

のみ、凝集体形成に大きな影響を受けている。P62 ノックアウトによって paradoxical な病態改善をみたことは選択的オートファジーにおいては阻害される分子種が限られているため、病態増悪よりも、核内封入体減少による改善の影響が強くなったものと考えられる。一方 Atg5 のノックアウトでは全般的なオートファジー阻害のため増悪因子が増加したものと考えられる。

遺伝子発現異常はポリグルタミン病病態の特徴であるが、p62 のノックアウトによって大きな改善は認められなかった。この点で寿命延長は認められたものの病態改善は不完全であり、核内封入体は減少したとはいえ、感受性のある遺伝子の変化は少なかったことから、病態自体は完全には抑制されていないものと考えられた。

E. 結論

異常伸長ポリグルタミン含有タンパク質の細胞質における凝集促進が核内封入体の減少をもたらし、病態一部改善をもたらすことができる。

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) Maheshwari M, Bhutani S, Das A, Mukherjee R, Sharma A, Kino Y, Nukina N & Jana NR: Dexamethasone induces heat shock response and slows down disease progression in

mouse and fly models of Huntington's disease. Hum Mol Genet (2014)

- 2) Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Akimoto K, Hirose T, Ohno S, Hattori N, Nukina N: Loss of aPKC λ in Differentiated Neurons Disrupts the Polarity Complex but Does Not Induce Obvious Neuronal Loss or Disorientation in Mouse Brains. PLoS One 2013; 8: e84036
- 3) Furukawa Y, Nukina N: Functional diversity of protein fibrillar aggregates from physiology to RNA granules to neurodegenerative diseases. Biochim Biophys Acta 2013; 1832: 1271-8
- 4) 貫名信行: 【神経変性疾患-研究と診療の進歩】 神経変性疾患の病態機序の解明 Proteinopathy からみた神経変性疾患の病態機序. 医学のあゆみ 2013; 247: 395-9
- 5) 松本弦, 貫名信行: Basic Neuroscience 生化学(分子生物学) p62 リン酸化とオートファジー. Annual Review 神経 2013; 2013: 29-36

2. 学会発表

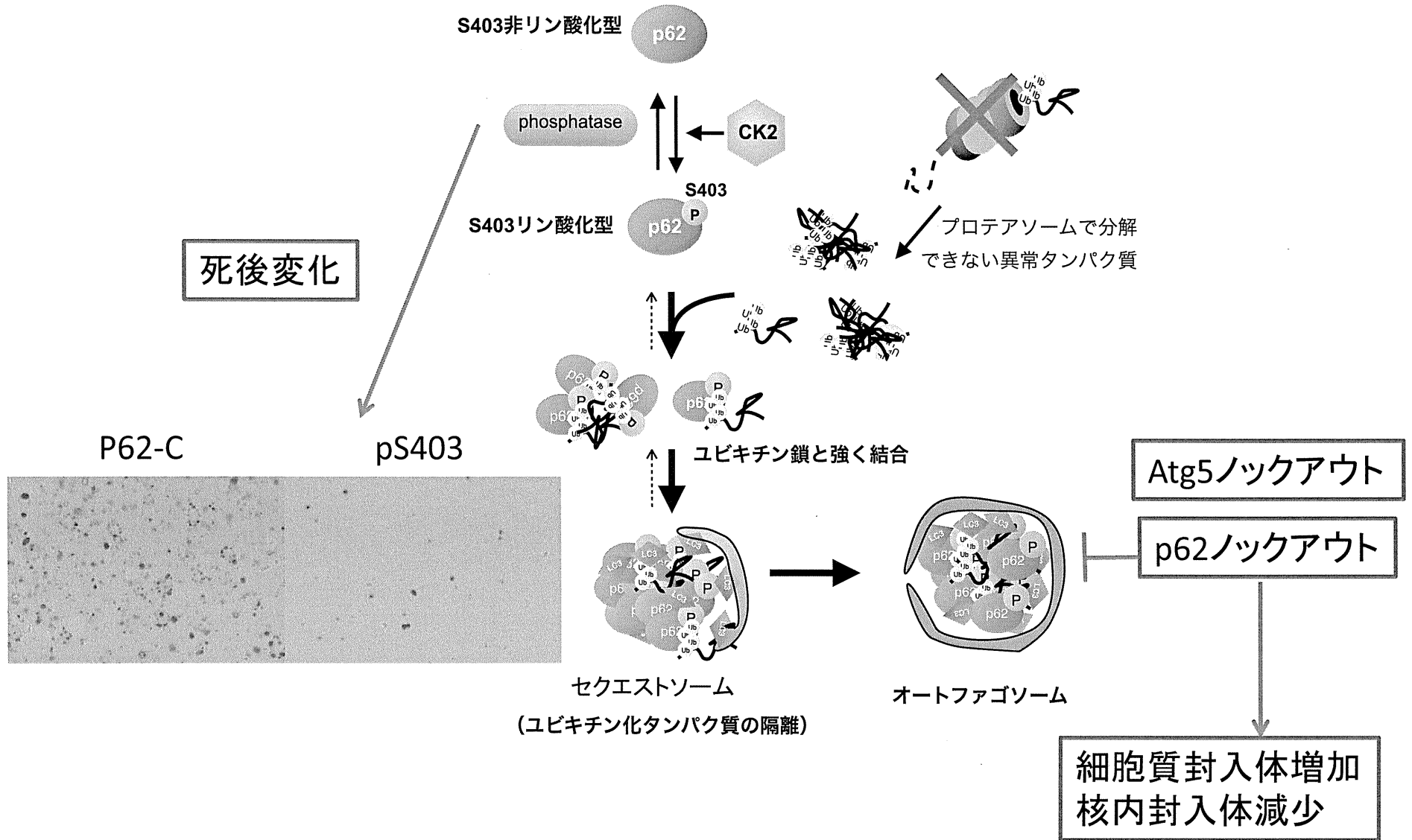
- 1) 貫名信行: 老化関連疾患における異常タンパク質除去機構の解明. 文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「高次神経機能障害の発症メカニズム解明と新規治療法の開発」第1回公開シンポジウム in 京都(同志社大学京田辺キャンパス)(2013/10/05)

