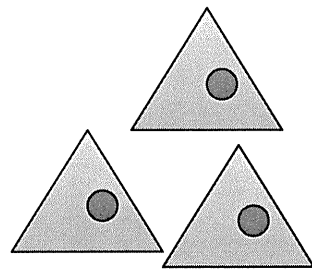
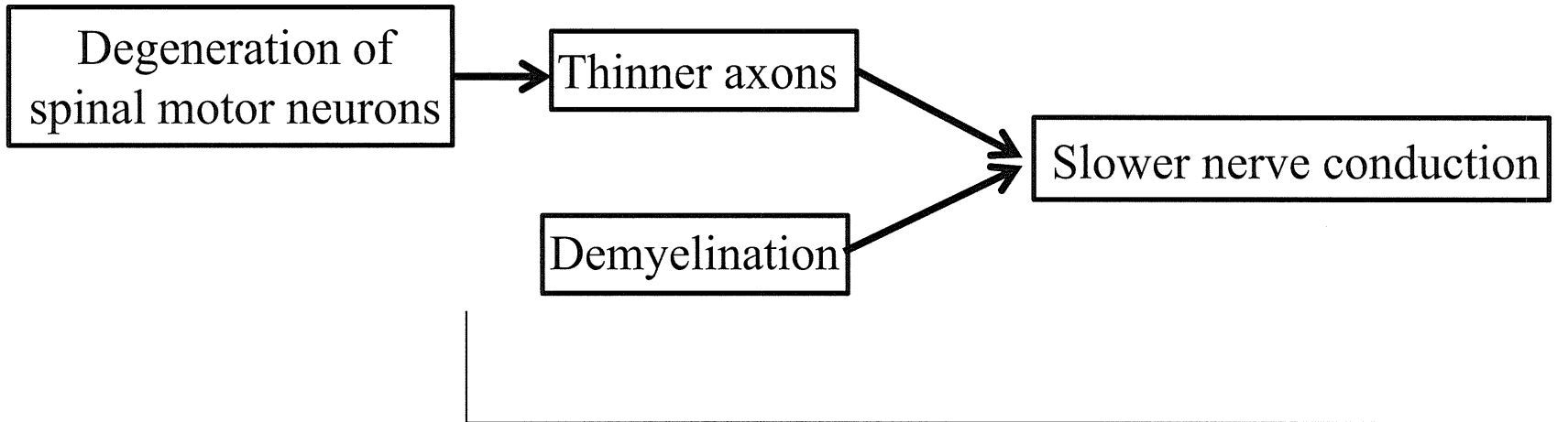


SCA1 mouse



Mesenchymal stem cells



Neurotrophic factor



Restoration

ロシア・ヤクート人との比較による SCA1 発症に関わる疫学研究
および小脳性運動失調の定量評価法の開発 (iPatax)

研究分担者 西澤 正豊（新潟大学脳研究所 神経内科）
共同研究者 他田 正義（新潟大学脳研究所 神経内科）
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）
高橋 俊昭（新潟大学医学部保健学科）
堅田 慎一（新潟大学脳研究所 神経内科）
土屋 美由紀（新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野）
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）
Maksimova Nadezda
(Yakut Scientific Center of Complex Medical Diseases of RAMS)

研究要旨

2つの研究課題について報告する。(1) ロシア・ヤクート人との比較による SCA1 発症に関わる疫学研究では、SCA1 の発症年齢に影響する環境・遺伝学的要因を明らかにすることを目的として、本邦 27 例および SCA1 の集積が多いロシア・サハ共和国のヤクート人 60 例の臨床遺伝学的比較検討を行った。その結果、同じ伸長 CAG リピート数であっても、ヤクート人症例の発症年齢が日本人症例に比べ 9 歳若年化していること、比較的環境要因が均一なヤクート人症例でも伸長 CAG リピート数の発症年齢に対する寄与率が 60%にとどまることを明らかにした。(2) 小脳性運動失調の評価法開発の研究では、鋭敏で信頼性の高い小脳性運動失調の新たな定量評価法を確立するために、iOS6.0/iPad を用いた検査システム iPatax (iPad Application for Evaluating Ataxia) を開発した。本検査システムにおいて、小脳性運動失調の臨床重症度 SARA と視標追跡課題における速度の変動係数が高い正の相関を示すこと、速度の変動係数は運動学習により課題遂行の後半に低下し、その学習効率は健常群に比して脊髄小脳変性症患者群で低下することを明らかにした。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、運動学習を評価できる可能性が期待できる。

A. 研究目的

(1) ロシア・ヤクート人との比較による SCA1 発症に関わる疫学研究：ポリグ

ルタミン (polyQ) 病では、伸長 CAG リピート数と発症年齢、疾患重症度の間に強い負の相関が認められ、CAG リピート数が

長いほど若年で発症し、重症化する。PolyQ 病の発症年齢の分散に対する伸長 CAG リピート数の寄与率（決定係数）は 40～80%と推定され、伸長 CAG リピート数は発症年齢を規定する最重要因子である。しかし、発症年齢分散の 20～60%以上が他の因子に起因しており、伸長 CAG リピート数以外の規定因子を明らかにすることは病態・治療研究を進める上で重要である。私たちは、ロシア・サハ共和国（ヤクーチア共和国）の Yakut Scientific Center of Siberian Department of Russian Academy of Medical Sciences (RAMS) との共同研究から、ヤクート人の中に脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) が多く集積していること、さらに、同じ伸長 CAG リピート数であっても本邦の SCA1 に比べ発症年齢が若年化していることを見出した。本研究では、SCA1 の発症年齢に影響する環境・遺伝学的要因を明らかにすることを目的とし、ヤクート人および日本人 SCA1 症例の臨床遺伝学的比較検討を行った。

(2) 小脳性運動失調の定量評価法の開発：小脳性運動失調の臨床評価尺度として国際的に広く使用されている 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、カテゴリー変数によって半定量的に評価する方法である。簡便で重症度評価には有用であるが、僅かな症状の変化を捉える必要のある脊髄小脳変性症 (SCD) の治療介入試験の評価法としては、鋭敏性に乏しく、評価者内・評価者間誤差が大きい等の深刻な欠点を有する。本研究では、鋭敏で信頼性の高い

