

201442061A(別冊有)

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))

運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究
平成26年度 委託事業成果報告書

業務主任者 水澤 英洋

平成27年(2015年)3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人 国立精神・神経医療研究センターが実施した平成26年度「運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))

運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究
平成26年度 委託事業成果報告書

業務主任者 水澤 英洋

平成27年(2015年)3月

運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	水澤 英洋	(独) 国立精神・神経医療研究センター病院	院 長
研 究 分 担 者	宇川 義一	福島県立医科大学医学部神経内科学	教 授
	岡澤 均	東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学	教 授
	瀧山 嘉久	山梨大学医学部神経内科学	教 授
	武田 篤	国立病院機構 仙台西多賀病院	副 院 長
	田中 真樹	北海道大学大学院医学研究科神経生理学	教 授
	貫名 信行	独立行政法人理化学研究所視床発生研究チーム	客員主管研究員
	平井 宏和	群馬大学大学院医学系研究科神経生理学	教 授
	若林 孝一	弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学	教 授
	和田 圭司	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	部 長
	池田 佳生	群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学	教 授
	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
	松浦 徹	自治医科大学神経内科	教 授
	宮嶋 裕明	浜松医科大学第一内科	教 授
	阿部 康二	岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経内科学	教 授
	寛 慎治	(公財) 東京都医学総合研究所・運動失調プロジェクト	プロジェクト リーダー
	祖父江 元	名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学	教 授
佐々木秀直	北海道大学大学院医学研究科神経病態学	教 授	
後藤 順	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学	准 教 授	
石川 欽也	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学 神経内科	講 師	
事 務 局	和田 圭司	(独) 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 東京都小平市小川東町4-1-1 T E L 042-341-2712 (内線5141) F A X 042-346-1745 e-mail wada@ncnp. go. jp	部 長
経理事務担当者	松田 敏宏	同上 財務経理部 財務経理課 TEL 042-341-2711 FAX 042-346-1425 E-mail t-matsuda@ncnp. go. jp	第二契約係長

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

運動失調症の分子病態解明・治療法の開発に関する研究……………	1
水澤 英洋 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター病院 院長	

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 運動失調症モデル動物の病態解析に基づく分子標的の探索と利用シーズの開発……………	7
祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科	
2. 分解系関連分子における多系統萎縮症や遺伝性脊髄小脳失調症に対する治療標的の探索……………	10
貫名 信行 独立行政法人理化学研究所 視床発生研究チーム	
3. 多系統萎縮症の発病素因解析ならびに分子マーカーの開発……………	13
佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科分野	
4. 異常タンパク伝播に着目したシヌクレイノパチーの病態解析と新規治療法の確立……………	17
武田 篤 国立病院機構仙台西多賀病院	
5. ミトコンドリア蛋白 TPPP に着目した多系統萎縮症の治療法探索……………	20
石川 欽也 東京医科歯科大学医学部附属病院神経内科	
6. 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 たんぱく質（DRPLA _p ）の生理的機能に基づく治療法……………	24
開発研究 後藤 順 東京大学医学部附属病院	
7. 脊髄小脳失調症 36 型(SCA36)における分子病態解明と新規治療法開発……………	27
阿部 康二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経内科学	
8. 非翻訳領域リピート伸長による運動失調症の分子病態・リピート不安定性解析……………	30
松浦 徹 自治医科大学医学部内科学講座神経内科学部門	
9. 遺伝性痙性対麻痺の新規原因遺伝子同定、病態機序解明と治療法開発……………	33
瀧山 嘉久 山梨大学医学部神経内科学	
10. iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた運動失調症の治療開発研究……………	36
岡澤 均 東京医科歯科大学難治疾患研究所	
11. 核酸・蛋白質の代謝恒常性破綻モデルの解析を通じた神経変性病態の解明と創薬……………	41
和田 圭司 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター疾病研究第四部	
12. 脊髄小脳失調症の霊長類モデルの作製と検証……………	44
平井 宏和 群馬大学大学院医学系研究科神経生理学	