- 2) 紀嘉浩 , 貫名信行: 神経疾患におけるタンパク質・RNA 凝集体の意義.
Protein/RNA aggregation in neurological disorders.
Neuro2013 (第36回日本神経科学大会)
in 京都 (国立京都国際会館)
(2013/06/20-23)

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



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（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研究班 分担研究報告

『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

私たちはこれまで、神経変性疾患病態で神経細胞における DNA 損傷修復異常が共通生ずる可能性を提唱している。すでに脊髄小脳失調症 1 型モデル動物において DNA 二重鎖切断が亢進していることを示した。しかし、数ある DNA 修復メカニズムの内、どの修復経路異常が病態に寄与しているかは不明であった。私たちは寿命短縮などの表現型を示す脊髄小脳失調症 1 型モデルショウジョウバエを用いた解析を新規に開発している。そこで、この系を用い脊髄小脳失調症 1 型の症状を改善できる DNA 修復関連遺伝子を *in vivo* でスクリーニングした。その結果、RPA1 の過剰発現により寿命の短縮と DNA 二重鎖切断の両方が改善できることを明らかにした。一方、我々のモデルショウジョウバエに対し CHK1 は寿命をさらに短縮したが、CHK1 阻害剤には寿命延長効果があった。

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。

HMGB1 はクロマチンリモデリングに機

能を持ち、どのようなタイプの DNA 損傷修復においても重要な役割を果たすと考えられる。そのため、ハンチントン病モデルのショウジョウバエ及びマウスに対する治療効果を持っていた (Qi et al., Nature Cell Biol 2007)。一方、Ku70 は非相同末端結合 (non homologous end-joining, NHEJ) という DNA 二重鎖切断修復に特異的に必要な分子である。そのため、その治療効果は NHEJ 阻害を主病態とするハンチントン病に限定的であった (Enokido et al., JCB 2010, Tamura et al., PLoS ONE 2011, and unpublished data)。

今回、数ある DNA 損傷修復のメカニズ

ムのうちどの経路が SCA1 病態において重要であるかをショウジョウバエ *in vivo* スクリーニングとシステムズバイオロジーを用いて検討を行った。

B. 研究方法

OK6-Gal4 のコントロール下で運動ニューロン特異的に SCA1 原因遺伝子、変異型アタキシン 1 (AT1-82Q) を発現するショウジョウバエ、OK6>AT1-82Q を用いた。OK6>AT1-82Q は羽化率の低下や寿命の短縮などの表現形を示す。このモデルショウジョウバエに国立遺伝学研究所に存在する Gene Search (GS) 系統の中から DNA 損傷関連遺伝子を発現する 38 系統を掛けあわせ、羽化率及び寿命を回復させる遺伝子を *in vivo* でスクリーニングした。

スクリーニングの結果を IPA (Ingenuity inc.) ソフトウェアによりネットワーク解析し、特に重要な DNA 損傷修復経路を推定した。また、回復効果を確認するため免疫染色により、DNA 二重鎖切断マーカー、 γ H2Av のシグナル強度を測定した。

(倫理面への配慮)

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、また東京医科大学の承認を得て行った。

C. 研究結果

スクリーニングの結果、寿命の短縮を回復できる 8 つの遺伝子を同定した。RPA1、XRCC3、XRCC4、CCNH、PER1、POLE、POLH そして PNKP である。モデルショウジョウバエの寿命は平均 22.8 日と野生型の 33.7 日に比べ顕著に短い。RPA1 の効果は

特に強く、共発現により平均 33.9 日と野生型レベルまで回復することが出来た。また、寿命をさらに短縮する 12 の遺伝子を同定した。LIG1、LIG3、XAB2、FEN1、ERCC2、ERCC5、CHEK1、BLM、SP011、XAB2、RecQL5、EME1 及び MUS81 である。羽化率を用いたスクリーニングでは、RPA1、CHK1、RecQL5 に回復効果があった。

次に寿命の結果を基に IPA ネットワーク解析を行った。寿命延長遺伝子から作られたネットワークにおいて、RPA1 が中心にありハブ的な役割を果たしていることが推定された。一方、寿命短縮遺伝子からなるネットワークのハブ的中心には CHK1 が存在した。そこで、これらの 2 つの遺伝子が実際に病態をコントロールするか、複眼変性モデルで確認した。予想通り、RPA1 は過剰発現で変性を回復し、ノックダウンで悪化させた。CHK1 は過剰発現で変性を悪化させ、ノックダウンで回復した。さらに、CHK1 阻害剤 (CHIR-124) をエサに混ぜたところ、0.02mg/ml の濃度で寿命を平均 29 日にまで回復することが出来た。

RPA1 は一本鎖 DNA を保護する役割を持ち、二重鎖切断部位に集積することで相同組換え修復 (HR 修復) に役割を果たす。変異型アタキシン 1 が RPA1 に結合しその働きを阻害することが DNA 損傷亢進の原因ではないかと考えその検証も行った。免疫沈降法により、神経細胞においてアタキシン 1 と RPA1 が結合することが示された。この結合は変異型アタキシン 1 により強かった。また、SCA1 モデルマウス (Atxn1-154Q KI マウス) で両者の核内での共局在を免疫染色により確認している。

