

2013/7088A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(精神疾患関係研究分野)

課題番号：H25- 神経・筋 - 一般 -003

新評価方法を用いたフォールディング病の
分子シャペロン療法の検討

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小野寺 理
新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター
分子神経疾患資源解析学 教授

平成26(2014)年3月

目 次

I. 総括研究報告

新評価方法を用いたフォールディング病の分子シャペロン療法の検討	-----	1
小野寺理		

II. 分担研究報告

タブレット型携帯端末 iPad を用いた小脳性運動失調の新たな定量評価法	-----	9
他田 正義		

多系統萎縮症(MSA)における蛋白凝集機構の探索	-----	14
石川欽也		

凝集阻害化合物のポリグルタミン病モデルマウスに対する治療効果	-----	19
永井義隆		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	25
-----------------	-------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）

（総括）研究報告書

新評価方法を用いたフォールディング病の分子シャペロン療法の検討

研究代表者：所属機関 新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター

小野寺 理

研究要旨 本研究申請の目的はフォールディング病に対し、化学シャペロンの病態進行抑制効果を検討する事である。その目的のために新たな臨床評価方法を確立する。近年多くの神経変性疾患が蛋白質のフォールディング異常で引き起こされる事が明らかとなった。このフォールディング異常を標的とした治療は、病態の進行を抑制する画期的な治療法に繋がる。我々はポリグルタミン病をモデルとして蛋白質フォールディング異常を抑制する化学シャペロンを探索し、治療薬候補として QAI1 を見出し、その治療効果を *in vivo*, *in vitro* で確認した。QAI1 は、臨床応用されている薬剤であり、有力な治療薬候補化合物である。しかし、そのヒトでの治療効果判定のためには、評価者間、内変動の入らない客観的評価方法の開発が不可欠である。我々は本症において高頻度に冒される小脳に注目し、小脳病変における「時間的予測性の障害」を、等速反復運動の速度の変動値として検出し、障害程度を連続変数として表す検査プログラムを開発し、iPad 端末に実装した。これによる反復運動の速度の変動係数は、従来の代表的なカテゴリ変数による評価方法と強い相関を示した。本法は、評価者の主観が介入せず、多施設共同研究を考えた場合、最適の方法である。本評価法を用い QAI1 の進行抑制効果を検討する。ポリグルタミン病の進行速度は個人間差が大きく、この個人差の影響を最小限に抑えるためにクロスオーバー試験にて行う。申請者らはすでに評価方法を作成、検証しており、かつ候補薬剤の検討を動物レベルで終了している。さらに候補薬剤はすでに他疾患で使用されており安全性が高い。平成 25 年度は(1) 本検査システムにおいてどのような課題が小脳性運動失調を検出するのに適している至適条件。(2) その課題条件のもとで、健常群と SCD 疾患群との違い、疾患重症度との相関を検討し、その結果本検査システムの有用性と問題点を明らかとした

分担研究者

西澤正豊 新潟大学脳研究所神経内科
柿田明美 新潟大学脳研究所神経病理学
赤澤宏平 新潟大学医歯学総合病院
永井義隆 国立精神・神経センター
石川欣也 東京医科歯科大学・神経内科・
佐藤俊哉 新潟大学脳研究所
他田正義 新潟大学脳研究所神経内科

1 研究目的

本研究申請の目的はフォールディング病（アルツハイマー病，シヌクレイノパチー，タウオパチー，TDP-43 プロテインオパチー，ポリグルタミン病）に対し，化学シャペロンの病態進行抑制効果を検討する事である。近年多くの神経変性疾患が蛋白質のフォールディング異常で引き起こされる事が明らかとなった。このフォールディング異常を標的とした治療は，病態の進行を抑制する画期的な治療法に繋がる。我々はポリグルタミン病をモデルとして蛋白質フォールディング異常を抑制する化学シャペロンを探索し，治療薬候補として QAI1 を見出した（永井）。この治療効果は，培養細胞を用いた二量体形成阻害アッセイ（小野寺），ポリグルタミン病モデル線虫（他田），モデルショウジョウバエ（永井），モデルマウスにても確認した（永井）。QAI1 は，臨床応用されている薬剤であり，有力な治療薬候補化合物である。しかし，今までに見いだされた多数の候補化合物のヒトへの臨床応用は，現実

は成功していない。この要因の一つが治療効果の評価方法にある。十分な検出力をもつ介入研究において，各群のサンプルサイズは，介入による効果判定値の平均値の差（推定効果量：E）と効果判定値の標準偏差（S）から $16/(E/S)^2$ の計算式で推定される。稀少疾患である本症はサンプルサイズに限界があるため，介入研究の成否は誤差の少ない評価方法に左右される。これには連続変数による評価が理想的であるが，フォールディング病では被見者の意志が混入しない連続変数による評価方法は存在しなかった。我々は本症において高頻度に冒される小脳に注目し，小脳病変における「時間的予測性の障害」（Spencer RM, et al. Science 2003; Ilg W, et al. Brain 2007, 2008）を，等速反復運動の速度の変動値として検出し，障害程度を連続変数として表す検査プログラムを開発した（他田）。このプログラムは iPad 端末に実装され，いつでも，どこでも，誰でも，簡便に短時間で実行可能である。このプログラムで測定した反復運動の変動係数（CV）は，従来の代表的なカテゴリ変数による評価方法である SARA との相関係数 0.8 以上， $P < 0.001$ と非常に強い相関を示した。我々の開発した方法は，評価者の主観が介入する余地が無く，評価者間，内変動が無く，多施設共同研究を考えた場合，最適の方法である。さらに被験者内での日内変動・日差変動も極めて小さい。遺伝学的背景が同一なポリグルタミン病患

