

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(2015)年 3 月

目 次

・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

・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学
- 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 . 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 たんぱく質 (DRPLap) の生理的機能に基づく治療法開発研究………… 13
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
- 4 . 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………… 17
岡澤 均 東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学
- 5 . 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………… 20
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
- 6 . 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………… 24
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
- 7 . 脊髄小脳失調症の霊長類モデルの作製と検証………… 27
平井 宏和 群馬大学大学院医学系研究科神経生理学
- 8 . 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………… 30
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
- 9 . 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 形成を指標にした治療薬の探索………… 33
池田 佳生 群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学
- 10 . 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………… 36
松浦 徹 自治医科大学医学部神経内科学
- 11 . 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………… 41
佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究科神経内科学

1 2 . 多系統萎縮症のモデル動物作製と分子病態解明	44
若林 孝一 弘前大学大学院医学研究科・脳神経病理学	
1 3 . 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	47
武田 篤 国立病院機構仙台西多賀病院	
1 4 . 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	50
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	
1 5 . 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	53
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	
1 6 . 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	56
瀧山 嘉久 山梨大学医学部神経内科学	
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	
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 - 脊髄小脳変性症と多系統萎縮症での検討	62
田中 真樹 北海道大学大学院医学研究科神経生理学	
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・対応システムの開発	65
寛 慎治 公益財団法人東京都医学総合研究所・運動失調プロジェクト	
. 学会発表実績	71
. 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	
. 研究成果の刊行物・別刷	85

厚生労働科学研究委託費
(生活習慣病・難治性疾患克服実用化研究事業(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)))
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

業務主任者 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、新しいシーズ解明と既知薬剤のリポジショニング推進、

現有・新規モデル動物の解析を経た病因解明、原因不明疾患での原因同定、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、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。

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。

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。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。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。

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 paeonefrolin 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。

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 を見いだしその機序を明らかにした。

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ユéronが重要である可能性を示唆する知見を

得た。

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。

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の実施が困難である。

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独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、民間での利活用に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。

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：蒋 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。

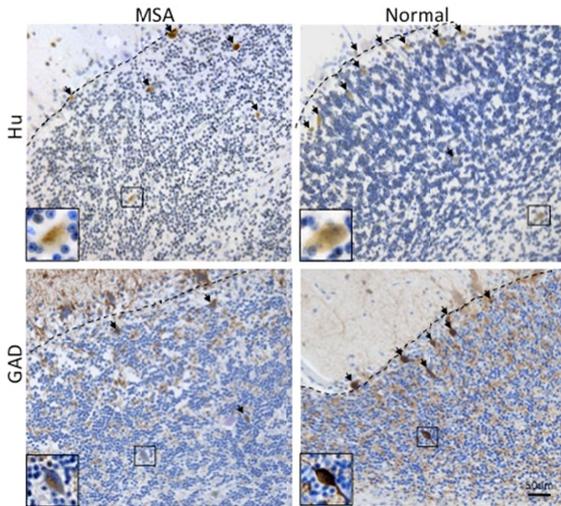


図 1. MSA およびコントロール小脳における Hu 陽性インターニューロンおよび GAD 陽性インターニューロン

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。

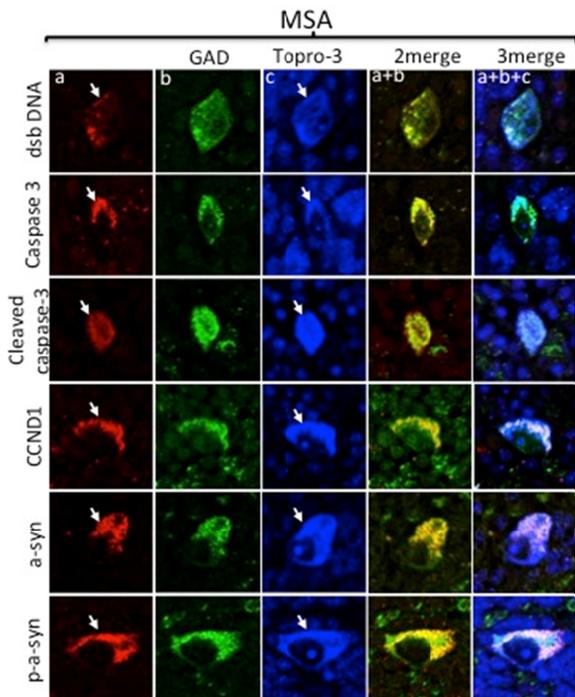


図 2. MSA 小脳インターニューロンにおける細胞障害

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。本研究班の目的である、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かどうかを検討することとした。本年度はシヌクレイノパチー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体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 β 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) 2014/06/11-13.

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

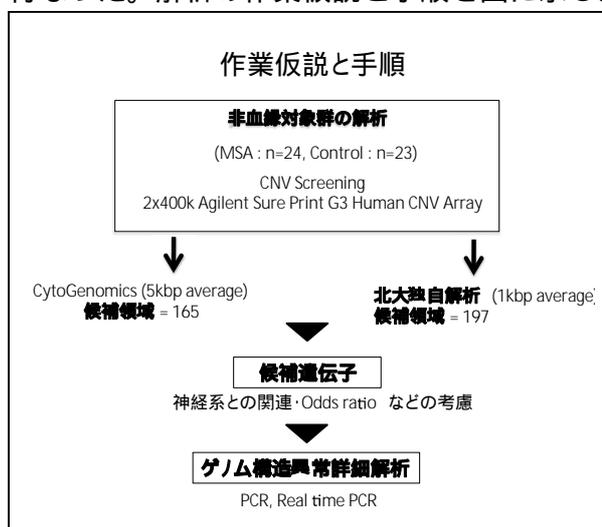
多系統萎縮症 (MSA) は成年期以降に発病する非遺伝性の神経変性疾患である。稀に家族性発症のあること、主たる症候に人種差のあることなどから、何らかの発病素因があると考えられる。その素因遺伝子の探索に関する報告は複数あるが、いまだ十分に解明されていない。本研究ではゲノム構造多型(CNV)の観点から素因遺伝子の解明を行うことを目的に、アレイ手法を用いて検討した。これまでにアレイ基盤、測定に使用する検体の品質によりデータが異なり解析結果に違いを生じることを報告してきた。それらを踏まえた実験、解析の工夫により、MSA 群に偏在する複数の CNV 候補領域の同定を目的とした。

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 (discordant 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。



(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箇所のゲノム領域には遺伝子がコードされていない、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、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 Ned4-1 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., 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 /TTPP 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、水谷顕洋、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 3.0×10^6 cell/well、培地 3 ml/well とし、Tet 添加濃度は $1 \mu\text{g/ml}$ 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。
() 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。

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

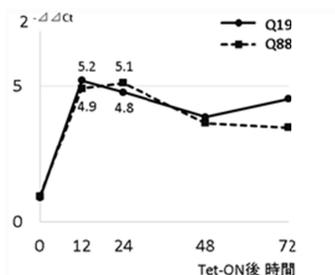
- 5) RNAseq ; total RNA 1 μ g から ribosomal RNA depletion を行った後、random primer により逆転写を行い cDNA library を調製した (Illumina, TruSeq Stranded Total RNA with Ribo Zero Gold Kit)。Q19, Q88 の、各々 Tet-ON, OFF の 2 条件 (以下 ON, OFF) について、biological triplicate とした 2 回ずつ行った。HiSeq2500 を用いて paired-end read (101 bp \times 2) 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 ; DRPLA mRNA 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)

平均 mapped read 数/sample は antisense 3.5×10^7 、sense 3.7×10^7 であった。

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。

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 $p < 0.01$ 。

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 DRPLA_p 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

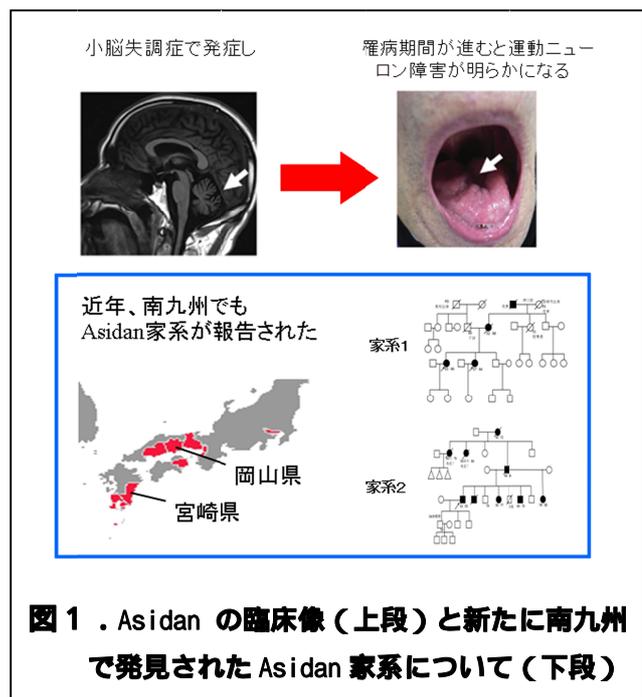
3) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病態学講座 神経内科・老年病学

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 リピート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



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 SCA/MND 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 転写物がその結合蛋白と核内凝集体 (foci) を作ることでトリガーとなり、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-Holthauzen 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。

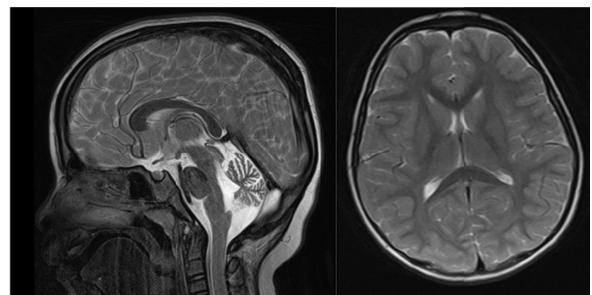
B. 研究方法

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

を行った症例の中に *PLA2G6* 遺伝子変異を伴う症例が含まれていたかどうかを検討した。**(倫理面への配慮)**

DNA サンプルを収集した研究協力者には山梨大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。また個人情報の取り扱いについては山梨大学個人情報保護規定に従って管理を行った。

C. 研究結果

双生児において、*PLA2G6* 遺伝子に新規の複合ヘテロ接合性変異 (c.517C>T/c.1634A>G, p.Q173X/p.K545R) を認めた。双生児はそれぞれ c.517C>T を父から、c.1634A>G 変異を母から受け継いでいた。この2つの変異は既報告のない変異ではあるものの、Mutation taster による in silico 解析では disease causing の判定であり、種を超えてアミノ酸配列が保存されている領域であることから本症例の原因遺伝子と考えた。

JASPAC に登録された常染色体劣性遺伝性と考えられる痙性対麻痺 88 症例中には *PLA2G6* 変異を伴う症例は認められなかった。

D. 考察

PLA2G6 遺伝子は infantile neuroaxonal dystrophy(INAD)、neurodegeneration with brain iron accumulation(NBIA)や PARK14 の原因遺伝子として知られている⁵⁾。本邦においては juvenile-onset neuroaxonal dystrophy 1 例, early-onset parkinsonism 3 例の報告がある^{6, 7)}。*PLA2G6* 変異例は, parkinsonism, mental retardation, hyperreflexia をきたすことが知られているが、特に幼児発症例においては痙性失調症を呈することに注意が必要である。

E. 結論

痙性失調症を呈した一卵性双生児において、*PLA2G6* 遺伝子に新規の複合ヘテロ接合性変異を認めた。まれではあるが、遺伝性痙性対麻痺症例においても *PLA2G6* 遺伝子変異を検索する必要があると考えられた。

[参考文献]

1. 瀧山嘉久. 痙性対麻痺: JASPAC. BRAIN and NERVE. 2014; 66; 1210-1217.
2. Shimazaki H, et al. A homozygous mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). J Med Genet 2012; 49; 777-784.
3. Shimazaki H, et al. Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014; 85; 1024-1028.
4. Koh K, et al. Novel mutations in the PNPLA6 gene in Boucher-Neuhauser syndrome. J Hum genet 2015 Jan 29 [Epub ahead of print]
5. Morgan. N.M. et al. PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. Nat. Genet. 2006. 38. 752-754.
6. Riku Y. et al. Extensive aggregation of α -synuclein and tau in juvenile-onset individual with a novel mutation in the PLA2G6 gene-splicing site. Acta Neuropathol Commun. 2013; 1
7. Yoshino H. et al. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. Neurology 2010. 75. 1356-1361

F. 健康危険情報

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Koh K, et al. Novel mutations in the PNPLA6 gene in Boucher-Neuhauser syndrome J Hum Genet 2015 Jan 29 [Epub ahead of print].
- 2) Wang Y, et al. A Japanese SCA5 family with a novel tree-nucleotide in-frame deletion mutation in the SPTBN2 gene: a clinical and genetic study. J Hum Genet 2014; 59: 569-573.
- 3) Shimazaki H, et al. Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014; 85: 1024-1028.
- 4) 瀧山嘉久. 遺伝性痙性対麻痺の最新情報. 臨床神経 2014; 54: 1009-1011.
- 5) 瀧山嘉久. 痙性対麻痺: JASPAC. BRAIN and NERVE 2014; 66: 1210-1217.

- 6) Ichinose Y, et al. Characteristic MRI findings in beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN). Neurol Clin Pract 2014; 4: 175-177.