さらに、マイクロレーザー照射法により、DNA 損傷部位への RPA1 集積を観察した。変異型アタキシン 1 を発現した U2OS 細胞では RPA1 のダメージ部位への集積が阻害されていた。これらの結果から変異型アタキシン 1 による RPA1 の機能阻害が明らかとなった。

D. 考察

私たちの行ったスクリーニングにより、複数の DNA 損傷修復関連遺伝子が SCA1 の病態を回復できる可能性が示された。また、システムバイオロジー解析により SCA1 病態における DNA 損傷修復において最も重要な役割を果たしていると考えられる分子、RPA1 を特定することが出来た。驚くべきことに RPA1 は HR 修復に重要な役割を担う BRCA2 とも結合した。また、BRCA1, 2 は変異型アタキシン 1 とも結合した。この事は変異型アタキシン 1 が HR 修復複合体の機能を阻害する事を示唆している。HR 修復は細胞周期の動いている細胞でのみ働く機構である。しかし神経細胞は G0 期にあり、疑問点であった。しかしながら、近年では変性疾患における細胞周期リエントリがしばしば報告されている。実際に私たちが検証したところ、SCA1 モデルマウスにおいて BrdU を取り込むプルキンエ細胞を発見している。このことから、RPA1 は SCA1 病態において細胞周期が再開した神経細胞の DNA 損傷を修復する機能があるのではないかと考えられる。

E. 結論

私たちの研究により、従来考えられて

いなかった、HR 修復の SCA1 病態への関与が明らかとなった。今回の結果から RPA1 による治療の可能性が見出された。また、CHK1 阻害剤が治療薬となる可能性も見出された。

これまで、私たちが明らかにしてきた SCA1 病態を回復する分子は、それぞれ DNA 損傷修復の異なるステップに関与している。そのため、これらの分子を同時に発現することで、相加的・相乗的に治療効果が得られることを期待している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Barclay SS, Tamura T, Ito H, Fujita K, Tagawa K, Shimamura T, Katsuta A, Shiwaku H, Sone M, Imoto S, Miyano S, Okazawa H: Systems biology analysis of *Drosophila in vivo* screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1. Hum Mol Genet 2014; 23(5): 1345-1364
- 2) Ikeuchi Y, de la Torre L, Matsuda T, Steen H, Okazawa H, Bonni A: The XLID protein PQBP1 and the GTPase dynamin 2 define a signaling link that orchestrates ciliary morphogenesis in postmitotic neurons. Cell Reports 2013; 4(5): 879-89
- 3) Shiwaku H, Yagishita S, Eishi Y, Okazawa H: Bergmann glia are reduced

in spinocerebellar ataxia type 1. Neuroreport 2013; 24: 620-625

- 4) Li C, Ito H, Fujita K, Shiwaku H, Qi Y, Tagawa K, Tamura T, Okazawa H: Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, an Intellectual Disability-Microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells. PLOS ONE 2013; 8: e68627
- 5) Fujita K, Nakamura Y, Oka T, Ito H, Tamura T, Tagawa K, Sasabe T, Katsuta A, Motoki K, Shiwaku H, Sone M, Yoshida C, Katsuno M, Eishi Y, Murata M, Taylor JP, Wanker EE, Kono K, Tashiro S, Sobue G, La Spada AR, and Okazawa H: A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA damage repair in multiple polyglutamine diseases. Nature Commun 2013; 4: 1816

2. 学会発表

〔国際学会〕

- 1) Ito H, Tagawa K, Okazawa H: “HMGB1 as a therapeutic molecule candidate for spinocerebellar ataxia type1 (SCA1).” Neuro2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Tokyo, 2013. 6. 20-23 (6/21) (Oral)
 - 2) Tamura T, Barclay SS, Fujita K, Ito H, Motoki K, Shimamura T, Tagawa K, Katsuta A, Shiwaku H, Sone M, Tagawa K, Imoto S, Miyano S, Okazawa H: “Replication - dependent DNA repair in SCA1 pathology.” Neuro2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Tokyo, 2013. 6. 20-23 (6/20) (Poster)
 - 3) Okazawa H: “Brain disease researches and brain bank.” Neuro 2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Tokyo, 2013. 6. 20-23(6/22) (Symposia)
 - 4) Okazawa H: “Morphological and molecular changes of synaptic spines in mouse models of PQBP1-linked intellectual disability. “ The 16th International Workshop on Fragile X, Novotel Barossa Valley Resort, Australia, 2013. 9. 17-20
- 〔国内学会〕
- 1) 伊藤 日加瑠, 田川 一彦, 岡澤 均: 「HMGB1 を用いた脊髄小脳失調症 1 型モデルマウス治療の試み」 (口演), 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会タワーホール船堀、2013. 4. 24-26 (発表日 4/26)
 - 2) 伊藤 日加瑠, 田川 一彦, 岡澤 均: 「HMGB1 を用いた脊髄小脳変性症 1 型モデルマウス治療への試み」 (口演), 第 54 回日本神経学会学術大会東京国際フォーラム, 2013. 5. 29-6. 1 (発表日 5/30)
 - 3) 田村 拓也, Barclay S Sam, 藤田 慶大, 伊藤 日加瑠, 本木 和美, 島村 徹平, 田川 一彦, 勝田 明寿香, 曾根 雅紀, 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 screening

