

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20500322

研究課題名(和文)ポリグルタミン病治療予測マーカーの探索:L-プラスチンの動態について

研究課題名(英文)L-plastin; the possibility as a surrogate marker of polyglutamine diseases.

研究代表者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA YASUKO)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：20334675

研究成果の概要(和文): ポリグルタミン病である DRPLA および HD 病患者の脳において L-plastin の量が増加していることを実際に確認したことから、これを治療予測因子として利用できる可能性について検討を加えた。ポリグルタミン病患者では剖検時凍結組織(肝臓、腎臓)では Western blotting 上、やや発現が増加している傾向があった。また、増大ポリグルタミン鎖発現細胞系を用いた実験では、L-plastin は初期には蓄積せず、数週間の経過で細胞内に蓄積していくことを観察した。

研究成果の概要(英文): L-plastin is a protein involved in actin filament organization and endocytotic processes. We found that the expression of L-plastin increased in the brains of polyglutamine diseases. We examined the relations about the L-plastin and polyglutamine. L-plastin was shown to come to have much expression in the progress of several weeks in vitro. It is thought that L-plastin may be related with a phenomenon to need time before polyglutamine disease develops.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経病理学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

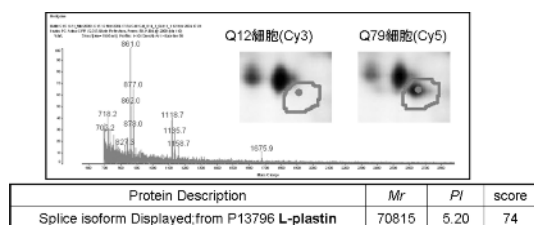
キーワード：ポリグルタミン病、L-プラスチン、治療予測マーカー、脳神経疾患病理学

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は原因遺伝子の翻訳領域中に CAG リピートの伸長を認め、異常ポリグルタミン鎖が神経細胞の細胞質や核内に蓄積することが細胞障害性に働くことが予想されており、これまでにいくつかの疾患についてモデルマウスが開発され、種々の治療薬が考案されているが、実際の患者への応用

には至っていない。我々はポリグルタミン病患者群および疾患コントロール群の凍結脳より抽出した標本を用い、differential proteomics 法で蛋白の発現差を比較した際に、常にポリグルタミン病患者群に多く発現するスポットの存在に気づいた。また、増大ポリグルタミン鎖安定発現系の細胞において、differential proteomics 法にて解析を加

えたところ、同定できた蛋白 5053 スポットの内、増大ポリグルタミン鎖発現細胞(Q79)で対照(Q12)に比し1.5倍以上の発現増加を認められた蛋白が36スポット存在していた。得られたスポットのうち最も変化の大きかった物を島津/KRATOS 飛行時間型質量分析装置 A X I M A にて解析を加えたところ、この蛋白質は actin 結合蛋白である L-plastin であることがわかった。



ヒト前頭葉での L-plastin 発現の比較

左は種々の脳神経疾患, HD はハンチントン舞踏病, 右は DRPLA を示す 約 1.3~3 倍の増加を認める

2. 研究の目的

DRPLA および HD 病患者の脳において検討を加え、それら疾患群で L-plastin の量が増加していることを実際に確認したことから、L-plastin がポリグルタミン鎖蓄積の動態と挙動をとまにすることが明らかになれば、これを治療予測因子として利用できる可能性がある。我々の研究の目的は患者の非神経細胞を採取し、L-plastin を増大ポリグルタミン鎖蓄積の治療効果予測マーカーとして利用できることを明らかにすることである。

3. 研究の方法

ヒト各組織での L-plastin 発現量の検討
まず各組織より抽出した蛋白を用い western blotting を行い、総量の増減を確認する。採取する組織は治療効果予測マーカーとして使用できるかに注目し、生検可能な組織を中心に試みる。また L-plastin は血液細胞での発現が多いことが知られているため、末梢血リンパ球でも確認する。さらに治療効果予測マーカーとしての可能性を検討するため髄液での発現も検討する。

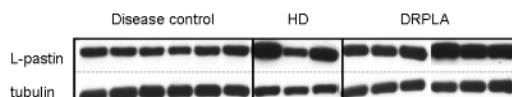
中枢神経系での L-plastin の発現分布の検討

ポリグルタミン病患者剖検脳組織を用いて、L-plastin の発現分布を検討する。まず L-plastin が神経細胞で増大しているか、グリア細胞で増大しているかを明確にする。疾患対象では L-plastin の増加が認められないことから、L-plastin の増加は単に反応性グリアの増加によるものではないと考えられるが、本蛋白増大の意義を明確とするためには、どの細胞で増加しているかを明らかとす

必要がある。さらに、plastin は細胞膜直下のみではなく、核内にも存在することが知られており、細胞内のどの部位で増加しているのかを免疫染色で明らかにする。

種々のポリグルタミン病での発現量の検討

DRPLA, HD の大脳皮質、小脳での発現増加は確認しているが、MJD の大脳では増加を認めていない。当教室で経験した他ポリグルタミン病 (SCA6, SCA17, 球脊髄性筋萎縮症) にて、その増加量、及び増加部位に差があるか、症例数を増やして western blotting を行い、より詳細に検討する。



ヒト前頭葉での L-plastin 発現の比較

左は種々の脳神経疾患, HD はハンチントン舞踏病, 右は DRPLA を示す 約 1.3~3 倍の増加を認める

4. 研究成果

本研究は、ポリグルタミン患者各組織での L-plastin 量の変化を明らかとし、本蛋白質の増加と病態の重症度との相関を明らかとすることを目的とする。実際の患者においてこの現象の普遍性を確認するために、歯状核・赤核・淡蒼球・ルイ体萎縮症 (DRPLA) およびハンチントン舞踏病 (HD) 患者において検討を加え、それら疾患群の大脳皮質、小脳で L-plastin の量が明らかに増加していることを見いだした。しかし、Machado-Joseph 病 (MJD) の大脳では増加を認めていない。より侵襲の少ない臓器による検査を試みるため、肝臓、腎臓における L-plastin の増大の有無を検討した。剖検時凍結組織 (肝臓、腎臓) では Western blotting 上、ポリグルタミン病患者ではやや発現が増加している傾向があった。これらの組織は中枢神経系に比べて比較的侵襲が小さく採取できることから、ポリグルタミン鎖依存性の L-plastin 増加が認められれば治療効果予測マーカーとなる。ポリグルタミン病は時間依存性に不溶蛋白が細胞質や核内に蓄積して発症することが考えられている。このことを検証するため、数週間低量の増大ポリグルタミン鎖を発現させ続けた状態での、L-plastin の蓄積を検討した。増大ポリグルタミン鎖発現細胞系を用いた実験では、L-plastin は初期には蓄積せず、数週間の経過で細胞内に蓄積していくことを観察した。これはポリグルタミン病を発症するまでにある一定以上の時間を必要とするという現象に、L-plastin が関わっている可能性を示すものと考えられる。増大ポリグルタミン鎖の発現により L-plastin が増加するモデル細胞系を用い、既に効果が

言われている種々の薬剤において、L-plastin の発現量の変化を検討したが、現在のところ優位に発現量の低下をみたものはない。

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11件)

Toyoshima Y, Emura I, Umeda Y et al. Vertebral basilar system dolichoectasia with marked infiltration of IgG4-containing plasma cells: A manifestation of IgG4-related disease? *Neuropathology in press*

Shimizu H., Yamada M., Toyoshima Y et al. Involvement of Onuf's nucleus in Machado-Joseph disease: A morphometric and immunohistochemical study *Acta Neuropathologica* 120: 439-448, 2010 査読有り

Kawachi I, Saji E, Toyoshima Y et al. Treatment-responsive opsoclonus-ataxia associated with ovarian teratoma. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 81:581-582, 2010 査読有

Yanagawa K, Kawachi I, Toyoshima Y et al. Pathological and immunological profiles of a limited form of neuromyelitis optica. *Neurology* 73:1628-37, 2009 査読有り

豊島靖子、高橋均、SCA17 *Clinical Neuroscience* 27:1334-1335, 2009 査読無し

Tan CF, Yamada M, Toyoshima Y et al. Selective occurrence of TDP-43-immunoreactive inclusions in the lower motor neurons in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol* 118:553-560, 2009 査読有り

Nishihira Y, Tan CF, Toyoshima Y, et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Widespread multisystem degeneration with TDP-43 pathology in a patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology* 29:689-696, 2009 査読有り

Tada M, Kakita A, Toyoshima Y, et al.

Depletion of medullary serotonergic neurons in patients with multiple system atrophy who succumbed to sudden death. *Brain* 132:1810-1819, 2009 査読有り

Kanazawa M, Shimohata T, Toyoshima Y, Cerebellar Involvement in Progressive Supranuclear Palsy: A Clinicopathological Study. *Mov Disord* 24:1312-1318, 2009 査読有り

Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O. Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 17:345-56, 2008 査読有り

Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M et al. Spinocerebellar Ataxia Type 17 (SCA17). In: GeneReviews at GeneTests 査読有: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2007. Available at <http://www.genetests.org>

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA YASUKO)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：2 0 3 3 4 6 7 5

(2)研究分担者

小野寺 理 (ONODERA OSAMU)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：2 0 3 0 3 1 6 7

高橋 均 (TAKAHASHI HITOSHI)

新潟大学脳研究所・教授

研究者番号：9 0 2 0 6 8 3 9

(3)連携研究者

()

研究者番号：