1 3. 多系統萎縮症のモデル動物作製と分子病態解明	47
若林 孝一 弘前大学大学院医学研究科・脳神経病理学教授	
1 4. 非翻訳マイクロサテライト・リピート伸長による脊髄小脳失調症の ribonuclear foci	50
形成を指標にした治療薬の探索	
池田 佳生 群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学	
1 5. In vitro 疾患モデル系を用いたポリグルタミン病治療薬候補の探索	53
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	
1 6. 脳内の鉄代謝制御-鉄放出系の解明とそれに作用する新たな鉄除去薬の開発	56
宮嶋 裕明 浜松医科大学内科学第一消化器・腎臓・神経内科学分野	
1 7. 上肢小脳機能障害の病態生理本質の解明：早期発見・治療効果判定に向けて	59
宇川 義一 福島県立医科大学医学部神経内科学講座	
1 8. 小脳疾患における高次脳機能障害の評価と病態生理の解明－脊髄小脳変性症と	62
多系統萎縮症での検討	
田中 真樹 北海道大学大学院医学研究科	
1 9. 脳内運動制御器の非侵襲的分析を利用した高齢者の転倒リスク早期発見・対応	65
システムの開発	
寛 慎治 公益財団法人東京都医学総合研究所	
III. 学会発表実績	71
IV. 資料	79
1. 平成 26 年度 運動失調症の医療基盤に関する調査研究 (H26-難治等 (難) 一般-030)	
運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究 (H26-委託 (難) 一般-061)	
合同ワークショップ	
テーマ：今後の運動失調症に関するグループ研究の推進について プログラム・抄録	
2. 平成 26 年度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) 運動失調症の医療基盤に関する調査研究班	
厚生労働科学研究委託費 運動失調症の分子病態解明・治療法の開発に関する研究班	
合同研究報告会 プログラム・抄録集	
V. 研究成果の刊行物・別刷	85

I . 委託業務成果報告 (総括)

運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班

水澤 英洋

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 病院長

研究要旨

脊髄小脳変性症(ポリグルタミン病、非翻訳 RNA リピート病など)、多系統萎縮症、痙性対麻痺を対象に、病態解析研究、治療薬開発のための標的分子の同定研究、モデルを利用した治療薬候補の有効性検討研究、連続変数を用いたバイオマーカーの開発研究を実施した。同一病名であっても病型の異なる多様な疾患群がその構成基盤にあることから、運動失調症の医療基盤に関する調査研究班と連携し、研究成果の実用化に当たって考えられる課題とその克服法を整理し、研究の効率化を図った。その結果今年度は代表的成果として、ポリグルタミン病ではアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性をモデルマウスで明らかにし、マーモセットを用いた霊長類モデルの作出に成功し、非翻訳 RNA リピート病では新規 RNA 分解システムの発見とその解析を行った。多系統萎縮症ではミトコンドリア蛋白質 TPPP が疾患時には病変細胞であるオリゴデンドロサイトの核膜周囲に局在することを初めて示し、また新規介入点として抑制性インターニューロンが重要である可能性を見いだした。痙性対麻痺では疾患原因となる遺伝子変異を同定するなど多くの成果をあげた。いずれの成果も多施設共同研究の実施によるところが大きく、今後も将来の臨床試験実施を見据え、モデル動物の解析を経た病態解明と標的分子同定、原因遺伝子変異同定、既知薬剤のリポジショニング推進、客観的病状評価法の開発を推進する。

水澤英洋	国立精神・神経医療研究センター	佐々木秀直	北海道大学
祖父江元	名古屋大学	若林孝一	弘前大学
貫名信行	順天堂大学	武田 篤	仙台西多賀病院
後藤 順	東京大学	石川欽也	東京医科歯科大学
岡澤 均	東京医科歯科大学	宮嶋裕明	浜松医科大学
小野寺理	新潟大学	瀧山嘉久	山梨大学
平井宏和	群馬大学	笥慎治	東京都総合医学研究所
和田圭司	国立精神・神経医療研究センター	宇川義一	福島医科大学
阿部康二	岡山大学	田中真樹	北海道大学
池田佳生	群馬大学		
松浦 徹	自治医科大学		

A. 研究目的

本研究では脊髄小脳変性症（ポリグルタミン病、非翻訳 RNA リピート病など）、多系統萎縮症、痙性対麻痺を取り上げ、①新しいシーズ解明と既知薬剤のリポジショニング推進、②現有・新規モデル動物の解析を経た病因解明、③原因不明疾患での原因同定、④客観的病状評価法とバイオマーカーの開発を目的とした。

罹患者は3万人以上存在すると考えられているが、同一疾患名が付いても、個々の病型は異なることが多く、希少かつ多様と言うことがこれらの疾患の特徴となっている。これらの課題を克服するために多施設共同研究体を構成した。

