

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249054

研究課題名（和文） 脊髄小脳失調症6型および31型の分子病態に基づく治療法開発研究

研究課題名（英文） A basic research for identifying fundamental therapy for SCA6 and SCA31

研究代表者

水澤 英洋（MIZUSAWA HIDEHIRO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30144091

研究成果の概要（和文）：

本研究は、本邦に患者が多く社会的ニーズの高い遺伝性神経変性疾患で、小脳プルキンエ細胞(PC)変性を特徴とする脊髄小脳失調症6型(SCA6)と同31型(SCA31)について、病態発症メカニズムに基づいた治療薬開発を目指して、主にモデル培養細胞および動物を用いた基礎的研究を行なった。SCA6については、病因となる変異 $Ca_v2.1$ チャンネル蛋白のカルボキシル末端断片が細胞質で凝集する際に毒性が発揮されること。さらにこの際、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)を含めた CREB 関連遺伝子群の発現に変動が生じ、患者 PC における BDNF の発現低下が SCA6 の病態と関連していることを明らかにした。また、SCA6 遺伝子エクソン 47 領域の選択的スプライシングに着目し、神経毒性を発揮する変異 $Ca_v2.1$ アイソフォームの発現を抑制しうる因子・薬剤を探索するために、同領域の選択的スプライシングを蛍光でモニターできる新しい神経細胞モデル系を確立した。このモデルは今後の候補因子のハイスループット探索に有用である。SCA31 については、患者ゲノムで認められる3種類の異常な繰り返し配列のうち、 $(TGGAA)_n$ の転写産物 $(UGGAA)_n$ が神経毒性の主要原因であることを明らかにし、それに基づいて患者脳での病態を模倣する SCA31 モデル細胞系を確立した。またドイツおよびフランス人の SCA 患者ゲノムとの比較から SCA31 が日本人特有の疾患である可能性を示した。以上両疾患とも研究着手前にはなかった治療薬発見への基盤を確立できた。

研究成果の概要（英文）：

We performed basic research for three years (FY2009-2011) and achieved three key developments toward discovering drugs that that may be able to stop primary degenerative processes in spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) and 31 (SCA31). First, we found that the carboxyl-terminal fragment of the $\langle 1A$ -calcium channel is toxic when expressed in the cytoplasm. Second, we succeeded in developing a cellular model that could efficiently monitor the splicing patterns of the $\langle 1A$ -calcium channel gene. This model could be useful for future drug screens. Third, we found a penta-nucleotide sequence that is necessary for the development of SCA31. These achievements are crucial for the future establishment of treatments of SCA6 and SCA31.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	20,400,000	6,120,000	26,520,000
2010年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2011年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
総計	36,000,000	10,800,000	46,800,000

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・蛋白質・応用動物・内科・脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

SCA6とSCA31の分子レベルでの病態解明と治療法開発実現のための基礎的研究成果を上げることである。

2. 研究の目的

3. 研究の方法

本研究は大別してSCA6については2つの研究テーマに、SCA31は1つのテーマに分けて記載する。

(1)SCA6のC末端断片(CTF)の細胞毒性に関する研究(水澤研究代表者)：研究開始当初、我々はSCA6患者脳でCTFが細胞内で凝集傾向を示すことと核内に異常分布していることを見出し誌上報告した(文献6)。この細胞内分布の違いによる細胞毒性を明らかにし、将来の治療法開発の基盤知見を得るため、2つの研究を行った。

①モデル培養細胞の作製と解析：CTFに正常長(Q13)と伸長(Q28)の異なるポリグルタミン鎖をそれぞれ繋ぎ、さらにそれぞれが核移行シグナル(NLS)、核脱出シグナル(NES)を付加した4種類のレコンビナント(r)CTFを作製し、これらが誘導条件下で発現する安定化PC12細胞を作製した。その結果、NESを有するCTFでは細胞質に凝集体が形成され、細胞死が生じたが、NLSを発現する細胞では凝集体が形成されても目立った細胞死は生じず、患者脳での病態を類似していることが判った。これらについて、研究3年度(H23年度)に細胞死が生じる直前に誘導される遺伝子群を探索した。その結果、CREB関連遺伝子、および非関連遺伝子群で異常変動する遺伝子を見出し、一部は患者脳での検証も行った。

