

脊髄小脳変性症の分子病態機序の解明と治療法の開発

研究分担者 辻 省次（東京大学医学部附属病院 神経内科）
共同研究者 三井 純、石浦浩之、市川 弥生子、高橋祐二、後藤 順
（東京大学神経内科）
高 紀信（山梨大学神経内科）
嶋崎晴雄（自治医科大学神経内科）
吉村 淳、土井晃一郎、森下真一（東京大学新領域創成科学研究科）
佐々木秀直（北海道大学神経内科）
瀧山嘉久（山梨大学神経内科）
Japan Spastic Paraplegia Research Consortium

研究要旨

多系統萎縮症多発家系に対する連鎖解析から、COQ2 遺伝子のホモ接合性変異および複合ヘテロ接合性変異を、2 家系の発症者で同定した。さらに、COQ2 遺伝子の関連解析から、COQ2 遺伝子変異のキャリアーが、孤発性 MSA 患者の危険因子であることを明らかにした。常染色体劣性遺伝が当初疑われた遺伝性痙性対麻痺 88 例について exome 解析を行い、32 例（36%）で病原性変異を見出し、分子疫学を明らかにした。遺伝性脊髄小脳変性症については、exome 解析により、これまで診断未確定であった 1 家系について、SETX の既知のナンセンス変異(Q1441X)を同定し、SCAR1 (A0A2)であることを示した。常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症の 2 家系について、KCND3 のミスセンス遺伝子変異を認め(p. G345V, p. T377M)、SCA19/22であることを示した。

A. 研究目的

多系統萎縮症：MSA は原則的に孤発性だが、稀に家系内に複数の MSA 発症者のいる家族性 MSA (Hara et al. Arch Neurol. 2007) が存在する。遺伝因子の関与が強いと考えられる多発家系に対して病因遺伝子同定を行い孤発性患者の疾患感受性遺伝子である可能性を検討する。

遺伝性痙性対麻痺：常染色体劣性遺伝が疑われる HSP 症例について exome 解析を

施行し、本邦における分子疫学を明らかにする。

遺伝性脊髄小脳変性症：診断未確定の遺伝性脊髄小脳変性症について、exome 解析を用いて、病原性変異を明らかにすること、さらに、国際共同研究に基づき、SCA19/SCA22 の病因遺伝子として見出された *KCND3* について、本邦の常染色体優性遺伝性脊髄小脳失調症 (ADSCA) 家系における臨床遺伝学的検討を行う。

B. 研究方法

多系統萎縮症：家族性 MSA、6 家系のうち血族婚のある 1 家系について連鎖解析を行い、発症者 1 例の全ゲノム解析を行った。日本（患者 363 例、対照者 520 例）、欧州（患者 223 例、対照者 315 例）、北米（患者 172 例、対照者 294 例）からのサンプル群に対して COQ2 遺伝子の全エクソン配列解析を行った。同定された変異に対して機能解析を行った。

遺伝性痙性対麻痺：対象は 88 例。SureSelect V5+UTR (Agilent) を用いてエクソン領域を濃縮し、HiSeq2500 (Illumina) を用いてエクソーム配列解析を実施した。

遺伝性脊髄小脳変性症：

1) 診断未確定 ARSCA の一家系 (Kobayashi et al. J Neurol Sci. 2007)：発症者 2 名（発端者および同胞 1 名）、同胞非発症者 1 名の DNA 検体を用いて連鎖解析を行い候補領域を定めた。発端者について exome 解析を行った。得られた変異については、直接塩基配列解析を行い、家系内での変異を確認した。

2) SCA19/22 の臨床遺伝学的検討：

自験例 ADSCA450 家系のうち原因未同定であった 54 家系を対象に、SCA19/22 の疾患遺伝子 *KCND3* の変異の有無について検討した。*KCND3* の各 exon について、直接塩基配列解析にて遺伝子変異を検索した。PCR 条件、プライマー配列およびについては、*KCND3* に関する既報告 (Postma AV et al. Hum Genet, 2000) に従った。

(倫理面への配慮)

本研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、

東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会からの承認を受けて実施する。

C. 研究結果

多系統萎縮症：

家族性 MSA、6 家系のうち血族婚のある 1 家系について連鎖解析を行い、発症者 1 例の全ゲノム解析を行った。候補領域のアミノ酸置換変異のうち、既存のデータベースに存在せず、日本人の健常者 180 人に認めない変異を検索したところ、COQ2 遺伝子の M78V ホモ接合性変異のみが残った (COQ2 遺伝子には他に比較的頻度の低い V343A 変異も同定された)。以上より、COQ2 遺伝子の M78V-V343A 変異が発症に関わっている可能性が高いと考えられた。残りの 5 家系についても、COQ2 遺伝子をシーケンスしたところ、もう 1 家系で発症者 2 例に R337X/V343A の複合ヘテロ接合性変異が独立して確認され、家系内の共分離も確認された。M78V-V343A ホモ接合性変異患者の凍結脳組織や R337X/V343A 複合ヘテロ接合性変異患者のリンパ芽球様細胞では、コエンザイム Q10 の組織内濃度が低下していることが確認された。

日本（患者 363 例、対照者 520 例）、欧州（患者 223 例、対照者 315 例）、北米（患者 172 例、対照者 294 例）からの孤発性 MSA 患者・対照群に対して COQ2 遺伝子をシーケンスして変異の関連解析を行った。13 種類の変異 (P22L, F29L, P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, N336H, R337Q, V343A) が検出された。V343A の頻度は比較的高く日本人サンプルにの

み観察された。アレル頻度は患者群で 4.8%、対照群で 1.6%、オッズ比 3.05、 p 値 1.5×10^{-4} と有意な関連を認めた。V343A 変異キャリアー MSA 患者例の COQ2 酵素活性は、変異を持たない健常例と比べて低下していた。

酵母を用いた機能補完アッセイを行い、9 種類の変異 (P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, R337Q) が機能障害性であることを示した。全サンプルを合計すると 758 例の患者中 8 例、1129 例の対照者中 1 例に機能障害性変異がヘテロ接合性に認められ、オッズ比 11.97、 p 値 0.004 と有意な関連を認めた。

遺伝性痙性対麻痺：

合計 19 名 (21.6%) で AR-HSP の病原性変異が同定された。複合型とされた 8 症例からは、ALS2・ARSACS などの痙性対麻痺も呈しうる他の劣性遺伝疾患も見出された。上記に加え、5 例は常染色体優性遺伝疾患と判明した。

遺伝性脊髄小脳変性症：

1) 診断未確定 ARSCA の一家系の解析：
early-onset で軸索型末梢神経障害を伴う家系。発症者 2 名 (発端者および同胞 1 名)、同胞非発症者 1 名について連鎖解析を施行し、候補領域を定めた。発端者の exome 解析の結果、候補領域内に spinocerebellar ataxia autosomal recessive1: SCAR1 (AOA2) の疾患遺伝子 *SETX* の Q1441X 変異を認めた。家系内解析では、発症者のみホモ接合性に同変異を認めており、本家系における病原性変異と考えた。Q1441X は既知変異で本邦の家系から報告されている (Moreira et al. Nature Genet 2004)。発症者のうち 1 名

について、残血清を用いて確認したところ α FP 値の上昇を認め、SCAR1 に矛盾しない所見を認めた。

2) SCA19/22 の臨床遺伝学的検討：

遺伝子変異が未同定であった ADSCA54 家系のうち 2 家系において *KCNB3* のミスセンス遺伝子変異を認めた (p .G345V, p .T377M)。いずれの変異も *KCNB3* の膜貫通部位に位置していた。日本人正常対照者 96 名を同様の方法で検索したところ、これら 2 変異は認められなかった。 p .G345V 変異は海外の Ashkenazi Jewish American の家系にもみられた変異と同一であった。

本邦の 2 家系とも、緩徐進行性の小脳性運動失調を主徴とする臨床像であった。

p .G345V 変異をもつ本邦家系では、発端者および同胞は 50 歳代発症であるが、親は 90 歳代でふらつき自覚。 p .T377M の家系では、発端者および同胞は 10 歳代発症であるが、親が 40 歳代発症と世代間での発症年令の若年化がみられた。

D. 考察

多系統萎縮症：家系に対する連鎖解析にと患者・対照者群に対する関連解析によって MSA の遺伝因子の一部を明らかにした。同定された遺伝因子を手掛かりに新たな治療方法の開発につなげていきたい。

遺伝性痙性対麻痺：88 名中、合計 32 名 (36%) で病原性変異を同定し、本邦における分子疫学を明らかにした。

遺伝性脊髄小脳変性症：

ARSCA には多くの疾患が含まれ、診断確定は容易ではないが、exome 解析は診断確

定の手段として有用性が高いと思われる。

本邦の SCA19/22 の 2 家系については、緩徐進行性の小脳性運動失調を主徴とする臨床像で、台湾からの報告例と類似した臨床像であった。

E. 結論

多系統萎縮症の発症に関わる遺伝子として、*COQ2* 遺伝子を同定した。2 アレルに変異がある場合、多発家系の発症に関連し、1 アレルに変異がある場合は、孤発性多系統萎縮症の発症のリスクになる事を明らかにした。

常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺と分類された 88 例について、36%の症例で、病原性変異を明らかにした。

常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺と分類された 88 例について、36%の症例で、病原性変異を明らかにした。

臨床所見から診断確定が困難であった ARSCA の本邦一家系において、SCAR1 であることを見出した。臨床像が多彩で診断が困難であることが多い ARSCA において、exome 解析は診断確定の手段として有用性が高いことが明らかとなった。

本邦の常染色体優性遺伝性脊髄小脳失調症の家系においても SCA19/22 の家系が存在することを明らかにした。SCA19/22 は発症年齢の若年化を特徴とし、経過は長く、緩徐進行性である。小脳性運動失調を主徴とする疾患であるが、欧州からの報告例では多彩な臨床像を呈しており、今後の症例の蓄積により本邦の SCA19/22 症例の詳細な臨床像を明らかにしていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) The Multiple-System Atrophy Research Collaboration: Mutations in *COQ2* in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 2013; 369: 233-44
- 2) Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J, Morishita S, Goto J, Tsuji S: Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *J Neurol Sci* 2013; 331: 158-60
- 3) Lee Y-c, Dürr A, Majczenko K, Huang Y-h, Lien C-c, Ichikawa Y, Goto J, Monin M-C, Li JZ, Liu Y-t, Chung M-y, Mundwiller E, Shakkottai V, Liu T-t, Tesson C, Lu Y-c, Brice A, Tsuji S, Burmeister M, Stevanin G, Soong B-w: Mutations in *KCND3* cause spinocerebellar ataxia type 22. *Ann Neurol* 2012; 72(6): 859-869

2. 学会発表

- 1) 石浦ら:常染色体劣性遺伝が疑われた遺伝性痙性対麻痺症例の exome 解析、人類遺伝学会、2013 年 11 月、仙台
- 2) Mitsui J, et al: Mutations of *COQ2* in Familial and Sporadic Multiple System Atrophy. American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, October 24th 2013, Boston
- 3) 三井ら: *COQ2* 変異は家族性・孤発性多系統萎縮症と関連する. 第 58 回日本

人類遺伝学会, 2013 年 11 月 22 日, 仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

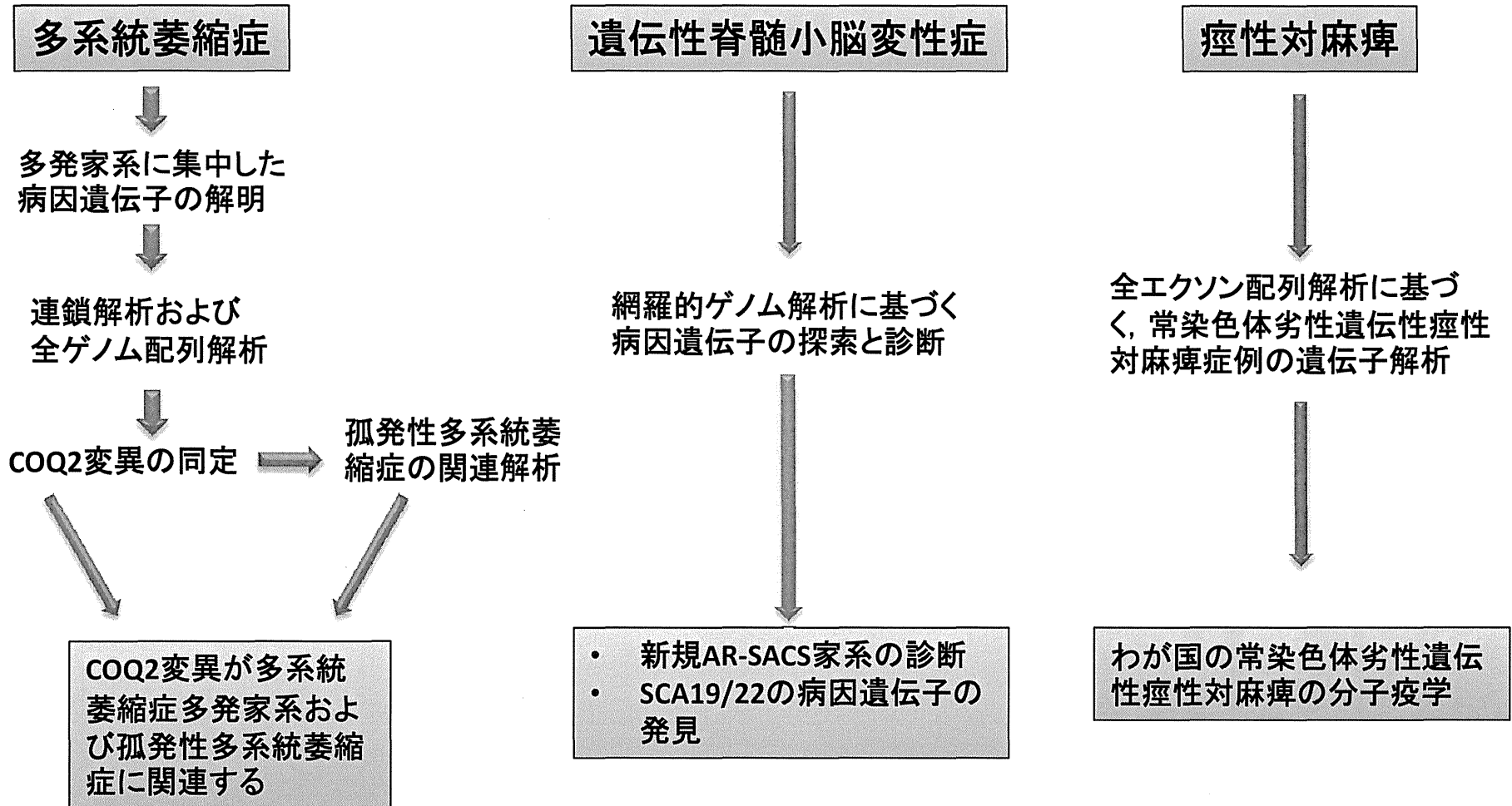
多系統萎縮症リスクの検査方法, 検査キット, 及び多系統萎縮症の治療又は予防薬 (特願 2013-20763)