有効な根本治療法が全く無い疾患群を対象とすることは、その成果が国や厚生労働行政に直接的に貢献しうることを意味する。そのため、医師主導型治験を含めて実績のあるグループが、独創性の高い研究を分担し展開する。また、厚生労働科学研究費補助金「運動失調症の医療基盤に関する調査研究」班とも連携し、リポジショニングも含め臨床研究への速やかな移行を進める。

B. 研究方法

分子神経科学、神経生理学などの研究手法を導入し、モデル動物、ヒト由来試料などを使用して研究を展開した。具体的には、①ポリグルタミン病におけるシーズ探索は、原因蛋白が関与する病態解析を行うとともに、iPS細胞由来ヒト神経細胞や画期的な霊長類モデルなどを用いた運動失調症の治療薬・治療法開発研究を実施した。in vitroモデルでの成果をin vivoで検証する発展研究を行った。②非翻訳RNAリピート病においては、日本人特有あるいは日本人で高頻度に認められるSCA31やSCA36を中心にRNA fociの形成機構の解明とシーズを発見する研究を実施した。

③多系統萎縮症については、申請者らが既に見出したマイクロRNAの変動から創薬ターゲットを見出す研究、一卵性双生児を用いた発病素因の解明研究、沈着蛋白質である α シヌクレインの伝播機構、およびミトコンドリア蛋白TPPPマウスの作製を通してミトコンドリア異常分裂機構を明らかにする病態研究を実施した。④痙性対麻痺については全国コンソーシアム(JASPAC)の試料収集システムを活用した痙性対麻痺の原因遺伝子解明研究を実施した。⑤バイオマーカーの探索として、医薬品開発に繋げることを念頭にした患者症候の連続変数による評価システム開発研究を進めた。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とした全ての研究においては、対象者の個人情報の保護など十分に配慮し、対象者に対する不利益・危険性について予め十分に説明を行い、インフォームドコンセントを得て研究を行う。研究成果の公表においては、個人が特定されることのないように十分に配慮する。ヒト遺伝子解析研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。ヒト髄液や血液等の生体採取試料を用いた研究は、臨床研究に関する倫理指針及び、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針を遵守する。疫学研究については、疫学研究に関する倫理指針を遵守する。臨床情報を用いた研究についてはヘルシンキ宣言及び臨床研究に関する倫理指針に従って進める。実験動物を用いる場合は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準じる。いずれの研究も各施設の医の倫理委員会、自主臨床研究審査委員会など、それに準ずる倫理委員会等で研究の審査と承認を得て行うこととする。組換え DNA 実験、動物実験は各施設の DNA 実験施設安全委員会の承認を得て行う。

C. 研究結果

個々の業務項目の成果は別添の分担研究者が作成する業務委託成果報告に記載した。

今年度より、従来の調査研究事業が政策研究事業と本研究班担当の実用化研究事業に分けられたことから、2014年7月31日に合同で最初のワークショップを開催し、研究方針等を確認し、政策研究事業班とも協力しつつ、それぞれのテーマ毎に研究を推進した。今年度の代表的成果は以下の通りである。

①ポリグルタミン病：変異 SCA1、SCA3 遺伝子発現 AAV の小脳注入によりマーモセットで新規の運動運動失調モデルを作出することに成功した。SCA3 トランスジェニックマーモセットについても作製に成功した。またヒト疾患遺伝子特異的な遺伝子サイレンシング法を DRPLA マウスで確立した。いずれの成果も実用化に向けた重要な基盤開発である。また、創薬に関してもペオニ抽出物 paeonifrolin が熱ショック蛋白質や転写因子 TFEB の発現レベルを増加させ蛋白質分解系を活性化し神経変性を抑制することを見いだした。今後臨床応用をめざす。

②非翻訳型リピート病：Asidan 患者脳で GGCCUG リピートをもつ Giant RNA foci が存在することを見いだした。また、SCA36:GGCCTG リピートについて培養細胞で RNA foci の形成・判定系を構築した。いずれもシーズ開発の基盤となる成果である。新規 RNA 分解システムである RNautophagy を見だしその機序を明らかにした。

③多系統萎縮症：遺伝子解析で本疾患に偏在する頻度の高い領域を特定することに成功した。またミトコンドリア蛋白質 TPPP が疾患時には病変細胞であるオリゴデンドロサイトの核膜周囲に局在することを初めて見いだした。新規介入点として抑制性インターニューロンが重要である可能性を示唆する知見を

得た。

④痙性対麻痺：痙性失調症一卵性双生児例について、PLA2G6 遺伝子新規複合ヘテロ接合性変異を同定した。無セルロプラスミン血症の変異遺伝子をヘテロで有し運動失調が中心となる 13 家系の臨床的特徴を明らかにした。いずれも病態機序解明に役立つ成果である。

⑤バイオマーカー研究：モーションキャプチャー法などを使用して連続変数による評価系の構築をめざした。運動能力を評価する系としてタッピング課題法を考案した。ヒトで有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

D. 考察

研究成果の実用化に当たって考えられる課題とその克服法及び期待される成果を次のように整理し、研究を実施した。

1. 多様な疾患の集合であり研究ステージが非同一のため研究の一律的实施が困難である。

対応策：診断基準、除外診断基準の明確化（医療班との連携）

期待される効果：スムーズで効率的なエントリー

2. 客観的症候評価指標が未整備であり、定量的連続変数による測定法の確立が喫緊の課題である。

対応策：モーションキャプチャーシステムの活用など

期待される成果：早期軽症・微細な変化の評価可能、臨床試験の精度向上

3. シーズが不足しており、その原因として標的分子がまだ不明確な場合が多いことが考えられる。

対応策：病態機序研究の一層の推進、基礎・臨床研究者の参入促進

期待される成果：シーズ・リード化合物等の開発促進

今年度の成果はいずれの研究も、海外を含めてまだ知見の無い当該領域におけるトップクラスの研究であり、他国に例のない高い獨創性が維持されたものである。対象とする疾患は、「致命的で、病気の進行が不可逆的かつ日常生活に著しい影響を及ぼす疾患」であるため、その発症や進行の遅延化が実現できれば、国の重点分野である「ライフイノベーション」における「国民が心身ともに健康で豊かさや生きていることへの充実感を享受出来る社会の実現を目指すこと」の達成に貢献できる。本研究が目指す革新的な医薬品・医療機器の開発に向けたシーズの発見は、厚生労働行政の施策としての、医薬品産業の振興に繋がる。またすでに分担研究者らは既存薬剤が対象疾患のモデル動物系で有効であることを確認しているため、もし既存薬剤が真に有効な薬剤であることが発見されれば、医療ニーズの高い未承認医薬品の迅速なリポジショニングという施策と医師主導型治験にすぐに発展できる。また、素因遺伝子・原因遺伝子研究は、先進医療 A に定められている「神経筋疾患の遺伝子診断」に直結する。さらに、患者症候の評価システム開発は、将来的に医療機器産業の振興に繋がり、遺伝子解析技術と共に、技術水準の向上と、民間での利活用発展する可能性が大きい。研究グループ内には別の疾患に対しての医師主導型治験の研究代表者・分担者を多数含むため、5年・10年の長期では医薬品や医療機器の開発に発展する可能性が大いに期待できる。

E. 結論

希少かつ多様と言う対象疾患の特徴を勘案し、多施設共同研究を実施した。ポリグルタミン病については H29 年度からの臨床試験実施が期待され、非翻訳 RNA リピート病、多系統萎縮症についてはリード化合物の同定

と最適化に向けた成果が蓄積した。痙性対麻痺についても治療薬候補の同定に繋がる成果が生み出されつつある。連続変数に基づいた新規バイオマーカーについては H29 年度からの臨床試験への導入をめざしている。

F. 健康危険情報

該当するものは無し。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

個々のものは分担研究者の委託業務成果報告書に記載。

2. 学会発表

個々のものは分担研究者の委託業務成果報告書に記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2014-209340「異常核酸分解誘導剤」、出願人：国立精神・神経医療研究センター、発明人：株田智弘、藤原悠紀、和田圭司、相澤修、長谷勝徳、出願日：2014 年 10 月 10 日

特願 2014-244034「ALS の原因タンパク毒性を軽減する核酸」、出願人：東京医科歯科大学/国立精神・神経医療研究センター、発明人：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、出願日：平成 26 年 12 月 2 日

特願 2014-244350「脊髄小脳失調症 3 1 型 (SCA31) 治療剤」、出願人：東京医科歯科大学/国立精神・神経医療研究センター、発明人：石川欽也、水澤英洋、永井義隆、石黒太郎、佐藤 望、和田圭司、出願日：平成 26

年 12 月 2 日

PCT/JP2014/077258 (基礎出願：特願
2013-214155) 「脊髄小脳変性症を予防又は治療
するための薬剤」、出願人：東京医科歯科大学、
発明者：岡澤 均

米 国 特 許 登 録 US 8,792,977 B2
「Quantitative motor function evaluation
system」、発明人：Kakei S, Lee JH、特許
登録日：Jul. 29, 2014

国内特許登録特許第 5623759 号「筋電図信号
に基づいた脳内の並列運動制御機能の同定及
び評価法」、発明人：笥 慎治, 李 鍾昊, 鏡
原 康裕、登録日：平成 26 年 10 月 3 日

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

無し。

Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

運動失調症モデル動物の病態解析に基づく分子標的の探索と利用シーズの開発

業務担当責任者：祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科
研究協力者：蔣 月梅 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科
足立弘明 産業医科大学神経内科
勝野雅央 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨

多系統萎縮症(MSA)患者の小脳におけるインターニューロンの病理学的変化について解析した。MSAでは小脳プルキンエ細胞層・顆粒細胞層におけるHu及びGAD陽性の抑制性インターニューロンの数が減少しており、残存するインターニューロンに α -synucleinが沈着し、double stranded break DNA、cleaved caspase-3、topro3が陽性であった。また、MSA小脳のインターニューロンでは細胞周期のマーカであるcyclin D1が細胞質に蓄積しており、細胞周期制御機構に異常が生じてアポトーシス様の細胞障害・細胞死を生じていることが示唆された。

A. 研究目的

MSAではオリゴデンドロサイトの細胞質内封入体(glial cytoplasmic inclusion: GCI)が病理学的特徴とされ、その構成成分として α -synucleinが同定されている。近年、各種神経変性疾患におけるインターニューロンの障害が報告されているが、MSAにおけるインターニューロンの障害については詳細な検討がなされていない。本研究ではMSAにおける小脳インターニューロンの変化に着目し、病理学的に解析した。

B. 研究方法

MSA剖検例の8例(男性4例,女性4例)および非神経疾患コントロール5例、および脊髄小脳変性症4例(SCA1 2例、SCA3 2例)から得られたパラフィン包埋組織を対象とした。抑制性インターニューロンのマーカーである抗Hu抗体、抗GAD抗体を用いた

免疫組織化学を行った。また、細胞障害の検出にはTunel in situ Hybridizationを用いた。定量的解析はWin Roof 5.6およびStat View 5.0を用いて実施した。

(倫理面への配慮)

患者検体(病理組織)を用いた実験については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、名古屋大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を受けた上で実施した。

C. 研究結果

小脳プルキンエ細胞層および顆粒細胞層に存在するHu陽性およびGAD陽性の抑制性インターニューロンの数はMSAにおいて減少していた(図1)。こうした変化はSCA1やSCA3では認められず、MSAに特異的な変化であることが示唆された。

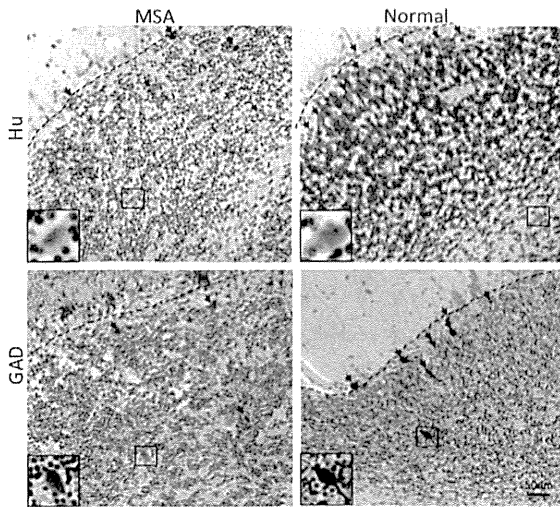


図 1. MSA およびコントロール小脳における Hu 陽性インターニューロンおよび GAD 陽性インターニューロン

MSA 小脳に残存する抑制性インターニューロンは、核染色である Topro3 で染色され、double stranded break DNA、cleaved caspase-3 も陽性であった (図 2)。Tunel を用いた解析でも MSA 小脳の抑制性インターニューロンは陽性を示し、これらの結果から MSA 小脳インターニューロンではアポトーシス経路が活性化していることが示唆された。

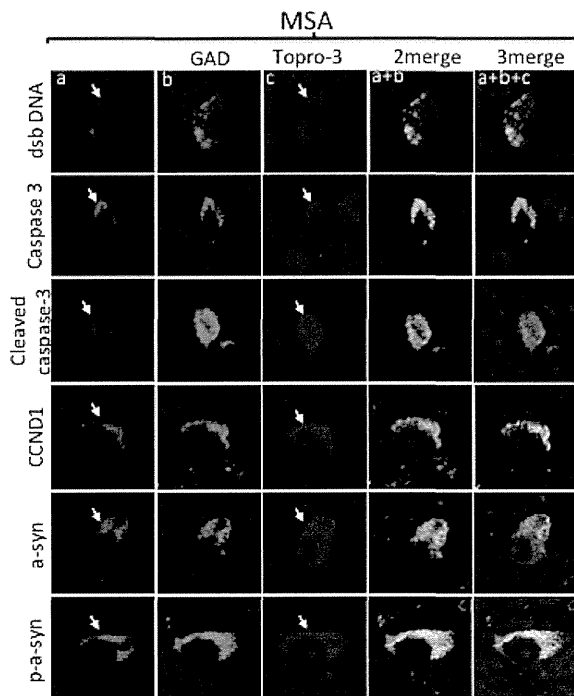


図 2. MSA 小脳インターニューロンにおける細胞障害

また、GCI に類似した細胞質内のリン酸化 α -synuclein がこれらの抑制性インターニューロン内にも認められ、両者に共通する病態の存在が示唆された。さらに、細胞周期マーカーを用いて染色を行ったところ、MSA 小脳に残存する抑制性インターニューロンの細胞質に cyclin D1 が蓄積していることが示され、少なくとも cyclin D1 陽性の一部は α -synuclein も陽性であった。

D. 考察

近年、神経変性疾患におけるインターニューロンの障害が報告されており、ハンチントン病や脊髄性筋萎縮症 (SMA) のモデルマウスではインターニューロン障害が表現型の発現に必須であることが示唆されており (Imlach et al., Cell 2012)、ALS のゼブラフィッシュモデルではインターニューロンの障害が運動ニューロン変性に先行することが知られている (McGown et al., Ann Neurol 2013)。MSA のモデルマウスにおいても抑制性インターニューロンの機能低下が示唆されており (Ito et al., BBRC 2012)、本研究結果を支持する所見であると考えられる。

E. 結論

MSA 患者の小脳では Hu 及び GAD 陽性の抑制性インターニューロンの数が減少しており、残存するインターニューロンに α -synuclein が沈着し、caspase-3 活性化などの分子変化が生じていることが示唆された。その機序の一つとして、細胞周期制御機構に異常が生じてアポトーシス様の細胞障害・細胞死を生じていることが示唆された。

[参考文献]

1. Imlach WL, Beck ES, Choi BJ, et al. SMN is required for sensory-motor circuit function in *Drosophila*. Cell.

2012;151(2):427-439.

2. McGown A, McDearmid JR, Panagiotaki N, et al. Early interneuron dysfunction in ALS: insights from a mutant sod1 zebrafish model. *Ann Neurol*. 2013;73(2):246-58.
3. Ito H, Nakayama K, Jin C, et al. α -Synuclein accumulation reduces GABAergic inhibitory transmission in a model of multiple system atrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 23;428(3):348-53.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 23(13) 3552-3565, 2014.
- 2) Renier KJ, Troxell-Smith SM, Johansen JA, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Chua JP, Sun Kim H, Lieberman AP, Breedlove SM, Jordan CL. Anti-androgen flutamide protects male mice from androgen-dependent toxicity in three models of spinal bulbar muscular atrophy.

Endocrinology. 155(7) 2624-2634, 2014.

- 3) Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. *Hum Mol Genet*. 24(2) 314-329 2015.

2. 学会発表

- 1) Halievski K, Xu Y, Henley CL, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Breedlove S, Jordan CL. Androgen-dependent deficits in muscle-derived BDNF correlate with motor dysfunction in two mouse models of spinal bulbar muscular atrophy. *Neuroscience 2014*, Washington DC, USA. 2014年11月.
- 2) Xu, Atchison W, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Breedlove S, Jordan CL. SBMA motor dysfunction may be due to failed neuromuscular transmission. *Neuroscience 2014*, Washington DC, USA. 2014年11月.

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

分解系関連分子における多系統萎縮症や遺伝性脊髄小脳失調症に対する治療標的の探索

業務担当責任者：貫名信行 順天堂大学大学院医学研究科神経変性疾患病態治療探索講座
研究協力者：奥住文美 順天堂大学大学院医学研究科脳神経内科
黒澤 大 理化学研究所視床発生研究チーム
波田野琢 順天堂大学大学院医学研究科脳神経内科
服部信孝 順天堂大学大学院医学研究科脳神経内科
古川良明 慶応義塾大学理工学部

研究要旨

運動失調症の治療標的である病態制御因子を探索するため、ポリグルタミン病マウスにおいて掛け合わせによってそのオートファジー関連分子 p62, Atg5 をノックアウトすると細胞質凝集体が増加し、核内封入体が減少することを見出した。特に前者では寿命の延長も見られ、核内封入体減少に基づくものと考えられた。この現象はオートファジーが細胞質で作用しているためと考えられたため、細胞質封入体が主であるシヌクレイノパチーについて伝播現象を用いてタンパク質分解系の病態への影響を明らかにするため、伝播現象の基礎的検討を行った。

A. 研究目的

神経変性疾患の病態において封入体（タンパク質凝集）形成が重要な役割を果たしていることが知られている。本研究の目的である、運動失調症の治療開発のために、タンパク質凝集を制御することを目指し、我々は運動失調症の多くを占めるポリグルタミン病における凝集体形成制御因子を探索し、オートファジーシステム、特に p62 のリン酸化が選択的オートファジーを制御し、凝集体形成に影響を及ぼすことを報告した (1)。さらに、p62, Atg5 のノックアウトにより細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少し、p62 ノックアウトの条件下ではポリグルタミン病モデルマウスの寿命が延長するという現象を報告した (2)。このことはオートファジー系が細胞質において凝集体形成を制御していること

を示唆しているが、他の神経変性疾患において凝集体形成の制御に影響を与えるかどうかは未だ明らかではない。そこで運動失調を示す多系統萎縮症を含むシヌクレイノパチーにおいてこれらのシステムが制御因子かどうかを検討する系を確立することを本研究の目的とした。これまでの方法であれば p62 や Atg5 のノックアウトマウスとシヌクレイノパチーのマウスを掛け合わせ、凝集体の形成が増加するかどうかを検討するのが定法であるが、シヌクレイノパチーは伝播実験が成立することから、伝播実験によってアッセイが可能であるかどうかを検討することとした。本年度はシヌクレイン凝集による伝播実験によってどのような系に広がるかどうかといった基礎実験を行った。

B. 研究方法

全長マウスシヌクレインを *in vitro* で合成し、線維性凝集体を形成したことを確認した上、マウスの線条体に注入した。これを6ヶ月例において剖検しリン酸化シヌクレイン抗体によって凝集体形成を検討した。

(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

片側線条体にシヌクレイン凝集体を注入したところ、同側の線条体および大脳皮質神経細胞に凝集体を認めた。また同側黒質神経細胞にも凝集体を認めた。さらにこれらの凝集体含有細胞の細胞種を同定するため、線条体中型有棘神経細胞の細胞体マーカーとして DARRP32, 軸索のマーカーとして sodium channel beta4 subunit あるいは Nav1.2 の抗体 (3) を用いて局在を検討したところ、凝集体は中型有棘神経細胞の細胞体、及び軸索に存在することが確認された。また黒質神経細胞のマーカーとして TH 抗体を用いて染色し、神経細胞及び軸索においてシヌクレイン凝集が存在することが確認された。これらの結果から注入されたシヌクレインはシードとして働き、順行性、逆行性に伝播されることが強く示唆された。

D. 考察

ポリグルタミン病モデルマウスにおいて p62, Atg5 をノックアウトすることにより、細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少することは、異常伸長ポリグルタミンが細胞質においてこれらの分子がノックアウトされることにより、オートファジーによる分解が阻害され、凝集性が増すためだと推察された。そのため、核移行が阻害され、核内封入体が減

少、病態の改善が認められたものと考察した。それでは多系統萎縮症などのシヌクレイン凝集においてはこのようなタンパク質分解系はどう影響するであろうか。多系統萎縮症においては主なシヌクレイン凝集体はオリゴデンドログリアに認められるが、神経細胞の細胞質にもシヌクレインの集積は認められる。そこでシヌクレイン凝集に対するこれらオートファジー系の分子の影響をみるには従来であれば、シヌクレイン過剰発現マウスとの掛け合わせを検討するのが通常であるが、最近注目されている凝集体の伝播現象を考慮すると外来性のシードを注入してその伝播現象に対する影響をアッセイできれば、より簡便になる可能性がある。今年度の検討により、確かに細胞体に対して順行性、逆行性にシヌクレインのシードが取り込まれていることが示唆された。ヌクレイノパチーに対する病態制御因子の検定に伝播現象を用いられるかどうかは、これが時間経過によって増大するかどうか、またそれを定量できるかの検討が必要であり、今後の課題である。

E. 結論

シヌクレイン凝集の伝播現象を検討し、順行性、逆行性にシヌクレイン凝集のシードが取り込まれ、伝播していくことが示唆された。

[参考文献]

1. Matsumoto G, Wada K, Okuno M, et al. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell*. 2011;44(2):279-89.
2. Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, et al. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. *Hum Mol Genet*. 2014.

3. 3)Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, et al. Singular localization of sodium channel beta4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. Nat Commun. 2014;5:5525.

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Yamanaka T, Wong HK, Tosaki A, Bauer PO, Wada K, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Large-scale RNA interference screening in mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation. PLoS One.2014;9(4): e93891
- 2) Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, Aosaki T, Abe T, Kiyonari H, Kino Y, Kurosawa M, Shimizu J, Ogiwara I, Yamakawa K, Koshimizu Y, Fujiyama F, Kaneko T, Shimizu H, Nagatomo K, Yamada K, Shimogori T, Hattori N, Miura M, Nukina N. Singular localization of sodium channel $\beta 4$ subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. Nat Commun.2014;5:5525
- 3) Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Hattori N, Ishiura S, Nukina N. Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and

repression of repeat-derived aberrant proteins. Hum Mol Genet.2015;24(3); 740-56

- 4) Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, Okuno M, Kurosawa-Yamada M, Washizu C, Taniguchi H, Nakaso K, Yanagawa T, Warabi E, Shimogori T, Sakurai T, Hattori N, Nukina N. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. Hum Mol Genet.2015;24(4); 1092-105

2. 学会発表

- 1) 山中智行, 戸崎麻子, 黒澤大, 松本弦, 小池正人, 内山安男, MAITY SN, 下郡智美, 服部信孝, 貫名信行. 転写因子 NF-Y の機能破壊はユビキチン・p62 の蓄積、小胞体異常を伴う神経変性を誘導する. 第66回日本細胞生物学会大会. 奈良 (奈良県新公会堂、東大寺総合文化センター) 2014 2014/06/11-13.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

多系統萎縮症の発病素因解析ならびに分子マーカーの開発

業務担当責任者 : 佐々木 秀直 北海道大学大学院医学研究科神経内科学
研究協力者 : 浜 結香¹、松島理明¹、矢部一郎¹、瀧川一学²、内海 潤^{1,3}
1) 北海道大学大学院医学研究科神経内科学
2) 北海道大学大学院情報科学研究科情報理工学専攻知識メディア研究室
3) 公益財団法人がん研究会

研究要旨:

400K CNV アレイによる解析により、非血縁の MSA 患者群(n=24)と成人対照群(n=23)の比較により、MSA に頻度の高い候補領域を複数検出した。また片方のみ MSA を発症した一卵性双生児(DMT)3組の比較により、発症者のみに共通する CNV 領域を 10 箇所特定した。この 10 箇所は、非血縁の患者群と対照群の解析では、MSA に特異的ではなかった。すなわち、疾患への寄与率の高い領域ではないことが示された。頻度の有意差については、多数例での検証が必要である。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) は成年期以降に発病する非遺伝性の神経変性疾患である。稀に家族性発症のあること、主たる症候に人種差のあることなどから、何らかの発病素因があると考えられる。その素因遺伝子の探索に関する報告は複数あるが、いまだ十分に解明されてはいない。本研究ではゲノム構造多型(CNV)の観点から素因遺伝子の解明を行うことを目的に、アレイ手法を用いて検討した。これまでにアレイ基盤、測定に使用する検体の品質によりデータが異なり解析結果に違いを生じることを報告してきた。それらを踏まえた実験、解析の工夫により、MSA 群に偏在する複数の CNV 候補領域の同定を目的とした。

B. 研究方法

前回の報告時より検体数を増やし、非血縁 MSA-C 患者 24 名、対照として非血縁の健常人 23 名の白血球ゲノム DNA を用いて、Agilent SurePrint G3 Human CNV 2x400k Array®に

より CNV を測定した。結果を CytoGenomics®、に加えて、北大独自手法 (報告済み) により解析した。候補領域については、患者及び対象群について、より多数例で解析した。JMP®を用いて二群間の統計学的有意差を検討した。

非血縁の対象群に加えて、片方のみ MSA を発症した一卵性双生児(disocordant monozygotic twin:DMT) 3組について dye-swap 法により同じく 400K アレイ解析を行なった。解析の作業仮説と手順を図に示した。