- による解析」 (ポスター), 第 54 回日本神経学会学術大会東京国際フォーラム、2013. 5. 29-6. 1 (発表日 5/30)
- 4) Ito H, Tagawa K, Okazawa H: “HMGB1 as a therapeutic molecule candidate for spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1).” (口演)、Neuro2013, 国立京都国際会館, 2013. 6. 20-23 (発表日 6/21)
- 5) Tamura T, Barclay SS, Fujita K, Ito H, Motoki K, Shimamura T, Tagawa K, Katsuta A, Sone M, Imoto S, Miyano S, Okazawa H: “causative pathway underlying in spinocerebellar ataxia type 1” (ポスター), Neuro2013, 国立京都国際会館, 2013. 6. 20-23 (発表日 6/20)
- 6) 藤田慶大, 中村蓉子, 岡 努, 伊藤日加瑠, 田村拓也, 田川一彦, 岡澤 均: 「TERA/VCP/p97 の DNA 修復機能不全は複数の神経変性疾患に関与する」 (ポスター), 第 32 回日本認知症学会学術集会, キッセイ文化ホール・松本市総合体育館, 2013. 11. 8-10 (発表日 11/9)
- 7) 田村拓也: 「神経変性疾患モデルシヨウシヨウバエを用いたバイオインフォマティック解析」 (口演), 第六回高次分子機能研究会, 軽井沢ホテル, 2013. 9. 17-19 (発表日 9/17)
- 8) 藤田慶大, 中村蓉子, 岡 努, 伊藤日加瑠, 田村拓也, 田川一彦, 笹邊俊和, 勝田明寿香, 本木和美, 塩飽裕紀, 曾根雅紀, 吉田千里, 岡澤 均: 「複数のポリグルタミン病における TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」 (ポスター), 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 2013. 12. 3-6 (発表日 12/4)
- [招待講演・セミナー]
- 1) 岡澤 均: 「神経疾患タンパク質研究とブレインバンク」, 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 シンポジウム・ブレインバンク, タワーホール船堀, 2013. 4. 24-26 (発表日 4/26)
- 2) 岡澤 均: 「神経変性疾患の分子標的治療を目指して」, 横浜市立大学大学院生命医科学研究科 大学院講義 横浜市大鶴見キャンパス, 2013. 5. 20
- 3) 岡澤 均: 「脳疾患研究とブレインバンク Brain disease researches and brain bank」, Neuro2013 シンポジウム, 国立京都国際会館, 2013. 6. 20-23 (発表日 6/22)
- 4) 岡澤 均: 「網羅的リン酸化タンパク質質量解析を用いた神経変性病態の解明の試み」, AB SCIEX 質量分析計によるタンパク質発現量解析セミナー, UDX GALLERY NEXT-1, 2013. 7. 17
- 5) 岡澤 均: 「網羅的リン酸化タンパク質質量解析を用いた神経変性病態の解明の試み」, AB SCIEX 質量分析計によるタンパク質発現量解析セミナー, 新大阪ブリックビル, 2013. 7. 19
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
- 発明: 脊髄小脳変性症 1 型を予防又は治療するための薬剤
- 出願者: 国立大学法人 東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

特願 2013-214155

2. 実用新案登録

3. その他

岡澤 均 夢のクスリ ー医療研究最
前線ー 『DNA 修復阻害メカニズムの解
明』、代ゼミナールジャーナル vol 619,
No 2, 2013 (代々木ゼミナール)

