

(倫理面への配慮)

研究は医学部医の倫理委員会の承認を得て行なった。被検者からの試料提供は口頭での説明に加えて、文書で説明し文書で同意を得た。

C. 研究結果

CytoGenomics®を用いた解析により平均5kbの範囲でコピー数の変化を示した領域はMSA群で165箇所であった。そのうち79箇所ゲノム領域には遺伝子はコードされていず、残りの86箇所には遺伝子がコードされている領域であった。その86箇所の中で神経組織に発現している遺伝子は75箇所であった。さらに、何らかの神経疾患との関連が報告されている遺伝子がコードされている領域は34箇所であった。この領域を一次スクリーニングの対象とした。これら領域について、アレイを用いて確認された領域、ゲノム上の位置、オッズ比などを考慮してMSAとの関連性が高い領域から優先順位を付けた。各々の候補領域についてはPCR法、リアルタイムPCR法、シーケンス解析などから、その領域のコピー数多型解析に適した方法を選択して候補領域の詳細な確認を行なった。現時点の結果ではゲノムの欠失や増幅多型はアレイ解析結果とPCR-ゲル電気泳動やqPCR解析結果とは良好な対応を認めた。

DMT3組の解析において、3組に共通してMSA患者に認められ、かつ非発症者にコピー数変化を認めなかった領域は10箇所であった。その内3箇所のゲノム領域については遺伝子がコードされていたが、残り7箇所は遺伝子がコードされていない領域であった。

片方のみMSAを発症したDMT例については10箇所の候補領域が特定された。これらの領域を非血縁の患者群と、成人対照群との比較した結果ではMSA群のみに特異的な領域は認められていない。現在、これらの領域について患者群と対照群で頻度に有意差があるか否か、

検討中である。

D. 考察

アレイCGH法は次世代シーケンサによる解析が困難な~Kb以上の構造多型解析に有力である。しかし、CNVアレイ解析はpseudo geneの存在や広範囲なメチル化部位などの影響を受けるので、web上のゲノムシーケンスデータベースを参照しながら、複数の解析手法を比べて解釈を進める必要がある。

ゲノムの欠損領域の確認について現時点ではPCR法の増幅とゲル電気泳動による判定が有効であり、多検体を処理できるという利点がある。この方法を用いて、検体数を増やして疾患との関連性の確認を推進中である。CNVアレイ解析でコピー数変化を示したが、リアルタイムPCR法でCNVとの相関が弱かった領域がある。その機序については、メチル化領域やSNPなどの多型が関与している可能性も考慮して原因を検討中する必要がある。

非血縁の患者と対照群の二群比較では、疾患特異的な変化もしくは浸透率の低い素因は、疾患とは直接関連性のない多型に埋没してしまう可能性を考慮しなくてはならない。それを極力排除する方法としてDMTの解析を進めている。現時点ではDMT3組においてMSA患者のみに共通してコピー数増加を示したCNV領域が10箇所認められている。それらの部位を非血縁の患者と対照群で比較した結果、MSA群に特異的ではなかった。ただし、二群間で頻度に相違があるか否かについては現在、解析を進めている。

3組のDMTでCNVが認められたことは、CNVそのものが個体発生早期の過程で生じることを示している。MSAは原則として孤発性疾患である。CNVがMSAの病態に関与していると仮定した場合、メンデル遺伝を示さないことを説明できるモデルの構築が必要となる。

E. 結論

400K CNV アレイによる解析により、非血縁のMSA患者群と成人対照群の比較により、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。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsushima M, Yabe I, Uwatoko H, Shirai S, Hirofumi M, Sasaki H. Reliability of the Japanese version of the Berg balance scale. *Inter Med* 53: 1621-1624, 2014
- 2) Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H. Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 2:173,2014
- 3) Matsushima M, Yabe I, Hirofumi M, Kano T, Sasaki H. Reliability of the Japanese version of the scales for outcomes in Parkinson's disease-autonomic questionnaire. *Clin Neurol Neurosurg* 124:182-4, 2014
- 4) Yasui K, Yabe I, Yoshida K, Kanai K, Arai K, Ito M, Onodera O, Koyano S, Isozaki E, Sawai S, Adachi Y, Sasaki H, Kuwabara S, Hattori T, Sobue G, Mizusawa H, Tsuji S, Nishizawa M, Nakashima K. *Orphanet J Rare Dis* 9:118,2014
- 5) Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Takahiro Kano Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S, Sasaki H. Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *J Neurol* 261:224-226,2014
- 6) Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 34:148-158,2014
- 7) Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. ALS-associated protein FIG4 is localized in Pick and Lewy bodies, and also neuronal nuclear inclusions, in polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. *Neuropathology* 34: 19-26, 2014
- 8) 矢部一郎, 佐々木秀直. 脊髄小脳変性症の治療の進歩 2013, *神経治療学* 31, 397-404, 2014

2. 学会発表

- 1) Matsushima M, Yabe I, Oba K, Sakushima K, Mito Y, Takei A, Houzen H, Tsuzaka K, Yoshida K, Maruo, Y, Sasaki H. Comparison Of Different Symptom Assessment Scales For Multiple System Atrophy In 1 Year. the 14th Asian and Oceanian Congress of Neurology, Macao, China, 3/2-3/5, 2014
- 2) Matsushima M, Yabe I, Oba K, Sakushima K, Mito Y, Takei A, Houzen H, Tsuzaka K, Yoshida K, Maruo Y, Sasaki