小脳性運動失調の定量評価法を確立することを目的とし、iOS6.0/iPad を用いた検査システム iPatax (iPad Application for Evaluating Ataxia) を開発した。臨床評価尺度 SARA や従来の定量評価法との比較検討から、本検査システムの有用性を検証した。

B. 研究方法

(1) ロシア・ヤクート人との比較による SCA1 発症に関わる疫学研究：1990 年 4 月～2011 年 3 月の過去 22 年間に、当研究室で遺伝子診断された SCA1 日本人患者 27 例、および Yakut Scientific Center で遺伝子診断されたヤクート人患者 60 例を対象とした。CAG リピート数の測定は、患者末梢血リンパ球から抽出したゲノム DNA と蛍光標識 DNA プライマーを用いて増幅させた PCR 産物を検体として、ABI377 を用いて行った。発症年齢を規定する因子として、性別、家族内発症数、父方・母方遺伝、伸長 CAG リピート数、正常アレルの CAG リピート数を解析した。

(2) 小脳性運動失調の定量評価法の開発 (iPatax)：以下の iPatax 検査プログラムを用いた。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 3)。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第 1 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 $[\Delta CVS1-S3 = (CVS1-CVS3)/CVS1]$ を算出した。対象：健常者36例（平均年齢41.5歳），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；平均年齢60.1歳）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，iPatax検査項目の測定値を解析した。統計解析はSPSS ver. 12.0を使用した。

（倫理面への配慮）

本研究は全て被験者から書面での同意を得た上で実施した。遺伝子検査は，各研究機関の遺伝子倫理委員会の承認を得た上で，ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針，疫学研究に関する倫理指針，研究機関で定めた倫理規定等を遵守して実施した。

C. 研究結果

（1）ロシア・ヤクート人との比較によるSCA1発症に関わる疫学研究：

日本人27例，ヤクート人60例は全例が正常アレルと伸長アレルのヘテロ接合体であった。平均発症年齢は，日本人43.9歳，ヤクート人36.8歳，ヤクート人が若い傾向がみられた。男女比は，日本人では差はないが，ヤクート人では女性に多い傾向がみられた。伸長CAGリピート数は日本人 46.9 ± 6.51 ，ヤクート人 $46.4 \pm$

5.11，正常CAGリピート数は日本人 28.5 ± 1.55 ，ヤクート人 28.9 ± 1.03 で差は認めなかった。日本人，ヤクート人ともに，正常アレルは25-32リピートの範囲に分布し，異常アレルは39-64リピートの範囲に分布し，両群間でリピート数の分布に大きな差はみられなかった（図1）。

ヤクート人および日本人の両群において，伸長CAGリピート数と発症年齢の間に有意な負の相関を認めた（ヤクート人 $r = -0.806$ $p < 0.001$ ，日本人 $r = -0.665$ ， $p < 0.001$ ，図2）。発症年齢の分散に対する伸長CAGリピート数の寄与率は，日本人42.0%，ヤクート人64.4%であった。興味深いことに，近似直線から算出される発症年齢は，39-64リピートの範囲で，日本人に比べヤクート人で平均 9.08 ± 1.69 歳若年化していた（図2）。収集できた臨床・遺伝情報（性別，家族内発症数，父方・母方遺伝，正常アレルのCAGリピート数）の中で，伸長CAGリピート数以外に発症年齢と相関する項目はなかった。

（2）小脳性運動失調の定量評価法の開発：

課題の至適条件の検証：どのような運動課題が小脳性運動失調を評価するのに適しているのかを明らかにするために，等速移動する視標追跡課題の条件（周回 vs 反復，速い速度 vs 遅い速度，検査の前半 vs 後半）を変えて，各条件における速度の変動係数と重症度SARAとの相関を比較検討した。その結果，非連続な（等速曲線運動では周回（ $r = 0.659$ ， $p < 0.001$ ）よりも反復（ 0.665 ， $p < 0.001$ ）），比較的ゆっくりとした（曲線では4秒/周（ $r = 0.577$ ， $p < 0.001$ ）よりも6秒/周

($r=0.665$, $p<0.001$), 直線では 15cm/2 秒 ($r=0.593$, $p<0.001$) よりも 15cm/3 秒 ($r=0.699$, $p<0.001$) 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ることが示唆された。また, 検査の最初 (第 1 区間 S1, $r=0.625$, $p<0.001$) よりも後半 (第 2+3 区間, $r=0.678$, $p<0.001$) の方が重症度と高い相関を示した。したがって, 以下の解析では, 反復運動で遅い速度を設定し, さらに (最初の 20 秒間を練習区間として) 後半の第 2+3 区間の測定値を採用して解析した。

速度の変動係数 CV と重症度 SARA との相関: 等速直線反復運動 (15 cm/3 秒) における速度の変動係数 CV は, SARA 合計 ($r=0.699$, $p<0.001$, 図 4A) および SARA 上肢機能 ($r=0.627$, $p<0.001$) と各々高い正の相関を示した。同様に, 等速曲線反復運動における速度の変動係数 CV も SARA 合計 ($r=0.665$, $p<0.001$, 図 4B) および SARA 上肢機能 ($r=0.577$, $p<0.001$) と正の相関を示した。iPatax 検査は, 従来の定量評価法である重心動揺検査の総軌跡長 ($r=0.569$, $p<0.001$) や矩形面積 ($p=0.614$, $p<0.001$), あるいは Timed Up and Go Test (椅子から立ち上がり 3m を往復して着席するまでの時間) ($r=0.608$, $p<0.001$) よりも SARA 合計と高い相関を示した。

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変動係数 CV の減少を認めた (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・E. 考察と結論