HDとSCA1のDNA損傷修復病態の共通性・特異性

HD/SCA1に共通して作用？

HMGB1

DNA高次構造変換

G0期ニューロン

S期ニューロン

DNA二重鎖切断

DNA二重鎖切断

Ku70

細胞周期再突入

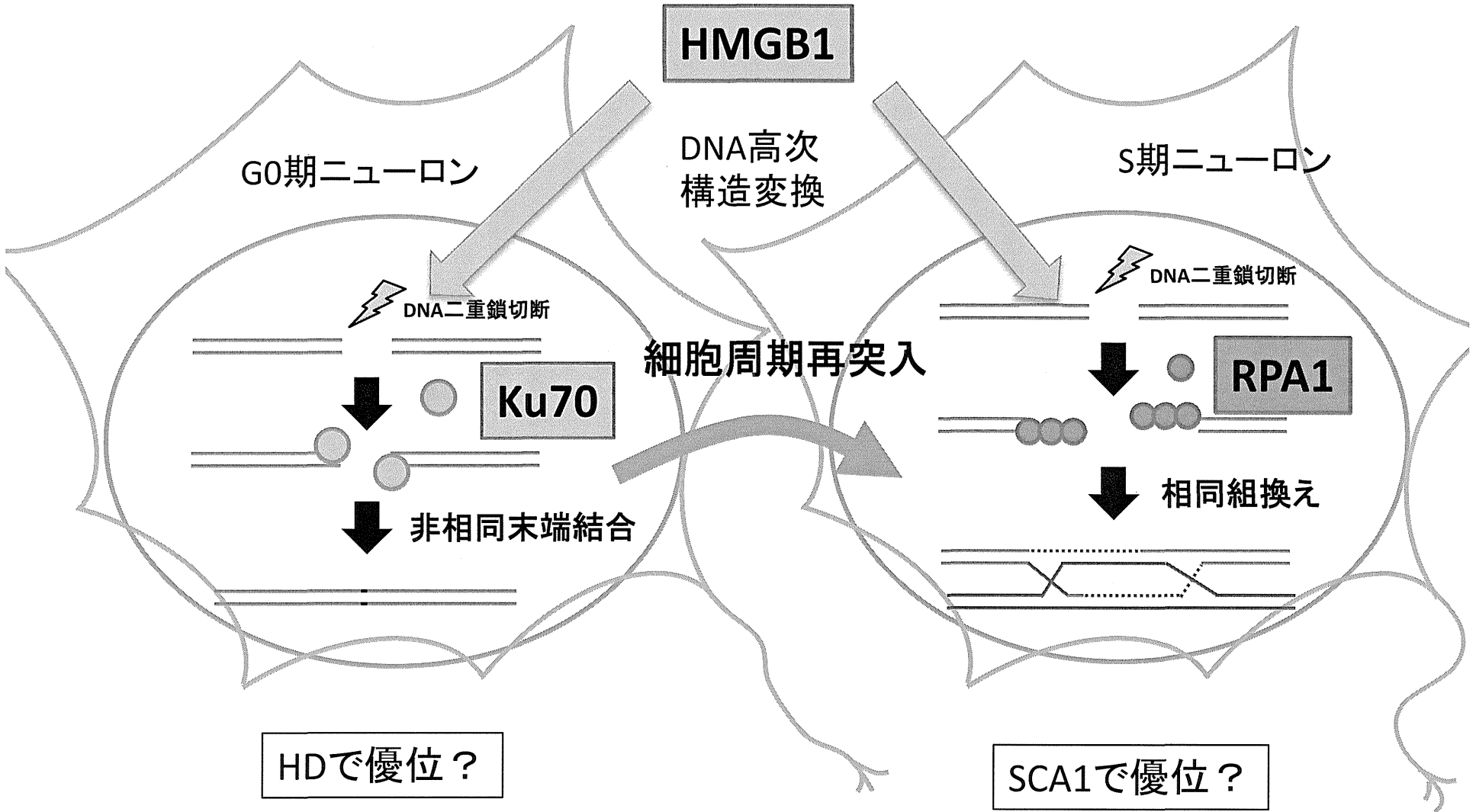
RPA1

非相同末端結合

相同組換え

HDで優位？

SCA1で優位？



SCA1 ノックインマウスでは発症前からシナプス成熟が遅滞している

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 畑中 悠佑 (同上)
和田 圭司 (同上)

研究要旨

本研究では、ポリグルタミン病における神経機能障害のメカニズム解明を目的として、2光子レーザー顕微鏡を用いて脊髄小脳失調症1型 (SCA1) ノックインマウスにおけるシナプス形態・動態異常の解析を行った。その結果、発症前のシナプス発達期では明らかなシナプスの形態異常は認めないが、シナプス足場タンパク質である Homer1b/c、Shank などの発現が有意に減少し、シナプスのターンオーバー率が有意に亢進していることが明らかになった。さらに、シナプスターンオーバー率の亢進は、シナプス成熟期でも持続することから、ポリグルタミン病などの晩発性神経変性疾患の神経機能障害の根底に発達期のシナプス成熟障害が寄与する可能性があると考えられた。

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) 病など多くの神経変性疾患において、様々なタンパク質のミスフォールディング・凝集がかかわる共通の神経変性メカニズムが考えられている。しかしながら、神経症状は最終的な神経細胞死に至る前の神経機能障害の段階で出現すること、そしてそれが可逆的であることが明らかにされたものの、タンパク質のミスフォールディング・凝集の下流で引き起こされる可逆性神経機能障害の実体、その詳細なメカニズムについてはこれまで未解明であった。発症後からの治療介入を考えた場合、可逆性神経機能障害の解明とそれによる新たな治療標的の特定は、きわめて重要

な課題である。私たちは、可逆性神経機能障害の分子メカニズム解明を目指して、これまで PolyQ 病モデルショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングを行い、複数のシナプス関連遺伝子が神経機能障害に関わることを明らかにしてきた。本研究では、神経変性疾患における可逆性神経機能障害の根底に存在するシナプス異常の詳細を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

B&C&D. 研究方法・結果および考察

様々なポリグルタミン病モデルの中から、ヒト患者での遺伝子異常を忠実に再現しているために組織特異的な神経ネットワーク障害が保存されている脊髄小脳失調症1型 (SCA1) のノックインマウス

SCA1^{154Q/2Q} (Watase et al. Neuron 2002) を用いた。この SCA1^{154Q/2Q} マウスは、ヒト SCA1 患者と同様に小脳の神経変性に伴う運動失調を発症する一方で、それ以外にも神経変性を認めない大脳皮質・海馬などの機能障害に伴う記憶・学習能の障害を呈することから、神経変性非依存的な神経機能障害の実体解明に適していると考えた。

ニューロンの樹状突起スパインを可視化するために神経細胞特異的に YFP を発現する Thy1-YFP マウスを用いて、このマウスと SCA1^{154Q/2Q} マウスとの交配により得られた SCA1^{154Q/2Q}/Thy1-YFP マウスについて解析を行った。

①共焦点レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳固定切片の *ex vivo* 解析

まず、SCA1^{154Q/2Q} マウスを経時的に灌流固定して脳切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてスパイン形態の解析を行った。その結果、海馬 CA1 錐体ニューロンの樹状突起スパインは、発症する 5 週齢時点では顕著な形態変化を認めなかったが、8 週齢、12 週齢と週齢を重ねるに連れてスパイン密度が徐々に減少し、スパイン頭部の大きさも狭小化していた。以上のことから SCA1 マウスにおけるシナプス変性は経時的に進行すると考えられた。

②2光子レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳の *in vivo* イメージング解析

次に、観察深度が深くレーザーによる組織・細胞障害が少ないため生体のタイムラプスイメージング解析に適した 2 光子レーザー顕微鏡を用いて、スパインの形態のみならず、その動態解析を行った。

SCA1^{154Q/2Q} マウスの頭蓋骨を薄く削り、非侵襲的な Thinned-skull 法にて大脳皮質ニューロンの樹状突起スパインの経時的な 2 光子レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、明らかなスパイン形態異常は認めない発症前の 4 週齢から、スパインの新生・消失を示すターンオーバー率が既に有意に亢進していることが明らかになった。さらに、通常は 6 週齢、8 週齢と成熟に伴って低下していくターンオーバー率が、亢進したまま持続することが明らかになった。以上のことから、SCA1 マウスでは発症前から発達期のシナプス成熟が遅延している可能性があると考えられた。

③SCA1 マウス脳におけるシナプス関連分子の発現解析

SCA1^{154Q/2Q} マウスから経時的に脳サンプルを採取し、RT-PCR およびウェスタンブロットにより、シナプス関連分子の発現変動を解析した。その結果、発症前の 4 週齢から Homer1b/c、Shank などの発現が有意に減少していた。一方で、PSD95 などには有意な変化を認めなかった。以上のことから、SCA1 マウスでは発症前からシナプスの足場タンパク質の発現が減少していることが明らかになった。

(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・指針および研究機関の動物実験倫理指針を遵守した。

E. 結論

本研究の結果から、SCA1 などの晩発性神経変性疾患の神経症状発症の根底に発

達期のシナプス成熟障害が寄与する可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeuchi T, Popiel HA, Futaki S, Wada K, Nagai Y: Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr Med Chem* (in press)
- 2) 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* 2013; 8(11): e81313
- 3) Popiel HA, Takeuchi T, Burke JR, Strittmatter WJ, Toda T, Wada K, Nagai Y: Inhibition of protein misfolding/aggregation using polyglutamine binding peptide QBP1 as a therapy for the polyglutamine diseases. *Neurotherapeutics* 2013; 10(3): 440-446
- 4) 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.* 2013; 126(2): 288-300
- 5) 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 2013; 49 (9): 849-853

- 6) 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* 2013; 27 (2): 128-135
 - 7) 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)
- ### 2. 学会発表
- 1) Nagai Y: Disruption of microtubule-dependent transport triggers accumulation and oligomerization of TDP-43 in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in ALS. *Niigata Neurosci Res Meeting* (Jun 3, 2013, Niigata, Japan)
 - 2) Nagai Y: Toxic protein conformational transition and amyloid fibril formation in the polyglutamine diseases. *Int Symp on Amyloidosis* (Jan 24, 2013, Tokyo, Japan)
 - 3) Fujikake N, et al: Impairment of microtubule-dependent transport of TDP-43 triggers its aggregation, leading to neurodegeneration in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies. *43rd SFN Meeting* (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA)
 - 4) Ishiguro T, et al: Expanded UGAA repeat RNA associated with SCA31 causes neurodegeneration in *Drosophila*. *43rd SFN* (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA)
 - 5) 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)
- 6) Popiel HA, 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)
- 7) Fujikake N, et al: Aggregation of TDP-43 is triggered by insufficiency of microtubule-dependent transport in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in *Drosophila*. 11th Int Conf on Alzheimer's & Parkinson's Dis (Mar 6-10, 2013, Florence, Italy)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 武内敏秀, 他: Hsp40 はエクソソーム依存的な細胞間伝播により個体レベルのタンパク質恒常性維持に寄与している. 第 36 回 日本分子生物学会 (H25. 12. 3-6、兵庫)
- 11) 鈴木マリ, 他: 過栄養食はインスリン様シグナルを介して神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性に影響する. 第 36 回 日本分子生物学会 (H25. 12. 3-6、兵庫)
- 12) 高橋理貴, 他: 野生型 α -シヌクレイン過剰発現に対する遺伝子発現補正型 RNAi 誘導法の確立と有効性評価. 第 36 回 日本分子生物学会 (H25. 12. 3-6、兵庫)
- 13) 長谷川隆文, 他: RNAi-mediated knockdown of VPS35 impairs α -synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D. 第 86 回 日本生化学会 (H25. 9. 11-13、横浜)
- 14) 藤掛伸宏, 他: DCTN1 依存的輸送の障害により TDP-43 発現ショウジョウバエの神経変性は増悪する. 第 54 回 日本神経学会学術大会 (H25. 5. 29-6. 1、東京)
- 15) 鈴木マリ, 他: GBA の機能喪失によりパーキンソン病モデルショウジョウバエの神経変性は増悪する. 第 54 回 日本神経学会学術大会 (H25. 5. 29-6. 1、東京)
- 16) 石黒太郎, 他: SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで複眼変性を引き起こす. 第 54 回 日本神経学会学術大会 (H25. 5. 29-6. 1、東京)
- 17) 今野昌俊, 他: ショウジョウバエモデルを用いた Vps35 遺伝子異常によるパーキンソン病発症機構の解析. 第 54 回 日本神経学会学術大会