H. Comparison of different symptom assessment scales for multiple system atrophy -second report-. 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Stockholm, Sweden, 6/8-6/12, 2014

- 3) 松島理明, 矢部一郎, 佐久嶋研, 大庭幸治, 水戸泰紀, 武井麻子, 保前英希, 津坂和文, 吉田一人, 丸尾泰則, 佐々木秀直. 多系統萎縮症における症状評価スケールの比較 第2報. 第55回日本神経学会学術大会. 福岡, 2014
- 4) 白井慎一, 松島理明, 矢部一郎, 佐々木秀直. 脊髄小脳変性症における歩行分析. 第32回日本神経治療学会総会. 東京, 2014

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

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

業務担当責任者：武田 篤 仙台西多賀病院神経内科
研究協力者 : 長谷川隆文 東北大学医学部神経内科学分野

研究要旨

近年パーキンソン病 (PD)、多系統萎縮症 (MSA) などの神経変性疾患病態において、凝集化 α シヌクレイン (α S) の細胞間伝播現象が注目を集めている。本研究では新たなシヌクレイノパチーマウスモデルを作製し、その病態解析をすすめる一方、異常タンパク伝播阻止による病変拡大阻止をめざした新しい治療薬のスクリーニングを行う。

A. 研究目的

近年、胎児中脳ドパミン神経移植後 10 数年経過した PD 患者脳の剖検例の検討において、ドナー由来の神経細胞内に α シヌクレイン (α S) 陽性のレビー小体 (LB) 様封入体が確認されたという事実が複数のグループから報告された。この様な現象は、病理組織学的観察においてのみならず、培養細胞や動物モデルにおいても実証されており、孤発性神経変性疾患においても、プリオン病同様に細胞間において病原性タンパクの伝播が起こり、隣接する神経組織へ神経変性が拡大する可能性—いわゆるプリオン仮説とよばれる新たな病態機序が提唱され注目を集めている。申請者らは α S の吸収・分泌・分解に関与する細胞内分子機構を世界に先駆けて明らかにしてきた。一方、伝播に関わる α S の分子種の詳細や、伝播現象がシナプスを介するのか否かという問題については未だ議論がある。これらを踏まえ、本研究では組換えヒト α S を脳室内投与した新規 α S 脳内伝播マウスモデルを作製し、運動機能に与える影響および病理変化・脳内に蓄積する α S の生化学的特徴を経時的に観察した。これらの研究を通じ、異

常タンパク伝播阻止に立脚したこれまでにないシヌクレイノパチー進行抑制療法を提案することを最終目的とする。

B. 研究方法

BL21 大腸菌を用いて組み替えヒト α S を大量調製し、Amicon Ultra®を用いた限外濾過にて 50kDa 以下、50kD 以上の oligomer に分離した。併せて 37°C、180rpm で 21 日間振盪して fibrillar α S を作製した。得られた oligomer・fibrillar α S 各を麻酔下にマイクロインジェクターを用いマウス側脳室内に 1, 5, 10, 25 μ M 単回投与する (各 5 匹準備)。Vehicle 処理マウスと共に 1 週毎に運動機能 (open field での spontaneous locomotion、vertical grid trial、rotarod test) を評価した。投与 1、3、6 および 12 ヶ月後にマウスを sacrifice し、免疫染色法にて脳組織内に蓄積する内在性のマウス α S および外来性のヒト α S を観察した。併せて抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体によるドパミン神経細胞数の定量的評価を行った。

(本研究の一部に組み替え DNA 実験・動物

実験を含むことから、「国立大学法人東北大学組換え DNA 実験安全管理規定」および「国立大学法人東北大学動物実験等に関する規程」に沿って実験計画を立案し、学内の所定機関にて実験内容はすでに承認されている（受付番号：2013 医組換-131。）

C. 研究結果

α S 脳内伝播マウスモデルではコントロール群との比較で、投与開始 6 週目以降において、open field での spontaneous locomotion の有意な低下、および vertical grid trial での T total・T turn 時間の有意な延長が観察された。マウス脳組織の抗ヒト α S モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的観察では、 α S 投与群の嗅索、中脳黒質などにおいて、 α S 陽性細胞の増加を認めた。また、抗 TH 抗体を用いた免疫組織学的観察では、 α S 投与群の黒質および線条体にて、TH 陽性ニューロン数の減少傾向が観察された。これらの変化は、投与側の半球でより顕著であった。

D. 考察

これまでに作成された α S 脳内伝播マウスモデルはすべて脳実質への stereotactic injection によるものであったが、脳室内への単回投与モデルでも、PD 患者と同様に嗅索や中脳黒質に α S 病理が出現することが確認された。脳室壁への α S 沈着は目立っておらず、これらの病理変化は、神経線維連絡を介した伝播によるものと推測された。

E. 結論

組換えヒト α S を脳室内投与した新規 α S 脳内伝播マウスモデルを作製し、運動機能低下および脳組織における α S 病理変化を確認した。今後は投与する α S の分子種（オリゴマー、フィブリル）を複数種検討すると共に、複数回投与による運動症状・病理像の増強効

果がないか確認する予定である。また先行研究にて α S 取り込み抑制効果を確認した sertraline をはじめとする SSRI 製剤をマウスに同時投与し、臨床症状・病理変化の悪化が抑制されるか確認する。さらに BF227 α S アミロイド PET トレーサーを用い、sertraline 服用下における患者脳内での α S 病理拡大への影響についても経時的な観察を計画中である。

[参考文献].

