦、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均：脊髄小脳変性症 1 型における DNA 損傷修復遺伝子の効果：in vivo スクリーニング。第 351 回日本神経科学大会，2012 年 9 月 182 日～21 日，名古屋国際会議場，名古屋3。
- 4) 田村拓也、中村蓉子、塩飽裕紀、岡澤 均：PQBP1 遺伝子発現量と症状の相関関係。第 31 回日本認知症学会学術集会，2012 年 10 月 26 日～28 日，つくば国際会議場，筑波
- 5) 伊藤 日加瑠、黒巢佳祐、岡澤 均：脊髄小脳変性症 1 型 (SCA1) の治療候補分子 HMGB1。第 35 会日本分子生物学会年会，2012 年 12 月 11 日～14 日，福岡国際会議場マリンメッセ福岡，福岡
- 6) 田村拓也、曾根 雅紀、中村 蓉子、島村 徹平、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均：発現量依存的に寿命をコントロールする遺伝子、PQBP1。第 35 回分子生物学会年会，2012 年 12 月 11 日～14 日，福岡国際会議場マリンメッセ福岡，福岡
- 7) 田村拓也、曾根 雅紀、中村 蓉子、島村 徹平、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均：発現量依存的に寿命をコントロールする遺伝子、PQBP1。第 85 回日本生化学会大会，2012 年 12 月 14 日～16 日，福岡国際会議場マリンメッセ福岡，福岡
- 8) 伊藤 日加瑠、岡澤 均：HMGB1 を用いた脊髄小脳変性症 1 型モデルマウスの治療。運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 平成 24 年度班会議，2013 年 1 月 9 日～10 日，都市センターホテル，東京

[招待講演・セミナー]

- 1) 岡澤 均：新学術領域研究「脳内環境」班会議。2012 年 1 月 28 日～29 日，KKR ホテル熱海，静岡
- 2) 岡澤 均：ポリグルタミン病の分子標的治療を目指して。大阪大学蛋白質研究所セミナー「神経疾患の克服に向けて」，2012 年 3 月 1 日～2 日，大阪大学蛋白質研究所，大阪
- 3) 岡澤 均：網羅的リン酸化タンパク解析による変性病態シグナル解明に向けて。パソシグナリングバイオロジーワークショップ，2012 年 4 月 24 日，東京医科歯科大学，東京
- 4) 岡澤 均：ポリグルタミン病の分子標的治療の開発に向けて。パソシグナリングバイオロジーワークショップ，2012 年 4 月 24 日，東京医科歯科大学，東京
- 5) 岡澤 均：変性と発達障害をつなぐ分子 PQBP1 の病態機能。都医学研セミナー，2012 年 5 月 14 日，東京都医学総

合研究所 講堂, 東京

- 6) 岡澤 均: ハンチントン病の分子病態
解明. 第 53 回日本神経学会学術大会
2011 年度植林賞受賞者招待講演, 2012
年 5 月 23 日, 東京国際フォーラム,
東京
- 7) 岡澤 均: ハンチントン病における
DNA の損傷と修復. 日本放射線影響学
会第 55 回大会, 2012 年 9 月 6 日~8
日, 東北大学川内北キャンパス, 仙台
- 8) 岡澤 均: New Common Pathologies of
Neurodegenerative Diseases. 第 35
回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18
日~21 日, 名古屋国際会議場, 名古屋
- 9) 岡澤 均: 脳の老化と変性における
DNA 損傷修復. 第 34 回日本生物学的精
神医学会, 2012 年 9 月 28 日~30 日,
神戸国際会議場, 神戸

登録番号: 特許第 5066710 号

登録日: 2012 年 8 月 24 日

出願番号: 特願 2007-014795

出願日: 2007 年 1 月 25 日

特許権者: 国立大学法人東京医科歯科
大学

発明者: 岡澤 均

本学整理番号: P06-069

- 3) 発明の名称: 新規タンパク質及びそれ
を利用したポリグルタミン病等の神
経変性疾患の予防・治療薬

出願番号: 特願 2006-545101

出願日: 2005/11/16

登録番号: 特許第 5103615 号

登録日: 2012/10/12

出願人: 国立大学法人東京医科歯科大
学

発明者: 岡澤 均

本学整理番号: P04-009P-JP

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を 含む。)

- 1) 特許査定 2012 年 3 月 27 日
発明の名称: ポリグルタミン病の予
防・治療剤
登録番号: 特許第 4982739 号
登録日: 2012 年 5 月 11 日
出願番号: 特願 2006-154059
出願日: 2006 年 6 月 1 日
特許権者: 国立大学法人東京医科歯科
大学
発明者: 岡澤 均
本学整理番号: P05-047
- 2) 発明の名称: 精神発達遅滞の非ヒトモ
デル動物及び精神発達遅滞の症状を
改善する活性を有する物質をスクリ
ーニングする方法