(H25. 5. 29-6. 1、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

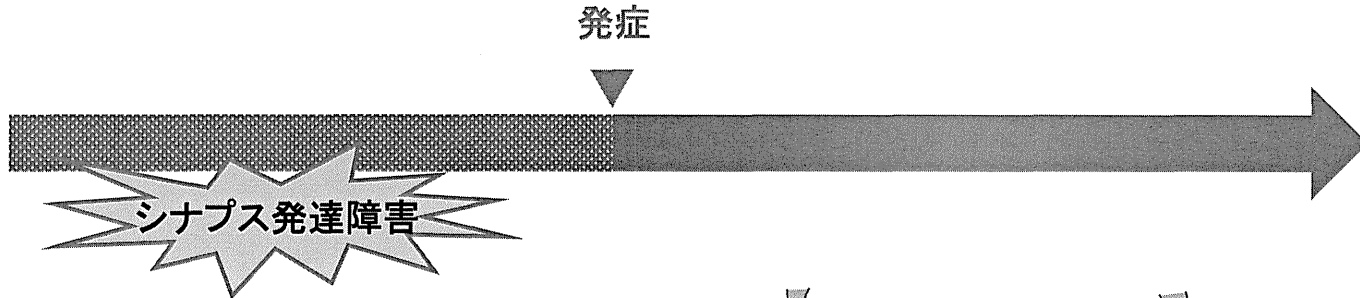
なし

ポリグルタミン病など晩発性神経変性疾患では 発達期のシナプス成熟障害が存在する可能性がある

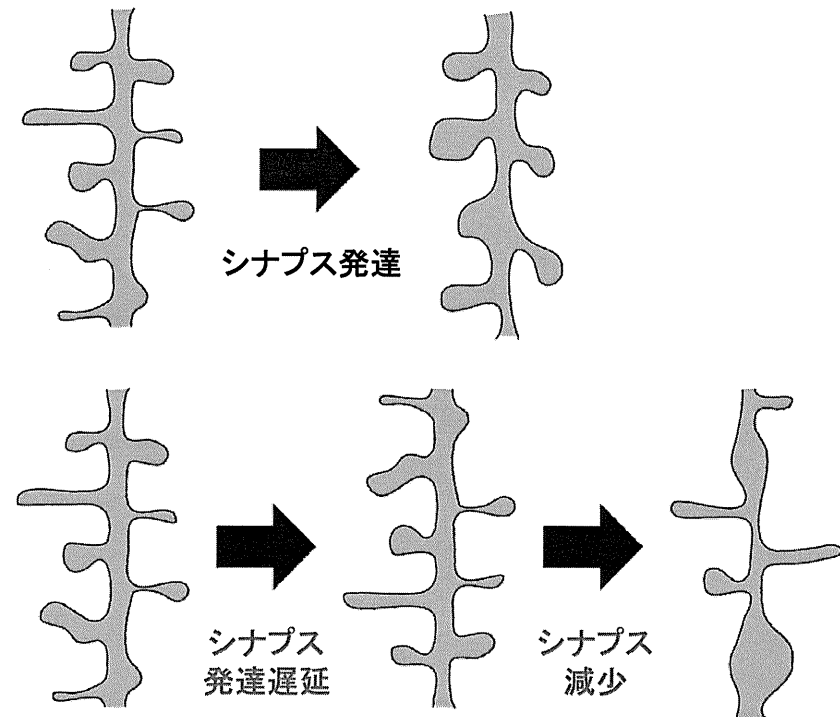
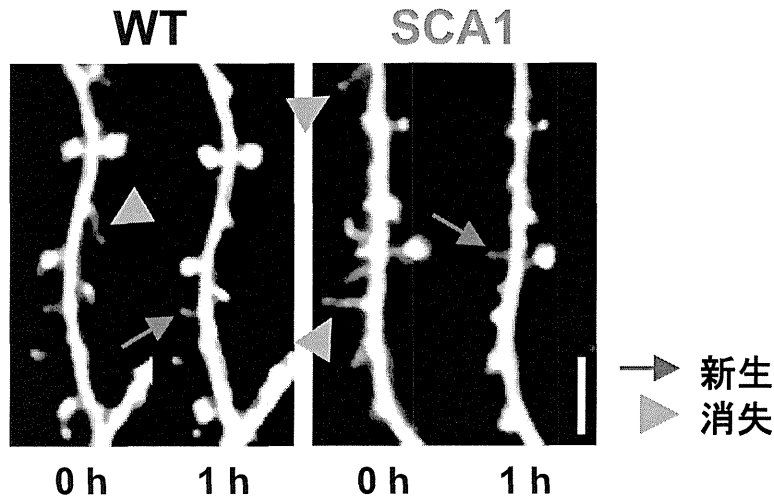
SCA1マウス



発症



2光子レーザー顕微鏡 / 生体イメージング



脊髄小脳変性症 1 型モデルマウス神経障害に対する間葉系幹細胞の治療効果

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）
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）

研究要旨

間葉系幹細胞は臍帯血、骨髄、脂肪等、複数の生体試料から簡単に単離できる細胞であり、脊髄小脳変性症 2 型マウス、*Lurcher* マウスなどの小脳失調モデルマウスに対して間葉系幹細胞小脳内移植の有効性が報告されている。今回我々は、脊髄小脳変性症 1 型マウスに対する間葉系幹細胞髄腔内投与の治療効果を検討することを目的とした。生後 1 か月の脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスおよびプルキンエ細胞特異的トランスジェニックマウスにマウス骨髄由来間葉系幹細胞を投与した結果、ノックインマウスにおいて観察される脊髄前根運動神経軸索の変性、運動神経伝導遅延が部分的に改善された。同様に、トランスジェニックマウスに見られるプルキンエ細胞の配列の乱れ、樹状突起退縮および運動失調が改善された。この改善効果は間葉系幹細胞培養上清投与でも再現されたため、間葉系幹細胞からの神経栄養因子の傍分泌が改善効果に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

遺伝性脊髄小脳変性症 1 型は常染色体優性遺伝性疾患で異常伸長したポリグルタミン鎖を持つアタキシン 1 が原因蛋白である。中枢および末梢神経系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 型に対する幹細胞治療研究としては、マウス脳室周囲から単離した神経幹細胞を脊髄小脳変性症 1 型トランスジェニックマウス小脳白質に移植したところ、小脳プルキンエ細胞の形態異常および運動機能が改善されたという報告がある。

一方、間葉系幹細胞の治療効果に関し

ては脊髄小脳変性症 1 型以外の運動失調マウスにおいて調べられている。例えば脊髄小脳変性症 2 型マウスとデルタ 2 型グルタミン酸受容体に変異を持つ *Lurcher* マウスの小脳内に間葉系幹細胞を移植したところ運動機能の改善が見られた。