1. Konno M, Hasegawa T, et al. Suppression of dynamin GTPase decreases α -synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener* 2012;7(1):38.
2. Hasegawa T, Konno M, et al., The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -synuclein. *PLoS One* 2011; 6(12):e29460.

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) Miura E, Hasegawa T, Konno M, Suzuki M, Sugeno N, Fujikake N, Geisler S, Tabuchi M, Oshima R, Kikuchi A, Baba T, Wada K, Nagai Y, Takeda A, Aoki M. VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of α -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2014; 71:1-13.

- 2) Sugeno N, Hasegawa T, Tanaka N, Fukuda M, Wakabayashi K, Oshima R, Konno M, Miura E, Kikuchi A, Baba T, Anan T, Nakao M, Geisler S, Aoki M, Takeda A. Lys-63-linked Ubiquitination by E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1 Facilitates Endosomal Sequestration of Internalized α -Synuclein. *J Biol Chem.* 2014; 289: 18137-18151.
- 3) Takeda A, Baba T, Kikuchi A., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Miura E., Mori E., Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 4:181-187, 2014.
- 4) Stankovic I., Krismer F., Jesic A., Antonini A., Benke T., Brown RG., Burn DJ., Holton JL., Kaufmann H., Kostic VS., Ling H., Meissner WG., Poewe W., Semnic M., Seppi K., Takeda A., Weintraub D., Wenning GK., Cognitive impairment in multiple system atrophy: A position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS multiple system atrophy (MODIMSA) Study Group., *Movement Disorders* 2014;29:857-867,.
- 5) Shoji Y., Nishio Y., Baba T., Uchiyama M., Yokoi K., Ishioka T., Hosokai Y., Hirayama K., Fukuda H., Aoki M., Hasegawa T., Takeda A., Mori E., Neural substrates of cognitive subtypes in Parkinson's disease: a 3-year longitudinal study., *PLoS One.* 9:e110547, 2014.
- 2. 学会発表**
長谷川隆文. 神経変性疾患関連タンパク分解における ESCRT 系の役割. 第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 16 日
- 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

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

業務担当責任者：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)

研究協力者：太田浄文¹⁾²⁾、大北 倫¹⁾、横田隆徳¹⁾、水澤英洋¹⁾³⁾

1) 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)

2) JA とりで総合医療センター神経内科

3) 国立精神・神経医療研究センター

研究要旨

TPPP(tubulin polymerization promoting protein)は oligodendroglia (ODG)に特異的に発現する蛋白で、多系統萎縮症(MSA)においては TPPP が ODG 内で分布を変化させ、GCI 形成と共にミトコンドリア蛋白の異常集積にも関係している可能性がある。本研究では TPPP を培養細胞に発現させ、ミトコンドリアの形態を観察した。未だ研究は完結していないが、目下のところミトコンドリアの形態異常を伴っていると考えられた。今後、TPPP 過剰発現によるミトコンドリア異常の機序を解明し、MSA の病態解明に挑みたい。

A. 研究目的

TPPP(tubulin polymerization promoting protein)は oligodendroglia (ODG)に特異的に発現する蛋白で、多系統萎縮症(MSA)においては α シヌクレイン(α SYN)の沈着に先行して核周囲の細胞体に集積するという報告¹⁾もある。我々は TPPP が正常な状態では ODG の細胞質だけでなく核と、細胞質内小器官ではミトコンドリアにも局在すること、MSA 患者の ODG 内ではミトコンドリア蛋白と共局在する様に膨化した細胞質内で TPPP が集積し、しばしばグリア細胞質内封入体(GCI)に一致するように局在を変化していることを発見し報告した²⁾。しかし、TPPP の機能とミトコンドリアの関係は不明であり、MSA の ODG のように、細胞質に TPPP が集積し

た際にミトコンドリアにどのような影響が起きるかも不明である。

本研究の目的は、TPPP を過剰発現した際のミトコンドリアの変化を明らかにすることである。

B. 研究方法

TPPP を組み込んだ pALC ベクターを作製し HeLa 細胞に導入した。対照には MBP を組み込んだベクターと empty なベクターを用いた。TPPP を導入した細胞の画分で、TPPP の細胞内局在を Western blotting(WB)で検討した。

ミトコンドリアの形態学的評価は、pDSRed2-Mito ベクターを同時に導入しその蛍光を顕微鏡下で観察した。

(倫理面への配慮)

東京医科歯科大学の医学部遺伝子解析研究に関する倫理委員会において審査を受け、承認を得て行った。

C. 研究結果

レコンビナント(r)TPPPは細胞質とミトコンドリアに局在していたが核には分布していなかった。一方、rMBPは細胞質のみに局在していた。rTPPPを導入した細胞群では断片化されたように見えるミトコンドリアが増加していた。