者にて、本法は罹病期間とも高い相関 (r=0.944, P<0.016) を得て、年間悪化率を 3.98%と算出することが出来た。

本研究では、申請者らが iPad にて開発した、簡便、鋭敏で、評価者間変動のない評価方法を用いて、QAI1 の進行抑制効果を検討する。聴診器の開発が医療に革新的な進歩をもたらしたように、近年の高性能デジタルデバイスを医療診断デバイスとして再定義する。初年度には、評価方法に基づく疾患進行速度の検討を行い既存の評価スケールと新規に開発した評価スケールとの間の詳細な比較を行った。

2 研究方法

私たちは、視標追跡課題により上肢運動機能を解析するための、iOS6.0/iPad を用いた定量的検査システムを開発した。本年度は (1) 本検査システムにおいてどのような課題が小脳性運動失調を検出するのに適しているのか、課題の至適条件、(2) その課題条件のもとで、健常群と SCD 疾患群との違い、疾患重症度との相関を検討した。健常者 36 例 SCD 患者 51 例 (MJD/SCA3 10 例, SCA6 8 例, DRPLA 3 例, CCA 26 例, 他の失調症 4 例) を対象に、臨床項目 (発症年齢, 罹病期間, ポリグルタミン病原因遺伝子の CAG リピート数), SARA スケール, iPatax 検査項目の測定値を解析した。課題の至適条件の検証: 等速移動する視標追跡課題の条件 (直線 vs 曲線, 数段階の速度, 周回 vs 反復) を変えて、各条件における速度の変動係数 (coefficient of

variation, CV) と重症度 SARA との相関を比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子解析を必要とするため、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に沿って、倫理的配慮のもとに実施する。すなわち、十分なインフォームドコンセントを行った上で文書で同意を得、末梢血から DNA を抽出し、保存する。これらのヒト由来試料や臨床データに関する個人識別情報は、連結可能匿名化を行い、大学内で定められた個人識別情報管理者が厳重に管理する。本研究の一部に関しては新潟大学遺伝子研究倫理委員会審査を受け、承認を得ている。今後全国共同研究推進に当たり、共同研究機関、対象の拡大について承認を得て行う。遺伝子以外の臨床情報、血液、画像所見などの使用に関しても、十分な倫理的配慮が必要となる。特に、疫学研究に関する倫理指針、ならびに臨床研究に関する倫理指針の各指針に則り、本研究を進める。この点に関して上記の遺伝子研究とは別に新潟大学倫理審査委員会に臨床試料の研究的使用の申請を行い、承認を得て行う。遺伝子解析とは別個にこの点に関しても文書で同意を得る。規定の P1 もしくは P2 実験室はすでに承認済みの施設を保有している。研究を通じて協力者の人権は守られ、現時点で予想される不利益はない。臨床試験も患者の同意書を得施行した。倫理委員会の承認 (H22 年 11 月 24 日付けにて承認) を受け行った。

3 研究結果

比較的ゆっくりとした、非連続運動より複雑な視標追跡課題が小脳性運動失調を検出するのに適していた。速度の CV と重症度 SARA との相関：等速直線反復運動および等速曲線反復運動における速度の CV は両者とも、SARA 合計および SARA 上肢機能と各々高い相関を示した。運動学習の効果：健常群、疾患群ともに、時間経過に伴い速度の CV の減少を認め、運動学習を反映している可能性が示された。学習効率は疾患群に比して健常群で高く、かつ疾患群では SARA の増加に伴い学習効率が有意に低下した。同一例の経時的变化：疾患群 10 例で 4～8 週毎にデータを取得し、経時的变化を解析した。個人差が大きく、悪化例と改善例がみられた。日差変動もあり、評価は慎重にする必要がある。以上より本検査システムは小脳性運動失調の定量評価に有用であると考えられた。

4 考察

神経・筋疾患は長期療養を必要とするため日常生活への支障が大きく、その病態の進行阻止治療は悲願である。しかし、未だ現実とはなっていない。この原因として、その希少性と多様性故に、評価できる検出力をもった治験が計画されていない事が上げられる。十分な検出力のある治験には、大きな症例数か、鋭敏でブレのない評価方法が必要である。しかし、症例数には必ずと限界がある。そのため、評価方法に成否が左右される。その評価

方法は、従来、主観の混入するカテゴリー分類が用いられてきた。本症の稀少性を顧みると、簡便で、どこでも、主観の混入なしに評価できることが望ましい。本申請計画にあるタブレット端末を用いた評価方法は、これらを解決する画期的な医療診断デバイスとなる可能性がある。本申請にある“評価デバイスの革新に基づく検出力をもった希少性疾患の治療研究”は、類似治療研究の増加を促し、結果として、希少性、神経・筋疾患患者に貢献する。また客観的な数値による評価基準は、症状の理解と、それに応じた生活基盤を確立する上で、患者にとっても極めて有用な情報になる。本研究により、医療診断デバイスとしてのタブレット端末の有効性が示されれば、施策へ直接反映される可能性、また、他疾患の評価において間接的に活用される可能性がある。また本研究申請で対象とする薬剤はすでに臨床で使用されている薬剤であり、薬剤のリポジショニング研究にも道を開く。これを凌駕するために評価方法について、複数回測定するなどの変更を加える必要がある。平成 26-27 年度半ばまで QAI1 の薬効評価の試験を行う。この目的のために、評価方法を最終的に平成 26 年度の半ばまでに決定しプロトコルを固める。