今回我々は、脊髄小脳変性症 1 型モデルマウスに対する間葉系幹細胞髄腔内投与の治療効果検討を行った。なぜならば、臨床応用を念頭においた時、間葉系幹細胞は臍帯血、骨髄、脂肪等、複数の生体試料から簡単に単離できるという利点を持ち、また、髄腔内注射はヒトで一般的に行われている投与経路であるからである。

B. 研究方法

使用したマウスは脊髄小脳変性症1型のノックインマウスおよびプルキンエ細胞特異的トランスジェニックマウスである。生後5週令の両マウス髄腔内に骨髄から樹立された間葉系幹細胞の細胞株KUM10を3000個投与した。

末梢神経に対する効果判定は生後25週以上のノックインマウスを用いて行った。腰髄神経細胞の髄鞘形成を myelin basic protein 抗体を使った免疫染色で解析し、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。

小脳での効果判定はトランスジェニックマウスを用いて行った。生後10-20週のマウスを使ったロータロッドテストにより協調運動機能を解析し、生後21-23週のマウスで小脳プルキンエ細胞の形態の解析を行った。形態解析はカルビンジン抗体による免疫染色および、プルキンエ細胞へのバイオサイチン注入による描出の2通りで行った。

また、間葉系幹細胞から放出される神経栄養因子の傍分泌による治療効果を判定するために間葉系幹細胞培養上清を5週令のノックインマウスに髄腔内投与し、その後、10週まで週1回静脈注射し、ロータロッドテストおよびプルキンエ細胞の膜容量測定を行った。

C. 研究結果

ノックインマウスでは下部腰髄前根において運動神経軸索変性が見られるが、間葉系幹細胞の髄腔内投与を施されたマ

ウスでは変性が軽減された。また、ノックインマウスで観察される腰髄刺激時の下肢筋肉収縮開始時間遅延も間葉系幹細胞の髄腔内投与により、部分的な改善を見た。

同様に、脊髄小脳変性症1型トランスジェニックマウスに見られるプルキンエ細胞の配列の乱れ、樹状突起退縮および運動失調が間葉系幹細胞髄腔内投与により改善された。

最後に、間葉系幹細胞培養上清をトランスジェニックマウスに投与したところ、プルキンエ細胞の膜容量が有意に上昇したことから、樹状突起退縮が抑制されたと思われる。また、ロータロッドテストの結果、協調運動機能障害が改善された。

D. 考察

間葉系幹細胞は損傷を受けた脳において複数の栄養因子を分泌し、局所の炎症の抑制、細胞死抑制、血管新生等を引き起こすことが報告されている。今回、間葉系幹細胞の髄腔内投与により、小脳プルキンエ細胞の樹状突起退縮が抑制されたこと、および、この改善効果は間葉系幹細胞培養上清髄腔内投与でも再現されたことから、間葉系幹細胞からの神経栄養因子の傍分泌が改善効果に寄与している可能性を考えている。今後、間葉系幹細胞から分泌される未知の神経栄養因子を探索する予定である。

E. 結論

間葉系幹細胞髄腔内投与は脊髄小脳変性症1型マウスに対して治療効果をもたらした。間葉系幹細胞が分泌すると予想

される神経栄養因子を探索する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H: Mesenchymal stem cells ameliorate cerebellar pathology in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum*, in press.
- 2) Konno A, Shuvaev AN, Miyake N, Miyake K, Iizuka A, Matsuura S, Huda F, Nakamura K, Yanagi S, Shimada T, Hirai H: Mutant ataxin-3 with abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar Purkinje cells. *Cerebellum* 2014;13:29-41

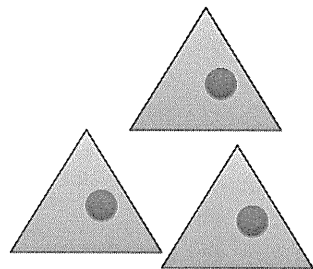
2. 学会発表

- 1) 中村 和裕, 平井 宏和 : 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. 第3回国際放射線神経生物学会, 2013年1月25-26日

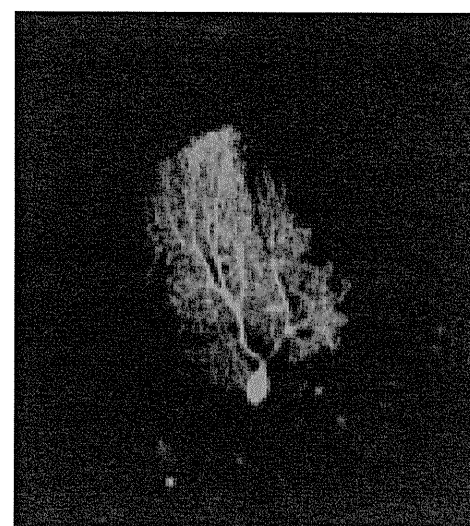
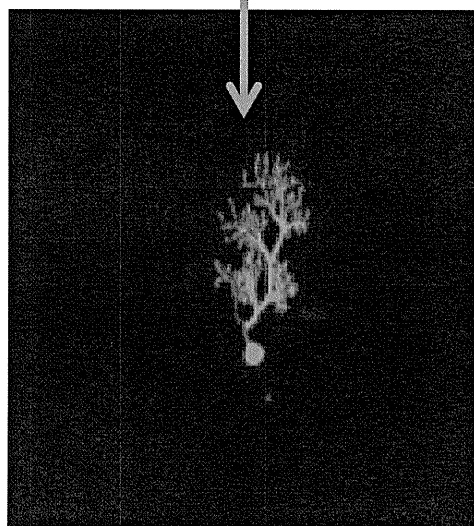
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

間葉系幹細胞



神經栄養因子



樹状突起退縮抑制
運動機能改善