D. 考察

今回の研究は未だ最終結論には至っていないが、レコンビナントTPPPを、本来TPPPを発現していない培養細胞に強制的に発現させると、核ではなく細胞質に集積し、さらにミトコンドリアに形態的变化を起こす可能性を得た。これまでTPPPは細胞質に局在する蛋白として報告されてきたが、我々はTPPPがミトコンドリアにも局在する蛋白であることを確認している。この蛋白がミトコンドリアに集積すると、ミトコンドリアの分裂などの形態異常を起こす可能性が考えられる。現時点では未だTPPPの過剰発現が、ミトコンドリアのどのような機能障害を起こすかは不明である。特にミトコンドリアの形態的異常がTPPPの過剰発現による直接的な影響である確証もないため、今後さらなる研究が必要である。

E. 結論

培養細胞を用いた実験では、TPPPを過剰発現すると一部は確かにミトコンドリアに局在することがわかった。また、TPPPを過剰発現させたときにはHeLa細胞ではミトコンドリアが断片化する。この病態は不明であり、今後解明する必要がある。さらに、MSA患

者脳ODG内のミトコンドリア形態変化も併せて検索する必要がある。

[参考文献]

1. Song YJ, Lundvig DM, Huang Y, Gai WP, Blumbergs PC, Hojrup P, Otzen D, Halliday GM, Jensen PH. p25 α relocalizes in oligodendroglia from myelin to cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Am J Pathol* 171:1291-1303, 2007.
2. Ota K, Obayashi M, Ozaki K, Ichinose S, Kakita A, Tada M, Takahashi H, Ando N, Eishi Y, Mizusawa H, and Ishikawa 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]

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) Ota K, Obayashi M, Ozaki K, Ichinose S, Kakita A, Tada M, Takahashi H, Ando N, Eishi Y, Mizusawa H, and Ishikawa 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]

- 2) Obayashi M, Stevanin G, et al. Spinocerebellar ataxia 36 exists in diverse populations and can be caused by a short hexanucleotide GGCTG repeat expansion. *J Neurol Neurosurg & Psychiatry*, 2014, Dec 4. Online.
- 3) Ozaki K, Sanjo N, Ishikawa K, Higahsi M, Hattori T, Tanuma N, Miyata R, Hayashi M, Yokota T, Okawa A, Mizusawa H. Elevation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of three patients with superficial siderosis. *Neurology and Clinical Neuroscience*, In press.
- 4) Ozaki K, Irioka T, Ishikawa K, Mizusawa H. CADASIL with a Novel NOTCH3 Mutation (Cys478Tyr). *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. In press.
- 5) Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hattori N. The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 35(7):1779.e17-21, 2014.
- 6) 榊原聡子, 饗場郁子, 齋藤由扶子, 犬飼晃, 石川欽也, 水澤英洋. Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31)の臨床像, 画像所見—Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)との小脳外症候の比較検討— *臨床神経学* 54:473-479, 2014.

2.学会発表

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. 総説など

- 1) 石川欽也. XV.小脳の障害と運動失調. 1. 小脳の解剖と機能. In: 橋本信夫監修、三國信啓、深谷 親編集, 「脳神経外科ブラックティス. 3.脳神経外科医のための脳機能と局在診断」文光堂, 2014; 278-282.
- 2) 石川欽也. XV.小脳の障害と運動失調. 2. 小脳機能障害の分類. In: 橋本信夫監修、三國信啓、深谷 親編集, 「脳神経外科ブラックティス. 3.脳神経外科医のための脳機能と局在診断」文光堂, 2014; 283-284.
- 3) 石川欽也. XV.小脳の障害と運動失調. 3. 小脳機能障害の評価. In: 橋本信夫監修、三國信啓、深谷 親編集, 「脳神経外科ブラックティス. 3.脳神経外科医のための脳機能と局在診断」文光堂, 2014; 285-287.
- 4) 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症の分類. In: 別冊 日本臨床. 新領域別症候群シリーズ No.27. 神経症候群(第 2 版) その他の神経疾患を含めて. II. 日本臨床, 2014; 330-335.
- 5) 佐藤 望, 石川欽也, 水澤英洋. 16q-ADCA (SCA31). In: 別冊 日本臨床. 新領域別症候群シリーズ No.27. 神経症候群(第 2 版) その他の神経疾患を含めて. II. 日本臨床, 2014; 365-368.
- 6) 石川欽也, 水澤英洋. 周期性失調症 II 型. In: 別冊 日本臨床. 新領域別症候群シリーズ No.27. 神経症候群(第 2 版) その他の神経疾患を含めて. II. 日本臨床, 2014; 452-455.
- 7) 石川欽也. 脊髄小脳変性症, ALS. In: 星 恵子、大野 勲、齋藤英胤、藤井 聡、

増子佳世、三木知博、水谷颯洋、武藤章弘、山下直美 編集, 「やさしい臨床医学テキスト」第3版 薬事日報社, 2014; 43-45.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許出願

- 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

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 たんぱく質 (DRPLA) の生理的機能に 基づく治療法開発研究

業務担当責任者：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
研究協力者：波多野敬子¹⁾、伊達英俊¹⁾、三井純¹⁾、石浦浩之¹⁾、吉村淳²⁾、
土井晃一郎²⁾、森下真一²⁾、辻省次¹⁾
1) 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
2) 東京大学大学院新領域創成科学研究科