その一つはBrain-derived neurotrophic factor (BDNF)で、細胞モデルでの異常変動をヒントに患者脳で検索したところ、患者脳でBDNF mRNAの低下が見られ、同蛋白は凝集体を形成していた(図1)。

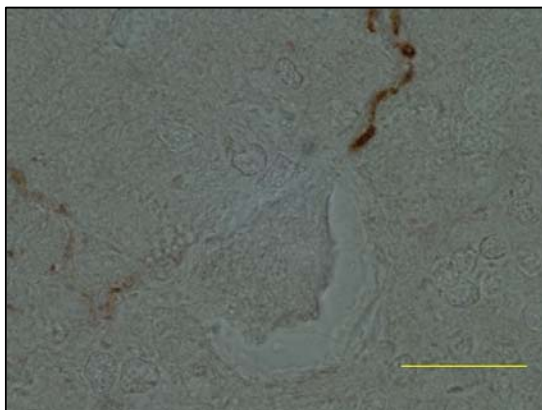


図1 SCA6患者Purkinje細胞でのBDNF陽性構造物 (Immunoperoxidase発色、スケールバー：50μm)

この変化は少なくとも対照症例(図2)や他の小脳変性症では見出さなかったため、SCA6の小脳に特異的であると考えられた。この結果を誌上報告した(文献#1)。

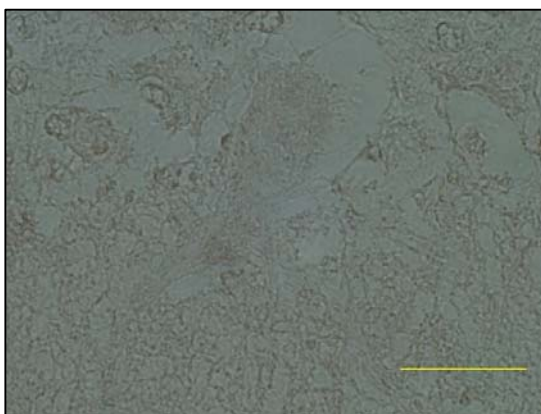


図2 対照患者Purkinje細胞でのBDNFに対する免疫組織化学(倍率は図1と同じ)

今後、SCA6脳内での特異性や、その基盤を明らかにし、BDNFを介した治療法が期待できるか検証する。また、作製したモデル培養細胞での網羅的遺伝子変動解析の結果を誌上公開する準備をしている。

②rCTF-Q28-NES、同-NLSを過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスの作製：本研究は、SCA6の特徴である短いポリグルタミン伸長とCTF産生の2つに基盤を置いた検証研究である。コンストラクトをpCAGプロモーターと2つのloxP配列が存在するベクターに挿入し、floxed-rCTFマウスを外部委託で作製した。継代に成功したfloxed Q28 NESマウス4系統、floxed Q28 NLSマウス6系統を維持した。最終年度にL7-Creマウスとの交配を進め、仔マウスを得ている。しかし、研究期間終了時点で目的遺伝子および蛋白の過剰発現が確認できていない。今後さらに継代・維持し目的のrCTFが適所に過剰発現しているかどうかを検証する必要がある。

(2) SCA6遺伝子スプライシング機構の解明

当初、SCA6遺伝子エクソン47領域の選択的スプライシングを制御しうる候補因子としてSRp75及びHDACインヒビターを予想したが、in vivo実験でそれを支持するデータは得られなかった。そこで小分子化合物や

siRNA ライブラリ等のスクリーニングを通じて修飾因子の同定を行なうこととし、そのためのツールを作製することとした。具体的には、2種類(MPI型及びMPc型)の選択的スプライシングに対応して、それぞれ異なる波長の蛍光を発する2種類の *Cacna1a* ミニコンストラクトを作製し、PC12細胞にトランスフェクトして、両者を安定的に発現するPC12二重安定細胞株を樹立した。

(3) SCA31

研究開始時に我々が同定した SCA31 の原因は、3種類ある5塩基繰り返し配列、(TGGAA)_n、(TAGAA)_n、(TAAAA)_nのうちのどれが必須か想像の域を超えていなかった。このため、HEKおよびPC12培養細胞にそれぞれのコンストラクトを発現させ、細胞死を検証する研究を行った。患者ゲノムから(TGGAA)_n(TAGAA)_n(TAGAATAAAA)_nをクローニングした。一方、健康者集団に稀に見られるリピートから(TAGAA)_n(TAGAATAAAA)_nをクローニングした。それぞれを培養細胞に一過性または安定性発現をさせた。その結果、(TAGAA)_n(TAGAATAAAA)_nをRNAとして発現させてもRNA foci (異常高次構造形成)や細胞死は決して生じなかったのに対して、(TGGAA)_n(TAGAA)_n(TAGAATAAAA)_nを発現させると必ずRNA fociと細胞死が招来された。つまり、当初の想定通り、毒性の主要原因は(TGGAA)_nの転写産物(UGGAA)_nにあると想定された。研究期間終了間際に、この毒性が招来された結果としての遺伝子発現プロファイリングを検証した。目下、その成果を誌上公開する準備をしている。

一方、石川分担研究者は本研究補助金の助成を得て平成21年度9月に3週間ドイツに研究のため渡航した。その研究成果を進展させて、ドイツおよびフランス人のSCA患者ゲノムにおいてSCA31の異常があるかを検索した。その結果、SCA31の発症要因である(TGGAA)_nは一切見られなかったが、多種類の異なる5塩基繰り返し、(TACAA)_n、(TAACA)_n、(GAAAA)_nなどを高頻度に発見した(図3)。このことは、SCA31が人種によって異なる5塩基配列伸長を起こす、きわめてユニークなローカスであることを示している。さらに、これらの5塩基は基本的には毒性がないこと、培養細胞での同様の実験でもRNA fociや毒性が見られないことから、RNAの異常高次構

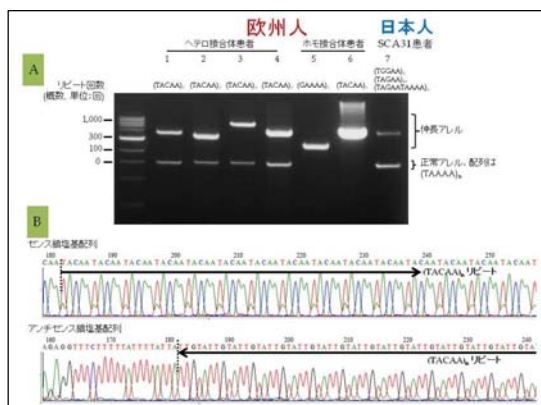


図3 欧州(フランス・ドイツ)人でのSCA31リピート。
A:欧州人では(TACAA)_nや(GAAAA)_nなど日本人には見られない様々な5塩基リピートが見られ、中にはSCA31患者より長い伸長も存在した。
B:欧州人の伸長アレルは、日本人と異なり1種類の純粋な5塩基リピートである。(文献3より)

造形成がSCA31の病態に重要であると考えた。本成果は誌上公表した(文献#3)。したがって、治療法開発の一つの重要な手掛かりとして、このRNA異常高次構造の形成阻害が期待できると考えるに至った。

4. 研究成果

(1)SCA6のCTFに関する研究:当初の計画にほぼ予定通り細胞内局在による細胞死の違いが証明され、国内はもちろん、海外の1,2グループと競合する成果が上がった。研究(2)と共に我が国に多いSCA6について今後も研究を推進する必要がある。

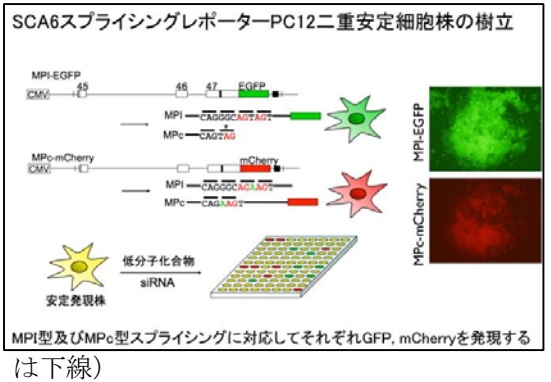
(2)SCA6遺伝子のスプライス制御機構についての研究:当初想定したSCA6遺伝子エクソン47領域のスプライス修飾候補因子・薬剤に関しては残念ながらネガティブな結果であった。しかし大規模スクリーニングに使用可能なPC12由来スプライングレポーター二重安定細胞株の樹立に成功し、今後の研究の進展に向けての基盤が確立できた(図4)。

図4 SCA6スプライングレポーター細胞株

(3)SCA31は日本人特有の疾患であることが判明した。原因同定後間もないが、確実に成果が上がった。

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



[雑誌論文] (計 件)

1. Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima Y, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama M, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H. Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of

- BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. 2012. *Neuropathology* (in press).
2. Obayashi M, Ishikawa K, Izumi Y, Takahashi M, Niimi Y, Sato N, Onodera O, Kaji R, Nishizawa M, Mizusawa H. Prevalence of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor type 1 gene (*ITPRI*) deletion, the mutation for spinocerebellar ataxia type 15 (SCA15), in Japan screened by gene dosage. 2012. *J Hum Genet*, 57(3): 202-206.
 3. Ishikawa K, Dürr A, Klopstock T, Müller S, De Toffol B, Vighetto A, Marelli C, Wichmann HE, Illig T, Niimi Y, Sato N, Amino T, Stevanin G, Brice A, Mizusawa H. Pentanucleotide repeats at the spinocerebellar ataxia type 32 (SCA31) locus in Caucasians. 2011. *Neurology*, 77(20): 1853-1855.
 4. Shiwaku, H., Yoshimura, N., Tamura, T., Sone, M., Ogishima, S., Watase, K., Tagawa, K. and Okazawa H. 2012. Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. 2010. *EMBO J*, 29(14): 2446-2460.
 5. Ishikawa K, Mizusawa H. The chromosome 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA*): A newly identified degenerative ataxia in Japan showing peculiar morphological changes of the Purkinje cell. 2010. *Neuropathology*, 30(5): 490-494.
 6. Ishiguro T, Ishikawa K, Takahashi M, Obayashi M, Amino T, Sato N, Sakamoto M, Fujigasaki H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Arai T, Sasaki H, Nagashima K, Kato T, Yamada M, Takahashi H, Hashizume Y, Mizusawa H. The carboxy-terminal fragment of alpha1A calcium channel preferentially aggregates in the cytoplasm of human spinocerebellar ataxia type 6 Purkinje cells. 2010. *Acta Neuropathol* 119(4): 447-464.
 7. Sato N, Amino T, Kobayashi K, Asakawa S, Ishiguro T, Tsunemi T, Takahashi M, Matsuura T, Flanigan KM, Iwasaki S, Ishino F, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Hashizume Y, Takahashi Y, Tsuji S, Shimizu N, Toda T, Ishikawa K, Mizusawa H. Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGA)n. 2009. *Am J Hum Genet* 85(5):544-557.
- [学会発表] (計 件)
1. Unno T, Mizusawa H, Watase K. A novel mouse model of spinocerebellar ataxia type 6 develops distinct Purkinje cell degeneration. 12th International Congress of Human Genetics / 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. Montreal, Quebec, Canada. October, 12th 2011.
 2. 石川欽也, 水澤英洋. 「脊髄小脳変性症の分子病態」. シンポジウム 4-S-5-3 (シンポジウム 4. こころと神経: 「神経変性疾患の病態と治療 (脊髄小脳変性症を含む)」) 第 28 回日本医学会総会 (震災のため抄録発表のみ).
 3. 渡瀬 啓. ノックインマウスモデルを用いた脊髄小脳変性症の病態解明. 第 28 回東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科大学院セミナー “脳神経疾患の理解と治療に向けた基礎研究の最前線”. 東京. 2011. 6. 27.
 4. 新美祐介, 佐藤 望, 網野猛志, 高橋 真, 大林正人, 石黒太郎, 石川欽也, 水澤英洋. 細胞モデルを用いた脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の病態探索. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 18.
 5. 渡瀬 啓, 石川欽也, 水澤英洋. SCA6-原因の同定から治療法の開発へ-. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 2010. 5. 22. (シンポジウム: 神経難病の克服 - 単一遺伝子病からのアプローチ-).
 6. 石川欽也, 網野猛志, 佐藤 望, 新美祐介, 融 衆太, 水澤英洋. シンポジウム 16. 「Neurodegenerative diseases and RNA.」 SCA31. 第 51 回日本神経学会総会. 東京. 2010. 5. 22.
 7. 渡瀬 啓. 脊髄小脳変性症 6 型の治療法開発に向けたマウスモデルの開発. 第 32 回日本神経科学大会. 名古屋 2010. 9. 18. (シンポジウム: 小脳神経回路の発達、障害その治療戦略).
 8. 石川欽也, 石黒太郎, 高橋 真, 佐藤 望, 網野猛志, 新美祐介, 水澤英洋. シンポジウム 9-1 ポリグルタミン病への分子生物学的アプローチ. 「脊髄小脳変性症への分子生物学的アプローチ」第 50 回日本神経学会総会. 仙台. 2009. 5. 22.
 9. 渡瀬 啓, Barrett CF, 宮崎太輔, 海野敏紀, 石川欽也, 笠井沙由美, 渡辺雅彦, 水澤英洋, Tsien RW, Zoghbi HY. SCA6 ノックインマウス表現型の経時的検討. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台.

2009. 5. 20.
10. 石川欽也, 水澤英洋. 50周年記念標本提示「日本が世界に発信したあの疾患」本邦で同定された新しい脊髄小脳変性症 16q-ADCA —その特異的 Purkinje 細胞変性— 第50回日本神経病理学会総会学術研究会. 高松. 2009. 6. 5-6.

[図書] (計 件)

- 1). 渡瀬 啓, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症 6 型 (SCA6) モデルマウス 脳・神経疾患—疾患モデルの作製と利用 三品昌美 編, p61-68. エル・アイ・シー 2011. 11. 22.
- 2). 石川欽也, 佐藤 望, 網野猛志, 新美祐介, 融 衆太, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31). Annual Review 神経 2011 巻 241-250.
- 3). 石川欽也, 水澤英洋. 遺伝性脊髄小脳変性症. 雑誌「内科」特集「内科疾患の診断基準病型分類・重症度」vol.105 増大号 No6. 2010. 1342-7. 南江堂、東京.
- 4). 石川欽也, 水澤英洋. 不随意運動. 雑誌「内科」特集「内科疾患の診断基準病型分類・重症度」vol.105 増大号 No6. 2010. 1398. 南江堂、東京.
- 5). 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症の分類と治療. 鈴木則宏・編「からだの科学」神経内科の病気のすべて. 日本評論社, 東京, 2010 : 98-102.
- 6). 石川欽也. 脊髄小脳変性症. In: 落合滋之監修 森田明夫、吉澤利弘編集, 「脳神経疾患ビジュアルブック」. 学研, 東京, 2009 : 256-259.
- 7). 石川欽也. 多系統萎縮症. In: 落合滋之監修 森田明夫、吉澤利弘編集, 「脳神経疾患ビジュアルブック」. 学研, 東京, 2009 : 260-263.
- 8).
- 9).

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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
水澤 英洋 (MIZUSAWA HIDEHIRO)
研究者番号 : 30144091
- (2) 研究分担者
石川 欽也 (ISHIKAWA KINYA)
研究者番号 : 30313240
- (3) 研究分担者
渡瀬 啓 (WATASE KEI)
研究者番号 : 30376800