6 結論

本検査システムは小脳性運動失調の定量評価に有用であることに加え、小脳機能として重要な運動学習を評価できる可能性が期待できる。今後、治療研究での実

用化に向けて、日内変動・日差変動、同一例での経時的変化等のデータを蓄積し評価する必要がある。

7 研究発表

論文発表

- 1) Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, Tsuji S, Takahashi H. Spinocerebellar Ataxia Type 17. Editors In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014.
- 2) Tada M, Nishizawa M, Onodera O. IP3 Receptors in Neurodegenerative Disorders: Spinocerebellar Ataxias and Huntington's and Alzheimer's Diseases Editors In: Weiss N, Koschak A. editors. Pathologies of Calcium Channels. Springer Berlin Heidelberg. 2014, pp 579-600
- 3) 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 西澤正豊, 小野寺理. 【小脳の神経学】治療研究に向けた小脳機能評価法の将来. 神経内科 2013;78:687-694.
- 4) Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, Yokoseki A, Arakawa K, Sekine Y, Shimohata T, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Onodera O, Takahashi H. Sporadic ALS with compound heterozygous mutations in the SQSTM1 gene. *Acta Neuropathol.* 2013 Sep;126(3):453-9.
- 5) Multiple-System Atrophy Research Collaboration(共著者 74 人順不同). Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med.* 2013 Jul 18;369(3):233-44.
- 6) Kanazawa M, Tada M, Onodera O, Takahashi H, Nishizawa M, Shimohata T. Early-clinical features of patients with progressive supranuclear palsy with predominant cerebellar ataxia. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 Dec;19(12):1149-51.
- 7) Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hattori N. The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2014 Jan 25. pii: S0197-4580(14)00039-6.
- 8) Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med.* 2013 Jul 18; 369(3):233-44.
- 9) Niimi Y, Takahashi M, Sugawara E, Umeda S, Obayashi M, Sato N, Ishiguro T, Higashi M, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. Abnormal RNA structures (RNA foci) containing a

- penta-nucleotide repeat (UGGAA)_n in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis. *Neuropathology*. 2013 Apr 22. doi: 10.1111/neup.12032. [Epub ahead of print]
- 10) Takahashi M, Obayashi M, Ishiguro T, Sato N, Niimi Y, Ozaki K, Mogushi K, Mahmut Y, Tanaka H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Yamada M, Takahashi H, Kato T, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. Cytoplasmic location of α 1A voltage-gated calcium channel C-terminal fragment (Ca_v2.1-CTF) aggregate is sufficient to cause cell death. *PLoS ONE*. 8(3): e50121, 2013.
- 11) Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* (in press)
- 12) Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y., Yamaguchi M. Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*. *Hum. Mol. Genet.* (in press)
- 13) Togashi K., Wakatsuki S., Furuno A., Tokunaga S., Nagai Y., Araki T. Na⁺/H⁺ exchangers induce autophagy in neurons and inhibit polyglutamine-induced aggregate formation *PLoS One* 8(11): e81313 (2013)
- 14) Popiel H.A., Takeuchi T., Burke J.R., Strittmatter W.J., Toda T., Wada K., *Nagai Y. Inhibition of protein misfolding/aggregation using polyglutamine binding peptide QBP1 as a therapy for the polyglutamine diseases. *Neurotherapeutics* 10(3): 440-446 (2013)
- 15) Higashi S., Kabuta T., Nagai Y., Tsuchiya Y., Akiyama H., Wada K. TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. *J. Neurochem.* 126(2): 288-300 (2013)
- 16) 永井義隆、藤掛伸宏. コンフォメーション病としての神経変性疾患. *ファルマシア* 49 (9): 849-853 (2013)
- 17) 畑中悠佑、和田圭司、永井義隆. 認知症におけるシナプス病態. *Dementia Japan* 27 (2): 128-135 (2013)
- 18) 永井義隆. ポリグルタミン鎖の伸長による SCA. <アクチュアル 脳・神経疾患の臨床⑤>「小脳と運動失調」(西澤正豊編、中山書店) 172-181 (2013) 学会発表

- 1) 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 小野寺理, 西澤正豊. 等速直線運動の速度変動に着手した小脳性運動失調の新たな定量評価法. 第54回日本神経学会学術大会, 2013/05/30, 東京
- 2) 太田浄文, 石川欽也, 大林正人, 尾崎心, 柿田明美, 高橋均, 水澤英洋. Glial cytoplasmic inclusion を形成する多系統萎縮症の oligodendroglia では、チューブリン重合促進蛋白 TPPP が核から消失する. 第54回日本神経学会学術大会, 2013年5月30日年, 東京.
- 3) 橋本祐二, 本多武尊, 中尾誠, 片野和彦, 石川欽也, 永雄総一, 水澤英洋. ヒトの加齢および小脳疾患における新しい定量的小脳運動学習システムの確立. 第35回日本神経科学大会, 2012年9月19日, 名古屋.
- 4) 本多武尊, 中尾誠, 橋本祐二, 片野和彦, 石川欽也, 水澤英洋, 永雄総一. ヒトの手の運動学習の新しい実験パラダイム. 第35回日本神経科学大会, 2012年9月19日, 名古屋.
- 5) Hashimoto Y, Ishikawa K, Honda T, Nagao S, Mizusawa H. A Novel System To Evaluate the Dynamic Cerebellar Motor Learning Capability and Its Application Identifies a Clinical Marker in Cerebellar Ataxias. 65th American Academy of Neurology Annual Meeting, 2013. 3. 19, San Diego, USA.
- 6) 橋本祐二, 石川欽也, 本多武尊, 中尾誠, 永雄総一, 水澤英洋. プリズム適応を用いた小脳運動学習の定量化. 第54回日本神経学会学術大会, 2013年5月30日, 東京.
- 7) 本多武尊, 橋本祐二, 曾我一將, 石川欽也, 水澤英洋, 永雄総一. ヒトの手の到達運動の学習評価のための新しい実験パラダイム. 第7回Motor control研究会. 2013年9月6日, 東京.
- 8) Nagai Y. Toxic protein conformational transition and amyloid fibril formation in the polyglutamine diseases. *Int Symp on Amyloidosis* (Jan 24, 2013, Tokyo, Japan)
- 9) Nagai Y., et al. Dietary restriction improves proteostasis and suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *7th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders* (Jun 23-28, 2013, Waterville Valley, NH)
- 10) Popiel H.A., et al. Identification of a polyglutamine oligomerization inhibitor with high brain permeability and safety, which exerts therapeutic effects on multiple mouse models of the polyQ diseases. *7th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders* (Jun 23-28, 2013, Waterville Valley, NH)
- 11) 永井義隆. Hsp40 はエクソソーム分泌により細胞非自律的なポリグルタミン病の治療効果を発揮する. **第32回**

日本認知症学会学術集会 (H25.11.8-10、
長野)

12) 永井義隆. 蛋白質ミスフォール
ディング・凝集を標的とした神経変性疾
患の治療戦略. **第13回日本蛋白質科
学会** (H25.6.12-14、鳥取)

13)

8 知的所有権の出願・取得状況 (予定
を含む)

1 特許取得

平成25年8月30日 出願 (拡大申請)
(石川ら)

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））

【新評価方法を用いたフォールディング病の分子シャペロン療法の検討班】

（分担）研究報告書

タブレット型携帯端末 iPad を用いた小脳性運動失調の新たな定量評価法

分担研究者	他田 正義	新潟大学脳研究所 神経内科
	赤澤 宏平	新潟大学医歯学総合病院 医療情報部
	西澤 正豊	新潟大学脳研究所 神経内科
	佐藤 俊哉	新潟大学脳研究所
	小野寺 理	新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野
研究協力者	徳永 純	新潟大学脳研究所 神経内科
	永井 貴大	新潟大学脳研究所 神経内科

研究要旨

本研究の目的は、多施設共同の臨床試験において使用可能な、鋭敏で安定性の高い小脳性運動失調の定量評価法を開発することである。分担研究者らは、タブレット型携帯端末 iPad を用いた簡便な検査システム iPatax (iPad Application for Evaluating Ataxia, 小脳性運動失調評価のための iPad アプリケーション) を開発した。本研究では、健常者および小脳失調症患者を対象とした解析により、視標追跡課題における速度の変動係数が臨床重症度 SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia) と非常に高い正の相関を示すことを明らかにした。速度の変動係数は、従来の定量評価法である重心動揺検査や Timed up and go test に比べて臨床重症度と高く相関し、経時的変化の解析において変性疾患特有の緩徐な進行を捉えることができた。さらに、速度の変動係数は課題遂行の後半に低下し、運動学習の効果を反映している可能性が示唆された。学習効率は健常群に比して患者群で低値であった。iPatax は小脳性運動失調の定量評価法として有用であることに加え、小脳機能として重要な運動学習を評価できる可能性が示唆された。

A. 研究背景・目的

脊髄小脳変性症 (SCD) に対しこれまで

で数多くの臨床試験が試みられてきたが、成功例は極めて少ない。不成功の最大の

要因の一つは、鋭敏で安定性の高い定量評価法が欠如していることにある。現在、国際的に広く使用されている小脳性運動失調の臨床評価尺度 SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia) は、評価者が被験者の運動遂行能力を観察してカテゴリ変数によって評価する半定量的評価法である。簡便で重症度とよく相関するが、SCD の臨床試験において症状のわずかな変化を捉えるには鋭敏性に乏しく、評価者間変動が大きい等の欠点を有する。SCD の SARA 年間変化率は、40 点満点中わずか 1.1~2.1 点に留まる。従来の評価法にみられる鋭敏性、安定性の問題を克服し、多施設共同の SCD の臨床試験を成功させるためには、連続変数による定量評価法の開発が不可欠である。

分担研究者らは、鋭敏で安定性の高い小脳性運動失調の新評価法を開発することを目的に、iPad (Apple 社) を用いた視標追跡課題の上肢運動機能評価システム “iPatatax (iPad Application for Evaluating Ataxia, 小脳性運動失調評価のための iPad アプリケーション)” を独自に開発した。本研究では、iPatatax 検査システムを用いて得られる各変数と SARA や従来の定量評価法との比較から、本検査システムの有用性を検証した。