研究要旨

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症蛋白質 (DRPLA) の転写 co-regulator としての標的遺伝子の検討を行った。テトラサイクリン (Tet) 誘導 全長 DRPLA 発現細胞系 (正常 polyQ₁₉、及び異常伸長 polyQ₈₈) を用い、Tet-ON 24 時間後の RNA にて、次世代シーケンサーによる RNAseq により網羅的な遺伝子発現解析を行った。DRPLA (Q₁₉) 発現に並行し、解析可能遺伝子の 99.7%が、ON で OFF に比し 0.5 倍~2.0 倍の範囲で発現変動した。有意に発現変動した遺伝子は 99 個であった。

A. 研究目的

DRPLA 原因遺伝子産物 DRPLA は共役蛋白質と共に転写調節機能を有することが示唆されているが、転写調節の標的遺伝子や共役蛋白質は同定されていない。

テトラサイクリン (Tet) 誘導全長 DRPLA 発現細胞系 (正常 polyQ₁₉、及び異常伸長 polyQ₈₈) を用い、次世代シーケンサーによる RNAseq により網羅的な遺伝子発現解析を行い、転写調節標的遺伝子を探索することを目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞 ; Tet-On/Off system 制御下で GFP-full length DRPLA (Q₁₉ or Q₈₈) 融合遺伝子を定常発現する HEK293 細胞株 (以下 Q₁₉、Q₈₈) を用いた。

2) 発現実験 ; 6 well plate で約 3.0×10⁶ cell/well、培地 3 ml/well とし、Tet 添加濃度は 1µg/ml とした。

3) RNA 抽出 ; 細胞からの total RNA 抽出 (Qiagen, RNeasy Plus Mini kit) の後、BioAnalyzer (Agilent Technologies) にて RNA Integrity Number >9 を確認した。

4) RNAseq の対象とするタイムウィンドウの検討 ; Q₁₉、Q₈₈ の定量 PCR (Tet-ON 0, 12, 24, 48, 72 時間後)、Q₁₉ の Western Blot (Tet-ON 24, 48, 72 時間後) を行った。

(i) 定量 PCR ; total RNA から cDNA を調製の後、Target を DRPLA、Endogenous Control を ACTB とし、比較定量法 (n=5) により行った。

(ii) Western Blot ; total protein に対し、抗 GFP 抗体、抗 β -actin 抗体 (Control) を用いた。

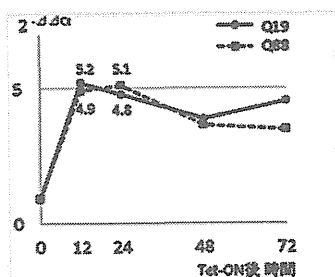
5) RNAseq ; total RNA 1 μ g から ribosomal RNA depletion を行った後、random primer により逆転写を行い cDNA library を調製した (Illumina, TruSeq Stranded Total RNA with Ribo Zero Gold Kit) 。Q19, Q88 の、各々 Tet-ON, OFF の 2 条件 (以下 ON, OFF) について、biological triplicate とした 2 回ずつ行った。HiSeq2500 を用いて paired-end read (101 bp \times 2) の sequence を行った。Q19 (ON) vs Q19 (OFF) (Q19 の存在下での発現変動遺伝子のプロファイリング)、Q88 (ON) vs Q19 (ON) (Q19 で得られた遺伝子発現プロファイリングが Q88 の存在下で受ける影響) の比較を計画した。解析は、マッピングは TopHat-2.0.8b、Bowtie2-2.1.0、発現解析は Cufflinks-2.1.1 を用いた。

(倫理面への配慮)

HEK293 細胞株を用いた実験で、特に問題はない。

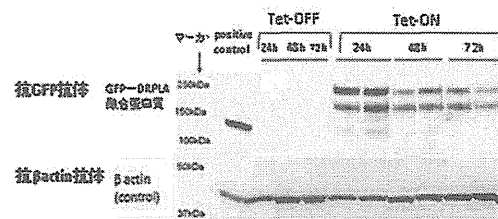
C. 研究結果・考察

1. 定量 PCR ; DRPLAmRNA 転写量は、Tet-ON 12 時間後、24 時間後で Q19, Q88 共に上昇が得られた。



2. Western Blot ; Tet-ON 24 時間後の GFP-DRPLA 融合蛋白質 (150kDa~

250kDa の 2 本のバンド) の発現を確認した。



3. RNAseq ; Q19 (ON) vs Q19 (OFF)

- ① 平均 mapped read 数/sample は antisense 3.5×10^7 、sense 3.7×10^7 であった。
- ② 遺伝子発現量の再現性は 3 組の実験間の FPKM 値について、Pearson の積率相関係数は 0.99~1.00 であった。
- ③ Q19 では、Tet-ON/OFF にて、DRPLA 発現は 2.2 倍で有意に増加し ($p=0.007$)、ACTB 発現に有意な変動はなかった ($p=0.989$)。尚、p 値は FDR 補正值、有意水準は $p < 0.01$ 。
- ④ 解析可能遺伝子数は 13,891、うち有意な発現変動遺伝子数は、99 (0.7%) であった (ON で down-regulation が 57%、up-regulation が 43%)。Fold Change は解析可能遺伝子の 99.7% が 0.5 倍~2.0 倍であった。発現変動遺伝子に対し、厳格な filtering 条件¹⁾ (平均発現量が発現変動遺伝子の上位 8 割の遺伝子のうち、Fold Change 0.5 未満または 2 より大) では、再現性の確認が必要であるが、4 遺伝子 (up-regulation 1 遺伝子、down-regulation 3 遺伝子) が残った。

D. 結論

正常 polyQ 長 DRPLA 発現系を用いて Tet-ON による DRPLAp の発現誘導を Western blot にて確認した。RNAseq 解

析で、OFF 時に対し ON 時の発現変動は、解析可能遺伝子の 99.7%が 0.5 ～2.0 倍の範囲で、有意に発現変動した遺伝子は 99 であった。

今後は全実験サンプルの解析結果を踏まえて、DRPLAp（正常 polyQ₁₉、及び異常伸長 polyQ₈₈）の転写 co-regulator としての標的の同定を進めたいと考えている。

[参考文献]

- 1) SEQC/MAQC-III Consortium. A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium. Nature Biotechnology 2014;32: 903-914.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表（2014/4/1～2015/3/31 発表）

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

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

業務担当責任者：阿部康二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

研究協力者：山下徹¹⁾, 太田康之¹⁾, 松菌構祐¹⁾, 菱川望¹⁾, 塩見一剛²⁾, 中里雅光²⁾,
大窪隆一³⁾, 高嶋博³⁾

1) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

2) 宮崎大学医学部内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野

3) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病態学講座 神経内科・老年病学

研究要旨

Asidan (SCA36)は臨床的に緩徐進行性の小脳失調症を主症状とし、舌や四肢・体幹の筋萎縮や線維束性収縮などの運動ニューロン徴候を高率に合併する特異な臨床像を示す。最近、本疾患患者が岡山県西方のみならず、宮崎県にも複数の家系が報告されてきた。そこで、岡山大学、宮崎大学、鹿児島大学 3 大学合同で宮崎県在住の計 3 名の Asidan 患者を診察ならびに認知機能検査を行い、また既にこれまでに行われていた頭部 MRI、脳血流 SPECT、末梢神経伝導速度検査等の電気生理学的検査を含めた検査結果も併せて比較検討した。宮崎大学での姉妹例では、小脳失調と上位運動ニューロン兆候に加え斜頸を認めた。また宮崎県串間市の症例では、起立性低血圧や MIBG 心筋シンチグラムでの集積低下などパーキンソン病類似の病態が並存している可能性が示唆された。本研究の結果から、Asidan の一部の家系に錐体外路障害や自律神経障害が起きている可能性が示唆された。

A. 研究目的

岡山大学神経内科では 50 歳以降に小脳失調で発症し、数年を経て舌や四肢の筋萎縮や脱力、線維束性収縮などの運動ニューロン障害を呈する特異な常染色体優性遺伝性家系を集積し、そのほとんどが岡山県西方 (広島県東部) にある芦田川流域の出身であったことから、Asidan と命名してきた。また、これまでに NOP56 遺伝子イントロン 1 における GGCCTG リpeat異常延長が本疾患の原因遺伝子変異であることも既に同定を行っている。一方、本疾患患者が岡山県西方のみならず、宮崎県にも複数の家系が報告されてきて

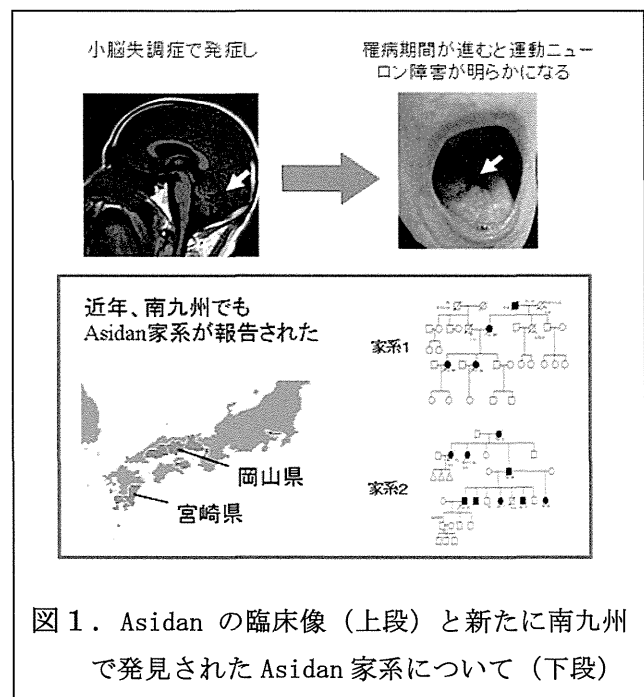


図 1. Asidan の臨床像 (上段) と新たに南九州で発見された Asidan 家系について (下段)

いる。そこで本研究では、この小脳失調症と運動ニューロン疾患の特徴を併せ持つ新たな遺伝性神経変性疾患 Asidan (spinocerebellar ataxia type 36: SCA36) の臨床的特徴を明らかにすることを目的に以下の研究を行った。

B. 研究方法

岡山大学神経内科より阿部教授以下4名が宮崎県に出向し、宮崎大学の中里教授、鹿児島大学高嶋教授と共に、計3名の Asidan 患者を診察ならびに認知機能検査を行った。また既にこれまでに行われていた頭部 MRI、脳血流 SPECT、末梢神経伝導速度検査等の電気生理学的検査を含めた検査結果も併せて比較検討した。



図2. 姉妹例を含む計3名の Asidan 患者の診察ならびに認知機能検査を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に参加した患者からは研究参加に向けて同意を取得し、その個人情報も万全の注意を払って保護に努めた。

C. 研究結果

宮崎大学での姉妹例では、小脳失調と上位運動ニューロン兆候に加え斜頸を認めた。また宮崎県串間市の症例では、起立性低血圧や MIBG 心筋シンチグラムでの集積低下などパーキンソン病類似の病態が並存している可能性が示唆された。

D. E. 考察と結論

本研究の結果から、一部の家系に錐体外路障害や自律神経障害が起きている可能性が示唆された。

[参考文献]

[雑誌]

1. Abe, K., Ikeda, Y., Kurata, T. et al. (2012) Cognitive and affective impairments of a novel SCAMND crossroad mutation Asidan. *Eur J Neurol*, 19, 1070-1078.
2. Ikeda, Y., Ohta, Y., Kobayashi, H. et al. (2012) Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology*, 79, 333-341.
3. Kobayashi, H., Abe, K., Matsuura, T. et al. (2011) Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet*, 89, 121-130.

[書籍]なし

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

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

業務担当責任者：松浦 徹 自治医科大学内科学講座神経内科学部門,

研究協力者：黒崎 辰昭^{1),2)}、山下喜洋¹⁾、大野欽司¹⁾、Partha S. Sarkar³⁾

1) 名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学,

2) Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, 3) Department of Neurology and Neuroscience and Cell Biology, University of Texas Medical Branch

研究要旨

脊髄小脳失調症 10 型 (SCA10) の原因遺伝子変異は 22q13.3 上の *ATXN10* イントロン 9 に存在する ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である (280~4500 リピート)。筋強直性ジストロフィーで明らかにされたように、RNA レベルで伸長 AUUCU リピートが SCA10 分子病態に寄与しているものと考えられており、SCA10 患者由来リンパ芽球の AUUCU 核内凝集体の存在は既に示されている。本研究では、AUUCU 凝集体の核内局在について解析を加え、傍核小体との共局在を認めた。また、伸長 AUUCU リピート結合タンパクの検索を行い、4 種の核タンパクを同定した。これらのタンパクはいずれも AUUCU 凝集体との共局在を認めた。その中の 1 つである PTBP1 においては、そのスプライシング因子としての機能障害を生じていた。更に、SCA10 剖検脳組織を用いて、これらの分子病態を確認した。

A. 研究目的

SCA10 の原因遺伝子変異は 22q13.3 上の *ATXN10* イントロン 9 に存在する ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である (280~4500 リピート)。この非翻訳領域リピート伸長が、何故どのように優性遺伝様式で病気を発症させるのかは十分に解明されていない。同じく非翻訳領域に CTG/CCTG リピート異常伸長をもつ筋強直性ジストロフィー (DM) の RNA 病態が明らかになってきた。すなわち、伸長 CTG リピートが RNA に転写され、CUG 転写物とその結合蛋白と核内凝集体(foci)を作ることがトリガーとなり、核内 RNA 蛋白制御不全をもたらすというもので

ある。SCA10 においても ATTCT 伸長リピートが RNA レベルで転写され、AUUCU foci を形成することを既に示されている。そこで、本研究の目的は 1) AUUCU foci の核内局在を明らかにすること、2) AUUCU 結合タンパクを同定し、3) その機能不全を解析することで、SCA10 RNA 病態を明らかにすることにある。

B. 研究方法

1) AUUCU foci 核内局在の解析

SCA10 リンパ芽球を用いて RNA-FISH で核内 AUUCU foci 検出後、その核内局在をより明らかにするために免疫蛍光法 (IF) を組

み合わせ、核膜（抗 Lamin B1 抗体）、核小体（抗 nucleolin 抗体）、PML 小体（抗 PML 抗体）、Cajal 小体（抗 Coilin 抗体）、スペックル（抗 SC35 抗体）、傍核小体（抗 CUGBP1 抗体）等との共局在を FISH-IF により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2) AUUCU 結合タンパク同定

ヒトリンパ芽球と神経芽腫細胞から核抽出物を精製し、AUUCU-pull down 法で質量分析により同定した。更にウエスタン法 (WB) で確認した。

3) SCA10 細胞における AUUCU 結合因子の発現解析

SCA10 リンパ芽球を用いて、2) で同定された AUUCU 結合タンパクと AUUCU 封入体との共局在を FISH-IF で検討した。更にそれらの発現量・スプライシングパターンを WB と RT-PCR でそれぞれ対照と比較検討した。さらに、その機能異常を検討した。

4) SCA10 剖検例での検討

SCA10 剖検例を用いて、AUUCU foci を検出し、2) で同定された AUUCU 結合タンパクの機能不全を実際の患者脳組織 (大脳・小脳) を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って行った。

C. 研究結果

D. 考察

E. 結論

- 1) AUUCU 封入体は傍核小体に局在していた。疾患コントロールとして筋強直性ジストロフィー 1 型・2 型 (DM1、DM2) の CUG、CCUG 封入体等はその局在が異なった。
- 2) AUUCU 結合タンパクとして MATRN3、PSF、p54nrb、PTBP1 の 4 種を確認した。
- 3) FISH-IF の結果、SCA10 リンパ芽球に

おいて上記の 4 因子は、AUUCU foci と共局在していた。SCA10 リンパ芽球の核抽出物を用いた WB 法では、対照と比較して発現レベルに差を認めなかった。しかしながら、PTBP1 がスプライシング調節している遺伝子のスプライシング異常が生じて、そのタンパクの発現が著明に上昇していた。

4) SCA10 剖検例において、核内 AUUCU foci を認めた。PTBP1 との共局在を確認し、PTBP1 の機能不全による異常スプライシングを、リンパ芽球と同様に確認した。

[参考文献]

1. Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Alu-mediated acquisition of unstable ATTCT pentanucleotide repeats in the human *ATXN10* gene. *Mol Biol Evol* 2009;26:2573-2579.
2. Hagerman KA, Ruan H, Edamura KN, Matsuura T, Pearson CE, Wang YH. The ATTCT repeats of spinocerebellar ataxia type 10 display strong nucleosome assembly which is enhanced by repeat interruptions. *Gene* 2009;434:29-34.
3. Almeida T, Alonso I, Martins S, Ramos EM, Azevedo L, Ohno K, Amorim A, Saraiva-Pereira ML, Jardim LB, Matsuura T, Sequeiros J, Silveira I. Ancestral origin of the ATTCT repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10). *PLoS One* 2009; 4:e4553.
4. #Kobayashi H, #Abe K, #Matsuura T (#equally contributed), Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Yang LW, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes a type of spinocerebellar ataxia (SCA36) accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet*

2011; 89:121-130.

5. Xia G, McFarland KN, Wang K, Sarkar PS, Yachnis AT, Ashizawa T. Purkinje cell loss is the major brain pathology of spinocerebellar ataxia type 10. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84:1409-1411.

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) Kameda T, Namekawa M, Shimazaki H, Minakata D, Matsuura T, Nakano I. Unique combination of hyperintense vessel sign on initial FLAIR and delayed vasoconstriction on MRA in reversible cerebral vasoconstriction syndrome: case report. *Cephalalgia* 2014;34:1093-6
- 2) Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K, Matsuura T* (*corresponding author). Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet* 2014;59:129-33.
- 3) Sato K, Morimoto N, Deguchi K, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Seven amyotrophic lateral sclerosis patients diagnosed only after development of respiratory failure. *J Clin Neurosci* 2014;218:1341-3.
- 4) Yamashita Y#, Tohru Matsuura# *

(#equally contributed, *corresponding author), Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita T, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Dis* 2014;69:200-5.

- 5) Gao R, Liu Y, Silva-Fernandes A, Fang X, Paulucci-Holthausen A, Chatterjee A, Zhang HL, Matsuura T, Choudhary S, Ashizawa T, Koeppen AH, Maciel P, Hazra TK, Sarkar PS. Inactivation of PNKP by mutant ATXN3 triggers apoptosis by activating the DNA damage response pathway in SCA3. *PLoS Genet* 2015;11:e1004834.

2. 学会発表

松浦 徹.「筋強直性ジストロフィーの分子病態～治療」.日本遺伝カウンセリング学会主催第6回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー. 大阪、2015年1月10日.

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

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

業務担当責任者： 瀧山嘉久 山梨大学大学院総合研究部医学域神経内科学
研究協力者： 高 紀信 山梨大学大学院総合研究部医学域神経内科学
星野恭子、泉鉉吉 南和歌山医療センター小児科
石浦浩之、辻 省次 東京大学神経内科
JASPAC Japan Spastic Paraplegia Research Consortium

研究要旨

遺伝性痙性対麻痺は heterogeneous な疾患群であり、分子遺伝学的に SPG1 から SPG72 まで分類されているが、表現型の異なる他疾患の原因遺伝子変異でも痙性対麻痺を呈する事がある。今回、我々は幼児期発症の痙性失調症を呈した一卵性双生児家系のエクソーム解析から *PLA2G6* 遺伝子による infantile neuroaxonal dystrophy の一病型として痙性失調を呈していることを見出した。*PLA2G6* は、これまでに JASPAC に登録されている常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺 88 症例では認められず、本邦では稀な疾患であると考えられた。

A. 研究目的

遺伝性痙性対麻痺は heterogeneous な疾患群であり、分子遺伝学的に SPG1 から SPG72 まで分類されているが、表現型の異なる他疾患の原因遺伝子変異でも痙性対麻痺を呈する事がある¹⁾。その例として、我々はこれまでに *c12orf65*²⁾、*LYST*³⁾、*PNPLA6*⁴⁾ 変異を報告してきた。今回、我々は幼児期発症の痙性失調症を呈した一卵性双生児例について原因遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

症例は6歳の男児2名である。妊娠分娩に問題はなかった。2歳9ヶ月で知的障害、多動、筋緊張低下を認めた。3歳過ぎから歩行障害が出現し、4歳9ヶ月から下肢痙縮が強くなったためボトックス療法を受けている。

脳神経領域には明らかな異常所見を認めなかった。筋力は MMT4 レベル以上あると考

えられた。四肢で筋緊張の低下を認めた。膝蓋腱反射の亢進を認めたが、その他の部位では正常範囲であった。歩行は失調性であった。明らかな錐体外路症状は認めなかった。

頭部 MRI において小脳の萎縮を認めた。基底核などに異常な鉄沈着は認めなかった(下図)。



長男と両親においてエクソーム解析を行い、ホモ接合性変異と複合ヘテロ接合性変異の検索を行った。候補遺伝子については、Sanger 法を用いて co-segregation を確認した。

加えて、過去に JASPAC でエクソーム解析