2. 実用新案登録

3. その他

脊髄小脳変性症の分子病態機序の解明と治療法の開発

研究分担者 辻省次 (東京大学医学部附属病院 神経内科)



ポリグルタミン病の病態機序解明と創薬

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 武内 敏秀、鈴木 マリ、畑中 悠佑、藤掛 伸宏、
ポピエル 明子、和田 圭司 (同上)

研究要旨

本研究では、ポリグルタミン病について、特に蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的として、病態機序解明と創薬を目指した研究を行い、以下の成果を得た。1) 蛋白質凝集を抑制する分子シャペロン Hsp40 がエクソソームを介して細胞外に分泌され、非細胞自律的な治療効果を発揮することを明らかにした。2) さらに、カロリー制限によりインスリンシグナルを介して蛋白質凝集が抑制され、神経変性が抑制されることを明らかにした。一方、3) ポリグルタミン病における神経機能障害の発現メカニズムとして、発達期のシナプス成熟障害が寄与する可能性を明らかにした。本研究により、ポリグルタミン病の病態機序解明が進み、創薬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・凝集を生じて神経機能障害をきたし、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、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、分子シャペロンの作用メカニズム、食事などの環境要因の寄与、シナプス異常による神経機能障害に着目して、以下の研究を行った。

B&C&D. 研究方法・結果および考察

①分子シャペロン Hsp40 の PolyQ 病モ

デルに対する治療メカニズムの検討

これまでに分子シャペロン Hsp40 発現ウイルスベクターを用いたハンチントン病モデルマウスの遺伝子治療実験から、驚くべきことに、ウイルス非感染細胞における治療効果も見出し、私たちは分子シャペロンが非細胞自律的 (non-cell autonomous) な治療効果を発揮する可能性を考えた。

本研究では、この仮説の検証、そのメカニズムを解明するために、培養細胞モデルを用いた実験を行った。その結果、細胞培養液上清から精製したエクソソーム分画にて Hsp40 が検出され、これらがエクソソーム経路を介して細胞外に分泌されることを明らかにした。さらに、ト

ランスウェルを用いた共培養実験により、分泌されたエクソソームは異常伸長 PolyQ 蛋白質を発現する別の細胞内に取り込まれ、非細胞自律的 (non-cell autonomous) に PolyQ 封入体を抑制することを明らかにした。

②食環境が PolyQ 病モデル病態に与える影響の解明

近年、糖尿病などの栄養・エネルギー代謝異常がアルツハイマー病 (AD) 発症や加齢に与える影響が注目されている。本研究では、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、ショウジョウバエモデルを用いて、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。

PolyQ 病あるいは AD モデルショウジョウバエを様々な餌条件にて飼育したところ、低栄養餌によりいずれも運動障害、寿命短縮、複眼変性が有意に改善した。そして、低栄養餌により PolyQ 病モデルの蛋白質凝集が抑制されることが明らかになった。さらにカロリー制限による複眼変性改善効果は、IRS (insulin receptor substrate) 遺伝子の変異により消失することが明らかになった。

③2光子レーザー顕微鏡を用いた SCA1 マウス脳 *in vivo* イメージング解析

これまでに PolyQ 病モデルマウスを用いた解析から、神経症状は神経細胞死に至る前の可逆的神経機能障害の段階で出現することが明らかにされた。本研究では、神経機能障害メカニズムとしてシナプス異常に着目して、2光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* イメージング解析を行った。

脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) ノックインマウスと Thy1-YFP マウスの交配により得た SCA1-154Q/Thy1-YFP マウスについて、経時的に 2光子レーザー顕微鏡解析を行った。その結果、発症前のシナプス発達期 (4 週齢) から、明らかなシナプス形態異常は認めないものの、シナプスのターンオーバー率 (新生/消失) が有意に亢進しており、シナプス成熟期でも持続することが明らかになった。さらに、発症前から Homer1b/c、Shank などのシナプス足場蛋白質の発現が有意に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

Hsp40 はエクソソーム経路を介した細胞外分泌により、PolyQ 病に対して非細胞自律的 (non-cell autonomous) な治療効果を発揮することが明らかになった。さらに、分子シャペロンの細胞間伝播が個体レベルでの蛋白質恒常性 (プロテオスタシス) 維持に寄与する可能性が考えられた。

また、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、AD などの神経変性疾患の病態を改善すると考えられた。

さらに、PolyQ 病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. 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) Popiel HA, 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Popiel HA, Burke JR, Strittmatter WJ, Oishi S, Fujii N, Toda T, Wada K, Nagai Y: The aggregation inhibitor peptide QBP1 as a therapeutic molecule for the polyglutamine neurodegenerative diseases. *J Amino Acids* 2011; 2011: 265084
- 9) Konya C, Hatanaka Y, Fujiwara Y, Uchida K, Nagai Y, Wada K, Kabuta T: Parkinson's disease-associated mutations in α -synuclein and UCH-L1 inhibit the unconventional secretion of UCH-L1. *Neurochem Int* 2011; 59 (2): 251-258
- 10) Sun H, Satake W, Zhang C, Nagai Y, Tian Y, Fu S, Yu J, Qian Y, Qian Y, Chu J, Toda T: Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet* 2011; 56 (4): 330-334

- 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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)
 - 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 永井義隆, 和田圭司: ハンチントン病. 稀少疾患・難病の診断/治療技術と製品開発 (技術情報協会) 973-979 (2012)
 - 17) 永井義隆, 貫名信行: QBP1 を応用した異常伸長ポリグルタミン蛋白質の特異的分解. *臨床神経学* 2011; 51 (11): 1108-1110
 - 18) 永井義隆, 藤掛伸宏: ショウジョウバエモデルから解明された TDP-43 プロテノパチーの分子病態. *Dementia Japan* 2011; 25 (2): 129-136
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 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 Meeting (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) Nagai Y: Molecular targeted therapy against the toxic protein conformation and aggregation for the polyglutamine neurodegenerative disorders. Max Planck Institute& NCNP Joint Symp (Oct 3-6, 2012, Munich, Germany)
- 9) Nagai Y, et al: Non-cell autonomous therapeutic effects of Hsp40 on polyglutamine disease models via its exosome-mediated secretion. 2nd Int Conf of Neural Cell Culture (Jun 16, 2012, Tokyo)
- 10) Hatanaka Y, et al: 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 (Nov 5-9, 2012, Suzhou, China)
- 11) Suzuki M, et al: Aggravation of neurodegeneration by high-nutrient diet in *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. Keystone Symp on Aging and Diseases of Aging (Oct 22-27, 2012, Tokyo, Japan)
- 12) Takeuchi T, et al: Exosome-mediated cell-to-cell transmission of heat shock proteins contributes to the maintenance of protein homeostasis. EMBO Symp on Quality Control (Sept 19-22, 2012, Heidelberg, Germany)
- 13) Nagai Y, et al: Molecular mechanism of novel unconventional secretion of Hsp40 to function extracellularly. 6th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders (Jun, 2011, Barga, Italy)
- 14) Popiel HA, et al: Hsp40 exerts non-cell autonomous therapeutic effects on polyglutamine disease mice via its unconventional secretion. 6th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders (Jun, 2011, Barga, Italy)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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 日本神経科学会 (H24. 9. 18-21、名古屋)
- 18) 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 (H24. 5. 22-25、東京)

- 19) 永井義隆, 貫名信行: QBP1 を応用した異常伸長ポリグルタミン蛋白質の特異的分解. 第 52 回日本神経学会 (H23. 5. 18-20、名古屋)
- 20) 永井義隆: 異常凝集病と病態. 平成 23 年度大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質異常凝集の原理と制御」 (H23. 4. 27-28、大阪)

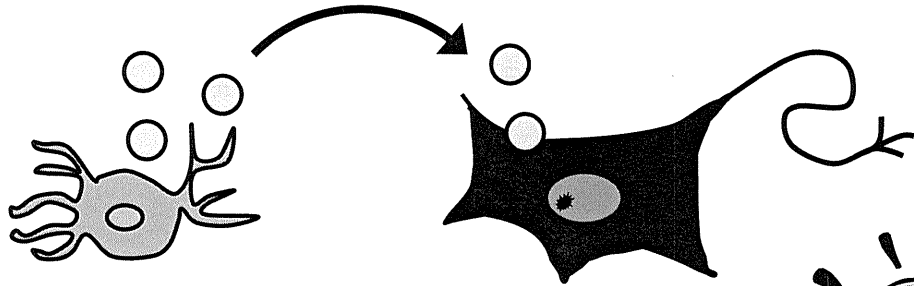
他、計 39 件

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

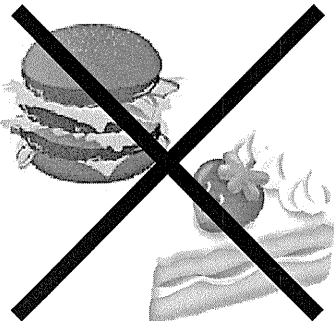
なし

ポリグルタミン病の病態機序解明と創薬

分子シャペロンの
細胞間伝播による治療効果

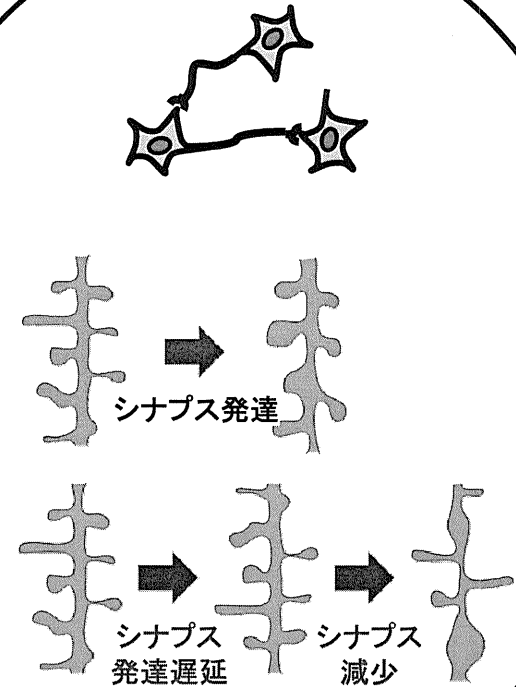


カロリー制限による
プロテオスターシス改善



- 予防・治療への応用
- 環境因子の解明

シナプス成熟障害



Machado-Joseph 病、脊髄小脳失調症 6 型の自然史に関する多施設共同研究

研究分担者	中島 健二（鳥取大学脳神経内科）
共同研究者	安井 建一（鳥取大学脳神経内科）
	矢部 一郎、佐々木 秀直（北海道大学神経内科）
	新井 公人（千葉東病院神経内科）
	澤井 摂、桑原 聡（千葉大学神経内科）
	吉田 邦広（信州大学第三内科）
	伊藤 瑞規、祖父江 元（名古屋大学神経内科）
	小野寺 理（新潟大学脳研生命科学リソースセンター）
	西澤 正豊（新潟大学神経内科）

研究要旨

遺伝性脊髄小脳失調症の代表的疾患である Machado-Joseph 病、脊髄小脳失調症 6 型の自然史を把握することを目的に特定疾患調査個人票を有効利用し、多施設共同で自然史調査研究を行った。2007 年度特定疾患申請にあわせて開始し 5 年間の前向き調査を行った。合わせて 2003 年以降の個票を後ろ向き、前向きに集計した。5 年間の追跡結果をまとめた。SCA6 は SARA で 1.4 ポイント/年、MJD は ICARS で 3.8 ポイント/年変化した。5 年間の前向き調査では、MJD の ICARS は 3.5 ポイント/年、SCA6 の SARA は 1.15 ポイント/年変化することを明らかにした。個票内の IDR-ICARS, IDR-BI は前向き調査で用いたスケール（SARA、ICARS、BI）と良い相関を持っていた。

A. 研究目的

Machado-Joseph 病（MJD）、脊髄小脳失調症 6 型（SCA6）の小脳失調症状を前向き調査し、自然史を把握する。

B. 研究方法

共同研究施設に通院または入院中で本研究に同意が得られた MJD、SCA6 患者を対象とし、連結可能匿名化で臨床情報を年一回収集した。前向き研究では、難治性疾患克服研究事業（Intractable