B. 研究方法

iOS6.0/7.0 上で作動する 2 種類の検査プログラムを開発し、Apple 社のタブレット型携帯端末 iPad に実装した。開発に

あたっては、予め iOS Developer Program に登録した。

視標追跡法による等速直線反復運動試験：直線上 (15 cm 長) を等速 (15 cm/2~3 秒) で反復移動する視標を利き手示指で 1 分間追跡し、視標と指の距離 (空間的ずれ)、速度、加速度を測定し、変動係数 (CV=母集団の標準偏差/平均値) を算出した (図 1)。**視標追跡法による等速曲線反復運動試験：**直径 10 cm の円周上を等速 (1 周/3~6 秒) で反復または周回移動する視標を利き手示指で 1 分間追跡し、視標と指の距離、速度、加速度を測定した。

1 分間の検査の後半で被験者の手技が上達するかどうか (運動学習の効果) を明らかにするために、測定区間を

第 1 区間 (S1) : 3-20 秒

第 2 区間 (S2) : 20-40 秒

第 3 区間 (S3) : 40-60 秒

に分け、S1 と S3 の変動係数の変化から運動学習効率を下記のとおり算出した。

$$\text{運動学習効率 } \Delta CV_{S1-S3} = (CV_{S1} - CV_{S3}) / CV_{S1}$$

対象：健常者 11 例 (男性 7 例, 女性 4 例, 平均年齢 30.0 歳), 小脳性運動失調症患者 44 例 (男性 22 例, 女性 22 例, 平均年齢 56.2 歳; 患者の内訳, 多系統萎縮症小脳型 (MSA-C) 7 例, 皮質性小脳萎縮症 (CCA) 10 例, マシャド・ジョセフ病 (MJD) 16 例, 脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) 3 例, 脊髄小脳失調症 31 型

(SCA31)1例, 他の失調症7例)を対象に, 臨床項目(発症年齢, 罹病期間, ポリグルタミン病のCAGリピート数), SARA, iPatax検査の各変数, 重心動揺検査, Timed Up & Go Test (TUGT, 椅子から立ち上がり往復6メートルを歩いて着席するまでの時間を測定)の各データを取得し, 測定値を解析した. 統計解析はSPSS ver.12.0を使用した.

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理委員会の承認を受け, 対象者から書面での同意を得た上で実施した.

C. 研究結果

1. 現行の臨床評価尺度(SARA)との相関

小脳性運動失調の重症度を反映する変数を明らかにするために, 等速直線反復運動(15 cm/3秒), 等速曲線反復運動(1周/6秒)において, 視標と指の距離(空間的ずれ)の平均値, 空間的ずれの変動係数, 速度の変動係数, 加速度の変動係数などの各変数と現行の標準的臨床評価尺度であるSARA合計との相関を各々解析した. その結果, 空間的ずれの平均値および速度の変動係数が各々SARA合計と有意に相関した. とくに, 速度の変動係数は等速直線反復運動($r=0.848$, $p<0.001$, 図2A), および等速曲線反復運動($r=0.807$, $p<0.001$, 図2B)ともにSARA合計と極めて高い正の相関を示した.

2. 従来の定量評価法との比較:

この視標追跡課題における速度の変動係数とSARA合計との相関係数は, 従来の定量的評価法である重心動揺検査の総軌跡長, 矩形面積とSARA合計との相関係数($r=0.571$, $p<0.001$; $r=0.545$, $p<0.001$), TUGTの最短時間とSARA合計との相関係数($r=0.768$, $p<0.001$)よりも高値となった(図3).

3. 継時的変化の検討

4-9週後に2度目の検査を実施した7例(MSA1例, CCA3例, MJD3例)について等速直線運動の速度変動係数の経時的変化を解析した(図4). CCA3例では変動係数の上昇は8週で 0.007 ± 0.278 , 平均変化率は8週でプラス $1.9\pm 6.9\%$ となった. MJD3例では変動係数の上昇は8週で 0.003 ± 0.040 , 平均変化率は8週でプラス $1.1\pm 7.9\%$ であり, いずれも安定した値が得られた.

4. 運動学習の効果の検討

健常群, 患者群ともに, 時間経過に伴い速度の変動係数の減少を認め, 運動学習を反映している可能性が示唆された(図5A). 学習効率 ΔCV_{S1-S3} は健常群に比して疾患群で低値を示した(図5B).

D. 考察と結論

多くの先行研究において, 小脳性運動失調の評価には時間測定異常の検出が重要と考えられている. これは, 小脳性運動失調の本態は筋活動の時間的パターン生成の異常であるという知見に基づいて

いる。速度の変動は、空間的ずれに比べて運動の時間的ずれ（時間測定異常）の要素を反映しやすいと考えられるが、本研究においても、視標追跡課題の速度の変動係数が従来の臨床評価尺度 SARA と強く相関し、先行研究と一致する結果が得られた。

iPatax 検査法は連続変数による小脳性運動失調の定量評価が可能であることに加え、以下の利点を有する。(1) 評価者の主観が介在する余地がなく、評価者内・評価者間誤差を無視できる、(2) 従来の特別な機器を用いた検査法に比べ臨床重症度をよく反映する、(3) 歩行が困難な症例でも実施可能である、(4) 操作は簡単で短時間（5分以内）に実施できる、(6) 機器が比較的安価で、かつ機動性が高い、(7) 簡単な課題のため被験者のベストパフォーマンスが得られやすい、などである。すなわち、従来の評価法に比べ鋭敏性、安定性、簡便性、機動性が高い点で優れていると考えられた。とくに、評価者間誤差が無視できることは、多施設共同の臨床試験を遂行していく上で利点が大きい。