2. 学会発表

平成 26 年度「運動失調症の医療基盤に関する調査研究」班、「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 .痙性失調症を呈した *PLA2G6* 複合ヘテロ接合性変異の一卵性双生児例 . 東京 . 平成 27 年 1 月 15 日 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

業務担当責任者：岡澤 均 東京医科歯科大学難治疾患研究所
研究協力者：田川一彦 東京医科歯科大学

研究要旨

岡澤グループはこれまでの研究事業を通じて、極めて高いレベルの網羅的質量解析技術を保持している。本研究では、ヒト SCA1 患者 iPS 細胞由来の神経細胞を対象として質量解析を行う。これにより、SCA1 の重症度・進行度を反映するバイオマーカーの探索を目指し、現在、条件検討など予備的な検討を行っている。

A. 研究目的

神経変性疾患の一部、特にアルツハイマー病などではバイオマーカー探索型研究が進んでおり、臨床的に有用なものもすでに存在している。一方、脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) は比較的希な疾患であり、研究は殆ど進んでいない。岡澤グループは、これまでポリグルタミン病あるいはアルツハイマー病を対象に、種々のモデル動物およびヒト脳サンプルを対象として、世界に先駆けて、プロテオーム、トランスクリプトーム、インタラクトームなど各種の網羅的解析(オミックス)を行い、病態関連分子を同定してきた(文献 1-4)。さらに、岡澤グループは、他の研究事業を通じて世界最高水準の網羅的質量解析技術を現在保有している。

本研究では、これらの経験を踏まえつつ、ヒト SCA1 患者患者 iPS 細胞由来の神経細胞を対象として、同様のオミックス解析を行い、SCA1 の重症度・進行度に直結するバイオマーカー候補分子を捉えることを目的とする。

B. 研究方法

北海道大学・佐々木教授グループより SCA1 患者の血液・皮膚の提供を受ける。慶応大学・岡野栄之教授グループとの共同研究を基に、これらの細胞から iPS 細胞を樹立する。これらのサンプルを LC-MS で解析し、健常者とリン酸化状態が異なる分子を探索する。また、得られた候補分子は臨床サンプルを用いて確認する。

(倫理面への配慮)

北大・慶応大および医科歯科において、血液・皮膚サンプルの採取と使用・iPS 細胞作成に関する申請がすでに受理されている。これらの倫理申請は、人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意の項目について、国の基準を完全に満たしている。また、実験動物は使用せず、動物愛護上の配慮には該当しない。これらのことから、本研究は倫理面において問題がないと判断した。

C. 研究結果

SCA1 特異的な iPS 細胞を二人の患者さんよりそれぞれ 3 系統ずつ、合計 6 系統作出した。樹立した iPS 細胞で見られる CAG リ

ピート数と患者で見られるリピート数の関係を、佐々木教授グループとの協働のもとに調べた。DNA は常法に従って抽出し、ダイレクトシーケンスおよびフラグメント解析法を用いて CAG リピート数を検討した。その結果、樹立した iPS 細胞の CAG リピート数が患者とほぼ同一であることが確認された。

D. 考察

これらの疾患特異的 iPS 細胞を用いて、神経細胞へ分化誘導することで、解析が開始できる。

E. 結論

サンプルの準備と条件設定が進行しており、解析が進めばバイオマーカーを捉えることができると考えられる。

[参考文献]

1. Qi M-L, Tagawa K, Enokido Y, Yoshimura N, Wada Y, Watase K, Ishiura S, Kanazawa I, Botas J, Saitoe M, Wanker EE, Okazawa H Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. *Nature Cell Biol.* 2007;9:402-414
2. Tagawa K1, Marubuchi S, Qi ML, Enokido Y, Tamura T, Inagaki R, Murata M, Kanazawa I, Wanker EE, Okazawa H. The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. *J Neurosci.* 2007; 27(4):868-80.
3. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, Sone M, Foulle R, Sawada H, Ishiguro H, Ono T, Murata M, Kanazawa I, Tomilin N,

Tagawa K, Wanker EE, Okazawa H. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol.* 2010;189(3):425-43.

4. Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., Okazawa, H. Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet.* 2015 : 24(2);540-58.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

1. Mizuguchi, M., Obita, T., Serita, T., Kojima, R., Nabeshima, Y., Okazawa, H. Mutations in the *PQBP1* gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15kD. *Nature Commun.* 2014;5:3822
2. Ito, H., Shiwaku, H., Yoshida, C., Homma, H., Luo, H., Chen, X., Fujita, K., Musante, L., Fischer, U., Frint, S. G., Romano, C., Ikeuchi, Y., Shimamura, T., Imoto, S., Miyano, S., Muramatsu, S. I., Kawachi, T., Hoshino, M., Sudol, M., Arumughan, A., Wanker, E. E., Rich, T., Schwartz, C., Matsuzaki, F., Bonni, A., Kalscheuer, V. M., Okazawa, H. In utero gene therapy rescues microcephaly caused by *Pqbp1*-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Mol Psychiatry.* 2014;doi: 10.1038/mp.2014.69.

3. Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., Okazawa, H. Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. ***Hum Mol Genet.*** 2015 : 24(2);540-58.
4. Ito, H., Fujita, K., Tagawa, K., Chen, X., Homma, H., Sasabe, T., Shimizu, J., Shimizu, S., Tamura, T., Muramatsu, SI., Okazawa, H. HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. ***EMBO Mol Med.*** 2014;7(1);78-101.
5. Shiraishi, R., Tamura, T., Sone, M., Okazawa, H. Systematic Analysis of Fly Models with Multiple Drivers Reveals Different Effects of Ataxin-1 and Huntingtin in Neuron Subtype-Specific Expression. ***PLoS One.*** 2014: 9(12);e116567.

2. 学会発表

1. Okazawa, H. "Comprehensive Phosphoproteome Analysis Unravels the Core Signaling Network that Initiates the Earliest Synapse Pathology in Preclinical Alzheimer's Disease Brain", ISP Symposium 2014 - Ageing and Metabolis, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 2014.8.28 (Oral)
2. Tamura, T., Barclay, S, S., Fujita, K., Ito, H., Motoki, K., Shimamura, T., Tagawa, K., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Tagawa, K., Imoto, S., Miyano,

- S., Okazawa, H. "Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1" Neuroscience2014, Pacifico Yokohama, Yokohama, 2014.9. 13 (Poster and short talk)
3. Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Yoshida, C., Sone, M., Okazawa, H. "A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases. Neuroscience2014, Pacifico Yokohama, Yokohama, 2014.9.12 (Poster)
4. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元清哉、宮野 悟、岡澤 均 第55回日本神経学会学術大会「脊髄小脳失調症1型におけるDNA損傷修復異常のコアネットワーク解析」(口演) 福岡国際会議場、2014.5.23
5. 藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第55回日本神経学会学術大会「TERA/VCP/p97のDNA修復機能不全は複数の神経変性疾患に関与する」(ポスター)、福岡国際会議場、2014.5.23
6. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元清哉、宮野 悟、岡澤 均 第55回日本神経病理学会総会学術研究会「脊髄小脳失調症1型におけるDNA損傷修復異常のコアネットワーク解析」(口演) 学術総合センター(東京) 2014.6.6
7. 藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊

藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会「複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(口演)、学術総合センター(東京)、2014.6.6

8. 田村拓也、岡澤均 第 7 回分子高次機能研究会「昆虫モデルから見る神経疾患の特異性と普遍性」(口演) KKR 沼津はまゆう(静岡) 2014.8.25

9. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元清哉、宮野 悟、岡澤 均 第 37 回日本神経科学大会「情報科学を用いた神経変性疾患の病態解明」(ポスター) パシフィコ横浜(横浜)、2014.9.13

10. 藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第 37 回日本神経科学大会「複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(ポスター) パシフィコ横浜(横浜)、2014.9.12

11. 田村 拓也、Barclay S Sam、藤田慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川 一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元清哉、宮野 悟、岡澤 均 第 37 回日本分子生物学会年会「脊髄小脳失調症 1 型の分子病態コアネットワークの解明」(ポスター) パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.26

12. 伊藤日加瑠、塩飽裕紀、吉田千里、本間秀典、陳西貴、藤田慶大、岡澤 均 第 37 回日本分子生物学会年会「神経幹細胞の Pqbp1 機能不全による小頭症は in utero 遺伝子治療によって改善できる」(ポスター)

パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.27

13. 矢島 隆明、田村 拓也、岡澤 均、曾根 雅紀 第 37 回日本分子生物学会年会「ショウジョウバエアルツハイマー病モデルにおける yata 遺伝子による APP 輸送制御」(ポスター) パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.25

14. 岡澤 均、大谷 彰子 運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班平成 26 年度 研究報告会「iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた SCA1 のバイオマーカー探索」(口演)、JA 共済ビル カンファレンスホール(東京) 2015.1.15

15. 岡澤 均「神経変性疾患と知的障害・小頭症をつなぐ RNA 関連分子 P Q B P 1」(招待講演)第 1 回 T M D U 「知の創造」若手コアセミナー、2014.8.20、東京医科歯科大学

16. 岡澤 均「ゲノム安定性と脳機能」(招待講演)第 37 回日本分子生物学会年会シンポジウム・ゲノム再生、パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.25-27(発表日 11/25)

17. 岡澤 均「シナプス病態から脳疾患治療へ、網羅的質量分析の示唆するアルツハイマー病のシナプス超早期病態の分子機構」(岡澤班)(招待講演)『包括脳ネットワーク』冬のシンポジウム「精神神経疾患研究の現状と展望：新学術 5 領域の相互理解・連携を目指して」2014.12.11、東京医科歯科大学

18. 岡澤 均「「シナプス病態」領域の紹介」(招待講演)『包括脳ネットワーク』冬のシンポジウム「「大脳新皮質構築」「シナプス病態」「メゾ神経回路」3 領域合同公開シンポジウム」2014.12.13、ホテル東京ガーデンパレス

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：脊髄小脳変性症を予防又は治療するための薬剤

出願人：国立大学法人 東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

出願番号：PCT/JP2014/077258（基礎出

願：特願 2013-214155）

2. 実用新案登録

3. その他

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について
 - ・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。
 - (2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、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(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。

3. 「C. 研究結果」について
 - ・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。

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

業務担当責任者：和田圭司

研究協力者：長谷勝徳、藤原悠紀、株田智弘

(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

研究要旨

脊髄小脳変性症および筋萎縮性側索硬化症(ALS)の一部において、遺伝子中の非翻訳領域におけるリピート配列の異常伸長が原因であることが報告されている。病態機序として、原因遺伝子から産生される異常伸長 RNA が神経細胞毒性を仲介していると考えられている。したがって、異常伸長 RNA を細胞内で分解することができれば新たな治療法となり得ると考えられる。我々は最近、RNA が ATP 依存的にリソソームに直接取り込まれ、分解されるという新たなオートファジーシステムを発見し、このシステムを RNautophagy と名付けた (Autophagy, 2013)。本研究では、異常伸長 RNA の分解に RNautophagy を活用することを目的に研究を行っている。そのため、RNA RNautophagy が基質選択性を有しているかどうか、また神経変性に関与するリピート RNA が RNautophagy の基質となるかを検討した。その結果、RNautophagy は基質選択性を有していること、また少なくとも特定のリピート RNA は *in vitro* において RNautophagy の基質となることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年脊髄小脳変性症および筋萎縮性側索硬化症(ALS)の一部において、遺伝子中の非翻訳領域におけるリピート配列の異常伸長が発症の原因となることが報告されている。原因遺伝子から作られる異常伸長 RNA が神経細胞毒性を仲介していると考えられており、異常伸長 RNA を細胞内で分解することができれば新たな治療法となり得る。ところが、神経細胞内における RNA 分解機構についてはほとんどわかっていない。細胞内分解システムのうち、リソソームを分解の場とするものは総称してオートファジーと呼ばれている。リソソームは多種類の加水分解酵素を内部に有しており、蛋白質だけでなく核酸や脂質、糖質も分解することができる。

我々は最近、RNA が ATP 依存的にリソソームに直接取り込まれ、分解されるという新

たなオートファジーシステムを発見し、この選択的分解システムを RNautophagy と名付けた (Autophagy, 2013)。同時に、このシステムにおいてリソソーム膜蛋白質である LAMP2C が核酸受容体として機能することを見いだした。興味深いことに、LAMP2C は脳内、とりわけ神経細胞に高発現しており、RNautophagy は神経細胞において機能し神経の恒常性維持に働いていると考えられる。また、LAMP2 遺伝子欠損マウス脳のトータル RNA 量を解析したところ、野生型と比較して RNA の蓄積が観察された。

本研究では、脊髄小脳変性症の治療のため、異常伸長 RNA の分解に RNautophagy を活用することを目的に研究を行っている。本年度は、RNautophagy が基質選択性を有しているかどうか、また異常伸長 RNA が RNautophagy の基質となるかを検討した。

B. 研究方法

LAMP2C の細胞質側配列(約 12 アミノ酸)を用いたプルダウンアッセイにより、LAMP2C に結合する RNA 配列を検討した。またマウス脳から単離したリソソームを用いて、どのような配列の RNA が RNautophagy の基質となるかについて解析した。RNA の配列としては、polyA, polyU, polyG, polyC および神経変性疾患の原因と関与するリピート RNA を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立精神・神経医療研究センター 神経研究所において該当する委員会の承認を受けて行った。実際の実施に当たっては 3R の原則に、研究者の responsibility を加えた 4R に配慮して行った。

C. 研究結果

PolyA, polyU, polyG, polyC のうち、特定の配列のみが LAMP2C の細胞側配列と結合した。また、LAMP2C の細胞質側配列と結合した RNA は RNautophagy によって単離リソソームに取り込まれたが、結合しない RNA は取り込まれなかった。さらに、神経変性疾患の原因と関与するリピート RNA についても LAMP2C の細胞質側配列と結合し、RNautophagy によって単離リソソームに取り込まれた。

以上の結果から、RNautophagy は基質選択性を有すること、少なくともある種の神経変性関連リピート RNA は in vitro において RNautophagy の基質となることが明らかとなった。

D. 考察

RNautophagy は神経細胞内において、不必要な RNA や異常 RNA をある程度選択的に分解している可能性がある。

E. 結論

RNautophagy は基質 RNA に対して選択性を有し、少なくとも特定の神経変性関連リピート RNA は in vitro において RNautophagy の基質となる。今後、細胞内において神経変性関連リピート RNA が RNautophagy の基質となるか検討し、脊髄小脳変性症の治療のための RNautophagy 活用法を構築する。

[参考文献]

1. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Yoshimura A, Tamai Y, Wada K, Kabuta T. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy*. 2013; 9(3): 403-409.
2. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, Kabuta T. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy*. 2013; 9(8): 1167-1171.

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

- 1) Furuta, A., kikuchi, H., Fujita, H., Yamada, D., kabuta, T., Blanz, J., Saftig, P., Nishino, I., Wada, k., Uchiyama, Y. Property of lysosomal storage disease associated with midbrain pathology in the CNS of LAMP-2-deficient mice. *Am. J., Pathol.*, in press

2. 学会発表

- 1) 鈴木マリ, 藤掛伸宏, 和田圭司, 永井義隆. ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 2) 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 岡本佑馬, 和田圭司, 永井義隆. ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 3) 藤掛伸宏, 木村展之, 長野清一, 齊藤勇二, 横関明男, 小野寺理, 和田圭司, 永井義隆. DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 4) 石黒太郎, 石川欽也, 藤掛伸宏, 上山盛夫, 永井義隆, 和田圭司, 水澤英洋. SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 5) 石黒太郎, 藤掛伸宏, 佐藤望, 和田圭司, 水澤英洋, 永井義隆, 石川欽也. 異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす. 第 37 回日本神経科学学会, 横浜,

2014.9.11-13.

- 6) 鈴木マリ, Anne-Marie Neumann, 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 和田圭司, 永井義隆. 神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 37 回日本神経科学学会, 横浜, 2014.9.11-13.
- 7) 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 岡本佑馬, 和田圭司, 永井義. p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす. 第 37 回日本神経科学学会, 横浜, 2014.9.11-13.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

脊髄小脳失調症の霊長類モデルの作製と検証

業務担当責任者 : 平井宏和 群馬大学大学院医学系研究科

研究協力者 : 松崎泰教、今野歩、中村和裕 群馬大学大学院医学系研究科

研究要旨

過去 20 年に渡って様々な脊髄小脳失調症 (SCA) モデルマウスが作成され、病態解明と治療法開発が大きく進んだ。しかし、これまでのところマウスで明らかになった治療法は一つも臨床応用されていない。原因の一つとして非ヒト霊長類モデルがないことが上げられる。本研究では、異常伸長した CAG 繰返し配列をもつ SCA3 型原因遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを、マーモセット小脳に注射することで SCA3 モデルマーモセット作成を目指した。ウイルスベクター注入 8 ヶ月後に評価したところ、変異遺伝子を発現するマーモセットは顕著な小脳失調を示し、組織学的には小脳顆粒細胞、小脳核の神経細胞に変異タンパク質凝集体が観察された。

A. 研究目的

非ヒト霊長類の疾患モデルが出来ると、疾患の治療法開発と臨床応用が飛躍的に早まる。近年、レンチウイルスベクターを用いて受精卵に疾患遺伝子を導入することで疾患モデルマーモセットが作成されている。これは有用な技術ではあるが、マウスのように短期間で繁殖するわけではないので、実験に必要な数の疾患モデルマーモセットを確保するにはかなり長い年月と大きな飼育設備が必要となる。また、レンチウイルスベクターを用いた場合、多コピーの疾患遺伝子がマーモセットのゲノムに組み込まれることが一般的で、子孫には少ないコピー数の遺伝子が遺伝することが多く、その場合、親と同じフェノタイプを示さない。本研究ではアデノ随伴ウイルス 9 型 (AAV9) ベクターを用いて、変異した脊髄小脳失調症 (SCA) 遺伝子を直接、成熟後のマーモセット小脳に発現させることで、SCA マーモセットモデルを作成することを

目的とした。

B. 研究方法

シナプシン I プロモーター制御下で 89 回のグルタミン繰返し配列をもつ ATXN1 タンパク質 (ATXN3[Q89]) を発現する AAV9 ベクターを生後 1 年 6 ヶ月のマーモセットの小脳に注射した。コントロールとして、15 回のグルタミン繰返し配列をもつ ATXN1 タンパク質 (ATXN3[Q15]) を発現する AAV9 ベクターを別の同年齢のマーモセット小脳に注射した。8 ヶ月後に小脳失調の有無について、独自に開発した 2 つの行動テストを用いて評価した。その後、小脳皮質、小脳核の遺伝子発現の様子を免疫組織学的に調べた。

(倫理面への配慮)

実験計画は遺伝子組換え安全委員会、動物実験委員会により承認されており、動物愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

ATXN3[Q89]を発現させたマーモセットは、ベクター注入 1~2 ヶ月後から、ケージの隙間に足を滑らせたり、高いところにあるバーに捕まり損ねたりするなど、小脳失調と思われる動きの失敗が見られるようになった。このような動きは ATXN3[Q15]を発現させたコントロールマーモセットでは見られなかった。注射 8 ヶ月に、餌をとる手の動き及び、高いところからステップを下らせる行動を評価したところ、ATXN3[Q89]発現マーモセットは何も処置をしていないマーモセットや ATXN3[Q15]を発現するコントロールマーモセットと比べて有意に低い成績を示した。その後、小脳の組織を観察したところ、顆粒細胞と小脳核のニューロンを中心に広範囲に ATXN3[Q89]が発現しており、凝集体は核内に局在していた。また多くの小脳核のニューロンは脱落していた。

D. 考察

この方法で同程度のフェノタイプを、同様の時間経過で示す SCA モデルマーモセットが安定して得られるのか今後検討が必要である。これらのモデルマーモセットにマウスで効果が示されている SCA の治療法を施し、症状の進行が抑えられ、あるいは改善が見られるのかを検討することで、マウスで明らかになった治療法の患者への臨床応用が促進することが期待される。

E. 結論

AAV9 ベクターを用いて、変異した脊髄小脳失調症 (SCA) 遺伝子を直接、成熟後のマーモセット小脳に発現させることで、行動学的及び、組織学的に SCA 患者と類似のフェノタイプを示すマーモセットモデルを作成することに成功した。

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) 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* 2014 Jun;13(3):323-30.
- 2) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T and Hirai H. Distinct transduction profiles in the CNS via three injection routes of AAV9 and the application to generation of a neurodegenerative mouse model. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* 1, Article number: 14032 (2014) doi:10.1038/mtm.2014.32
- 3) Saida H, Matsuzaki Y, Takayama K, Iizuka A, Konno A, Yanagi S, Hirai H. One-year follow-up of transgene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice. *Gene Therapy* 2014 Sep;21(9):820-7.
- 4) Nakamura K, Mieda T, Suto N, Matsuura S, Hirai H. Mesenchymal Stem Cells as a Potential Therapeutic Tool for Spinocerebellar Ataxia. *Cerebellum* 2014 Oct 4. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 平井宏和. Molecular mechanisms and potential therapies of the

spinocerebellar ataxia and the future perspective of the clinical application. International congress on Neuroscience. クラスノヤルスク (ロシア) . June 20, 2014.

- 2) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H. Distinct transduction profiles resulting from direct cortical, intrathecal or intravenous injection of AAV9 in the CNS. 9th Federation of European Neuroscience Societies. ミラノ (イタリア) . July 5-9, 2014.
- 3) Hosoi N, Hirai H. Abnormalities of metabotropic glutamate receptor (mGluR)-mediated signaling at cerebellar parallel fiber-purkinje cell synapses in spinocerebellar ataxia type 1(SCA1) model mice. ミラノ (イタリア) , July 5-9, 2014.
- 4) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H. Cerebellar transduction profiles after ssAAV9 injection via cortical, intrathecal or intravenous routes. 第 37 回日本神経科学学会大会

横浜. Sep. 11-13. 2014.

- 5) 今野歩、平井宏和. AAV による遺伝子導入を介した脊髄小脳変性症 3 型モデルマウスの作出. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.
- 6) 松崎泰教、齊田英恵、高山清彦、飯塚朗、今野歩、柳茂、平井宏和. インテグレーションを欠損させたレンチウイルスベクターによる一年間の遺伝子発現の経過観察と遺伝性神経変性疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療での有効性の検討. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.
- 7) 平井宏和. シンポジウム [Synaptic regulation in the cerebellum and motor control] Impairment of synaptic transmission that induces cerebellar ataxia and the underlying molecular mechanisms. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

多系統萎縮症のモデル動物作製と分子病態解明

業務担当責任者 : 若林孝一 弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座

研究協力者 : 三木康生、丹治邦和、森文秋

弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座

研究要旨

Sigma-1 receptor (SIGMAR1) は小胞体シャペロンの 1 つであり、小胞体関連分解を介した異常タンパク質分解に関わることが知られている。最近、我々は SIGMAR1 が種々の神経変性疾患の核内封入体に蓄積すること、核内と細胞質を行き来することを示し、SIGMAR1 が核内異常タンパク質の分解に関わること示唆した。そこで今回、HeLa 細胞に CAG リピートが異常に伸長したハンチンチン遺伝子を導入したハンチントン病モデル細胞を作製し、siRNA による SIGMAR1 の機能抑制あるいは SIGMAR1 遺伝子の過剰発現が核内の異常タンパク質分解に及ぼす影響を検討した。さらに、核輸送阻害剤、選択的プロテアソーム阻害剤を用いた際の核内異常タンパク質の蓄積、そしてこれらの処理を行った際のユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) およびオートファジー・ライソソーム系の変化について評価した。

SIGMAR1 siRNA、選択的プロテアソーム阻害剤、核輸送阻害剤の投与で核内凝集物が有意に増加した。SIGMAR1 siRNA 投与群の LC3-II および p62 量には変化がなかったが、SIGMAR1 siRNA 投与群では有意にプロテアソーム活性が低下していた。さらに、SIGMAR1 の過剰発現で細胞内凝集物の形成は有意に抑制された。

SIGMAR1 は小胞体関連分解を介した核内の異常タンパク質の分解に関わり、その分解には UPS が重要であることが示唆された。既に臨床で使用されている Fluvoxamine をはじめとする抗うつ薬のいくつかは、SIGMAR1 に強い親和性を持つことが知られている。Fluvoxamine が UPS を活性化することが判明すれば、ハンチントン病を含むポリグルタミン病の薬物治療へ通ずる可能性がある。

A. 研究目的

核内封入体の形成を病理学的特徴とするポリグルタミン病などの神経変性疾患では、細胞内分解機能の異常が認められ、タンパク質分解酵素に不溶性のタンパク質が神経細胞死に関与している。Sigma-1 receptor

(SIGMAR1) は小胞体 (ER) に存在する分子シャペロンであり、異常タンパク質を ER からユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) に逆輸送し、分解する (ER 関連分解) ことにも関わっている。我々は昨年度、SIGMAR1 が核内封入体を形成する神経変性疾患に特異

的に関与していることを報告した¹⁾。そこで今回、SIGMAR1 が核内封入体として不溶化したタンパク質の分解に関与しているか否かについてハンチントン病の細胞モデルを用い検討した。

B. 研究方法

HeLa 細胞に、ハンチンチン遺伝子の第 1 エクソン内にある CAG リピートが異常に伸長した遺伝子 (Q74) およびリピート数が正常な遺伝子 (Q23) を導入し、核内に異常タンパク質が蓄積する細胞モデルと正常対照を

作成した。それらを用い、SIGMAR1 siRNA による SIGMAR1 の機能抑制あるいは SIGMAR1 遺伝子の過剰発現が核内の異常タンパク質分解に及ぼす影響、SIGMAR1 遺伝子を過剰発現させる時期が核内異常タンパク質の分解に及ぼす影響、SIGMAR1 の agonist、antagonist、核輸送阻害剤 (leptomycin B)、選択的プロテアソーム阻害剤 (epoxomicin) 投与が核内異常タンパク質の蓄積に及ぼす影響、これらの処理を行った培養細胞の UPS およびオートファジー・ライソソーム系の変化について、免疫染色、ウェスタンブロット法、プロテアソームアクティビティアッセイにて評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理審査が必要な研究に該当しない。

C. 研究結果

Q74 を遺伝子導入した培養細胞においてのみ細胞質内および核内に変異型ハンチンチンの凝集物が認められた。SIGMAR1 siRNA と epoxomicin の投与で細胞質内および核内凝集物が有意に増加した。Leptomycin B の投与でも核内凝集物が増加した。さらに、変異型ハンチンチンは SIGMAR1 siRNA と epoxomicin 投与群で不溶化した。Control siRNA 投与群と比較して、SIGMAR1 siRNA 投与群の LC3-II および p62 量には変化がなかったが、SIGMAR1 siRNA 投与群では有意にプロテアソーム活性が低下していた。SIGMAR1 の過剰発現で細胞内凝集物の形成は有意に抑制された。

D. 考察

SIGMAR1 は核内の異常タンパク質の分解に関わり、その分解には UPS が重要であることが示唆された。

Fluvoxamine をはじめとする抗うつ薬の

いくつかは臨床的に既に使用されており、SIGMAR1 に強い親和性を持つことが知られている。Fluvoxamine が UPS を活性化することが確認できれば、核内異常タンパク質の蓄積を抑制できる可能性があり、ハンチントン病を含むポリグルタミン病の薬物治療へ通ずるものと思われる。

E. 結論

SIGMAR1 は核内の異常タンパク質の分解に ER 関連分解を介し、関わっている可能性がある。

[参考文献]

1. 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* 2014; 34: 148-158.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Miki Y, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K. Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2014; 74C: 25-31.
- 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 Comm 2014; 2: 173.

- 3) Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Maruyama A, Nikaido Y, Mimura J, Mori F, Warabi E, Yanagawa T, Ueno S, Itoh K, Wakabayashi K. p62 deficiency enhances α -synuclein pathology in mice. Brain Pathol (in press)

2. 学会発表

- 1) 若林孝一. MSA とオートファジー. 第 55 回日本神経学会総会(福岡、2014 年 5 月 21 ~ 24 日)
- 2) 森文秋、豊島靖子、丹治邦和、柿田明美、高橋均、若林孝一. 脊髄小脳失調症 2 型脳に認められた 2 種類の核内封入体. 第 55 回日本神経病理学会総会(東京、2014

年 6 月 5 ~ 7 日)

- 3) 若林孝一、森文秋、柿田明美、高橋均、内海潤、佐々木秀直. ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた神経変性疾患の microRNA 解析. 第 55 回日本神経病理学会総会(東京、2014 年 6 月 5 ~ 7 日)

H. 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

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 形成を指標にした治療薬の探索

業務担当責任者：池田佳生 群馬大学大学院医学系研究科 脳神経内科学

研究協力者：古田夏海、平柳公利 群馬大学大学院医学系研究科 脳神経内科学

研究要旨

非翻訳領域におけるマイクロサテライト・リピート伸長を原因とする脊髄小脳失調症のうち、SCA36/Asidan、SCA31、SCA8 について、各病型の伸長リピートをリポーター遺伝子内の非翻訳領域に発現するように導入した培養細胞モデルを作成して、各 SCA の分子病態解析および ribonuclear foci 形成を指標にした治療候補薬の探索を行う。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症の分子病態解明および新規治療法開発を推進するため、非翻訳領域におけるマイクロサテライト・リピート伸長を原因とする脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxia: SCA) のうち、SCA36/Asidan、SCA31、SCA8 について、各病型の培養細胞モデルを作成し、ribonuclear foci (RNA foci) 形成を指標にした治療候補薬探索を行うことを目的とする。

B. 研究方法

SCA36/Asidan については (GGCCTG)₈ および逆相補的な(CAGGCC)₅ のペアオリゴヌクレオチドプライマーを用いて self-templating PCR (STP-PCR) 法により伸長 GGCCTG リピートを合成した。SCA31 および SCA8 においては患者由来の伸長リピート領域を PCR 法により単離した。これらの伸長リピートを、2 エクソン (エクソン 1 とエクソン 2) およびその間のイントロンから構成される eGFP (enhanced Green

Fluorescent Protein) 遺伝子構造を持つ発現ベクターのイントロン領域に挿入した。各々のコンストラクトを哺乳動物細胞 (HEK293 細胞) に導入し、培養細胞モデルを作成した。RNA fluorescent in situ hybridization (RNA-FISH) の手法により、分子病態と関連の深いマーカーで伸長リピート転写物の凝集からなる RNA foci 形成について解析した。また本培養細胞モデルに各種の低分子化合物を作用させて、RNA foci 形成が抑制されるような候補治療薬を探索する。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して行われている。

C. 研究結果

SCA36 に関して、STP-PCR により得た (GGCCTG)₄₀ リピートをイントロン領域に挿入した eGFP ベクターを導入した HEK293 細胞において、GGCCTG リピートを挿入していないコントロールベクターと同様に

eGFP を発現したが、RNA-FISH 解析では明らかな RNA foci 形成を認めなかった。STP-PCR により GGCCTG リピートは現在 75 リピートまで単離されており、更に長いリピートを得るべく検討を行っている。

SCA31 では 1.5kb サイズの normal fragment をイントロン領域に挿入したベクターを導入した HEK293 細胞においても正しくスプライシングをされて、イントロン領域に挿入のないコントロールベクターと同様に eGFP を発現した。現在は伸長 TGGAA リピートが挿入されたコンストラクトを得るべく検討中である。

SCA8 では現在、CTG リピート数が 73 リピートのコンストラクトを作成しており、(CTG)₇₃ リピートをイントロン領域に挿入した eGFP ベクターを導入した HEK293 細胞においても、コントロールと同様に eGFP を発現したが、RNA-FISH 解析では明らかな RNA foci 形成を認めなかった。更に長いリピートを得るべく検討中である。

D. 考察

今年度の検討で SCA36・SCA8 培養細胞モデルで RNA foci が形成されなかった理由として、各リピート長が病的な表現型を呈するリピート数を下回っていた可能性が考えられた。そのため SCA36・SCA 31・SCA 8 のより長い伸長リピートを挿入したコンストラクトを作成することを目指し、RNA foci が形成されるかについて継続して検討をしている。また HEK293 細胞以外の哺乳動物培養細胞を用いた検討も行う予定である。

今後の検討課題として、蛋白レベルでの分子病態解明が挙げられる。非翻訳領域マイクロサテライト・リピート伸長病の新たな発症メカニズムとして提唱されている伸長リピート由来の homopolymeric protein の翻訳である repeat-associated non-ATG translation

(RANT)に関連して、各 SCA 培養細胞モデルにおいて RANT を介した細胞内封入体形成を伴う神経細胞障害を認めるか、神経細胞内封入体に対する抗体を用いた免疫染色により確認を行う。更なる検討課題として、候補治療薬スクリーニングが挙げられる。作成した各 SCA 培養細胞モデルを用いて、FDA 承認薬物スクリーニング用 library plate 上で培養を行い、病的表現型として形成される RNA-foci や RANT タンパク由来封入体が抑制されるか否かを定量的に評価する。RNA-foci 形成や RANT 由来封入体形成が抑制された場合には、当該の化合物は各 SCA に対する候補治療薬になり得ると考えられる。

E. 結論

現時点で有効な治療法の存在しない難治性神経疾患の代表である脊髄小脳変性症について、培養細胞モデルを作成することにより分子病態に基づいた候補治療薬を効率的に、より早期に見出し、脊髄小脳変性症の克服へ寄与することを目指して検討している。

[参考文献]

1. Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi H, Okamoto M, Takamatsu K, Ota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K. Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology*. 2012 ; 79 ; 333-341.
2. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Liu W, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum*

Genet. 2011 : 89 ; 121-130.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

Liu W, Ikeda Y, Hishikawa N, Yamashita T,
Deguchi K, Abe K. Characteristic RNA foci

of the abnormal hexanucleotide GGCCUG
repeat expansion in spinocerebellar ataxia
type 36 (Asidan). *Eur J Neurol.* 2014 : 21 ;
1377-1386.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

業務担当責任者	：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
研究協力者	：加藤泰介	新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
	藤田菜摘	新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
	佐藤俊哉	北里大学医学部実験動物学
	辻 省次	東京大学大学院医学系研究科神経内科学
	西澤正豊	新潟大学脳研究所神経内科学分野

研究要旨

ハンチントン病や脊髄小脳変性症を含むポリグルタミン病は、原因遺伝子内のグルタミン酸をコードする CAG 繰り返し配列の異常伸長によって引き起こされる重篤な神経変性疾患であるが、有効な治療法は開発されていない。我々は、ポリグルタミン病の一つである DRPLA をモデルとして、原因物質であるポリグルタミンタンパク質の産生そのものをアンチセンスオリゴヌクレオチド (antisense oligonucleotide; ASO) によって抑制し治療するという研究を開始した。本年度は、数種の ASO の遺伝子サイレンシング効率の検討と選定を行った。その結果、生体の中枢神経系で、原因遺伝子の発現抑制効果を示す ASO が見出された。現在、この ASO を用いてモデル動物の病態発症を抑制可能であるか、検討を進めている。

A. 研究目的

ハンチントン病をはじめとするポリグルタミン病は、原因遺伝子の CAG 反復配列の異常伸長によって引き起こされ、この伸長したグルタミン鎖を含む原因遺伝子産物がミスフォールディングによって不溶性の線維構造を形成し、神経細胞に蓄積することにより細胞が傷害される。

ポリグルタミン病で指摘されている細胞毒性には、上記のタンパク毒性に加えて、伸長 CAG トリプレットリピートを持った mRNA による RNA 毒性が存在する。RNA 毒性では、CAG 異常伸長型 mRNA が RNA foci と呼ばれる RNA 凝集物として核内に蓄積し、ここに細胞の恒常性に必須なスプライシングファクターなどのタンパク質がトラップされるこ

とによって、機能を失うことが毒性の原因であると考えられている。つまり、ポリグルタミン病では、タンパク毒性のみならず、mRNA に由来する細胞障害性も治療の標的とする必要があると考えられる。

これまでにタンパク毒性に対しては、シャペロン介在性オートファジーや凝集阻害剤などの手法が検討されており、RNA 毒性に対しては siRNA や shRNA の効果が検討されてきている。siRNA や shRNA による発現の抑制は、mRNA の分解を介するため、mRNA 毒性も制御可能であるが、効果が短期間である点や、作用部位が投与部位近辺に限られるなどの欠点があった。そこで本研究では、mRNA 毒性とタンパク毒性を共に制御できる可能性のあるアンチセンスオリゴヌクレオ

チド (antisense oligonucleotide; ASO)に着目した。本研究でモデルとしたポリグルタミン病の一種である DRPLA (歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症)は、進行性ミオクローヌステんかん、小脳失調、舞踏アテトーシス、性格変化、痴呆など多彩な神経症状を示し、歯状核赤核路と淡蒼球ルイ体路の変性を特徴とする常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症である。本症は原因遺伝子;atrophin-1 内の CAG リピートの異常伸長によって発症する (Koide R et al., Nat Genet. 1994.)。本研究の目的は、我々が保有するモデルマウスが呈する DRPLA 病態を ASO 投与によって制御可能であるかどうかを検討することである。

B. 研究方法

本研究では、発現抑制の手法として、mRNA からの翻訳を抑制する ASO と RNaseH を介した mRNA の分解を誘導する Gapmer 型 ASO の効果を検討した。

本研究では、翻訳抑制型 ASO として、Gene Tool, LLC 社の Morpholino を用いて、atrophin-1 の発現サイレンシングを行うこととした。第 3 世代と呼ばれる ASO である Morpholino ASO は従来の ASO よりも特異性が高く、off-target による非特異的な遺伝子への作用が少ない。

Gapmer 型 ASO には、Exiqon 社の LNA 修飾 ASO を使用した。ヒト atrophin-1 特異的な LNA ASO を 5 種、設計・合成した。

ヒト atrophin-1 サイレンシング効果の最も高い ASO を選抜するため、atrophin-1 の発現を認める、ヒト神経芽細胞腫である SHSY5Y 細胞を用いて *in vitro* にて判定を行った。

in vivo の解析は、DRPLA モデルマウスである DRPLA Q129 マウスを用いた。この DRPLA モデルマウスは 129 リピートの CAG トリプレットリピートを exon5 内に保持した

全長型のヒト変異型 atrophin-1 遺伝子をシングルコピーで導入されたラインである。このマウスは生後 3 週程度から運動失調を認め、脳内に週齢依存的に核内ポリグルタミン鎖の凝集物を認める。その後 11 週程度からてんかん様発作の発生をおこし、16 週までに死亡する (Sato T et al., Hum Mol Genet. 1999)。ASO の投与は、生後 1 日齢の DRPLA Q129 マウスに対して、ガラスキャピラリーを用いて両側脳室内投与 (i.c.v)によって行った。

(倫理面への配慮)

動物の愛護及び管理に関する法律に基づいて行うとともに、新潟大学の動物実験規則および組換え DNA 実験安全管理規則に従い、学長許可を受けて実施した

C. 研究結果

<Morpholino>

in vitro における検討の結果、翻訳抑制型の morpholino を処理することによって、内在性 atrophin-1 のタンパク質レベルでの減少が確認された。そこで、次に *in vivo* での効果を検討するために、新生仔 DRPLA Q129 マウス脳室内に morpholino の投与を行った。しかしながら、morpholino によって DRPLA Q129 マウスのヒト変異型 atrophin-1 のタンパク質の発現量に減少効果は見られず、本マウスの DRPLA 病態の表現型にも効果は見られなかった。

<LNA Gapmer>

in vitro におけるスクリーニングの結果、ASO のサイレンシングの効果は、ターゲット配列によって差が認められた。いずれの LNA ASO においても、内在性 atrophin-1 の mRNA レベル、タンパク質レベルの減少が認められた。このうち最も効果の高かった 1 種を *in vivo* での効果検証に用いることとした。

新生仔 DRPLA Q129 マウス脳室内に ASO

を投与し、一週間後におけるサイレンシング効果の検討を行った結果、コントロールと比較して ASO 投与マウス脳内ではヒト atrophin-1 の mRNA レベル、タンパク質レベルでの減少が認められた。一方で、内在性マウス atrophin-1 タンパク質レベルに変化はなく、ASO がヒト atrophin-1 特異的にサイレンシング効果を発揮していることが確認された。

D. 考察

これまでの研究によって、ASO 投与によって中枢神経系 atrophin-1 が抑制可能であることが示された。ASO は変異遺伝子由来だけではなく、正常型由来の発現も抑制することから、副作用が一部で懸念されているが、atrophin-1 ノックアウトマウスは、正常に出生し、重篤な表現型もなく寿命も野生型とほぼ同様であることが確認されている。従って、ASO を用いた原因遺伝子発現のサイレンシングは、DRPLA の有効な治療戦略になりうることを示唆される。

E. 結論

ポリグルタミン病の一種である DRPLA の原因遺伝子;atrophin-1 は ASO によって発現制御可能である。

[参考文献]

1. Koide R1, Ikeuchi T, Onodera O, et al.:Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-

pallidoluysian atrophy (DRPLA). Nat Genet. 1994 Jan;6(1):9-13.

2. Sato T1, Oyake M, Nakamura K, Nakao K, Fukusima Y, Onodera O, et al.: Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients.Hum Mol Genet. 1999 Jan;8(1):99-106.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当

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

業務担当責任者：宮嶋裕明 浜松医科大学内科学第一講座
研究協力者：河野 智 浜松医科大学内科学第一講座

研究要旨

運動失調症をきたした低セルロプラスミン血症の 31 家系において臨床症候、検査所見、遺伝子変異について検討し、13 家系でセルロプラスミン遺伝子変異(ヘテロ接合体)を 6 つ同定した。その臨床像は、若年発症、緩徐進行性の躯幹を中心とした運動失調症状で歩行障害をきたした。頭部 MRI では鉄沈着は明らかではなく、小脳萎縮は発症後 5 年以上の一部の症例で軽度に認められた。また、これらの症例では血清の亜鉛濃度が低下しており、ドイツの症例では亜鉛治療を行ったところ運動失調の改善をみた。微量元素代謝の相互作用が関与している可能性がある。

A. 研究目的

鉄代謝異常症の無セルロプラスミン(CP)血症の研究をする中で、低 CP 血症を伴う運動失調症のなかには、CP 遺伝子変異のヘテロ接合体患者が存在し、比較的早期発症の運動失調を来す傾向がみられることを報告してきた。すなわち CP 遺伝子異常症には、1) CP の loss-of function により脳、肝など全身に鉄蓄積をきたし、このために成人発症の糖尿病、神経症状(運動失調、不随意運動、パーキンソニズム、認知機能障害)をきたし、網膜変性を呈する鉄過剰症の無 CP 血症、2) CP 遺伝子変異のヘテロ接合体で運動失調を主徴とし、必ずしも全身症状は明らかでない低 CP 血症(鉄沈着が組織で見られることがある)が存在する可能性がある。

今回は、運動失調症をきたした低 CP 血症の 31 家系を対象に CP 遺伝子変異について検討するとともにその臨床像を明らかにし、治療のひとつとして鉄キレート薬のみならず亜鉛療法の可能性について検討した。

B. 研究方法

世界各地から CP 遺伝子の解析依頼のあった低 CP 血症の 31 家系について、その病歴、神経学的所見、血液検査、頭部 MRI について比較し、CP 遺伝子の解析を行った。この研究は、浜松医科大学「医の倫理委員会」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」の承認を得ている。

C. 研究結果

13 家系で CP 遺伝子の変異を同定した。それらの患者は、歩行時のふらつきで発症することが多く、発症年齢は 15-48 歳、構音障害は軽度で、失調は四肢よりも躯幹に強い傾向がみられた。なかには発症後 10 年経過しても独歩可能の患者が存在する。筋トーンは正常からやや亢進、パーキンソニズムはなかった。血清 CP は 7.5-13.2 mg/dl (基準値 21-32mg/dl)、血清銅は低値、血清鉄、フェリチンは基準値内～やや増加傾向であった。血

清の亜鉛濃度は基準値下限より低下していた。尚、SCA1, 2, 3, 6, 7, 8, 12, 31, DRPLA の遺伝子変異はなかった。患者は CP 遺伝子変異のヘテロ接合体で、ミスセンス変異 (D58H, G176R, P177R, R701W)、truncation 変異 (c.2482delG, W858X) が同定された。

16 歳より右手の巧緻運動障害、歩行時のふらつきで発症したドイツの 19 歳の女性患者では、血清 CP 10mg/dl、亜鉛 80µg/dl (基準値 95-145µg/dl) で、CP 遺伝子変異 R701W のヘテロ接合体であることが分かった。そこで亜鉛製剤を 1 日 100mg 内服したところ 15 ヶ月後には継足歩行が数歩可能になり、書字が改善した

D. 考察

CP は体内の鉄代謝、細胞からの鉄排出機構に関与しているため、ホモ接合体では無 CP 血症となり、脳をはじめ全身の組織に著明な鉄沈着が認められる。この過剰鉄から遊離鉄 (redox active iron)、あるいは水溶性の生体不安定鉄で高反応性のフリーラジカル、(オキソ)(パーオキサイド)架橋二核鉄()種を生じ、組織傷害を惹起する。このため経口投与の鉄キレート薬が治療に用いられ、症状の改善を認めている。これに対し、低 CP 血症を伴う運動失調症のなかには CP 遺伝子の変異をもつヘテロ接合体が存在するが、著明な鉄沈着はなく、遺伝子変異と運動失調症状との関連は明らかでない。しかし、これらの症例の多くでは血清の亜鉛濃度の減少が認められる。1 例ではあるが亜鉛の内服により運動失調が改善しており、今後細胞レベルでの解析は必要であるが、鉄キレート剤治療以外の治療法として応用できる可能性がある。

E. 結論

CP 遺伝子の変異をもつ運動失調症では、鉄代謝の異常だけでなく、亜鉛など他の微量金

属の代謝が関与している可能性がある。

[参考文献]

1. Kuhn J, Bewermeyer H, Miyajima H, Takahashi Y, Kuhn KF, Hoogenraad TU. Treatment of symptomatic heterozygous aceruloplasminemia with oral zinc sulphate. *Brain Dev* 2007; 29(7): 450-453.
2. Kono S: Aceruloplasminemia. *Curr Drug Targets* 2012; 13(9): 1190-9, 2012

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) Tai M, Matsushashi N, Ichii O, Suzuki T, Ejiri Y, Kono S, Terada T, Miyajima H, Harada M. Case of presymptomatic aceruloplasminemia treated with deferasirox. *Hepatol Res* 2014; 44(12): 1253-1258.
- 2) Miyajima H. Aceruloplasminemia. *Neuropathol* 2015; 35(1); 83-90.
- 3) Kono S, Miyajima H. Aceruloplasminemia. In: Rosenberg RN, Pascual JM eds. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease. Fifth Edition.* Elsevier, Academic Press, Chapter 45, p.495-506, 2015.

2. 学会発表

- 1) Miyajima H. Aceruloplasminemia. 55th Annual Meeting of JSNP. Tokyo, 2014.6.7.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

業務担当責任者: 宇川義一(福島県立医科大学神経内科・教授)¹⁾

研究協力者: 寺尾安生(東京大学神経内科・講師)²⁾・松田俊一²⁾・古林俊晃^{2, 3)}
徳重真一²⁾・濱田 雅²⁾・堤涼介⁴⁾・清水崇宏²⁾・田中信行²⁾・
寺田さとみ²⁾・花島律子⁴⁾・松本英之⁵⁾・辻 省次²⁾

1) 福島県立医科大学神経内科、2) 東京大学神経内科、3) 東北文化学園
大学、4) 北里大学神経内科、5) 日本赤十字医療センター神経内科

研究要旨

脳による時間の情報処理には、時間の長短を判断したり(認知) 提示された時間と同じ長さの時間を再現する(再生)機能などがあり、小脳や大脳基底核、前頭・頭頂葉などが関わるのが近年明らかにされつつある。時間的統合はどのくらいの時間の長さを”一塊り“の時間(時点)として認識し、脳内に保持できるかという能力であり、正常人ではその限界は 2-3 秒とされる。脊髄小脳変性症における時間保持機能を検討したところ、健常者と比較して有意に短縮していた。この短縮は小脳疾患患者における運動失調症状では説明できず、これとは別の独立した小脳の機能を見ている可能性がある。

A. 研究目的

脳による時間の情報処理には、時間の長短を判断したり(認知) 時間を再現する(再生)機能などがあり、小脳や大脳基底核、前頭葉・頭頂葉などが関わるのが近年明らかにされつつある。一般には 0.5s 秒以下の時間処理には小脳が、それ以上の長さの時間処理には大脳基底核が主に関わりとされている。一方である時点と別の時点が同時、あるいはどちらが先か、というような判断をする時間情報処理(時間的統合)についての研究はまだ少ない。時間的統合にはどのくらいの時間の長さを”一塊り“の時間(時点)として認識し、脳内に保持できるかという能力が重要となる。即ちある時間の長さ以下の時間は一つの”塊“として捉えられるが、その長さを超えると一塊りとしては認識しにくくなる時間の限界があり、正常人では 2-3 秒とされる(Mates ら、

1994)。脊髄小脳変性症(SCA)における時間保持機能の異常について検討した。この機能の異常を詳細に評価することにより、治療薬の開発の評価に役立てたり、小脳の機能異常を発症初期から検知して早期治療に貢献することが可能になると思われる。

B. 研究方法

対象は純粹小脳型の SCA 症例 17 例(SCA6: 11 名, SCA31: 6 名、年齢 65.0±11.0)、年齢をマッチさせた正常人 17 名(年齢 63.0 ± 11.0 歳)である。時間保持機能を調べる課題としてタッピング課題を用いた。この課題では被験者に一定の間隔で鳴る音(音自体の持続は 50 ms)を聞かせ、その音と丁度一致するようなタイミングでボタン押しをさせた。音がなる間隔(interstimulus interval, ISI)は 200ms (5Hz) ごとの速い頻度から、5 秒に一回程

度 (0.2Hz) までの遅い頻度まで様々に変えた。各 ISI に対し 100 試行を行った。もし被験者がある音と次の音との間隔を正しく“一つのまとまった時間”としてとらえられれば、被験者は次の音のタイミングを予測してボタン押しするので、ボタン押しのタイミングは音のなるタイミングとまったく一致するか、やや先行する。逆に“一つのまとまった時間”としてとらえられなくなれば、被験者は音がしてからボタンを押しようになり、ボタン押しは音より遅れることが予想される。先行するタイミングから、遅れるタイミングでのボタン押しへの「移行」がどの ISI で起きるかを検討し、正常人・SCA の両者での ISI(移行帯)を比較・検討した。

(倫理面への配慮)

東京大学医学部研究倫理委員会で承認された方法に従い (審査番号 2814-(4)) 検査に先立ち被験者に方法についてよく説明しインフォームド・コンセントを得た上で実験を行った。被験者が耐え難い不快を感じるがあれば検査を中止した。プライバシー確保のため得られたデータを研究分担者らが所定の場所に責任をもって保管し、研究分担者ら以外がアクセスしないような管理体制とした。

C. 研究結果 (平成 26 年度)

健常者では移行帯の ISI は 2400-3600ms であった。これに対し SCA 患者では、1200-2400ms と有意に早い ISI で移行が起こっていた。コントロールとして検査を行った球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の患者ではボタン押しのタイミングはばらつくものの移行帯は正常だった。移行帯の短縮は、小脳の運動症状の臨床スコア (ICARS) と有意な相関を示さなかった。

D. 考察

SCA 患者では保持できる時間の長さが正常

者より有意に短縮していた。小脳の時間保持機能を反映すると思われるが、その短縮の程度は小脳の運動症状の臨床スコアとは有意に相関せず、臨床的に評価される小脳症状とは異なる、運動を実行するための時間予測に必要な能力を評価していると考えられた。

SCA 患者において、音の出るタイミングを予測してキーボードを押し運動準備をする能力が低下しているとの報告もあるが (Molinari ら、2005) 本研究のように ISI を変えて移行帯を検討したものはない。また 500ms と短い ISI の音に対するタッピング課題を用いた脳磁図の検討では、小脳、視床、感覚運動野をつなぐループがこのような正確なタッピングに関わる可能性が示唆されている (Müller ら、2000)。これまで 1 秒以上の時間処理については、小脳より大脳基底核の関与が強いとされてきたが、1 秒以上の時間保持能力については小脳も上記のループを通じて関与している可能性がある。

E. 結論

小脳の時間保持能力は SCA 患者では健常者と比較して有意に短縮していた。この短縮は小脳疾患患者における失調症状では説明できず、これとは別の独立した小脳の機能を見ている可能性がある。

[参考文献]

- 1) Mates J, Pöppel E et al. Temporal integration in sensorimotor synchronization. *J Cogn Neurosci* 1994 ; 6 ; 332-340.
- 2) Molinari M, et al. Sensorimotor transduction of time information is preserved in subjects with cerebellar damage. *Brain Res Bull* 2005 ; 67 ; 448-58.
- 3) Müller K, et al. Neuromagnetic correlates of sensorimotor synchronization. *J Cogn Neurosci* 2000 ; 12 ; 546-555.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

Matsuda S, Matsumoto H, Furubayashi T, Fukuda H, Hanajima R, Tsuji S, Ugawa Y, Terao Y. Visual scanning area is abnormally enlarged in hereditary pure cerebellar ataxia. *Cerebellum* 2014 [Epub ahead of print]

Matsuda S, Matsumoto H, Furubayashi T, Fukuda H, Emoto M, Hanajima R, Tsuji S, Ugawa Y, Terao Y. Top-down but not bottom-up visual scanning is affected in hereditary pure cerebellar ataxia. *PLoS One* 2014;9(12):e116181.

2. 学会発表

松本英之、寺尾安生、古林俊晃、弓削田晃弘、福田秀樹、江本正喜、花島律子、宇川義一。パーキンソン病の注視範囲狭小化は大脳基底核障害に由来する。第 55 日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 22 日、福岡。

田中信行、堤涼介、清水崇宏、松田俊一、寺田さとみ、濱田雅、寺尾安生、宇川義一、花島 律子。4 連発磁気刺激(QPS)を用いたゾニサミドによる大脳皮質可塑性変化の検討。第 55 日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 22 日、福岡。

堤涼介、花島律子、寺尾安生、代田悠一郎、清水崇宏、田中信行、宇川義一。一次運動野の反復単相性 4 連発経頭蓋磁気刺激 QPS による対側一次運動野への可塑性誘導。第 55 日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 23 日、福岡。

榎本 博之、寺尾安生、門脇傑、榎本(中谷)雪、小林俊輔、宇川義一。QPS による運動野 intrinsic plasticity の誘導。第 55 日本神経

学会学術大会。2014 年 5 月 23 日、福岡。

徳重真一、松田俊一、寺尾安生、清水崇宏、田中信行、堤涼介、弓削田晃弘、寺田さとみ、濱田雅、花島律子、辻省次、宇川義一。パーキンソン病における書字動作中の眼と手の協調運動の解析。第 55 日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 23 日、福岡。

花島律子、内村元昭、北澤茂、大南伸也、堤涼介、清水崇宏、田中信行、寺尾安生、辻省次、宇川義一。脊髄小脳変性症患者におけるプリズム順応障害と古典的運動失調症状との関連。第 55 日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 24 日、福岡。

清水崇宏、花島律子、堤涼介、代田悠一郎、濱田 雅、田中信行、松田俊一、寺尾安生、宇川義一。前補足運動野に対する四連発経頭蓋反復磁気刺激がヒト視覚運動系列学習に与える影響。第 55 回日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 24 日、福岡。

徳重真一、寺尾安生、松田俊一、清水崇宏、田中信行、弓削田晃弘、寺田さとみ、濱田雅、宇川義一。パーキンソン病の小字症に及ぼす眼球運動の影響。第 44 回日本臨床神経生理学学会学術大会、2014 年 11 月 19 日、福岡。

寺田さとみ、徳重真一、松田俊一、清水崇宏、田中信行、弓削田晃弘、濱田雅、宇川義一、寺尾安生。脊髄小脳変性症における眼球運動の解析。第 44 回日本臨床神経生理学学会学術大会、2014 年 11 月 19 日、福岡。

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

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
- 脊髄小脳変性症と多系統萎縮症での検討

業務担当責任者：田中真樹 北海道大学神経生理学分野
研究協力者：吉田篤司 北海道大学神経生理学分野・放射線診断科
植松明子 北海道大学神経生理学分野
松山 圭 北海道大学神経生理学分野
伊藤さやか 北海道大学神経内科学分野
矢部一郎 北海道大学神経内科学分野
佐々木秀直 北海道大学神経内科学分野

研究要旨

脊髄小脳変性症を対象に種々の心理物理検査を行い、高次機能障害を抽出して小脳の新たな機能評価法を開発することを目指して研究を進めている。今年度は脊髄小脳変性症6型(SCA6)で認められたオドボール検出課題での反応遅延の責任部位を脳画像を用いた相関解析で探った。神経内科外来を受診したSCA6の12名と統制群12名を対象に、心理物理検査とMRI撮像を行った。拡散強調画像を用いて小脳半球領域ごとの白質の平均FA値を求め、心理物理検査で得られた反応時間と相関を示す部位を探索したところ、患者群でのみ、タイミング予測を必要とする条件で右上小脳半月に有意な相関を認めた。今後、別の行動課題でも同様の解析を行い、小脳半球の各部位の機能を抽出するための行動パラメータの探索を進める。また、類似の行動課題を訓練したサルに脊髄小脳変性症と同様の障害を生じさせ、その病態生理を明らかにするための準備を並行して進める。

A. 研究目的

小脳障害における高次機能障害は既存の認知機能バッテリーを用いた臨床研究で指摘されているが、障害の内容を明らかにして定量化するためには、より詳細な検査法の開発が望まれる。こうした研究は医薬品開発に必要な実効的な臨床評価法を確立するために不可欠である。本研究では、心理物理実験で用いられてきた認知課題を純粹小脳型の脊髄小脳変性症に適用し、その高次機能障害を抽出できる行動パラメータを探索する。本年度

は、脊髄小脳変性症6型で認められた時間予測を必要とする行動課題での成績低下の責任病巣を拡散強調画像(DTI)を用いた相関解析で探った。また、同様の行動課題を訓練したサルに神経生理・薬理学的手法を適用して脳内メカニズムを探究するとともに、ウイルスベクターを用いたモデル動物を作成して病態生理を明らかにすることを目指して準備を進めている。

B. 研究方法

北大病院神経内科外来を受診している患者群 12 名 (62.4±5.8 歳) と統制群 12 名 (63.2±6.2 歳) を対象とした。心理物理検査として、外来に設置した端末を用いてオドボール検出課題を行わせた。この課題では、一定の時間間隔で繰り返し提示される視聴覚刺激が不意に一拍抜ける (missing 条件) か、刺激の色と音が変化する (deviant 条件) ので、被験者はそれに気づいたら素早くボタンを押すように指示される。脳画像は心理物理検査とは別に 3.0T MRI (Achiva TX, Philips) を用いて DTI (MPG32 軸, b 値: 0, 1000 [s/mm²], TE/TR 85/6158 ms, FOV: 256×256 mm², slice thickness: 3.0 mm) を撮影し、FSL4.1 を用いて tract-based spatial statistics (TBSS) 解析を行い、小脳アトラスを用いて小脳半球領域ごとの白質の平均 FA (fractional anisotropy) 値を求め、心理検査で得られた反応時間の相関を示す小脳領域を同定した。

また、類似の行動課題を訓練したサルに生理・薬理学的手法を適用し、小脳変性症における病態生理を探っている。

(倫理面への配慮)

脊髄小脳変性症を対象とした心理物理検査に関しては、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受けた上で行っている。同委員会の規定に従い、被験者には書面と口頭で研究の趣旨と生じうる不利益について担当者から説明をし、被験者の同意を書面で確認してこれを保存している。被験者の個人情報、とくに遺伝子診断の結果など疾患に関する情報の扱いには細心の注意を払いながら研究を進めている。なお、本研究で行う心理物理検査では侵襲的な操作は行っていない。

実験動物を用いた研究に関しては、北海道大学動物委員会の承認を受けた上で、同委員会の定める動物実験に関する指針を遵守して

行っている。

C. 研究結果

オドボール課題での反応時間に 2 要因分散分析を行ったところ、群間による主効果のみに有意差を認め、課題条件による主効果と交互作用に有意差を認めなかった。また、患者群の臨床スコア (SARA および BBS) と反応時間の間に有意な相関は無かった。

小脳半球の各領域ごとに ROI を設定して相関解析を行ったところ、患者群で missing 条件では右上小脳半月 (crus) で、deviant 条件では右後四角小葉 (lobule) で FA 値と反応時間に有意な負の相関を認めた ($p < 0.05$, Spearman's rank correlation)。一方、健常統制群では有意な相関を認めなかった。

動物実験に関しては、オドボール課題を行っている際の小脳核および視床ニューロンの活動を調べるとともに、小脳外側部の機能を調べるための行動課題の開発を進めている。

D. 考察

今回の画像解析の結果からは、外界からの刺激に反応する際には右後四角小葉、内的リズムを用いたタイミング予測には右上小脳半月が関与していることが示唆された。特に上半月小葉は前頭連合野と視床・橋核を介した双方向性の強い結合が知られており、前頭葉と小脳とのネットワークがタイミング予測の機能に関与している可能性が考えられる。今後、別の行動課題でも同様の解析を行い、小脳外側部の各領野の機能を抽出するための行動パラメータの探索を進める。また、動物実験に関しては、現在遅れているベクター開発の進捗を見ながら、モデル動物に適用する行動課題の開発を続ける。

E. 結論

純粋小脳型の脊髄小脳変性症を対象とした

心理物理検査により、運動を伴わない知覚判断が低下していることが明らかとなり、その責任病巣として右小脳半月が示唆された。脊髄小脳変性症では同部と前頭葉皮質との機能連関が低下している可能性が考えられ、今後はその病態生理をモデル動物などで詳しく調べるとともに、他の小脳部位の機能を抽出できる検査法の開発を進めることが必要と思われる。

[参考文献]

1. Ohmae S, Uematsu A & Tanaka M : Temporally specific sensory signals for the detection of stimulus omission in the primate deep cerebellar nuclei. *Journal of Neuroscience*, 2013 : 33 ; 15432-15441.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Yoshida A & Tanaka M : Two types of neurons in the primate globus pallidus external segment play distinct roles in antisaccade generation. *Cerebral Cortex*, 2015 : doi:10.1093/cercor/bhu308 (Advanced online publication)
- 2) Matsushima A & Tanaka M : Different neuronal computations of spatial working memory for multiple locations within versus across visual hemifields. *Journal of Neuroscience*, 2014 : 34 ; 5621-5626.
- 3) Matsushima A & Tanaka M : Differential neuronal representation of spatial attention dependent on relative target locations during multiple object tracking. *Journal of Neuroscience*, 2014 : 34 ; 9963-9969.
- 4) 4) 植松明子, 田中真樹 : 高次脳機能と小脳 In : 鈴木則宏, 祖父江元, 宇川義一他編, *Annual Review 神経 2015*, 東京, 中外医学社, 2015 ; 107-114.

2. 学会発表

- 1) 田中真樹 . 計時と予測の神経機構 . 日本神経回路学会 オータムスクール (ASCONE) 諏訪市, 2014年11月2日 .
- 2) 田中真樹 . Neural mechanisms of temporal monitoring and prediction . 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム . 東京, 2014年12月13日 .
- 3) 伊藤健史, 田中真樹 . 眼球運動における時空間予測の学習 . 第8回 Motor control 研究会 . つくば, 2014年8月8日 .
- 4) 伊藤健史, 田中真樹 . 予測性眼球運動の空間および時間学習 . 日本生理学会北海道地方会 . 札幌, 2014年8月30日 .
- 5) Kunimatsu J, Suzuki T & Tanaka M. Anti-saccade signals in the primate cerebellar dentate nucleus. 2014年日本神経科学大会 横浜, 2014年9月11日 .
- 6) Matsuyama K & Tanaka M. Neuronal correlates of temporal prediction in the primate central thalamus. 2014年日本神経科学大会 横浜, 2014年9月11日 .
- 7) 植松明子, 田中真樹 . 2つの時間課題でのサル小脳歯状核の神経活動の比較 . 日本神経回路学会 オータムスクール (ASCONE) 諏訪市, 2014年11月1日 .
- 8) Kunimatsu J, Suzuki T & Tanaka M. Contribution of the cerebellar dentate nucleus to the generation of anti-saccades. Society for Neuroscience . Washington DC, 2014年11月15日 .

- 9) Matsuyama K & Tanaka M. Neurons in the primate central thalamus predicting the timing of periodic stimulus. Society for Neuroscience . Washington DC, 2014 年 11 月 18 日 .
- 10) Matsuyama K & Tanaka M . Role of the primate thalamus in temporal prediction. 2014 International Symposium "Vision, Memory, Thought" . 東京 , 2014 年 12 月 6 日 .
- 11) 伊藤健史 , 田中真樹 . Spatiotemporal adaptation of predictive saccades in monkeys. 第 92 回日本生理学会 . 神戸 , 2015 年 3 月 21 日 .
- 12) 植松明子 , 田中真樹 . Effects of electrical microstimulation to the primate cerebellar dentate nucleus on the detection of stimulus omission in the missing oddball paradigm. 第 92 回日本

生理学会 . 神戸 , 2015 年 3 月 23 日 .

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

脳内運動制御器の非侵襲的分析を利用した加齢性小脳萎縮を持つ 高齢者の転倒リスク早期発見・対応システムの開発

業務担当責任者： 笥 慎治 東京都医学総合研究所・運動失調プロジェクト

研究協力者： 李 鍾昊¹⁾, 石川享宏¹⁾, 岡田安弘²⁾³⁾

1)東京都医学総合研究所・運動失調プロジェクト, 2)神戸大学医学部,
3)加古川脳神経・認知リハビリテーション研究センター

研究要旨

加齢性小脳萎縮は、小脳機能の低下により姿勢制御の劣化をもたらし、高齢者の転倒リスクを高め、ひいては転倒事故の増加に寄与している可能性が懸念されている。しかし加齢性小脳萎縮の運動制御への影響については定量的な評価が未だ行われていない。そこで我々は加齢性小脳萎縮と転倒リスクの関係について検討するために、脳内の運動制御器の異常による転倒のハイリスクパターンを高感度で検出する評価システムを開発する。今年度はシステム構築のための動作分析装置の選定を行うとともに、並行して脳内の運動制御器評価システムの精度向上に努め、来年度以降のシステム開発の基本デザインを確立した。

A. 研究目的

小脳加齢性萎縮と転倒リスクの相関について検討するために、脳内の制御器の異常による転倒のハイリスクパターンを高感度で検出する評価システムを開発する。

B. 研究方法

転倒リスクの上昇を脳の運動制御系の機能低下と筋力低下の相乗効果と捉え、これまで困難であった前者の評価を独自技術(文献1-4)〔下記米国特許および国内特許を登録済み〕で実現し、転倒リスク評価の質的転換と精度向上を図る。そのために、1)高齢者施設(リハビリテーション病院併設)に入所する、介護記録から予め転倒リスクが既知の高齢被験者で手関節運動に関する脳の予測制御系の精度とフィードバック制御系の精度の2つのパ

ラメータを計測する。さらに、2)同じ被験者で歩行および姿勢が変化する全身運動(立ち座り等)を計測する。1)と2)を総合して、運動制御器の精度と全身運動の異常パターンの相関関係を分析する。次に、MRIデータが得られる被験者について、小脳加齢性萎縮の有無と運動制御器の精度および転倒リスクの関係についてベイズ統計の手法で分析を行い、最終的に小脳加齢性萎縮の転倒リスクへの寄与度について評価を行う。

(倫理面への配慮)

研究の実施に当たっては、研究倫理および安全面に十分に配慮し、具体的には予め危険性の排除に努め、インフォームド・コンセントのもとに被験者への不利益を排除したうえで計測を行う。

C. 研究結果

本研究の成否は、客観的な転倒リスクが既知の多数の高齢者からデータを収集し、リスクパターンを発見できるかにかかっている。我々はこの課題の前半部分を解決するためのアイデアとして、介護記録の完備している高齢者施設の入居者を対象被験者とすることにした。そのためには候補施設との間に個人情報入手に関して特別な信頼関係を築き、共同研究体制を確立することが不可欠である。

初年度の今年度は、共同研究施設である加古川脳神経・認知リハビリテーションセンターとの共同研究の実施体制、特に個人情報の保護について十分な打合せを行い、臨床情報へのアクセスを含む研究契約を締結するとともに、全身運動を記録するためのモーションキャプチャーシステム選定のための feasibility study を進めた。検討したモーションキャプチャーシステムは、簡易・低コスト品としては、米国マイクロソフト社の Kinect および Kinect2 を、高スペック品としては VICON 社の VICON MX システムの、計 3 システムである。

Kinect および Kinect2 は、モーションキャプチャーとしては市販価格が 3 - 4 万円と破格の低コストである反面、ゲーム用に速い動きに最適化されているため、高齢者のゆっくりとした動きや微妙な動きの検出や、静止状態での検出の安定性に大きな問題があり、データの精度に十分な信頼性が置けないことがわかった。一方、VICON MX システムゆっくりとした動きの検出における安定性も、静止状態での安定性も申し分なく、高齢者の全身運動を記録するには

D. 考察

今回の結果から、Kinect および Kinect2 は、本研究における転倒のハイリスクパターンを検出する目的には適さない。そこで、今後の

研究では VICON MX システムを用いて歩行・全身動作を記録・分析することが必要である。しかしながら、将来のシステムの実用化・普及を考えると、システムの低コスト化が必須であるため、今後の研究で発見されるハイリスクパターンの検出に、Kinect2 等の低コストシステムの利用を模索するべきである。

E. 結論

[参考文献]

[雑誌]

1. Lee JH, *Kakei S. Functional evaluation of motor commands based on a simple linear model in human wrist movements and its clinical application. *ISITC 2014 proceeding 2014; in press.*
2. Ishikawa T, Tomatsu S, Tsunoda Y, Lee J, Hoffman DS, *Kakei S. Releasing dentate nucleus cells from Purkinje cell inhibition generates outputs from the cerebrotocerebellum. *PLoS One* 2014; 9:e108774 (pp.1-16).
3. Ishikawa T, Tomatsu S, Tsunoda Y, Hoffman DS, *Kakei S. Mossy fibers in the cerebellar hemisphere show delay activity in a delayed response task. *Neurosci Res* 2014; doi: 10.1016/j.neures.2014.07.006.

[書籍]

1. 筧 慎治, 李鍾昊「小脳症状の解析 predictive control and feedback control (Chapter 1 の 2)」, *Annual Review 神経* 2014, 中外医学社, 鈴木則宏、祖父江元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆 編, pp.11-17 (2014)

F. 健康危険情報

記載すべき事なし。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Lee JH, *Kakei S. Functional evaluation of motor commands based on a simple linear model in human wrist movements and its clinical application. *ISITC 2014 proceeding 2014; in press.*
- 2) Ishikawa T, Tomatsu S, Tsunoda Y, Lee J, Hoffman DS, *Kakei S. Releasing dentate nucleus cells from Purkinje cell inhibition generates outputs from the cerebrocerebellum. *PLoS One* 2014; 9:e108774 (pp.1-16).
- 3) Ishikawa T, Tomatsu S, Tsunoda Y, Hoffman DS, *Kakei S. Mossy fibers in the cerebellar hemisphere show delay activity in a delayed response task. *Neurosci Res* 2014; doi: 10.1016/j.neures.2014.07.006.
- 4) 筧 慎治, 李鍾昊 「小脳症状の解析 predictive control and feedback control (Chapter 1 の 2)」, Annual Review 神経 2014, 中外医学社, 鈴木則宏、祖父江元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆 編, pp.11-17 (2014)

2. 学会発表

(招待講演)

- 1) Kakei S. “Dissociation and evaluation of outputs from predictive and feedback controllers for tracking movements in normal subjects and patients with neurological disorders” INCF Japan Node International Workshop, Advances in Neuroinformatics 2014 @ RIKEN BSI (9月25日)

- 2) 筧 慎治 「手首の動きから探る脳内の運動制御器の状態—基礎と臨床応用」 第6回神経科学・リハビリテーション・ロボット工学のシナジー効果に関する研究会@九州工業大学(1月28日)

(一般発表)

- 1) Ishikawa T, Tomatsu S, Hoffman DS, Kakei S. “Mossy fibers in the cerebellar hemisphere show activity during an instructed delay period” 第44回北米神経科学学会@ Washington D.C. (11月18日)
- 2) Ishikawa T, Tomatsu S, Hoffman DS, Kakei S. “Releasing dentate nucleus cells from Purkinje cell inhibition generates output from the cerebrocerebellum” Vision, Memory, Thought –国際シンポジウム(12月6日@東京大学伊藤記念ホール)
- 3) 石川享宏, 戸松彩花, 筧 慎治. 「遅延運動課題における小脳半球部への苔状線維入力」第37回日本神経科学大会(9月11日)
- 4) 関庚甫, 李鍾昊, 筧 慎治 “Estimation of pulling directions of wrist prime movers on the wrist with a musculoskeletal model” 第37回日本神経科学大会@パシフィコ横浜(9月11日)
- 5) 李鍾昊, 織茂智之, 筧 慎治. “Evaluation of motor symptoms of patients with Parkinson's disease in terms of three components of tracking movement of the wrist” 第37回日本神経科学大会@パシフィコ横浜(9月11日)
- 6) 石川享宏, 筧 慎治 「歯状核ニューロンのバースト活動は脱抑制によって形成される」 第8回 Motor Control 研究会 @筑波大学(8月9日)
- 7) 石川享宏, 筧 慎治 「大脳小脳における

出力生成メカニズム」 包括脳ネットワーク 冬のシンポジウム @東京医科歯科大学 (12月12日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

1. 特許取得

- 1) 米国特許登録【発明の名称】Quantitative motor function evaluation system. 【特許登録日】Jul. 29, 2014【US特許番号】US 8,792,977 B2【発明者】Kakei S, Lee JH

- 2) 国内特許登録「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」 (登録日:平成26年10月3日)【特許登録番号】特許第5623759号【発明者】笥 慎治, 李 鍾昊, 鏡原 康裕 (2014)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

なし

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究」

機関名 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果 (発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所 (学会等名)	発表した時期	国内・外の別
Machado-Joseph 病と筋萎縮性側索硬化症の合併例ではポリグルタミン凝集と核 TDP43 脱失とが同一神経細胞に共存する	山田哲夫、内原俊記、伊藤栄作、伊藤陽子、大八木正貴、石橋哲、三條伸夫、石川欽也、明石 功、横田隆徳、水澤英洋、江石義信	第 55 回日本神経病理学会総会	2014 年 6 月	国内
易転倒性で発症し、早期に小脳失調が見られた進行性核上性麻痺の 1 剖検例	新宅 洋、融 衆太、内原俊記、日熊麻耶、石川欽也、水澤英洋、今田安津子、竹本 暁、北川昌伸、廣川勝昱、斎藤和幸、小林高義	第 55 回日本神経病理学会総会	2014 年 6 月	国内
小児失調症 59 例における自己抗体陽性率、免疫治療効果についての検討	南里和紀、大熊美咲、佐藤沙紀、田口丈士、上田優樹、田中伸幸、石河朝子、三苫 博、水澤英洋	第 26 回日本神経免疫学会総会学術集会	2014 年 9 月	国内
Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 cases progressive neurodegeneration in Drosophila.	Ishiguro T, Fujikake N, Sato N, Wada K, Mizusawa H, Nagai Y, Ishikawa K	第 37 回日本神経科学大会	2014 年 9 月	国内
Internal model mechanisms of slow and fast prism adaptation in human hand-reaching movement	Honda T, Nagao S, Hashimoto Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Ito M	第 37 回日本神経科学大会	2014 年 9 月	国内

小脳失調症 臨床と研究 最前線	水澤英洋	第10回国立精神・ 神経医療研究セン ター 神経内科短 期臨床研修セミ ナー	2014年7月	国内
脳を守る 運動失調症を きたす小脳の病態とその 診断・治療	水澤英洋	第22回脳の世紀シ ンポジウム	2014年9月	国内
ビデオセッション 内科 疾患における movement disorders	水澤英洋	第8回パーキンソン 病・運動障害疾患コ ングレス	2014年10月	国内
Present and future of gene therapy in neurology	Mizusawa H	69 th Annual Congress of the Chilean Neurology ,Psychiatr y and Neurosurgery Association , Puerto Varas, Chile	2014年10月	国外
脊髄小脳変性症の克服に 向けて.	水澤英洋	第14回 信州 Neuro CPC (日本医 師会生涯教育講座)	2014年10月	国内
Neuropathological feature of SCA 31	Mizusawa H	he 3 rd Congress of Asian Society of Neuropathology (CASN)、Seoul, Korea	2014年11月	国外
難治性神経疾患における 病態機序解明と治療法開 発への展望	水澤英洋	平成26年度厚生 労働科学研究(難治 性疾患等克服研究 (難治性疾患等実 用化研究))推進事 業 研究発表会 公開講座 これか らの難病研究~新 しい治療法の開発 ~	2015年1月	国内

小脳疾患の克服に向けて- プルキンエ細胞からのア プローチ-	水澤英洋	第6回公開シンポ ジウム 脳とここ ろの病気の克服を めざして~脳科学 からのアプローチ ~ CREST「精神・ 神経疾患の分子病 態理解に基づく診 断・治療へ向けた新 技術の創出」	2015年1月	国内
生涯にわたる脳の健康を 目指して	水澤英洋	第7回脳プロ公開シ ンポジウム 育 ち・暮らし・古い 人生を支える生涯 健康(脳) 文部科 学省「脳科学研究戦 略推進プログラム (脳プロ)」	2015年2月	国内
「これからの難病医療」	水澤英洋	第9回ファブリ病シ ンポジウム.	2015年3月	国内
パーキンソン病の注視範 囲狭小化は脳基底核障 害に由来する.	松本英之、寺尾安生、 古林俊晃、弓削田晃 弘、福田秀樹、江本 正喜、花島律子、宇 川義一	第55日本神経学会 学術大会	2014年5月	国内
4連発磁気刺激(QPS)を用 いたゾニサミドによる大 脳皮質可塑性変化の検討	田中信行、堤涼介、 清水崇宏、松田俊一、 寺田さとみ、濱田雅、 寺尾安生、宇川義一、 花島 律子	第55日本神経学会 学術大会	2014年5月	国内
一次運動野の反復単相性 4連発経頭蓋磁気刺激 QPSによる対側一次運動 野への可塑性誘導	堤涼介、花島律子、 寺尾安生、代田悠一 郎、清水崇宏、田中 信行、宇川義一	第55日本神経学会 学術大会	2014年5月	国内
QPSによる運動野 intrinsic plasticity の誘導	榎本 博之、寺尾安 生、門脇傑、榎本(中 谷) 雪、小林俊輔、 宇川義一	第55日本神経学会 学術大会	2014年5月	国内

パーキンソン病における書字動作中の眼と手の協調運動の解析.	徳重真一、松田俊一、寺尾安生、清水崇宏、田中信行、堤涼介、弓削田晃弘、寺田さとみ、濱田雅、花島律子、辻省次、宇川義一.	第 55 日本神経学会 学術大会	2014 年 5 月	国内
脊髄小脳変性症患者におけるプリズム順応障害と古典的運動失調症状との関連	花島律子、内村元昭、北澤茂、大南伸也、堤涼介、清水崇宏、田中信行、寺尾安生、辻省次、宇川義一	第 55 日本神経学会 学術大会	2014 年 5 月	国内
前補足運動野に対する四連発経頭蓋反復磁気刺激がヒト視覚運動系列学習に与える影響	清水崇宏、花島律子、堤涼介、代田悠一郎、濱田 雅、田中信行、松田俊一、寺尾安生、宇川義一	第 55 日本神経学会 学術大会	2014 年 5 月	国内
パーキンソン病の小字症に及ぼす眼球運動の影響	徳重真一、寺尾安生、松田俊一、清水崇宏、田中信行、弓削田晃弘、寺田さとみ、濱田雅、宇川義一	第 44 回日本臨床神経生理学会学術大会	2014 年 11 月	国内
脊髄小脳変性症における眼球運動の解析	寺田さとみ、徳重真一、松田俊一、清水崇宏、田中信行、弓削田晃弘、濱田雅、宇川義一	第 44 回日本臨床神経生理学会学術大会	2014 年 11 月	国内
Comprehensive Phosphoproteome Analysis Unravels the Core Signaling Network that Initiates the Earliest Synapse Pathology in Preclinical Alzheimer's Disease Brain", ISP	Okazawa, H	Symposium 2014 - Ageing and Metabolis, Tokyo Medical and Dental University,	2014 年 8 月	国内
Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1	Tamura, T., Barclay, S, S., Fujita, K., Ito, H., Motoki, K., Shimamura, T., Tagawa, K., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Tagawa, K.,	Neuroscience2014, Yokohama	2014 年 9 月	国内

	Imoto, S., Miyano, S., Okazawa, H.			
A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine disease	Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Yoshida, C., Sone, M., Okazawa, H.	Neuroscience2014, Yokohama	2014 年 9 月	国内
脊髄小脳失調症 1 型における DNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析	田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均	第 55 日本神経学会 学術大会	2014 年 5 月	国内
TERA/VCP/p97 の DNA 修復機能不全は複数の神経変性疾患に關与する	藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均	第 55 日本神経学会 学術大会	2014 年 5 月	国内
脊髄小脳失調症 1 型における DNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析	田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均	第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会	2014 年 6 月	国内
複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全	藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉	第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会	2014 年 6 月	国内

	田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均			
昆虫モデルから見る神経疾患の特異性と普遍性	田村拓也、岡澤均	第7回分子高次機能研究会	2014年8月	国内
情報科学を用いた神経変性疾患の病態解明	田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均	第37回日本神経科学大会	2014年9月	国内
複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全	藤田 慶大、中村 蓉子、岡 努、伊藤 日加瑠、田村 拓也、田川 一彦、笹邊 俊和、勝田 明寿香、本木 和美、塩飽 裕紀、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均	第37回日本神経科学大会	2014年9月	国内
脊髄小脳失調症1型の分子病態コアネットワークの解明	田村 拓也、Barclay S Sam、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、島村 徹平、田川一彦、勝田 明寿香、曾根 雅紀、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均	第37回日本分子生物学会年会	2014年11月	国内
神経幹細胞の Pqbp1 機能不全による小頭症は in utero 遺伝子治療によって改善できる	伊藤日加瑠、塩飽裕紀、吉田千里、本間秀典、陳西貴、藤田慶大、岡澤 均	第37回日本分子生物学会年会	2014年11月	国内
ショウジョウバエアルツハイマー病モデルにおける yata 遺伝子による APP 輸送制御	矢島 隆明、田村 拓也、岡澤 均	第37回日本分子生物学会年会	2014年11月	国内
iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた SCA1 のバイオマーカー探索	岡澤 均、大谷 彰子	運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班平成26年度 研究報告会	2015年1月	国内

神経変性疾患と知的障害・小頭症をつなぐRNA関連分子PQB P1	岡澤 均	第1回TMDU「知の創造」若手コアセミナー	2014年8月	国内
ゲノム安定性と脳機能	岡澤 均	第37回日本分子生物学会年会 シンポジウム・ゲノム再生	2014年11月	国内
シナプス病態から脳疾患治療へ、網羅的質量分析の示唆するアルツハイマー病のシナプス超早期病態の分子機構	岡澤 均	包括脳ネットワーク』冬のシンポジウム「精神神経疾患研究の現状と展望：新学術5領域の相互理解・連携を目指して	2014年12月	国内
「シナプス病態」領域の紹介	岡澤 均	包括脳ネットワーク』冬のシンポジウム「大脳新皮質構築」「シナプス病態」「メゾ神経回路」3領域合同公開シンポジウム」	2014年12月	国内
痙性失調症を呈したPLA2G6複合ヘテロ接合性変異の一卵性双生児例	瀧山嘉久	平成26年度「運動失調症の医療基盤に関する調査研究」班、「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	2015年1月	国内
神経変性疾患関連タンパク分解におけるESCRT系の役割	長谷川隆文	第87回日本生化学会大会	2014年10月	国内
計時と予測の神経機構	田中真樹	日本神経回路学会 オータムスクール (ASCONE)	2014年11月	国内
Neural mechanisms of temporal monitoring and prediction	田中真樹	包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム	2014年12月	国内
眼球運動における時空間予測の学習	伊藤健史, 田中真樹	第8回 Motor control 研究会	2014年8月	国内

予測性眼球運動の空間および時間学習	伊藤健史, 田中真樹	日本生理学会北海道地方会	2014 年 8 月	国内
Anti-saccade signals in the primate cerebellar dentate nucleus	Kunimatsu J, Suzuki T & Tanaka M	日本神経科学大会	2014 年 9 月	国内
Neuronal correlates of temporal prediction in the primate central thalamus	Matsuyama K & Tanaka M	日本神経科学大会	2014 年 9 月	国内
2 つの時間課題でのサル小脳歯状核の神経活動の比較	植松明子, 田中真樹	日本神経回路学会 オートムスクール (ASCONE)	2014 年 11 月	国内
Contribution of the cerebellar dentate nucleus to the generation of anti-saccades	Kunimatsu J, Suzuki T & Tanaka M	Society for Neuroscience (Washington DC)	2014 年 11 月	国外
Neurons in the primate central thalamus predicting the timing of periodic stimulus.	Matsuyama K & Tanaka M	Society for Neuroscience (Washington DC)	2014 年 11 月	国外
Role of the primate thalamus in temporal prediction	Matsuyama K & Tanaka M	2014 International Symposium "Vision, Memory, Thought	2014 年 12 月	国内
Spatiotemporal adaptation of predictive saccades in monkeys	伊藤健史, 田中真樹	第 92 回日本生理学会	2015 年 3 月	国内
Effects of electrical microstimulation to the primate cerebellar dentate nucleus on the detection of stimulus omission in the missing oddball paradigm	植松明子, 田中真樹	第 92 回日本生理学会	2015 年 3 月	国内
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	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	第 66 回日本細胞生物学会大会	2014 年 6 月	国内

Molecular mechanisms and potential therapies of the spinocerebellar ataxia and the future perspective of the clinical application	平井宏和	International congress on Neuroscience.(ロシア)	2014 年 6 月	国外
Distinct transduction profiles resulting from direct cortical, intrathecal or intravenous injection of AAV9 in the CNS	Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H	9th Federation of European Neuroscience Societie.ミラノ(イタリア)	2014 年 7 月	国外
Abnormalities of metabotropic glutamate receptor (MGLUR)-mediated signaling at cerebellar parallel fiber-purkinje cell synapses in spinocerebellar ataxia type 1(SCA1)model mice	Hosoi N, Hirai H	9th Federation of European Neuroscience Societie.ミラノ(イタリア)	2014 年 7 月	国外
Cerebellar transduction profiles after ssAAV9 injection via cortical, intrathecal or intravenous routes.	Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内
AAV による遺伝子導入を介した脊髄小脳変性症 3 型モデルマウスの作出	今野歩、平井宏和	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内
インテグラーゼを欠損させたレンチウイルスベクターによる一年間の遺伝子発現の経過観察と遺伝性神経変性疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療での有効性の検討	松崎泰教、齊田英恵、高山清彦、飯塚朗、今野歩、柳茂、平井宏和	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内
Synaptic regulation in the cerebellum and motor control] Impairment of synaptic transmission that induces cerebellar ataxia and the underlying molecular mechanisms	平井宏和	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内

MSA とオートファジー	若林孝一	第 55 回日本神経学会総会	2014 年 5 月	国内
脊髄小脳失調症 2 型脳に認められた 2 種類の核内封入体	森文秋、豊島靖子、丹治邦和、柿田明美、高橋均、若林孝一	第 55 回日本神経病理学会総会	2014 年 6 月	国内
ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた神経変性疾患の microRNA 解析	若林孝一、森文秋、柿田明美、高橋均、内海潤、佐々木秀直	第 55 回日本神経病理学会総会	2014 年 6 月	国内
ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する	鈴木マリ、藤掛伸宏、和田圭司、永井義隆	第 55 回日本神経学会総会	2014 年 5 月	国内
ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する	斉藤勇二、藤掛伸宏、岡本佑馬、和田圭司、永井義隆	第 55 回日本神経学会総会	2014 年 5 月	国内
DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する	藤掛伸宏、木村展之、長野清一、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、永井義隆	第 55 回日本神経学会総会	2014 年 5 月	国内
SCA31 (UGGAA) _n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす	石黒太郎、石川欽也、藤掛伸宏、上山盛夫、永井義隆、和田圭司、水澤英洋	第 55 回日本神経学会総会	2014 年 5 月	国内
異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす	石黒太郎、藤掛伸宏、佐藤望、和田圭司、水澤英洋、永井義隆、石川欽也	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内
神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する	鈴木マリ、Anne-Marie Neumann、斉藤勇二、藤掛伸宏、和田圭司、永井義隆	遅延運動課題における小脳半球部への苔状線維入力	2014 年 9 月	国内
p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす	斉藤勇二、藤掛伸宏、岡本佑馬、和田圭司、永井義隆	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内

筋強直性ジストロフィーの分子病態～治療	松浦 徹	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	2015 年 1 月	国内
Aceruloplasminemia	Miyajima H	55 th Annual Meeting of JSNP	2014 年 6 月	国内
Dissociation and evaluation of outputs from predictive and feedback controllers for tracking movements in normal subjects and patients with neurological disorders	Takei S.	INCF Japan Node International Workshop, Advances in Neuroinformatics 2014	2014 年 9 月	国内
手首の動きから探る脳内の運動制御器の状態－基礎と臨床応用	筧 慎治	第 6 回神経科学・リハビリテーション・ロボット工学のシナジー効果に関する研究会	2015 年 1 月	国内
Mossy fibers in the cerebellar hemisphere show activity during an instructed delay period	Ishikawa T, Tomatsu S, Hoffman DS, Takei S	第 44 回北米神経科学学会	2014 年 11 月	国外
Releasing dentate nucleus cells from Purkinje cell inhibition generates output from the cerebrocerebellum	Ishikawa T, Tomatsu S, Hoffman DS, Takei S	Vision, Memory, Thought –国際シンポジウム	2014 年 12 月	国内
遅延運動課題における小脳半球部への苔状線維入力	石川享宏, 戸松彩花, 筧 慎治	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内
Estimation of pulling directions of wrist prime movers on the wrist with a musculoskeletal model	関庚甫, 李鍾昊, 筧 慎治	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内
Evaluation of motor symptoms of patients with Parkinson's disease in terms of three components of tracking movement of the wrist	李鍾昊, 織茂智之, 筧 慎治	第 37 回日本神経科学学会大会	2014 年 9 月	国内
歯状核ニューロンのバースト活動は脱抑制によ	石川享宏, 筧 慎治	第 8 回 Motor Control 研究会	2014 年 8 月	国内

て形成される」				
大脳小脳における出力生成メカニズム	石川享宏, 筧 慎治	包括脳ネットワーク 冬のシンポジウム	2014 年 12 月	国内
Androgen-dependent deficits in muscle-derived BDNF correlate with motor dysfunction in two mouse models of spinal bulbar muscular atrophy	Halievski K, Xu Y, Henley CL, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Breedlove S, Jordan CL	Neuroscience 2014, Washington DC, USA	2014 年 11 月	国外
SBMA motor dysfunction may be due to failed neuromuscular transmission	Xu, Atchison W, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Breedlove S, Jordan CL	Neuroscience 2014, Washington DC, USA	2014 年 11 月	国外
Comparison Of Different Symptom Assessment Scales For Multiple System Atrophy In 1 Year.	Matsushima M, Yabe I, Oba K, Sakushima K, Mito Y, Takei A, Houzen H, Tsuzaka K, Yoshida K, Maruo, Y, Sasaki H	the 14th Asian and Oceanian Congress of Neurology, Macao, China	2014 年 3 月	国外
Comparison of different symptom assessment scales for multiple system atrophy -second report	Matsushima M, Yabe I, Oba K, Sakushima K, Mito Y, Takei A, Houzen H, Tsuzaka K, Yoshida K, Maruo Y, Sasaki H	18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Stockholm, Sweden	2014 年 6 月	国外
多系統萎縮症における症状評価スケールの比較 第 2 報	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	第 55 回日本神経学会総会	2014 年 5 月	国内
脊髄小脳変性症における歩行分析	白井慎一, 松島理明, 矢部一郎, 佐々木秀直	32 回日本神経治療学会総会.	2014 年 11 月	国内
多系統萎縮症において p25 α /TPPP はオリゴペプチドグリアの核から細胞質に局在変化を起こす	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	第 55 回日本神経病理学会総会	2014 年 6 月	国内

2 . 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Characteristic RNA foci of the abnormal hexanucleotide GGCCUG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 36 (Asidan).	Liu W, Ikeda Y, Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Abe K.	Eur J Neurol.	2015	国外
Cognitive and affective functions in diabetic patients associated with diabetes-related factors, white matter abnormality and aging.	Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K.	Eur J Neurol.	2015	国外
Time-dependent Profiles of MicroRNA Expression Induced by Ischemic Preconditioning in the Gerbil Hippocampus.	Sun M, Yamashita T, Shang J, Liu N, Deguchi K, Feng J, Abe K.	Cell Transplant	2015	国外
Anti-oxidative nutrient rich diet protects against acute ischemic brain damage in rats.	Yunoki T, Deguchi K, Omote Y, Liu N, Liu W, Hishikawa N, Yamashita T, Abe K.	Brain Res	2015	国外
Acceleration of TDP43 and FUS/TLS protein expressions in the preconditioned hippocampus following repeated transient ischemia.	Sun M, Yamashita T, Shang J, Liu N, Deguchi K, Liu W, Ikeda Y, Feng J, Abe K.	J Neurosci Res	2014	国外
Characteristic RNA foci of the abnormal hexanucleotide GGCCUG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 36 (Asidan).	Liu W, Ikeda Y, Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Abe K.	Eur J Neurol.	2015	国外

Cognitive and affective functions in diabetic patients associated with diabetes-related factors, white matter abnormality and aging.	Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K.	Eur J Neurol.	2015	国外
Time-dependent Profiles of MicroRNA Expression Induced by Ischemic Preconditioning in the Gerbil Hippocampus.	Sun M, Yamashita T, Shang J, Liu N, Deguchi K, Feng J, Abe K.	Cell Transplant	2015	国外
Anti-oxidative nutrient rich diet protects against acute ischemic brain damage in rats.	Yunoki T, Deguchi K, Omote Y, Liu N, Liu W, Hishikawa N, Yamashita T, Abe K.	Brain Res	2015	国外
Large-scale RNA interference screening in mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation.	Yamanaka T, Wong HK, Tosaki A, Bauer PO, Wada K, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N.	PLoS One.	2014	国外
Singular localization of sodium channel β 4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum.	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.	Nat Commun.	2014	国外
Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins.	Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Hattori N, Ishiura S, Nukina N.	Hum Mol Genet.	2015	国外

Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice.	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.	Hum Mol Genet.	2015	国外
Large-scale RNA interference screening in mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation.	Yamanaka T, Wong HK, Tosaki A, Bauer PO, Wada K, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N.	PLoS One.	2014	国外
Singular localization of sodium channel β 4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum.	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.	Nat Commun.	2014	国外
Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins.	Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Hattori N, Ishiura S, Nukina N.	Hum Mol Genet.	2015	国外
Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease	Miki Y, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K	Neurobiol Dis	2014	国外
Analysis of microRNA from archived formalin-fixed	Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H	Acta Neuropathol Comm	2014	国外

paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis				
p62 deficiency enhances α -synuclein pathology in mice	Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Maruyama A, Nikaido Y, Mimura J, Mori F, Warabi E, Yanagawa T, Ueno S, Itoh K, Wakabayashi K	Brain Pathol	in press	国外
Functional evaluation of motor commands based on a simple linear model in human wrist movements and its clinical application.	Lee JH, Kakei S	ISITC 2014 proceeding	2014	国外
Releasing dentate nucleus cells from Purkinje cell inhibition generates outputs from the cerebrotocerebellum.	Ishikawa T, Tomatsu S, Tsunoda Y, Lee J, Hoffman DS, Kakei S	PLoS One	2014	国外
Mossy fibers in the cerebellar hemisphere show delay activity in a delayed response task.	Ishikawa T, Tomatsu S, Tsunoda Y, Hoffman DS, Kakei S	Neurosci Res	2014	国外
Non-invasive cerebellar stimulation - a consensus paper.	Grimaldi G, Argyropoulos GP, Boehlinger A, Celnik P, Edwards MJ, Ferrucci R, Gales KJM, Groiss SJ, Hiraoka K, Kassavetis P, Lesage E, Manto M, Miall RC, Priori A, Sadnicka A, Ugawa Y, Ziemann U	Cerebellum	2014	国外
The 3-second rule in hereditary pure cerebellar ataxia: a synchronized tapping study.	Matsuda S, Matsumoto H, Furubayashi T, Hanajima R, Tsuji S, Ugawa Y, Terao Y	Plos One	(in press)	国外

Visual scanning area is abnormally enlarged in hereditary pure cerebellar ataxia	Matsuda S, Matsumoto H, Furubayashi T, Fukuda H, Hanajima R, Tsuji S, Ugawa Y, Terao Y.	Cerebellum	2014	国外
Top-Down but Not Bottom-Up Visual Scanning is Affected in Hereditary Pure Cerebellar Ataxia.	Matsuda S, Matsumoto H, Furubayashi T, Fukuda H, Emoto M, Hanajima R, Tsuji S, Ugawa Y, Terao Y	Plos One	2014	国外
Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cerebellar Pathology in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 1.	Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H.	Cerebellum	2014	国外
Distinct transduction profiles in the CNS via three injection routes of AAV9 and the application to generation of a neurodegenerative mouse model.	Huda F, Konno A. Matsuzaki Y. Goenawan H. Miyake K. Shimada T and Hirai H.	Molecular Therapy — Methods & Clinical Development	2014	国外
One-year follow-up of transgene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice.	Saida H, Matsuzaki Y, Takayama K, Iizuka A, Konno A, Yanagi S, Hirai H.	Gene Therapy	2014	国外
Mesenchymal Stem Cells as a Potential Therapeutic Tool for Spinocerebellar Ataxia.	Nakamura K, Mieda T, Suto N, Matsuura S, Hirai H.	Cerebellum	2014	国外
Characteristic RNA foci of the abnormal hexanucleotide GGCCUG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 36 (Asidan).	Liu W, Ikeda Y, Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Abe K.	Eur J Neurol	2014	国外
Redefining cerebellar ataxia in degenerative ataxias: lessons from recent	Tada M, Nishizawa M, Onodera O.	J Neurol Neurosurg Psychiatry.	2015	国外

research on cerebellar systems.				
Spinocerebellar ataxia 36 exists in diverse populations and can be caused by a short hexanucleotide GGCTG repeat expansion.	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, Ishikawa K, Dürr A.	J Neurol Neurosurg & Psychiatry.	2014	国外
Elevation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of three patients with superficial siderosis.	Ozaki K, Sanjo N, Ishikawa K, Higahsi M, Hattori T, Tanuma N, Miyata R, Hayashi M, Yokota T, Okawa A, Mizusawa H.	Neurology and Clinical Neuroscience.	2015	国外
CADASIL with a Novel NOTCH3 Mutation (Cys478Tyr).	Ozaki K, Irioka T, Ishikawa K, Mizusawa H.	Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.	2015	国外
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.	Ota K, Obayashi M, Ozaki K, Ichinose S, Kakita A, Tada M, Takahashi H, Ando N, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K.	Acta Neuropathol Commun.	2014	国外
The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease.	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.	Neurobiol Aging.	2014	国外

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—	榊原聡子，饗場郁子，齋藤由扶子，犬飼晃，石川欽也，水澤英洋．	臨床神経	2014	国内
VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of α -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease.	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.	Neurobiol Dis	2014	国外
Lys-63-linked Ubiquitination by E3 Ubiquitin Ligase Nedd4-1 Facilitates Endosomal Sequestration of Internalized α -Synuclein.	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.	J Biol Chem	2014	国外
Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease.	Takeda A., Baba T., Kikuchi A., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Miura E., Mori E.	J. Parkinsons Dis.	2014	国外
Cognitive impairment in multiple system atrophy: A position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS multiple system atrophy (MODIMSA) Study Group.	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.	Movement Disorders	2014	国外
Neural substrates of cognitive subtypes in Parkinson's disease: a 3-year longitudinal study.	Shoji Y., Nishio Y., Baba T., Uchiyama M., Yokoi K., Ishioka T., Hosokai Y., Hirayama K., Fukuda H., Aoki M.,	PLoS One	2014	国外

	Hasegawa T., Takeda A., Mori E.			
Novel mutations in the PNPLA6 gene in Boucher-Neuhauser syndrome.	Koh K, Kobayashi F, Miwa M, Shindo K, Isozaki E, Ishiura H, Tsuji S, Takiyama Y.	J Hum Genet	29-Jan-15	国外
A Japanese SCA5 family with a novel three-nucleotide in-frame deletion mutation in the SPTBN2 gene: a clinical and genetic study.	Wang Y, Koh K, Miwa M, Yamashiro N, Shindo K, Takiyama Y.	J Hum Genet	2014	国外
Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation.	Shimazaki H, Honda J, Naoi T, Namekawa M, Nakano I, Yazaki M, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda S, Ishiura H, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Takiyama Y.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	2014	国外
遺伝性痙性対麻痺の最新情報	瀧山嘉久	臨床神経	2014	国内
痙性対麻痺：JASPAC	瀧山嘉久	BRAIN and NERVE	2014	国内
Characteristic MRI findings in beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN).	Ichinose Y, Miwa M, Onohara A, Obi K, Shindo K, Saito H, Matsumoto N, Takiyama Y.	Neurol Clin Pract	2014	国外
Property of lysosomal storage disease associated with midbrain pathology in the CNS of LAMP-2-deficient mice.	Furuta, A., kikuchi, H., Fujita, H., Yamada, D., kabuta, T., Blanz, J., Saftig, P., Nishino, I., Wada, K., Uchiyama, Y.	Am. J. Pathol.		国外
Unique combination of hyperintense vessel sign on initial FLAIR and delayed vasoconstriction on MRA	Kameda T, Namekawa M, Shimazaki H, Minakata D, Matsuura T, Nakano I.	Cephalalgia	2014	国外

in reversible cerebral vasoconstriction syndrome: case report.				
Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2.	Nakayama T, Nakamura H, Oya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K, Matsuura T.	J Hum Genet	2014	国外
Seven amyotrophic lateral sclerosis patients diagnosed only after development of respiratory failure.	Sato K, Morimoto N, Deguchi K, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K.	J Clin Neurosci	2014	国外
LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity.	Yamashita Y [#] , Tohru Matsuura [#] * ([#] equally contributed, *corresponding author), Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita T, Ibi T, Sahashi K, Ohno K.	Neurobiol Dis	2014	国外
Two types of neurons in the primate globus pallidus external segment play distinct roles in antisaccade generation.	Yoshida A & Tanaka M	Cerebral Cortex	2015 (AOP)	国外
Different neuronal computations of spatial working memory for multiple locations within versus across visual hemifields.	Matsushima A & Tanaka M	Journal of Neuroscience	2014	国外
Differential neuronal representation of spatial attention dependent on relative target locations during multiple object tracking.	Matsushima A & Tanaka M	Journal of Neuroscience	2014	国外
Case of presymptomatic aceruloplasminemia treated with deferasirox.	Miyajima H	Hepatol Res	2014	国外
Aceruloplasminemia	Miyajima H	Neuropathol	2015	国外

Mutations in the PQBP1 gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15kD.	Mizuguchi, M., Obita, T., Serita, T., Kojima, R., Nabeshima, Y., Okazawa, H.	Nature Commun.	2014	国外
In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells.	Ito, H., Shiwaku, H., Yoshida, C., Homma, H., Luo, H., Chen, X., Fujita, K., Musante, L., Fischer, U., Frint, S., Romano, C., Ikeuchi, Y., Shimamura, T., Imoto, S., Miyano, S., Muramatsu, SI., Kawauchi, T., Hoshino, M., Sudol, M., Arumughan, A., Wanker, EE., Rich, T., Schwartz, C., Matsuzaki, F., Bonni, A., Kalscheuer, VM., Okazawa, H.	Mol Psychiatry	2014	国外
Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain.	Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., Okazawa, H.	Hum Mol Genet.	2015	国外
HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice.	Ito, H., Fujita, K., Tagawa, K., Chen, X., Homma, H., Sasabe, T., Shimizu, J., Shimizu, S., Tamura, T., Muramatsu, SI., Okazawa, H.	EMBO Mol Med.	2014	国外
Systematic Analysis of Fly Models with Multiple Drivers Reveals Different Effects of Ataxin-1 and	Shiraishi, R., Tamura, T., Sone, M., Okazawa, H.	PLoS One.	2014	国外

Huntingtin in Neuron Subtype-Specific Expression.				
「神経変性疾患の細胞死と Hippo pathway 神経変性は Hippo pathway で制御されるか？」	田村拓也、岡澤均	医学のあゆみ	2014	国内
Impaired DNA Damage Repair as a Common Feature of Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders	Shiwaku, H., Okazawa, H.	Current Molecular Medicine	2015	国外
Mutations in the PQBP1 gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15kD.	Mizuguchi, M., Obita, T., Serita, T., Kojima, R., Nabeshima, Y., Okazawa, H.	Nature Commun.	2014	国外
In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells.	Ito, H., Shiwaku, H., Yoshida, C., Homma, H., Luo, H., Chen, X., Fujita, K., Musante, L., Fischer, U., Frint, S., Romano, C., Ikeuchi, Y., Shimamura, T., Imoto, S., Miyano, S., Muramatsu, S., Kawauchi, T., Hoshino, M., Sudol, M., Arumughan, A., Wanker, E.E., Rich, T., Schwartz, C., Matsuzaki, F., Bonni, A., Kalscheuer, V.M., Okazawa, H.	Mol Psychiatry	2014	国外
Reliability of the Japanese version of the Berg balance scale.	Matsushima M, Yabe I, Uwatoko H, Shirai S, Hirotsu M, Sasaki H.	Inter Med	2014	国外

Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis.	Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H	Acta Neuropathol Commun	2014	国外
Reliability of the Japanese version of the scales for outcomes in Parkinson's disease-autonomic questionnaire.	Matsushima M, Yabe I, Hirotsu M, Kano T, Sasaki H	Clin Neurol Neurosurg	2014	国外
A 3-year cohort study of the natural history of spinocerebellar ataxia type 6 in Japan.	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	Orhanet J Rare Dis	2014	国外
Identification of anti-Sez612 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy.	Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Takahiro Kano Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama K, Hatakeyama S, Sasaki H	J Neurol	2014	国外
Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases.	Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K.	Neuropathology	2014	国外
ALS-associated protein FIG4 is localized in Pick and Lewy bodies, and also neuronal nuclear inclusions, in polyglutamine and intranuclear inclusion body	Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K.	Neuropathology		国外

diseases.				
Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy.	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.	Hum Mol Genet.	2014	国外
Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors.	Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G.	Hum Mol Genet.	2015	国外
Anti-androgen flutamide protects male mice from androgen-dependent toxicity in three models of spinal bulbar muscular atrophy.	Renier KJ, Troxell-Smith SM, Johansen JA, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Chua JP, Sun Kim H, Lieberman AP, Breedlove SM, Jordan CL .	Endocrinology.	2014	国外
脊髄小脳変性症の治療の 進歩 2013	矢部一郎, 佐々木秀直	神経治療学		国内