Diseases Research:IDR）の特定疾患調査個人票（個票）、運動失調スケール（SCA6 では SARA、MJD では ICARS を用いた）、Barthel-index（BI）で評価した。IDR 個票からは部分的 ICARS（IDR-ICARS、0-26）、部分的 BI（IDR-BI、0-55）を抽出した。調査開始時に後ろ向き研究として、過去の個票（2003 年以降の現行の個票）を収集し、個票の有用性評価、前向き研究との比較を行った。

(倫理面への配慮)

調査は匿名符号化を用いて個人情報削除したデータを解析し、事務局である鳥取大学医学部の倫理委員会の承認を得たのち、各共同研究施設での倫理委員会承認を経て研究を実施した。

C. 研究結果

2007-2008 年に症例登録し、2013 年度で予定していた5年間の追跡を終了した。5年間の追跡率は MJD (42 例) で 36%、SCA6 (49 例) で 80%であった。

前向き研究

[MJD]

追跡率は1年目 90%、2年目 88%、3年目 62%、4年目 45%、5年目 36%で、3年目以降の追跡率が低下した。追跡中、2例が死亡、25例が追跡困難となった。1年以上追跡した38例の平均追跡期間は3.6年±5.4年であった。5年間の追跡でΔICARS/年は3.5±1.8であった。ΔBI/年は-5.33±2.97であり、歩行、車椅子移乗動作の点数低下が目立った。

[SCA6]

追跡率は1年目 96%、2年目 94%、3年目 92%、4年目 88%、5年目 71%で、高い追跡率を維持することが出来た。追跡中、4例が死亡、6例が追跡困難となった。1年以上追跡した47例の平均追跡期間は4.6年±0.9年であった。5年間の追跡でΔSARA/年は1.15±0.68で、歩行、立位、指追跡運動で点数変化が目立った。ΔBI/年は-2.06±2.31とMJDより低下は目立たなかった。歩行、車椅子移乗動作で点数低下が目立つ傾向は同様であった。

IDR 個票評価

前向き調査5年を終え、後ろ向きと合わせ、10年分のデータが蓄積された。

[MJD]

IDR-ICARS、IDR-BIは登録時それぞれ15.2±7.1、35.8±16.6であった。調査全期間(前向き後ろ向き全体)10年間はほぼ線形に推移していた。IDR-ICARSは全期間で0.93ポイント/年、前向き研究で0.99ポイント/年、後ろ向き研究で0.82ポイント/年の変化であった。

[SCA6]

IDR-ICARS、IDR-BIは登録時それぞれ14.8±6.0、37.3±15.0であった。調査全期間(前向き後ろ向き全体)10年間はほぼ線形に推移していた。IDR-ICARSは全期間で0.67ポイント/年、前向き研究で0.64ポイント/年、後ろ向き研究で0.68ポイント/年の変化であった。

MJDのIDR-ICARSはSCA6のIDR-ICARSに比して有意に大きく変化した。

IDR-ICARS、IDR-BIはともにICARS(またはSARA)、BIと良好な相関関係にあった。

D. 考察

5年間の長期にわたる多施設共同自然史研究を行った。各疾患の進行度は海外で報告されているものと同程度であり、長期追跡である点からも有用なデータである。個票内のIDR-ICARS、IDR-BIは前向き調査で用いた国際的スケール(SARA、ICARS、BI)と良い相関を持っており、簡便な追跡スケールとしての意義を明らかにした。

E. 結論

自然史研究5年間の追跡調査を終えた。

5年間の前向き調査では、MJDのICARSは3.5ポイント/年、SCA6のSARAは1.15ポイント/年変化することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura T, Inoue Y, Högl B, Uemura Y, Yasui K, Sasai T, Namba K, Nakashima K: Comparison of the clinical features of rapid eye movement sleep behavior disorder in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Psychiatry Clin Neurosci* 2011; 65(3): 264-71