さらに、速度の変動係数は課題遂行の後半に低下し、運動学習の効果を反映している可能性が示唆された。学習効率は健常群に比して疾患群で低値を示した。本検査システムは小脳性運動失調の定量評価に有用であることに加え、小脳機能として重要な運動学習を評価できる可能性が期待できる。

今後、治療研究での実用化に向けて、日内変動・日差変動、同一例での経時的変化等のデータを蓄積し評価する必要がある。

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。）

とくになし。

G. 研究発表

論文発表

19) 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 西澤正豊, 小野寺理. 【小脳の神経学】治療研究に向けた小脳機能評価法の将来. 神経内科 2013;78:687-694.

学会発表

14) 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 小野寺理, 西澤正豊. 等速直線運動の速度変動に着目した小脳性運動失調の新たな定量評価法. 第54回日本神経学会学術大会, 2013/05/30, 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

（特許取得・実用新案登録・その他）

とくになし

図1. iPatax 検査の概要

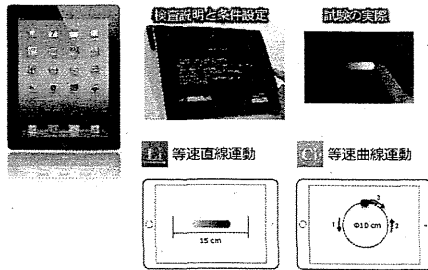


図2. 等速直線・曲線反復運動課題における速度の変動係数とSARAとの相関

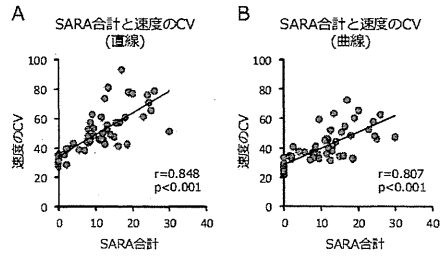


図3. 従来の定量評価法とSARAとの相関

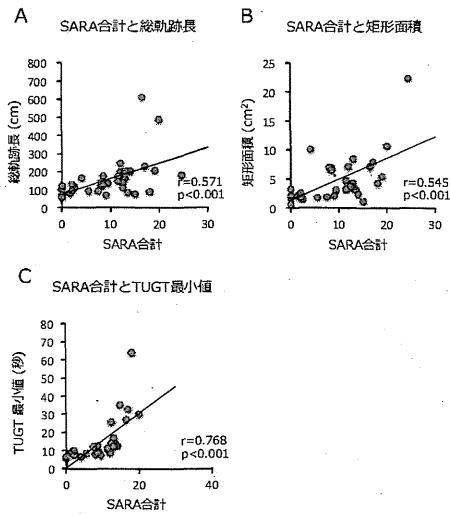


図4. 速度の変動係数の経時的変化

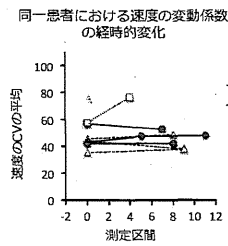
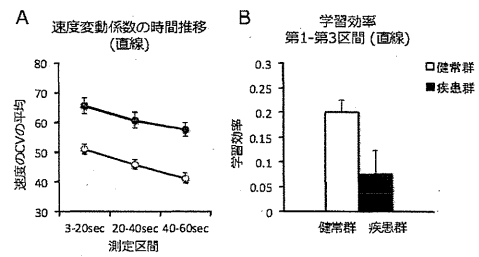


図5. 運動学習 (速度変動係数の時間推移)



厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））

【新評価方法を用いたフォールディング病の分子シャペロン療法の検討班】

（分担）研究報告書

多系統萎縮症(MSA)における蛋白凝集機構の探索

研究分担者：石川欽也¹⁾ 柿田明美²⁾

1) 東京医科歯科大学医学部附属病院神経内科

2) 新潟大学脳研究所

研究要旨

多系統萎縮症(MSA)は、オリゴデンドログリアの細胞質内に α シヌクレイン蛋白が凝集する、我が国に多い神経変性疾患である。この疾患には分子シャペロンがどのように関わるか不明である。本研究では、 α シヌクレイン蛋白の凝集に先駆けて細胞内の局在が変化すると言われる、オリゴデンドログリア特異的蛋白、p25 α / tubulin polymerization promoting protein (以下、TPPP と略す)について主に神経病理学的な検索を行った。その結果初めて、TPPP が正常では細胞質のみならず核とミトコンドリアにも豊富に存在し、MSA 患者脳では TPPP が α シヌクレイン沈着と共局在し、核からは消失していること、を見出した。今後、分子シャペロンの関与を探索する。

A. 研究目的

多系統萎縮症(MSA)は、我が国に1万人以上の罹患者が存在する致死的な神経難病である。臨床症状は小脳性神経障害、寡動などの錐体外路徴候、錐体路徴候、自律神経障害を主とし、発症後5年程度で重度の歩行困難、8年程度で歩行不能・寝たきりになるという臨床経過も報告されている。MSAの一部(10%以下)の患者で、そのゲノムにミトコンドリア遺伝子COQ2の異常が、本研究員を含む我が国の三井、辻らにより2013年に発見されたが(The Multiple System Atrophy

Research Collaboration. New England Journal of Medicine, 369(3):233-244, 2013.)、ほとんどの患者は孤発性(非遺伝性)であり、原因は不明である。しかし、この疾患で重要な細胞であるオリゴデンドログリア細胞(ODG)に、 α -synuclein 蛋白が異常な沈着を起こすことがMSAの病態に非常に重要であると考えられている。この凝集体を、glial cytoplasmic inclusion (GCI)と呼ぶ。重要なことに、この α -synuclein 蛋白はODGに本来発現していないため、どのような機序で同蛋白の沈着が起きるか不明な点が多い。

この問題を解明することを目的として、本研究員は、ODG に特異的な蛋白 p25 α /tubulin polymerization promoting protein (TPPP)に着目した。この TPPP は、2007 年 Song YJ らにより α -synuclein 蛋白沈着に先行するという神経病理学的報告がなされた(Song YJ. et al. American Journal of Pathology, 171(4): 1291-1303, 2007)。しかし、TPPP 蛋白は市販抗体では免疫組織化学的に検索が困難であるため、独自に抗体を作製せざるを得なかった。本研究では、独自に作製した2種類の抗体を用いてMSA患者脳で検証した TPPP と α -synuclein の ODG 内での関係を明らかにする。

B. 研究方法

本研究では別研究により作製した、抗 TPPP 抗体の2種類を用いた。2つの抗体はそれぞれ TPPP のアミノ (N) 末端とカルボキシル(C)末端を認識することを確認している。また、野生型マウスや健常ヒト剖検脳における、免疫組織化学、蛍光2重免疫染色、免疫電顕、オルガネラ分画を使用した western blotting 法にて正常脳白質での TPPP の細胞内局在の解析は完了している。

MSA 患者と対照患者の橋、小脳、大脳において、リン酸化 α シヌクレイン抗体と TPPP 抗体との蛍光2重染色にて TPPP の局在変化について検討した。

(倫理面への配慮)

公表された患者剖検脳を用いた染色結果には本人を特定できる情報はない。

C. 研究結果

対照者脳では既報告通り、TPPP は中枢神経系白質に、び漫性に強く発現し、ミエリンの染色パターンと一致することを確認した。これまでに報告がないこととして、本研究で初めて TPPP が ODG の細胞質のみならず、核および核膜周囲にも発現することを発見した。この結果は、免疫電顕での免疫金分子の局在パターンでも支持され、細胞分画を用いた western blotting でも確認した。さらに、核だけでなく細胞質内ではミトコンドリアに TPPP が強く発現することを発見した。一方 MSA 患者では、橋、小脳、大脳白質のいずれの部位でも変性に合致してミエリンの TPPP の染色性が極端に低下していた。MSA 患者脳を用いた蛍光2重染色では、リン酸化 α シヌクレイン陽性の GCI には、TPPP が強く局在していることを見出した(図1~3)。

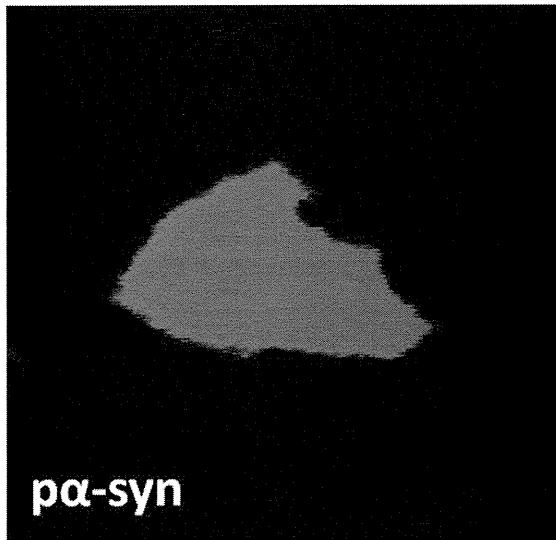


図 1 : ODG の GCI 内のリン酸化 α -synuclein 沈着.

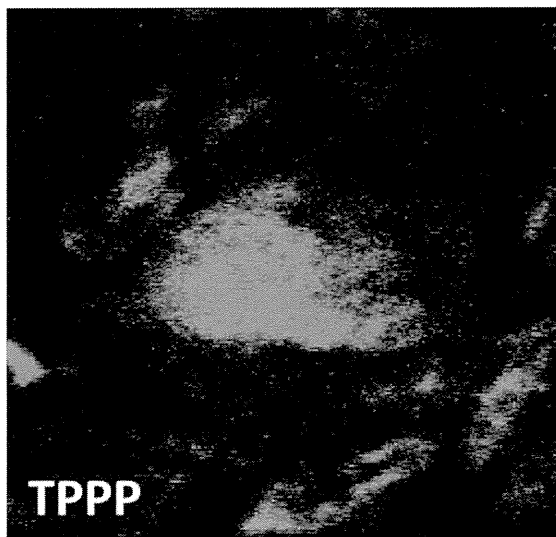


図 2 : 同じ ODG 内の TPPP.

