

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

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

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(iPatax)。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ー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。本申請は本評価法を用い QAI1 の進行抑制効果を検討することを目標とする。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 26 年度は iPatax について健常者 33 例、SCD 患者 68 例の解析を終了し、速度の変動係数 (coefficient of variation, CV) が評価法として適切であることを明らかとした。さらに、本評価法は経時的变化でのば

らつきも従来のスケールによる評価方法より少なく、より客観的な視標であることが示された。一方、本評価方法は上肢のみしか評価できない問題があるため、小脳性歩行障害を定量評価するために、Kinect® を用い 3 次元動作解析システムを構築した。以上より小脳性運動失調の簡便な定量評価方法を確立した。

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 プロテノパチー, 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, 現実には成功していない. 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. 本年度は引き続き (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 33 例, SCD 患者 68 例 (MJD/SCA3 18 例, SCA6 12 例, MSA 8 例, CCA 16 例, 他の失調症 15 例) を対象とした. 一方, 本評価方法は上肢の

みしか評価できない問題があるため、小脳性歩行障害を定量評価するために、Kinect® を用い3次元動作解析システムを構築した。健常者 15 例、脊髄小脳変性症(SCD)患者 16 例 (MJD 6 例, SCA6 2 例, CCA 2 例, その他 6 例) を対象とし、歩行運動中の頸点の X 軸成分の座標成分を解析した。

(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(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号、平成 16 年 12 月 28 日 全部改正、平成 17 年 6 月 29 日 一部改正)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(平成 16 年 文部科学省・厚生労働省告示第 2 号)、ならびに臨床研究に関する倫理指針(平成 16 年 厚生労働省告示第 459 号)人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成 27 年 4 月 1 日 施行予定)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文書で同意を得る。本研究で対象とするヒト由来資料については、資料、DNA の保存・管理、その後の解析について患者および患

者の親族に説明し、研究目的に使用することへの同意を得ている。また個人のプライバシーに関しては十分に保護する。組み換え DNA 実験、動物実験は、法令を遵守し、本学の承認を得て行う。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

新規評価法の開発を目的として、iPatax の症例数を増やし、かつ新たに、歩行解析を試みた。iPatax では、対象を健常者 33 例、SCD 患者 68 例 (MJD/SCA3 18 例, SCA6 12 例, MSA 8 例, CCA

16 例, 他の失調症 15 例) に増やし解析した。速度の変動係数 (coefficient of variation, CV) は SARA 合計および SARA 上肢機能と高い正の相関

を示した。(2) 同一例における経時的変化では、CV の値のばらつき [(最大値-最小値)/最大値] は

平均 13.4% (最大 24.2%, 最小 4.15%) であった。一方、SARA 合計のばらつきは平均 19.3% (最大 54.2%, 最小 0.0%) であり、iPatax よりもデータのばらつきが大きかった。(3) 運動学習の効果：健常群、疾患群ともに、1 分間の課題遂行の中で時間経過に伴い CV の減少を認め学習効果を認めた。この減少率は疾患群に比して健常群で高く ($p < 0.01$)、かつ疾患群では SARA と有意に相関した。Kinect センサーを用いた小脳性歩行の定量評価：小脳性歩行障害を定量評価するために、Kinect® を用い3次元動作解析システムを構築した。健常者 15 例、脊髄小脳変性症(SCD)患者 16 例 (MJD 6 例, SCA6 2 例, CCA 2 例, その他 6 例) を対象とし、歩行運動中の頸点の X 軸成分の座標成分を解析した。周波数解析では、SCD 患者

群では遅い周波数成分が増加し、歩行率(歩行回数/秒)を反映する中間の周波数成分(0.8～3.9 Hz)のばらつきも増加した。SCD 患者群では頸点 X 座標のピーク解析にて振幅および歩行周期の変動係数が増加した。これら変動係数の増加は SARA 合計および SARA 歩行と高い正の相関を示した。以上より、安価に簡便に小脳性歩行障害を定量評価する方法を開発した。

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、症例数には自ずと限界がある。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。

新規評価法として開発した iPatax について健常者 33 例、SCD 患者 68 例の解析を終了し、速度の変動係数 (coefficient of variation, CV) が評価法として適切であることを明らかとした。さらに、本評価法は経時的变化でのばらつきも従来のスケールによる評価方法より少なく、より客観的な視標であることが示された。一方、本評価方法は上肢のみしか評価できない問題があるため、小脳性歩行障害を定量評価するために、Kinect® を用い 3 次元動作解析システムを構築した。健常者 15 例、SCD 患者 16 例を対象とし、歩行運動中の頸点の X 軸成分の座標成分を解析した。周波数解析では、SCD 患者群では遅い周波数成分が増加し、歩行率(歩行回数/秒)を反映する中間の周波数成分(0.8～3.9 Hz)のばらつきが増加すること。SCD 患者群では頸点 X 座標のピーク解析にて振幅および歩行周期の変動係数が増加する事を見出した。今回開発した、簡便に小脳性歩行障害を定量評価する方法を用い、平成 26-27 年度半ばまで L-アルギニンの薬効評価を行う。症例数は 50 例とする。症例数の算定は、□近年の脊髄小脳変性症を対象とした無作為化比較試験において 13～48 例の症例数にて有意な効果が示されていること □連続変数での評価方法に加えてクロスオーバー試験とすることから、従来の SARA を用いた評価法から推定される症例数である約 100 例より減らしようと算定した。平成 27 年度半ばまで QAI1 の薬効評価の試験を行う。

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。最終年度、本評価方法を用いた実際の薬効判定を行う。

7 研究発表

論文発表

1. Tada M, Nishizawa M, Onodera O. Redefining cerebellar ataxia in degenerative ataxias: lessons from recent research on cerebellar systems. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015 Jan 30. pii: jnnp-2013-307225. doi: 10.1136/jnnp-2013-307225
2. Tada M, Nishizawa M, Onodera O. IP3 Receptors in Neurodegenerative Disorders: Spinocerebellar Ataxias and Huntington's and Alzheimer's Diseases. Norbert Weiss, ed. in *Pathologies of Calcium Channels*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 2014;579-600
3. Bundo M, Toyoshima M, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Okada Y, Akamatsu W, Kato M, Okano H, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K. Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 2014; 81 (1): 1-8.
4. Konno T, Tada M, Tada M, Koyama A, Nozaki H, Harigaya Y, Nishimiya J, Matsunaga A, Yoshikura N, Ishihara K, Arakawa M, Isami A, Okazaki K, Yokoo H, Ihoh K, Yoneda M, Kawamura M, Inuzuka T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Ikeuchi T. Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathological characterization in patients with HDLS. *Neurology* 2014; 82 (2): 139-148.
5. Yokoseki A, Saji E, Arakawa M, Kosaka T, Hokari M, Toyoshima Y, Okamoto K, Takeda S, Sanpei K, Kikuchi H, Hirohata S, Akazawa K, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M, Kawachi I. Hypertrophic pachymeningitis: significance of myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody. *Brain* 2014; 137 (Pt2): 520-536.
6. Hirabayashi S, Kosugi S, Isobe Y, Nashimoto A, Oda I, Hayashi K, Miyashiro I, Tsujitani S, Kodera Y, Seto Y, Furukawa H, Ono H, Tanabe S, Kaminishi M, Nunobe S, Fukagawa T, Matsuo R, Nagai T, Katai H, Wakai T, Akazawa K. Development and external validation of a nomogram for overall survival after curative resection in serosa-negative, locally advanced gastric cancer. *Annals of Oncology* 2014; 25(6): 1179-1184.
7. Yoshida T, Nin F, Ogata G, Uetsuka S, Kitahara T, Inohara H, Akazawa K, Komune S, Kurachi Y, Hibino H. NKCCs in the fibrocytes of the spiral ligament are silent on the unidirectional K⁺ transport that controls the electrochemical properties in the mammalian cochlea. *Pflugers Archiv* 2014, Aug 22 (online)
8. Saitoh Y., Fujikake N., Okamoto Y., Popiel H.A., Hatanaka Y., Ueyama M., Suzuki M., Gaumer S., Murata M., Wada K., *Nagai Y. P62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. *J. Biol. Chem.* 290(3):1442-53 (2015)
9. Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* 21(23): 2575-2582

(2014)

10. Obayashi M, Stevanin G, Synofzik M, Monin ML, Duyckaerts C, Sato N, Streichenberger N, Vighetto A, Desestret V, Tesson C, Wichmann HE, Illig T, Huttenlocher J, Kita Y, Izumi Y, Mizusawa H, Schöls L, Klopstock T, Brice A, Ishiikawa K, Dürr A. Spinocerebellar ataxia type 36 exists in diverse populations and can be caused by a short hexanucleotide GGCCTG repeat expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Dec 4. pii: jnnp-2014-309153. doi: 10.1136/jnnp-2014-309153. [Epub ahead of print]

11. Ota K, Obayashi M, Ozaki K, Ichinose S, Kakita A, Tada M, Takahashi H, Ando N, Eishi Y, Mizusawa H, Ishiikawa K. Relocation of p25 α /tubulin polymerization promoting protein from the nucleus to the perinuclear cytoplasm in the oligodendroglia of sporadic and COQ2 mutant multiple system atrophy. *Acta Neuropathol Commun*. 2014 Sep 11;2(1):136. [Epub ahead of print]

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, 尾崎心, 市野瀬志津子, 他田真理, 柿田明美, 高橋均, 石川欽也, 水澤英洋. 多系統萎縮症において p25 α /TPPP はオリゴデンドログリアの核から細胞質に局在変化を起こす. 第55回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2014年6月6日.

3. Nagai Y. Misfolding and aggregation of the polyglutamine protein and its suppression by intercellular transmission of molecular chaperone.

Hungary-Japanese Symp on Mechanism and regulation of aberrant protein aggregation (Nov 17-21, 2014, Osaka, Japan)

4. Nagai Y., et al. Dysfunction of microtubule-dependent transport triggers oligomerization and cytoplasmic accumulation of TDP-43, leading to neurodegeneration. CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)

5. Saitoh Y., et al. p62 plays a protective role in the autophagic degradation of polyglutamine protein oligomers in polyglutamine disease model flies. CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)

6. Ishiguro T., et al. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes progressive neurodegeneration in *Drosophila*. CSHL 2014 Neurodeg Dis meeting (Dec 3-6, 2014, CSH, NY, USA)

7. 永井義隆. 神経変性疾患に対する蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした治療戦略 - ポリグルタミン病をモデルとして. 第9回青森神経科学談話会 (H26.6.14, 弘前)

8 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1 特許取得

1) 発明の名称: ALSの原因タンパク毒性を軽減する核酸

石川欽也、水澤英洋、永井義隆、横田隆徳、石黒太郎、佐藤望、和田圭司

出願番号 : 特願 2014-244034

(東京医科歯科大学/国立精神・神経医療研究センター)
【出願日：平成 26 年 12 月 2 日】

2) 発明の名称：脊髄小脳失調症 3 1 型
(SCA31) 治療剤
石川欽也、水澤英洋、永井義隆、石黒太郎、佐藤望、和田圭司
出願番号：特願 2014-244350 (東京医科歯科大学/
国立精神・神経医療研究センター)
【出願日：平成 26 年 12 月 2 日】

2 実用新案登録
なし
3 その他
なし