2. 学会発表

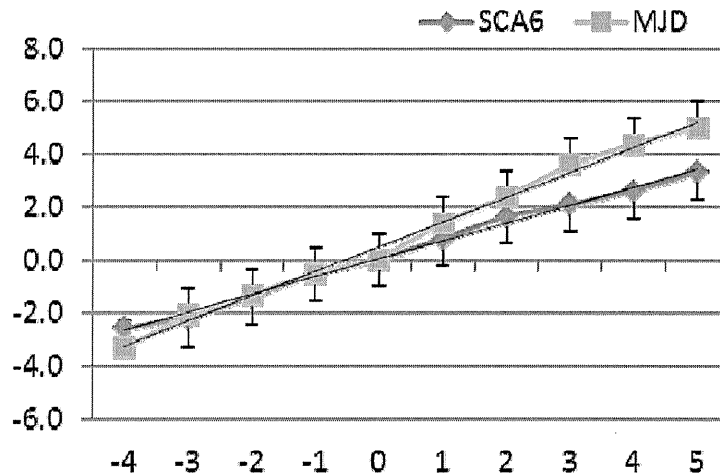
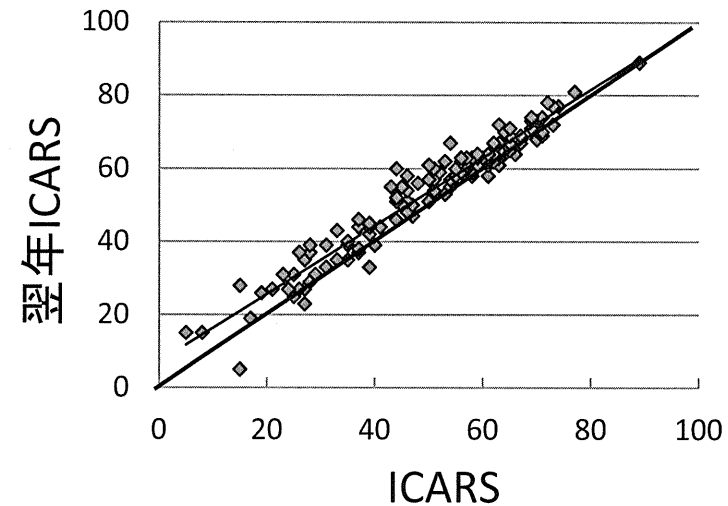
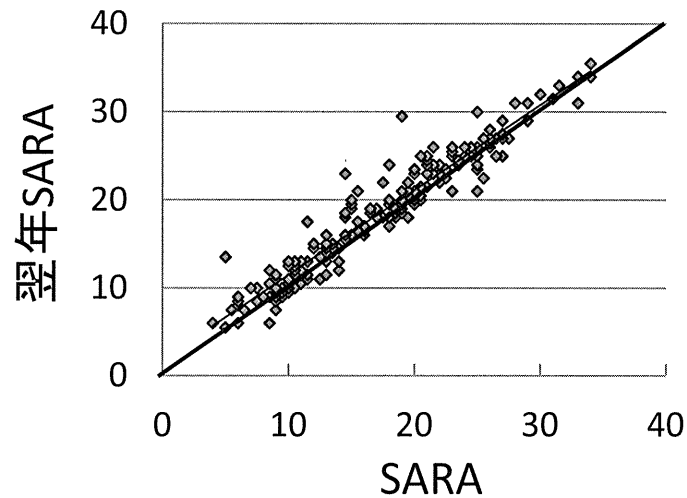
- 1) 安井建一, 中島健二ほか: 特定疾患調査個人票を用いた脊髄小脳変性症6型の自然史調査. 第52回日本神経学会学術集会, 2011.5/18, 名古屋
- 2) 安井建一, 中島健二ほか: 小脳失調症のリズム解析評価の試み. 第54回日本神経学会, 2013年5/29-6/1, 東京
- 3) 野村哲志, 中島健二ほか: 多系統萎縮症のREM期睡眠行動異常症の経過. 7回MDSJ, 2013年10/10-12, 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

【 MJD・SCA6の多施設共同自然史研究】

脊髄小脳変性症の縦断的自然史調査。
5年間の追跡調査を行いました。



個人調査票を活用した症状
データを解析し、疾患の実
態把握に有用なデータを収
集しました。

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とそれ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

遺伝性脊髄小脳変性症 1 型患者で観察される末梢神経機能異常が遺伝性脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスで観察されるか調べたところ、脊髄前角運動神経核内にポリグルタミン凝集体を認め、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。

次に、この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したところ、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、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

脊髄小脳変性症は根治療法がない難病であり、約 3 割が遺伝性である。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。実際に脊髄小脳変性症 1 型患者脳の大規模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 型ノックインマウス脳の形態、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し、更にそれらに対する間葉系幹細胞髄腔内投与の治療効果検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

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。

間葉系幹細胞による治療実験では、生後 5 週令の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、生後 25 週以上に達した時に形態学的、電気生理学的解析を行った。

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。

間葉系幹細胞の髄腔内投与を施されたノックインマウスでは軸索の変性が軽減し、腰髄刺激時の下肢筋肉収縮開始時間延についても部分的な改善が見られた。

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事、これら 2 点がそ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。

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、ノックインマウスで観察される末梢神経機能異常が部分的に改善されたが、今後、間葉系幹細胞からの神経栄養因子の傍分泌が本改善効果に寄与している可能性について探求する予定である。

E. 結論

脊髄小脳変性症 1 型患者で見られる末梢神経機能異常が脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウスでも見られ、それらは間葉系幹細胞髄腔内投与により部分的に改善された。

F. 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
- 3) 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

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, 沖縄