(1) ロシア・ヤクート人との比較による SCA1 発症に関わる疫学研究: ヤクート人 SCA1 患者の発症年齢が, 同じ伸長 CAG リピート数であっても, 日本人患者に比べて 9 歳若年化していることを明らかにした。比較的環境要因が均一と考えられるヤクート人でも伸長 CAG リピート数の寄与率が 60%に留まることから, 他の遺伝学的要因が発症年齢に寄与していると推測される。SCA1 発症に関わる環境・遺伝学的要因を明らかにするために, 今後, より詳細な臨床情報の収集・解析および網羅的な遺伝子多型解析を行う必要がある。

(2) 小脳性運動失調の定量評価法の開発: iPatax 検査システムは, 従来の臨床重症度 SARA と非常に高い相関を示すばかりでなく, 連続変数による定量評価を汎用性の高い安価な機器で実施可能としたことにより, 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。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くなることが示された。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, 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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasuga K, Ikeuchi T, Arakawa K, Yajima R, Tokutake T, Nishizawa M: A patient with fragile x-associated tremor/ataxia syndrome presenting with executive cognitive deficits and cerebral white matter lesions. *Case Rep Neurol* 2011;3:118-123
- 2) 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* 2011;21:181-184
- 3) Shimohata T, Tomita M, Nakayama H, Aizawa N, Ozawa T, Nishizawa M. Floppy epiglottis as a contraindication of CPAP in patients with multiple system atrophy. *Neurology* 2011;76:1841-1842
- 4) Takado Y, Igarashi H, Terajima K, Shimohata T, Ozawa T, Okamoto K, Nishizawa M, Nakada T: Brainstem metabolites in multiple system atrophy of cerebellar type: 3.0-T magnetic resonance spectroscopy study. *Mov Disord* 2011;26:1297-1302
- 5) Yamazaki H, Nozaki H, Onodera O, Michikawa T, Nishizawa M, Mikoshiba K: Functional characterization of the P1059L mutation in the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 identified in a Japanese SCA15 family. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;410:754-758
- 6) Yokoseki A, Ishihara T, Koyama A, Shiga A, Yamada M, Suzuki C, Sekijima Y, Maruta K, Tsuchiya M, Date H, Sato T, Tada M, Ikeuchi T, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O: Genotype-phenotype correlations in early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminaemia. *Brain* 2011;134:1387-1399
- 7) Kanazawa M, Shimohata T, Endo K, Koike R, Takahashi H, Nishizawa M: A serial MRI study in a patient with progressive supranuclear palsy with cerebellar ataxia. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:677-679
- 8) Miyai I, Ito M, Hattori N, Mihara M, Hatakenaka M, Yagura H, Sobue G, Nishizawa M: Cerebellar Ataxia Rehabilitation Trialists Collaboration. Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases. *Neurorehabil Neural Repair* 2012;26:515-522
- 9) Ozawa T, Revesz T, Paviour D, Lees AJ, Quinne N, Tada M, Kakita A, Onodera O, Wakabayash K, Takahashi H, Nishizawa M, Holton JL: Difference in MSA Phenotype Distribution Between Populations: Genetics or Environment? *J Parkin Dis* 2012;2:7-18
- 10) Shimohata T, Nakayama H, Tomita M, Ozawa T, Nishizawa M: Daytime sleepiness in Japanese patients

- with multiple system atrophy: prevalence and determinants. BMC Neurol 2012;12:130
- 11) Furushima H, Shimohata T, Nakayama H, Ozawa T, Chinushi M, Aizawa Y, Nishizawa M: Significance and usefulness of heart rate variability in patients with multiple system atrophy. Mov Disord 2012;27:570-574
- 12) Ozawa T, Sekiya K, Sekine Y, Shimohata T, Tomita M, Nakayama H, Aizawa N, Takeuchi R, Tokutake T, Katada S, Nishizawa M: Maintaining glottic opening in multiple system atrophy: efficacy of serotonergic therapy. Mov Disord 2012;27:919-921
- 13) Ozawa T, Tokunaga J, Arakawa M, Ishikawa A, Takeuchi R, Mezaki N, Miura T, Sakai N, Hokari M, Takeshima A, Utsumi K, Kondo T, Yokoseki A, Nishizawa M: Abnormal ghrelin secretion contributes to gastrointestinal symptoms in multiple system atrophy patients. J Neurol 2013;260:2073-2077
- 14) 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
- 15) 西澤正豊:【神経疾患-その多彩な症状と診断手順】診断の方法と手順 運動失調. Clinical Neuroscience 2013;31:569-570
- 16) 西澤正豊: 神経疾患治療ノート 遺伝性脊髄小脳変性症に合併する末梢神経障害. Clinical Neuroscience 2013;31:1454-1455
- ## 2. 学会発表
- 1) 高橋俊昭, 石平悠, 堅田慎一, 他田正義, 他田真理, 佐藤俊哉, 柿田明美, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊: ヒト疾患脳におけるポリグルタミン病重合体の検出. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011/05/18, 名古屋
- 2) 小澤鉄太郎, 徳永純, 荒川武蔵, 竹内亮子, 小野寺理, 西澤正豊: 多系統萎縮症におけるグレリン分泌異常: gut-brain axis 障害の可能性. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011/05/17, 名古屋
- 3) 徳永純: 多系統萎縮症の QOL と影響因子に関する検討. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011/05/18, 名古屋
- 4) 他田正義, 高橋俊昭, 小野寺理, 西澤正豊, Paulson H L: 重合体形成阻害を標的としたポリグルタミン病の新規治療法開発. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011/05/18, 名古屋
- 5) Ozawa T, Tokunaga J, Arakawa M, Takeuchi R, Onodera O, Nishizawa M: Plasma ghrelin levels are affected in patients with multiple system atrophy: Evidence of gut-brain axis dysfunction. 15th International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders, Editorial Board Meeting, 2011/06/03, トロント (カナダ)
- 6) 下畑享良, 芹川武大, 明石真美, 横関明男, 土谷美和, 長谷川有香, 生

- 野寿史, 小池亮子, 高桑好一, 田中惠子, 田中憲一, 西澤正豊: 常染色体劣性遺伝性若年生パーキンソニズム (ARJP/PARK2) 患者の妊娠・出産. 第 5 回日本パーキンソン病・運動障害疾患学会 (MDSJ), 2011/10/05, 東京
- 7) 下畑享良: 睡眠医学と神経学「多系統萎縮症の睡眠障害について」. 36 回日本須眠学会学術集会シンポジウム, 2011/10/14, 京都
- 8) 小澤鉄太郎, 徳永 純, 荒川武蔵, 石川 厚, 竹内亮子, 横関明男, 西澤正豊: パーキンソン病と多系統萎縮症に共通するグレリン分泌異常. 第 63 回日本自律神経学会総会, 2011/10/26, 秋田
- 9) 下畑享良, 富田雅彦, 中山秀章, 相澤直孝, 小澤鉄太郎, 西澤正豊: 多系統萎縮症にみられる floppy epiglottis の検討. 第 29 回日本神経治療学会総会, 2011/11/16, 福井
- 10) 安井 建一(鳥取大学 脳神経内科), 矢部 一郎, 佐々木 秀直, 新井 公人, 金井 数明, 桑原 聡, 吉田 邦広, 伊藤 瑞規, 祖父江 元, 児矢野 繁, 小野寺 理, 西澤 正豊, 中島 健二: 特定疾患臨床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 53 回日本神経学会総会
- 11) 小澤鉄太郎, 徳永純, 石川厚, 荒川武蔵, 竹内亮子, 横関明夫, 西澤正豊: 多系統萎縮症の消化器症状にはグレリンが関与する. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013/05/30, 東京
- 12) 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
- 13) 下畑享良, 西澤正豊: 多系統萎縮症に対する NPPV 療法の継続に関する検討. 第 31 回日本神経治療学総会, 2013/11/22, 東京
- G. 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
とくになし

図1. 日本人とヤクート人SCA1患者のCAGリピート数

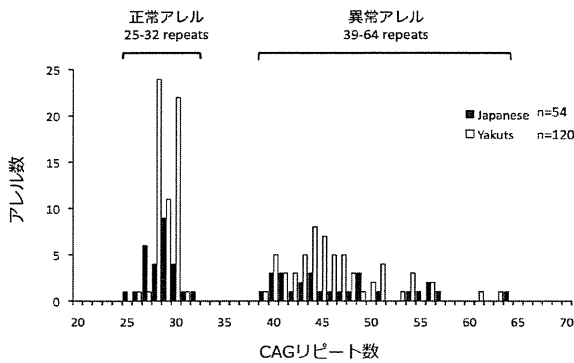


図2. 伸長CAGリピート数と発症年齢の関係

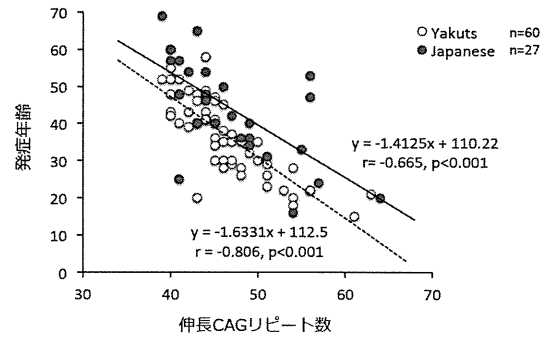


図3. iPatax 検査の概要

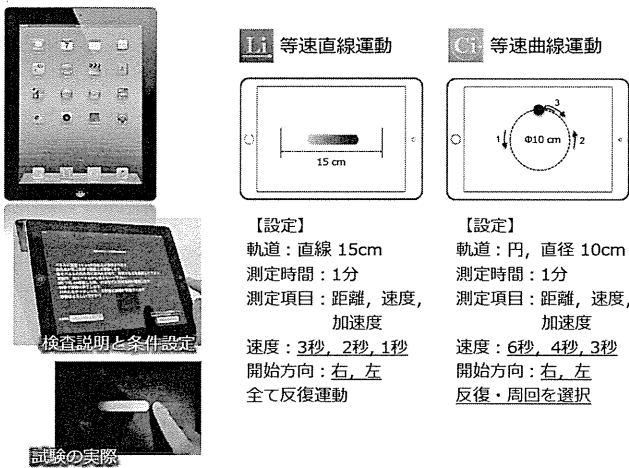


図4. 等速直線・曲線反復運動課題における速度の変動係数とSARAとの相関

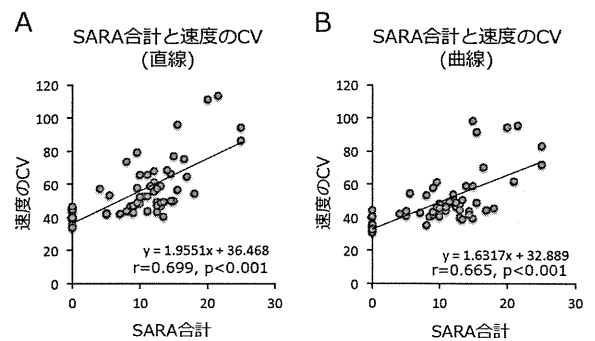
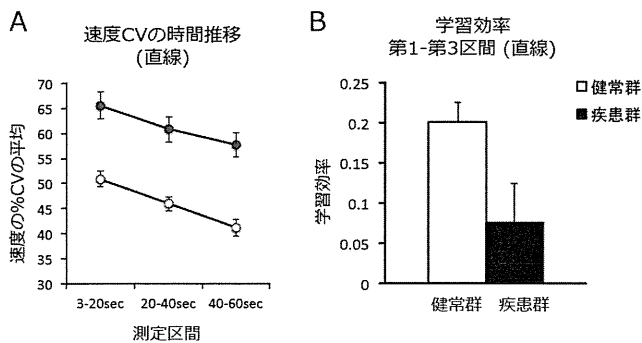


図5. 運動学習 (速度の変動係数の時間推移)



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、理化学研究所視床発生研究チーム)

共同研究者 黒澤 大、松本 弦 (理化学研究所視床発生研究チーム)

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中心に制御機構を検討した。我々は23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。24年度には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。その結果p62の染色性の悪いことを見出し、その原因として、死後変化の影響が大きいことを示した。25年度はp62の欠損およびAtg5の欠損がポリグルタミン病マウスの寿命、病理に及ぼす影響を検討した。ポリグルタミン病モデルマウスの寿命においてはp62欠損によってポリグルタミン伸長依存性に寿命の延長を認めた。その原因として細胞質における選択的オートファジーの障害が凝集を促進し、核移行を阻害し、核内での毒性が減少したためと考えられた。

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、p62S403リン酸化がその制御因子であることを見出したので、その様々な神経変性疾患における影響を検討した。またp62のノックアウトによるポリグルタミン病病態に対する影響を検討し、選択的オートファジーのポリグルタミン病における治療標的としての可能性について検討した。

B. 研究方法

- 1) 詳細はMatsumoto et al Mol Cell 2011に報告した。
- 2) モノクローン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、ALSなど）の剖検脳（パラフィン包埋切片）を染色した。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) p62ノックアウトマウスとハンチントン病モデルマウスR6/2, HD190QG (Kotliarova J Neurochem 2005), また

HD190QG からリピートの縮小を起こしたものを選択して確立した HD120QG を掛け合わせ、それぞれのモデルマウスで p62 ノックアウトの影響を寿命、病理学的に検討した。オートファジー全般を阻害したときの影響を見るため、Atg5 のノックアウトマウスと R6/2 の掛け合わせを行い、その寿命、病理への影響を検討した。

(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) p62 リン酸化部位として S24, S207, T269, S272, S282, S332, S366, S403 を同定した。このうち S403 のリン酸化がプロテアソーム阻害によって誘導され、オートファジー阻害によっても増加した。S403 リン酸化 p62 は p62 body を多く形成した。また ATG5 KO マウス脳においても蓄積が認められた。また S403 リン酸化はポリユビキチンとの結合を増すことを S403E 変異体や細胞内でリン酸化された p62 によって示した。

CK2 によって p62S403 は *in vitro* でリン酸化されること、またその阻害剤が細胞内でこのリン酸化を減少することなどを見出し、CK2 が S403 のリン酸化酵素の一つであることを示した。

さらに CK2 発現や脱リン酸化酵素阻害剤によってポリグルタミン発現細胞を処理するとポリグルタミン凝集体の形成が減少することを見出し、p62S403 のリン酸化によって選択的オートファジーが促進され、異常タンパク質の分解が促進するこ

とが示された。(Matsumoto et al. Mol Cell 2011)

2) 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。この結果から、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。

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) ポリグルタミン病モデルマウス R6/2 は 120-133 CAG repeats であるが、p62 のノックアウトによって寿命は 26% 延長した。また HD190QG (190 repeats) とこれからリピートの縮小したラインである HD120QG における p62 のノックアウトの影響は前者が 44%、後者が 27% の寿命延長の影響が認められ、これらのマウスでも p62 のノックアウトは寿命の延長を認め、その効果はリピートの長い方で強い傾向が認められた。これらの p62 をノックアウトしたマウスでは細胞質の封入体の増加を認め、核内封入体の減少を認めた。

選択的オートファジー阻害によって細胞質封入体の増加、核内封入体の減少が認められる原因が細胞質のオートファジー阻害によることを確認するため、R6/2においてAtg5をノックアウトした。このマウスにおいても細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少した。しかしながら寿命においてはAtg5ノックアウトによって短縮傾向を認めた。

D. 考察

選択的オートファジーの制御因子としてのp62S403のリン酸化を発見した。これによってユビキチン化された異常タンパク質の沈着をもたらす、様々な神経変性疾患の治療ターゲットとしての可能性が示された。一方様々な神経変性疾患においてp62が結合したユビキチン化された封入体が存在することが知られていたが、これらの封入体のp62のS403がリン酸化されているかどうかを検討した。リン酸化された封入体が少ないことが見出され、これは死後脱リン酸化が進む可能性によることを示した。死後変化のない状態でも脱リン酸化されている可能性もあり、そのためにオートファジー系の分解が遅れている可能性もあるので、今後の検討が必要である。

さらにp62をノックアウトしたときにポリグルタミン沈着に与える影響をモデルマウスを用いて検討した。その結果細胞質でオートファジーが抑制されるため、細胞質の封入体形成が促進され、核内封入体が減少し、寿命も延長すると行ったparadoxicalな影響を見出した。この結果はポリグルタミンの毒性が主に核内封入

体によるものであることを示唆し、細胞質における凝集を促進すると行ったparadoxicalな治療法の可能性があることが示された。

E. 結論

選択的オートファジーとポリグルタミン治療に関するp62を中心とした検討を行い、p62の治療標的としての可能性を示した。

F. 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 (in press)
- 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) Bauer PO, 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
- 5) 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
- 6) Bauer PO, Hudec R, Ozaki S, Okuno M, Ebisui E, Mikoshiba K, Nukina N: Genetic ablation and chemical inhibition of IP3R1 reduce mutant huntingtin aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 416: 13-7
- 7) Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N: Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell* 2011; 44: 279-89
- 8) Doi H, Yoshida K, Yasuda T, Fukuda M, Fukuda Y, Morita H, Ikeda S, Kato R, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Sakai H, Miyatake S, Shiina M, Nukina N, Koyano S, Tsuji S, Kuroiwa Y, Matsumoto N: Exome Sequencing Reveals a Homozygous SYT14 Mutation in Adult-Onset, Autosomal-Recessive Spinocerebellar Ataxia with Psychomotor Retardation. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 320-7
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 松本弦, 貫名信行:【細胞の分子構造と機能-核以外の細胞小器官】 ファゴソーム 選択的オートファジーによるユビキチン化タンパク質の処理機構. *生体の科学* 2012; 63: 490-1
- 12) 松本弦, 貫名信行:【神経筋疾患の分子標的治療開発】 p62 のリン酸化と選択的オートファジー. *BIO Clinica* 2012; 27: 916-20
- 13) 紀嘉浩, 貫名信行:【in vivo 実験医学によるヒト疾患解明の最前線 生体イメージングとモデル動物を用いた研究戦略と臨床応用】 (第3章) 疾患モデルと分子標的探索による治療薬開発 ハンチントン病の治療法開発とモデルマウスを用いた評価. *実験医学* 2012; 30: 349-56
- 14) 紀嘉浩, 黒沢大, 貫名信行: ハンチントン病モデルマウス. in 脳・神経疾患-疾患モデルの作成と利用 (ed. 三品昌美) 39-47 (エル・アイ・シー, 東京, 2011)

2. 学会発表

- 1) Nukina N: Autophagic machinery for degrading the misfolded proteins. The 6th International Symposium of Autophagy 2012, 61 (Nago, Japan)

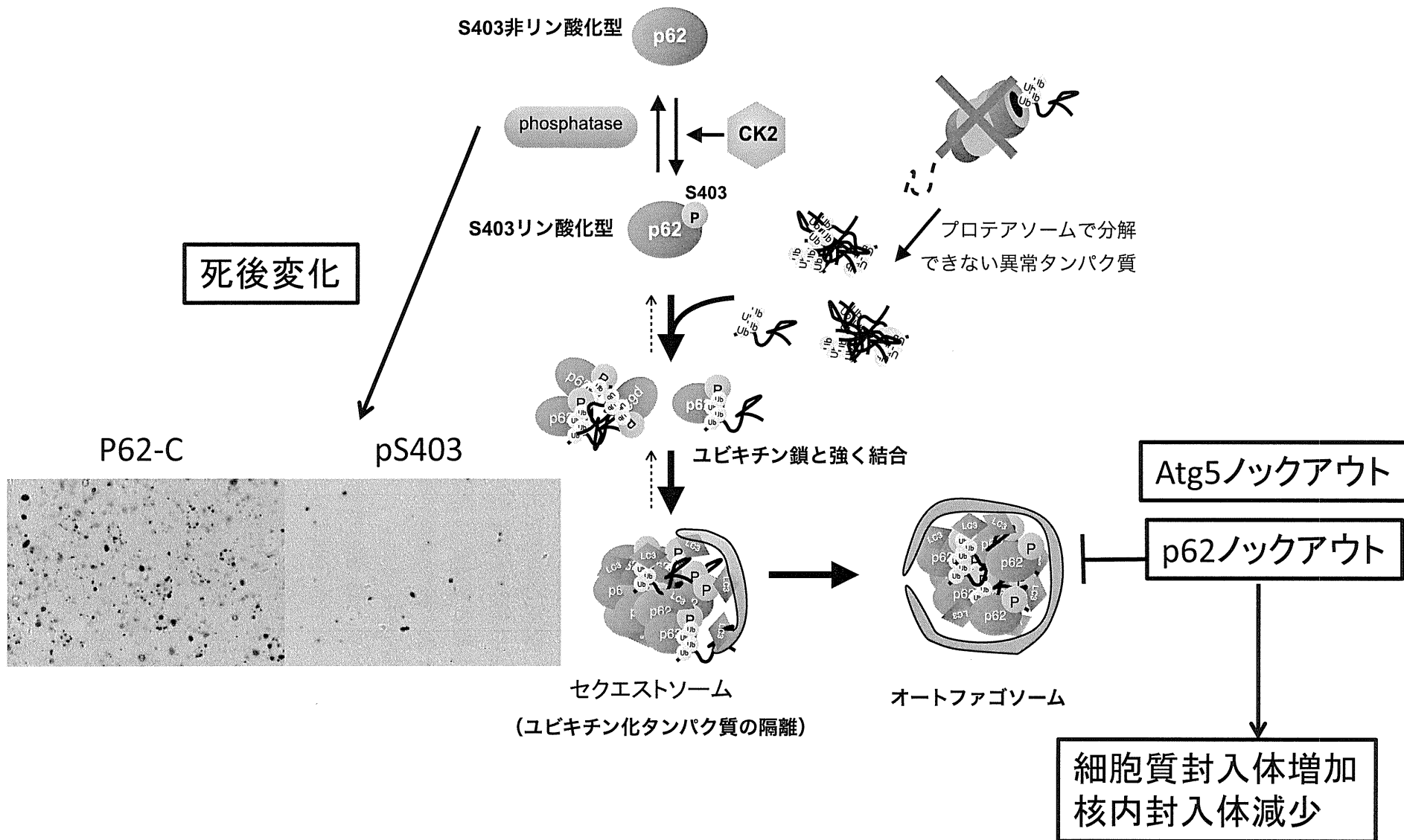
(2012/10/28- 11/01)

- 2) Nukina N: Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. Huntington's Disease WORLD CONGRESS 2011, 24 (Melbourne, Australia) (2011/09/11~14)
- 3) Nukina N: Enhancing the clearance of misfolded polyglutamine proteins. 2011 Gordon Research Conferences on CAG Triplet Repeat Disorders (Lucca (Barga), Italy) (2011/06/05-10)
- 4) Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N: Phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. Cold Spring Harbor Laboratory 2011 Meeting on the Ubiquitin Family (Cold Spring Harbor, USA) (2011/05/17~21)
- 5) 貫名信行: ポリグルタミン病の病態と治療戦略. 第3回神経科学と構造生物学の融合研究会 in 大阪(大阪大学蛋白質研究所) (2012/10/04-05)
- 6) 貫名信行: 凝集体形成からみた神経変性機序. 第52回日本神経学会学術大会, 178 in 名古屋(名古屋国際会議場) (2011/05/18-20)

G. 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

オートファジー制御と凝集体



脊髄小脳失調症(SCA) 31型の病態解析および小脳運動学習機能を定量評価する機器の開発

研究分担者 水澤英洋（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
共同研究者 石川欽也（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
尾崎 心（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
太田浄文（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
新美祐介（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
橋本祐二（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
佐藤 望（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
本多武尊（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)・
理化学研究所脳科学総合研究センター）
永雄総一（理化学研究所脳科学総合研究センター）

研究要旨

我が国には、多数の種類 of 優性遺伝性脊髄小脳変性症(SCA)が存在する。東京医科歯科大学の集積家系では、SCA患者の約30%がSCA31である。これは、小脳皮質が限局的に障害される病型である。本研究の目的は、まずSCA31の病態を明らかにすることである。今回我々は、培養細胞を用いた実験でSCA31の原因である5塩基繰返し配列(TGGAA)_nが、転写されRNA(UGGAA)_n配列として発現することが細胞毒性を示すことと、その際にRNAの高次構造異常(RNA foci)を形成することを明らかにした。一方、患者の小脳失調を客観的定量的に評価できる臨床マーカーの確立が重要な課題である。このため、我々は小脳の持つ運動学習機能に着目し、それを定量的に評価できる機器を開発した。この機器を用いると、ヒトにおける小脳運動学習機能がAdaptability index (AI)として表現でき、AI値は脊髄小脳変性症患者の運動失調症の程度はもちろん、加齢による脳機能の低下も評価することができることを明らかにした。

A. 研究目的

我が国に存在する優性遺伝性脊髄小脳変性症、脊髄小脳失調症31型(SCA31)の根本病態の解明を目的とする。さらに、患者の臨床症状を評価する方法の開発も行い、将来治療法の評価にも応用する。

B. 研究方法

①脊髄小脳失調症31型(SCA31)の病態研究

我々が2009年に発表したSCA31の原因である(TGGAA)_n(TAGAA)_n(TAAAATAGAA)_n配列を培養PC12細胞に発現する系を作製し

た。対照として、健常者に見られる (TAGAA)_n (TAAAATAGAA)_n 配列を発現する細胞系を作製し、遺伝子発現後の細胞死を LDH アッセイなどの方法で解析した。また、変異 DNA 配列が RNA に転写されたものが、異常高次構造 (RNA foci と呼ぶ) を形成するかを、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で解析した。また、患者脳組織でも同様に FISH 法を行い、RNA foci の検索も行った。

②運動学習機能を定量評価する機器開発とその臨床応用

個人差の少ない動作で正確かつ迅速に課題を遂行でき、リアルタイムに結果がモニターできるように、タッチスクリーンを用いた手の到達運動のプリズム適応課題を開発した。

評価はターゲットと、示指で触った位置の水平方向のずれ(距離)を測定した。運動学習の定量評価として、新たに定義した Adaptability index (AI) と、従来法の一つでプリズム装着時のずれの減衰の程度を数値化したもの (τ) とした。前者は、プリズム装着中最後の 10 トライアル中何回正確なタッチができたかの割合、プリズム脱着直後の 5 回中何回プリズムと反対方向に一定以上のずれが生じたかの割合、プリズム脱着後の最後の 10 トライアル中何回正確なタッチができたかの割合から算出した。AI の範囲は 0 (適応なし) から 1 (最適) で数値化した。後者はプリズム装着時のずれをプロットし指数関数で fitting した際の時定数 (τ) とした。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関する倫理的側面は、倫理指針に則って研究の計画を立案し、研究

計画は東京医科歯科大学で承認を受けた。また遺伝子に関する研究は、ヒトゲノム研究に関する倫理指針に則って研究の計画を立案し、研究計画は東京医科歯科大学で承認を受けた。そのうえで患者に口頭と文書で本研究の趣旨などを説明し、同意を得て研究に参加頂き、遺伝子研究では血液の採取とゲノム DNA の解析を行った。

C. 研究結果

①SCA31 の病態研究

培養細胞に変異遺伝子、すなわち RNA では (UGGAA)_n 配列が発現した際に (図 1 「SCA31」)、確かに細胞死が招来される

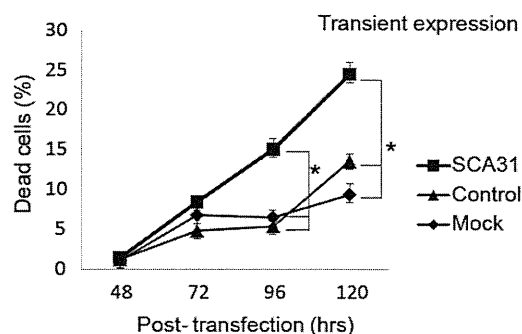


図 1

ことが判明した。一方、対照配列 (図 1 「control」) および mock は細胞死を来す効果が、変異配列での効果より統計的解析でも有意に低かった。

一方、(UGGAA)_n 配列を培養 PC12 細胞に発現すると、RNA foci が確認されたのに対し、Control 配列では RNA foci は形成されなかった。また、患者脳でも (UGGAA)_n に対するプローブで確かに RNA foci が形成されていることを確認した。以上より、SCA31 の病態には (UGGAA)_n が来す影響が

あり、RNA foci 形成が関係していると考えられた。したがって、根本的治療法の開発には(UGGAA)_n の発現を標的にすることが考えられる。

②運動学習機能を定量評価する機器開発とその臨床応用

研究対象は、健常者 22 名(平均 55.3 歳)、
 脊髄小脳変性症(SCD)患者 55 名(平均
 49.8 歳)で行った。SCD の内訳は、
 純粋小脳型 19 名(SCA6 5 名, SCA8 2 名,
 SCA31 7 名, CCA 5 名)、多系統型(SCA2 1 名,
 MJD 13 名, SCA36 1 名, DRPLA 1 名,
 MSA-C 16 名, MSA-P 4 名)であった。
 健常者では、初めプリズムなしで、
 ターゲットの中心付近をタッチし、
 プリズム装着によりターゲットの右に
 大きくずれるものの繰り返しで、
 ターゲットをタッチできるようになった。
 その後プリズムを着脱後、
 プリズム装着中の学習によると考えら
 れる記憶により左方向へのずれが生じた
 が繰り返すことで最後には正確にター
 ゲットがタッチできた。一方で SCD 患
 者では様々なパターンが確認されたが、
 典型的にはプリズム装着中は右にず
 れたままターゲットをタッチできず、
 プリズム着脱直後も左方向へのずれ
 がみられなかった。これらの結果は先
 行する報告と一致した。

定量評価するため、従来の τ を使っ
 て比較するも健常者と SCD で正確に
 識別することはできなかった。一方、
 新たに定義したでは AI では両者での
 重なりは少なく有意差をもって識別
 可能とした。また健常者とオーバーラ
 ップした SCD 患者は小脳症状を欠く
 MSA-P 患者であった。さらにこれま
 での小脳評価法である SARA や 9-hole
 peg test (9HPT) との関係を検討し

た。両者ともに負の相関関係が確認さ
 れた(それぞれ、相関係数 = -0.375, -5.000)。

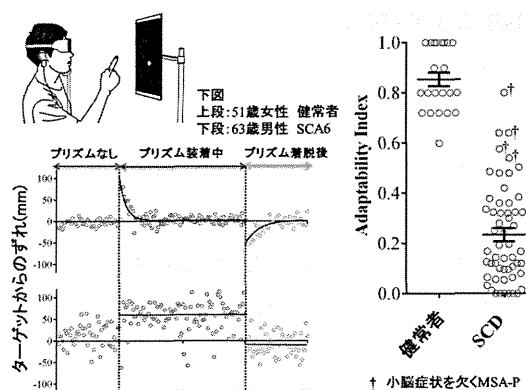


図 2 小脳運動学習評価機器の概略と結果。

①右上が概略図。②右中段：健常者の
 結果；右下段：SCA6 患者の結果。運動学
 習のパターンが青・緑の曲線で全く異な
 ることが判る。③左図：結果のまとめ。
 Adaptability Index は SCD 患者群(青)
 で明らかに低下している。小脳症状を欠
 く MSA-P 患者では比較的高値を示した。

D. 結論

- ①日本人に多い SCA31 の病態に、(UGGAA)_n
 が発揮する毒性と RNA 高次構造異常(RNA
 foci 形成)が関係する。
- ②小脳失調症の定量評価に、運動学習機
 能を用いることが出来、我々が開発した
 機器での AI が有用である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishikawa K, Dürr A, Klopstock T,
 Müller S, De Toffol B, Vighetto A,
 Marelli C, Wichmann HE, Illig T,
 Niimi Y, Sato N, Amino T, Stevanin
 G, Brice A, Mizusawa H:
 Pentanucleotide repeats at the

- spinocerebellar ataxia type 31(SCA31) locus in Caucasians. *Neurology* 2011; 77: 1853-1855
- 2) Unno T, Wakamori M, Koike M, Uchiyama Y, Ishikawa K, Kubota H, Yoshida T, Sasakawa H, Peters C, Mizusawa H, Watase K: Development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(43): 17693-17698
 - 3) Obayashi M, Ishikawa K, Izumi Y, Takahashi M, Niimi Y, Sato N, Onodera O, Kaji R, Nishizawa M, Mizusawa H: Prevalence of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor type 1 gene (*ITPR1*) deletion, the mutation for spinocerebellar ataxia type 15 (SCA15), in Japan screened by gene dosage. *J Hum Genet* 2012; 57(3): 202-206
 - 4) Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima Y, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama M, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H: Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology* 2012; 32(6): 595-603
 - 5) 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; 33: 600-611
 - 6) 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 $\alpha 1A$ voltage-gated calcium channel C-terminal fragment (Ca_v2.1-CTF) aggregate is sufficient to cause cell death. *PLoS ONE* 2013; 8(3): e50121
- ## 2. 学会発表
- 1) 石川欽也, 水澤英洋: 「脊髄小脳変性症の分子病態」. シンポジウム 4-S-5-3 (シンポジウム 4. ところと神経: 「神経変性疾患の病態と治療 (脊髄小脳変性症を含む)」) 第 28 回日本医学会総会 (震災のため抄録発表のみ)
 - 2) Brookes Rachel S, Ishikawa K, Mizusawa H: Cathepsin D and myosin IIB colocalize in spinocerebellar ataxia type 6 and other polyglutamine diseases. The 63rd American Academy of Neurology Annual Meeting. Honolulu. April. 13, 2011
 - 3) Ishikawa K, Ota K, Sato N, Mizusawa H: Open-labeled clinical trial of

- rifampicin in multiple system atrophy. The 63rd American Academy of Neurology Annual Meeting. Honolulu. April. 14, 2011
- 4) 佐藤 望, 石川欽也, 新美祐介, 網野猛志, 水澤英洋: 脊髄小脳失調症 31 型の挿入配列 RNA 結合タンパクの探索. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 18.
 - 5) 新美祐介, 佐藤 望, 網野猛志, 高橋真, 大林正人, 石黒太郎, 石川欽也, 水澤英洋: 細胞モデルを用いた脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の病態探索. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 18.
 - 6) 石川欽也, 太田浄文, 大林正人, 新美祐介, 高橋 真, 石黒太郎, 佐藤 望, 柴野 健, 水澤英洋: 多系統萎縮症に対するリファンピシン内服療法. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 20.
 - 7) Ishikawa K, Furuki H, Matsuo H, Yamashita T, Mizusawa H: Screening ANO10 mutations in a Japanese cohort of cerebellar ataxia. The 12th International Congress of Human Genetics & the 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. Montreal, Canada. 2011.10.12.
 - 8) Obayashi M, Takahashi M, Niimi Y, Sato N, Onodera O, Ishikawa K, Nishizawa M, Mizusawa H: Prevalence of spinocerebellar ataxia type 15 in Japan screened with TaqMan PCR assay. The 12th International Congress of Human Genetics & the 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. Montreal, Canada. 2011.10.12.
 - 9) Takahashi M, Obayashi M, Ishiguro T, Sato N, Niimi Y, Mogushi K, Mahmut Y, Tanaka H, Ishikawa K, Mizusawa H: A polyglutamine expansion in $\alpha 1A$ calcium channel C-terminal exerts toxicity in the cytoplasm with CREB transcriptional activation. The 12th International Congress of Human Genetics & the 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. Montreal, Canada. 2011.10.14.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Mizusawa H: Clinical features and pathogenesis of SCA 6. The 4th Xiangya International Congress of Clinical and Basic Research on Cerebellar Ataxia, Changsha, May 25-30, 2012
 - 13) Mizusawa H: Hereditary ataxias with special reference to SCA31. 13th Asian Oceanian Congress of