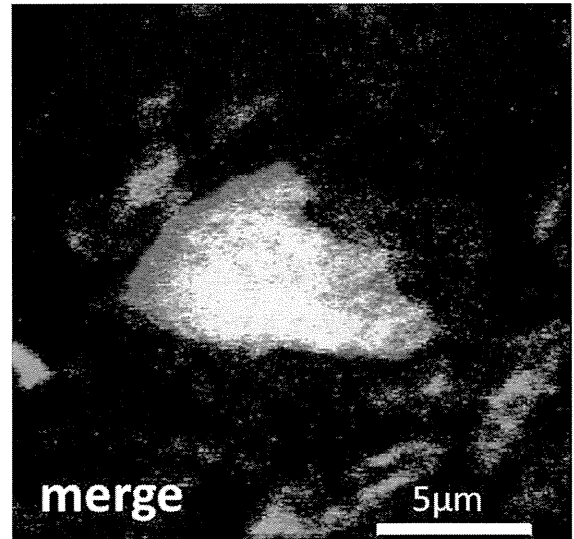


図 3 : 図 1 と図 2 の merge 像。リン酸化 α -synuclein 陽性の GCI に TPPP が蓄積していることが示された。

このような GCI 形成 MSA-ODG では、核内での TPPP 発現が減少している場合が多いことも判明した。

D. 考察

TPPP は α -synuclein 蛋白と結合し、それを凝集させる働きがあることが、すでに in vitro 実験や培養細胞を用いた研究で明らかになっている(Hasegawa T, et al. *Neurochemistry International*, 57(8): 857-866, 2010; Konno M, et al. *Molecular Neurodegeneration*, 7:38, 2012)。したがって、本研究の結果からは、GCI の形成には、ODG 内に本来存在する TPPP のうち、核内の成分が消失し、何らかの理由で細胞質に蓄積する過程で、 α -synuclein がともに発現し、そこで凝集

する、と仮説を立てることが可能と思われた。今後、この過程の検証を行うことで、病態の進展機構を阻害する薬剤の探索・発見が可能になる可能性が期待できる。また、GCI形成の過程における分子シャペロンが、どのようにかわるかを次年度探索する計画である。

E. 結論

TPPPはODG特異的蛋白であり細胞質だけではなく核とミトコンドリアにも豊富に存在する。MSA脳では変性早期から核内TPPPは減少し、細胞体へ移行し、 α -synucleinの凝集に関係している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 著者名：論文名、雑誌名、発表年；
巻（号）：最初頁-最後頁

1) Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hattori N. The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Jan 25. pii: S0197-4580(14)00039-6.

2) Multiple-System Atrophy

Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med*. 2013 Jul 18; 369(3):233-44.

3) Niimi Y, Takahashi M, Sugawara E, Umeda S, Obayashi M, Sato N, Ishiguro T, Higashi M, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. Abnormal RNA structures (RNA foci) containing a penta-nucleotide repeat (UGGAA)_n in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis. *Neuropathology*. 2013 Apr 22. doi: 10.1111/neup.12032. [Epub ahead of print]

4) Takahashi M, Obayashi M, Ishiguro T, Sato N, Niimi Y, Ozaki K, Mogushi K, Mahmut Y, Tanaka H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Yamada M, Takahashi H, Kato T, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. Cytoplasmic location of α 1A voltage-gated calcium channel C-terminal fragment (Ca_v2.1-CTF) aggregate is sufficient to cause cell death. *PLoS ONE*. 8(3): e50121, 2013.

2. 学会発表

1). 太田浄文, 石川欽也, 大林正人, 尾崎心, 柿田明美, 高橋均, 水澤英洋. Glial cytoplasmic inclusion を形成する多系統萎縮症の oligodendroglia では、チュブリ

ン重合促進蛋白TPPPが核から消失する。
第54回日本神経学会学術大会，2013年
5月30日，東京。

2). 橋本祐二，本多武尊，中尾誠，
片野和彦，石川欽也，永雄総一，水澤英
洋。ヒトの加齢および小脳疾患における
新しい定量的小脳運動学習システムの確
立。第35回日本神経科学大会，2012年
9月19日，名古屋。

3). 本多武尊，中尾誠，橋本祐二，
片野和彦，石川欽也，水澤英洋，永雄総
一。ヒトの手の運動学習の新しい実験パ
ラダイム。第35回日本神経科学大会，
2012年9月19日，名古屋。

4). Hashimoto Y, Ishikawa K,
Honda T, Nagao S, Mizusawa H. A
Novel System To Evaluate the Dynamic
Cerebellar Motor Learning Capability
and Its Application Identifies a Clinical
Marker in Cerebellar Ataxias. 65th
American Academy of Neurology
Annual Meeting, 2013. 3. 19, San
Diego, USA.

5). 橋本祐二，石川欽也，本多武尊，
中尾誠，永雄総一，水澤英洋。プリズム
適応を用いた小脳運動学習の定量化。第
54回日本神経学会学術大会，2013年5
月30日，東京。

6). 本多武尊，橋本祐二，曾我一將，
石川欽也，水澤英洋，永雄総一。ヒトの
手の到達運動の学習評価のための新しい
実験パラダイム。第7回Motor control研
究会，2013年9月6日，東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予
定を含む。）

1. 特許取得

平成25年8月30日 出願（拡大申請）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし