

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590981
 研究課題名（和文） 本邦に高頻度存在する脊髄小脳変性症に対する画期的免疫療法の開発
 研究課題名（英文） Investigation for developing a novel immunotherapy for a degenerative ataxia common in Japan.

研究代表者
 石川 欽也（ISHIKAWA KINYA）
 東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：30313240

研究成果の概要：脊髄小脳失調症 6 型 (spinocerebellar ataxia type 6; SCA6) は、本邦に高頻度存在する常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症で、 $\alpha 1A$ -カルシウムチャンネル遺伝子内の 3 塩基 (CAG) 繰り返し配列が異常に伸長するために起きる疾患であり、このチャンネル蛋白が神経細胞内で凝集・沈着することが病態に関連している。本研究では、SCA6 の基本病態を明らかにし、それに基づく画期的な免疫療法を開発するための基礎研究を行った。その成果として、チャンネル蛋白の凝集・沈着には、このチャンネル蛋白の C 末端部分が重要であることを初めて明らかにし、この部分を特異的に認識するモノクローナル抗体を得た。この成果をもとに、抗体療法を開発するという発展が期待された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：遺伝子、神経、遺伝、蛋白

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症 6 型 (Spinocerebellar ataxia type 6; SCA6) は、常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症の一病型で、ヒト $\alpha 1A$ -カルシウムチャンネル遺伝子 (*CACNA1A*) 内の 3' 側に存在する 3 塩基 (CAG) 繰り返し配列が、軽度ながら異常に伸長するために起きる神経変性疾患である。本疾患は、ハンチントン病やマシヤド・ジヨセフ病などとともに、遺

伝子レベルでは CAG 繰り返し配列が、蛋白レベルではその産物であるポリグルタミン鎖が、正常より異常に伸長する疾患、「ポリグルタミン病」の一つに数えられている。

SCA6 の原因となる CAG 繰り返しは、正常者では 4-18 回程度に分布するが、患者では 19 回から 24 程度、まれに最長で 33 回まで軽度ながら伸長している。この異常伸長がどのようにして SCA6 の病態を起こすかは未だ不明

である。

我々は、同チャネル蛋白が患者脳内でも最も SCA6 で障害される小脳 Purkinje 細胞の細胞体内に大きな凝集体を形成していることを明らかにしていた。また、CAG 繰り返し伸長部分が翻訳されると、ポリグルタミン鎖の伸長を有するカルシウムチャネル蛋白ができるが、この伸長したポリグルタミン鎖に対する抗体を用いた場合に、小さな多数の凝集体が認められる。しかし、この大小2種類の凝集体の異同は明らかになっておらず、SCA6 での蛋白凝集・沈着のメカニズムの根本も不明な点が多いと言わざるを得ない状態であった。

一方、他のポリグルタミン病でも伸長ポリグルタミンを有する蛋白断片が神経細胞内にて凝集する。たとえばハンチントン病ではこの凝集体の形成を阻止すると、疾患の進行が抑制されることが多数の研究で証明されている。その一つの手段が、異常たんぱくに対するモノクローナル抗体を用いた抗体（免疫）療法である。

しかし、SCA6 では蛋白の凝集がどのようにして形成されるか十分に判っておらず、そのために免疫療法の可能性も全く不明のままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の2つにまとめられる。

目的1：この凝集体の主要構成成分を同定することである。この結果、2種類認められる凝集体がどのようにして出現するかを明らかにする。

目的2：凝集する蛋白を同定し、その凝集を阻止することによる治療法確立の可能性を検証する初期的研究として、凝集体構成成分に対するモノクローナル抗体を得ることである。

3. 研究の方法

(1)目的1に対する研究：まず、我々はヒト α 1Aカルシウムチャネル蛋白のC末端部分で、ポリグルタミン鎖に近い領域に存在するペプチドに対して作製したポリクローナル抗体(#5803)を用いて、対照ヒト剖検脳およびSCA6患者脳で、免疫組織化学およびウエスタンブロッティングを行った。

①免疫組織化学は、これまで本研究者が行ってきた方法で行った。すなわち、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから、6 μ mの厚さで切片を作製し、それに対して免疫組織化学的手法で染色した。方法は通常のABC法(avidin

biotinylated peroxidase complex 法)であるが、抗原賦活化のために、脱パラフィン後に0.01Mクエン酸緩衝液(pH7.0)中でマイクロウェーブ照射を1分間3回行った。

用いたSCA6患者は合計6名で、いずれも生前に遺伝子診断で正確に診断されている。対照者は、6名で小脳に病変を有さない、パーキンソン病患者2名、筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者4名である。

②ウエスタンブロッティング法は、まず剖検によって得られた対照およびSCA6患者の凍結脳組織を用いて行った。0.1g組織からまず0.32Mシヨ糖液存在下で13000回転で遠心した。

(2)目的2に対する研究：

(2)-①：委託によるモノクローナル抗体作製：#5803ポリクローナル抗体が認識するペプチドと同じものを認識するモノクローナル抗体を、業者委託により初年度作成委託した。初年度後期に納品した。これを用いてリコンビナント蛋白の認識を試みた。方法は(2)-②の項に記載する。

(2)-②：別途のモノクローナル抗体利用：本研究着手前に共同研究で作製していたモノクローナル抗体を、再度その認識の特異性検証を行った。まず、C末端部分 α 1Aカルシウムチャネル蛋白と同一の分子サイズになる、リコンビナント蛋白を作製することとした。このために、CACNA1A cDNAから、想定した部分に2か所プライマーを設計。PCR法を用いて増幅後、ベクターにクローニングした。この際、部分チャネル蛋白の5'末(蛋白レベルではN末)にはhemmagglutinin A(HA)タンパクを、3'末(C末)にはc-mycのそれぞれがタグとして融合するように設計した。これによってPC12細胞に一過性発現させると、HA-CTF-c-myc融合蛋白として発現する。さらにCTFには正常長、異常長、超異常伸長長のポリグルタミン鎖を有するように、別々の長さのCAG繰り返し配列を挿入した。これによって、融合蛋白はポリグルタミン鎖長11回(正常長)、28回(異常伸長)、165回(超伸長)の長さのポリグルタミン鎖を有する。

ウエスタンブロッティングは、脳で行ったことと同様に行った。抗体は東京理科大学新井孝夫教授に依頼し作製していただいた。

4. 研究成果

(1)-①：免疫組織化学

5803抗体を用いると、対照患者では異常は見られず、Purkinje細胞の細胞体が他の神経細胞より若干強く染まるのみであった(図1)。

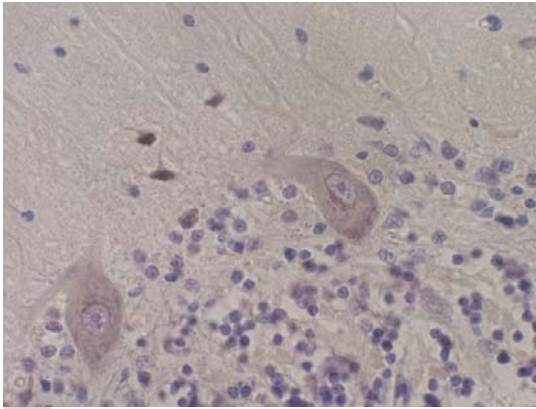


図1 対照者脳(小脳)での抗カルシウムチャンネル蛋白抗体(#5803)を用いた免疫組織化学

一方、SCA6 患者では、残存する Purkinje 細胞に限局して、細胞体内に顆粒状の免疫反応陽性構造物が多数認められた(図2)。

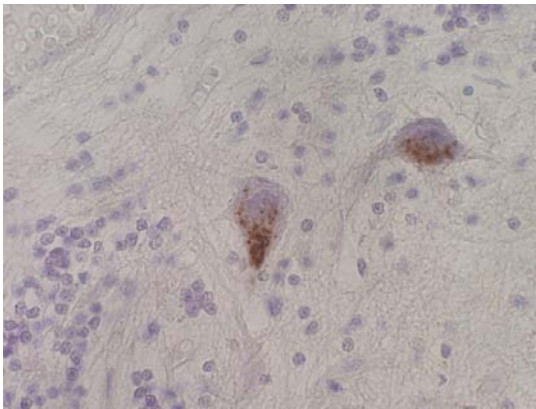


図2 SCA6 患者での免疫組織化学

このようにきわめてはっきりとした差異が認められた。さらに詳細に検索してみると、この凝集体は、Purkinje 細胞の細胞質に存在することがわかった。また、伸長ポリグルタミン鎖を認識する、モノクローナル 1C2 抗体で検出される小型凝集体も、チャンネル最 C 末端部を認識する A6PRT-C 抗体が認識する大型の凝集体も、両方をこの抗体が検出することがわかった。したがって、本研究の開始当初判明していなかった、2 種類の凝集体の異同は、同一のものという極めて明確な結論へと導かれた。

- (1) - ②: ウェスタンブロットニング
 (2) - ②: 既作製モノクローナル抗体 2D-1, 2B-1
 まず、#5803 およびモノクローナル抗体 2D-1 の抗体特異度検証の実験結果を、次の図3に示す。

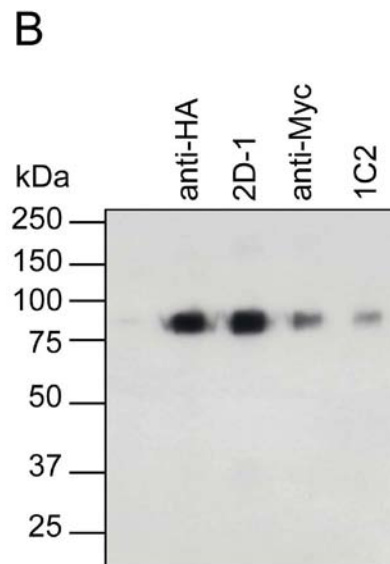
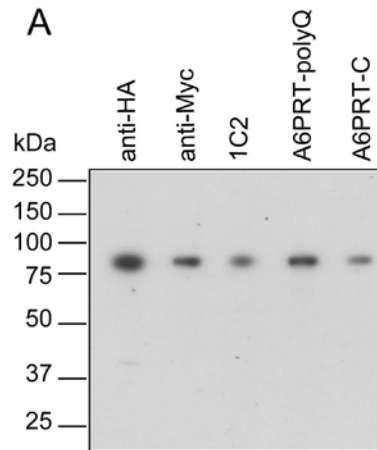


図3 #5803 抗体(A)および2D-1 抗体(B)の特異度検証実験結果

この結果から、タグと同じ位置にリコンビナント蛋白を認識しており、#5803、2D-1 ともに確かに α 1A-カルシウムチャンネル蛋白を認識することがわかった。

対照者および SCA6 患者の脳(小脳)での、本チャンネル蛋白のウェスタンブロットニング解析は、これまで報告されていない。

#5803 を用いてウェスタンブロットを行った結果を図4に示す。

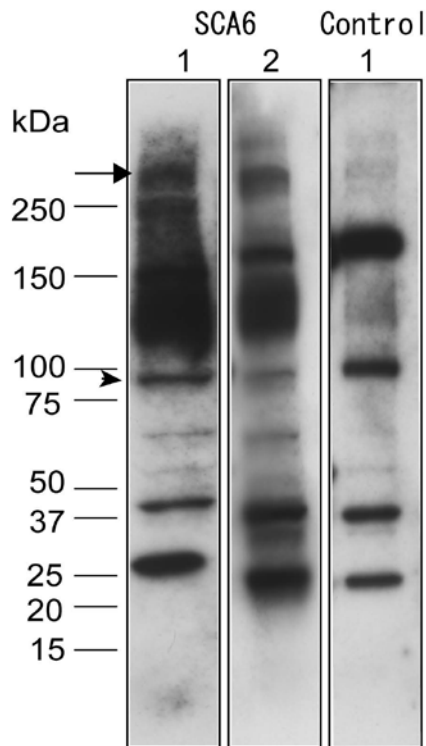


図 4 ウェスタンブロット結果. 上の矢印は全長チャンネル蛋白、下の矢印は CTF(本文参照)に対応.

对照患者では全長蛋白(上の一の位置)はわずかに見られる程度であり、強いバンドは下の矢印の 75~100 キロダルトン(kDa)間に存在した。このバンドは、C 末端部分チャンネル蛋白(C-terminal fragment: CTF)であると考えられた。その理由は、リコンビナント全長蛋白からこのサイズのバンドが産生されており、N 末端側のタグでは認識されない一方で、C 末端タグでは検出されることから判断した。この他、150~250kDa 間、37 ~50、25 kDa 付近のものは正確には決定できないが、変性蛋白である可能性が考えられた。

一方、SCA6 患者ではこれらの 4 種類のバンド以外に 75~250 kDa の間に 2 症例ともスメアが見られた。この他に、ギ酸で初めて可溶化される SDS(sodium dodecyl sulfate)非可溶性蛋白分画に CTF に一致するバンドが見られた。これらの結果から、SCA6 患者脳では確かに CTF を中心として蛋白が凝集していると考えられ、SCA6 での蛋白凝集の病態を初めて解き明かす研究とすることができた。

(2) ①: 委託による抗体作製

委託により作製された抗体では、チャンネル蛋白を認識する結果が得られなかった。

このため、既に以前に作製したモノクローナル抗体 2D-1, および 2B-1 を検証することになった。

以上の結果から、大きく分けて 2 つの研究結果が得られた。1 つ目は、SCA6 患者小脳で、全長チャンネル蛋白ではなく、むしろ一部分に相当する CTF が凝集に強く関わっているということである。

2 つ目は、CTF を鋭敏に検出する抗体の作製に成功したことである。当初の目的のようにこのモノクローナル抗体の遺伝子を同定することによって、CTF の凝集抑制が可能になるか、今後さらに研究をする必要があるといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Watase K, Barrett CF, Miyazaki T, Ishiguro T, Ishikawa K, Hu Y, Unno T, Sun Y, Kasai S, Watanabe M, Gomez CM, Mizusawa H, Tsien RW and Zoghbi HY. Spinocerebellar ataxia type 6 knock-in mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant Ca_v2.1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(33):11987-92, 2008.
2. Tsunemi T, Ishikawa K, Jin H, Mizusawa H. Cell-type-specific alternative splicing in spinocerebellar ataxia type 6. *Neurosci Lett*. 2008. [Sept 30. Epub].
3. Lin J. X, Ishikawa K (Corresponding author), Sakamoto M, Tsunemi T, Ishiguro T, Amino T, Toru S, Kondo I, Mizusawa H. Direct and accurate measurement of CAG repeat configuration in the ataxin-1 (*ATXN-1*) gene by "dual-fluorescence labeled PCR-restriction fragment length analysis". *J Hum Genet* 53: 287-295, 2008.

4. Honglian Jin, Ishikawa K (Corresponding author), Tsunemi T, Ishiguro T, Mizusawa H. Analyses of copy number and mRNA expression level of the [alpha]-synuclein gene in multiple system atrophy. *J Med Dent Sci* 55: 145-153, 2008.
5. Amino T, Ishikawa K (Corresponding author), Toru S, Ishiguro T, Sato N, Tsunemi T, Murata M, Kobayashi K, Inazawa J, Toda T, Mizusawa H. Redefining the disease locus of 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia. *J Hum Genet.* 52: 643-649, 2007.
6. Li Y, Yokota T, Gama V, Yoshida T, Gomez JA, Ishikawa K, Sasaguri H, Cohen HY, Sinclair DA, Mizusawa H, Matsuyama S. Bax-inhibiting peptide protects cells from polyglutamine toxicity caused by Ku70 acetylation. *Cell Death Differ* 14(12): 2058-67, 2007. Epub 2007 Sep21.

[学会発表] (計 1件)

1. Ishikawa K, Ishiguro T, Takahashi M, Amino T, Mizusawa H. Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) is associated with small α 1A-calcium channel protein aggregates containing expanded polyglutamine in the cytoplasm and the nucleus of human Purkinje cells. 第 58 回

米国人類遺伝学会年次大会, 2008年11月13日. 米国フィラデルフィア市

[図書] (計 1件)

Ishikawa K, Flanigan K, Mizusawa H. Chromosome 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia and spinocerebellar ataxia type 4, the clinically distinct ataxias linked to the same locus. In, "*Research advances in spinocerebellar degeneration and spastic paraplegia*". Nishizawa M & Takiyama Y, Editors. Research SignPost, Kerala, India.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他] なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
石川 欽也

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし