

## 10. 脊髄小脳変性症の病態解明と治療法開発

田中 良男 (医学部医学科 4年)

指導教員

平井 宏和 (学際科学実験センター 助教授)

### Introduction:

脊髄小脳変性症 (Spinocerebellar degeneration, SCD) は、国指定の難病特定疾患の 1 つであり、進行性の運動失調を主症状とする神経変性疾患で患者数は全国におよそ 2 万人程度である。北陸における患者数は約 500 人であり、全国的にみても患者数が多い地域といえる。症状としては歩行時のふらつきや構音障害などの運動失調に加えて、眼症状や自律神経症状、パーキンソン様症状などの多彩な症状が加わり、現在では神経内科だけでなく、眼科、耳鼻科、泌尿器科、脳外科などの関連診療科において、統合的な治療がおこなわれている。また、昨年 TBS 系で放映された TV ドラマ「1 リットルの涙」では、脊髄小脳変性症を発症した主人公の悲劇的な運命が描写され、この疾患に対する社会的認知は急速に加速している。

近年のゲノム科学の著しい発展に伴い遺伝性 SCD の原因遺伝子が次々に発見されている。その中で、現在で最も研究が進んでいるタイプに Spinocerebellar Ataxia Type1 (SCA1) がある。これは最初に原因遺伝子座・遺伝子異常が同定された疾患であり<sup>1</sup>、小脳性運動失調を症状の基本とする小脳型常染色体優性遺伝形式の SCD に分類され、組織学的には主に小脳プルキンエ細胞の変性を特徴としている。また、興味深いことに、SCA1 の患者では原因遺伝子である ataxin1 の塩基配列 CAG の繰り返し配列が、ハンチントン病の場合と同様に異常延長しており、いわゆるポリグルタミン病であることも分かっている<sup>2,3,4</sup>。その CAG 反復配列の増加と SCA1 の発症との関係については完全には解明されていないが、リピート数が 40 回以上に増加することで(正常は 30 回前後)、Ataxin1 のミスフォールディングが起これ、その結果として Ataxin1 が何らかの毒性を持ち、プルキンエ細胞内に凝集体として蓄積する。この凝集体が結果的にプルキンエ細胞に変性・アポトーシスを引き起こさせる (図 1)。

このように、分子病態については解明が進みつつある SCA1 であるが、現在行われている治療法は薬物治療とリハビリ療法のみであり、慢性進行性疾患である本症に対しての効果は非常に低く、根治につながる効果的な治療法が存在しないばかりか病気の進行を抑えることもできていないのが現状である。本症の場合、ataxin1 の発現を小脳プルキンエ細胞で

抑制することや異常タンパクを分解することが根治につながると考えられる。SCDの根治につながる治療法を考えた場合、幹細胞(EmbryonicもしくはAdult stem cell)を用いた細胞移植と治療用遺伝子を用いた遺伝子治療が存在する。前者は、変性・脱落した神経細胞を外部から補充する方法であるが、ES細胞は倫理面での評価が困難であり、Adult stem cellを用いた場合、細胞分化のコントロールを行なうことが現時点ではできておらず、治療に適しているとは言い難い。すなわち、現時点では、後者の遺伝子治療法が最も臨床応用可能な治療法であると考えられる。この遺伝子治療法には2つのアプローチ法がある。

#### ① 異常遺伝子発現抑制

一昨年、マウスにおけるRNAiを用いた原因タンパク質の発現抑制によって症状の進行が抑制されることが報告された<sup>5</sup>。しかしながら、RNAiを用いた異常 ataxin1 の発現抑制は一時的なものであり、また小脳プルキンエ細胞特異的な抑制ではないために、導入したRNAiによる他の細胞での非特異的なタンパク質発現抑制が懸念され標準的な治療法になり得るかについて疑問が残る。

#### ② 遺伝子導入により異常タンパク質を減少させる(図2)

細胞内には合成された異常なタンパク質を補正する経路と、特異的に分解する経路による生体内防御機が存在する。前者は分子シャペロンによるもの、後者はユビキチン・プロテアソーム系による機構である<sup>6</sup>。近年の研究により、これらの経路に働く重要な遺伝子が報告されており<sup>7,8</sup>、これらの中にはin vitroで細胞内に蓄積したポリグルタミン異常タンパク質を減少させる機能を持つ遺伝子があることが明らかになってきている。すなわち、これらの遺伝子はin vivoにおいても、脊髄小脳変性症の治療用遺伝子となり得る可能性が高く、本研究では4種類の遺伝子を治療用遺伝子としてクローニングに成功した。また、最近神戸大学のグループが、新規のAtaxinなどのストレスタンパク質を分解する遺伝子の同定に成功した<sup>9</sup>。この遺伝子も治療用遺伝子の候補となり得る可能性がある。

この遺伝子導入法は非常に有用性が高いと考えられるが、どのように効率的かつ特異的に小脳プルキンエ細胞へ導入するのかという大きな問題が存在する。もし、変性しているプルキンエ細胞以外の正常な神経細胞に遺伝子が導入された場合、脳の正常な機能が損なわれる可能性があり、細胞特異的に遺伝子を導入することは臨床応用を考えた場合回避な問題である。

我々の研究室では、長年の小脳における受容体を中心とした協調運動および運動学習の分子基盤解明の研究をおこなってきた。その課程において、レンチウイルスベクターを用いて小脳プルキンエ細胞に特異的かつ効率的に遺伝子を導入する技術を世界に先駆けて開発することに成功した<sup>10</sup>(特許出願、図5)。すなわち、治療用遺伝子を当研究室が開発したシステムを用いて、SCA1モデルマウスのプルキンエ細胞特異的に導入・発現させることによって、小脳の変性が抑制できれば、将来的に有効なSCA1の遺伝子治療法となることがおおいに期待される。私はこれを研究テーマとし、SCA1モデルマウスを作製し、小脳のプルキンエ細胞に治療用遺伝子を特異的に導入・発現させる実験をおこなっている。

## Result&Discussion:

### SCA1 疾患モデルマウスの作出 (図 3)

治療法の有効性を検証するためには、SCA1 を発症している疾患モデルマウスの作出は不可欠である。SCA1 トランスジェニック (Tg) マウスの作出をおこなった。

#### (1) SCA1 患者からの原因遺伝子 ataxin1 のクローニング

60 歳代、女性の患者からのゲノム DNA を template とし、PCR 法を用いてクローニングを行なった。得られたクローンの塩基配列を調べると、ataxin1 内の CAG リピート回数は 30 回のクローンと 49 回のクローンが存在した。SCA1 が常染色体優性遺伝形式で遺伝することを考慮すると、30 回のは正常な親由来の遺伝子、49 回のは SCA1 患者由来の遺伝子であると考えられる。すなわち、CAG リピートが 49 回に伸長した ataxin1Q49 遺伝子がこの患者さんを苦しめている原因遺伝子である。

#### (2) Transgene の作成と Tg マウスの作出

遺伝性 SCD は CAG リピートの回数が増幅すればするほど、症状が重篤かつ早期に発症することが分かっている。作出する SCA1Tg マウスの症状を早期に発症させるため、クローニングした ataxin1 遺伝子の CAG リピートの増幅を行った。制限酵素の Tag を付加させたプライマーを用いて、multiple-step の PCR 法で増幅を試みた。その結果、CAG リピート回数を 49 回から 76 回に伸長させた ataxin1Q76 を作成することに成功した。

SCA1Tg マウスを作出するためには、変性する小脳プルキンエ細胞特異的に CAG リピートが伸長した ataxin1 遺伝子を発現させることがポイントある。そこで私は、小脳プルキンエ細胞特異的プロモーターである L7 を使用し、このプロモーターの下流に ataxin1Q76 を挿入することにより、特異的に遺伝子を発現させるようにした (pBS-L7-HA-ataxin1Q76)。その後、マウスの受精卵にインジェクションを行い、2 ラインの SCA1 疾患モデル Tg マウスを作出した。

それぞれのラインについて野生型マウスと交配を行い、現在 F1 個体を増やしているところである。作出された Tg マウスは Hot shot PCR 法にて transgene の導入は確認されているが、歩行運動での評価、Rota Rod 試験の結果ともに、現在のところ明らかな小脳失調の表現系は確認できていない。一般的に CAG リピート病は世代を重ねるにつれ、より症状が重篤かつ低年齢発症を引き起こす表現促進現象 (anticipation) が知られている (図 4)。したがって、現在作出中である F1 個体、あるいはそれ以降では早期の小脳失調の出現が期待される。

#### 治療用遺伝子のクローニングとウイルスベクターへの組み込み

ポリグルタミンを分解し、プルキンエ細胞の変性・脱落を抑制できると考えられる遺伝子の PCR 法によるクローニングを行った。クローニングした治療用遺伝子をウイルス作成用

ベクターに組み込んだ。

分子シャペロンに関する遺伝子

①VCP/p97 ②HDJ2 ③EDEM ④CRAG

ユビキチン・プロテアソーム系に関する遺伝子

⑤E4B

完成したレンチウイルスベクター

① pCL20C-CMV-3×Flag-VCP/p97 ② pCL20C-CMV-3×Flag-HDJ2

③ pCL20C-CMV-3×Flag-EDEM ④ pCL20C-CMV-3×Flag-CRAG

⑤ pCL20C-CMV-3×Flag-E4B

### (3) 治療用遺伝子の *in vitro* での効果の確認

まず、作成した ataxin1Q76 を用いて、細胞毒性の確認を行った。その結果、HEK293 細胞、HeLa 細胞共にポリグルタミン凝集体が蓄積してくることが免疫染色で確認できた(図 5)。また、Western blot 法を用いて、タンパク質の発現を確認したところ、トランスフェクション後 24 時間で最高になることが分かった。

次にクローニングした治療用遺伝子 *in vitro* での効果を検証するために、ataxin1Q76 と治療用遺伝子を両発現させた。その後、蓄積しているポリグルタミン凝集体の大きさと数の変化を測定、さらに Western blot 法を用いて ataxin1Q76 タンパク質の定量を行った。

CRAG 遺伝子については、タンパク質の発現は確認できたが、明らかな ataxin1Q76 による凝集体の分解は確認できなかった。しかしながら、報告では、*in vitro* 系での有効性が証明されていることからさらなる検証が必要である。また、今回クローニングに成功した他の治療用遺伝子についても、同様な方法での有効性の確認を行なっているところである。さらに HEK293 細胞と HeLa 細胞等のセルラインだけでなく、より小脳細胞の初代培養系を用いて同様に細胞の形態、凝集体の変化を指標として治療用遺伝子の効果の検証を予定している。

脊髄小脳変性症の発症機序

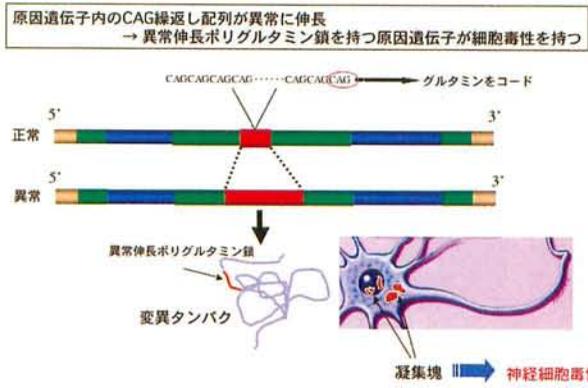


図 1 脊髄小脳変性症の発症機序

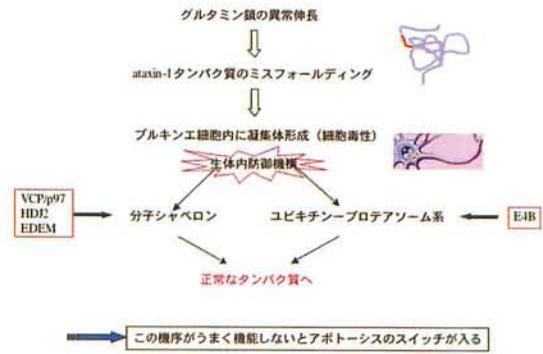


図 2 異常タンパク質に対する防御機構

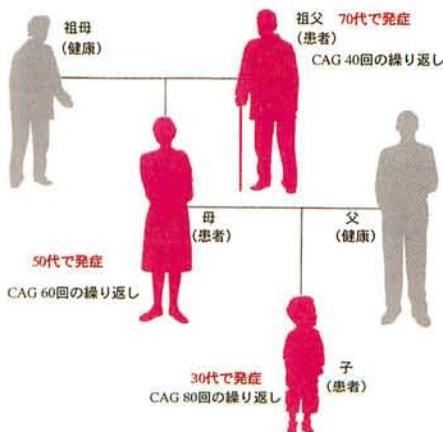
pBS-L7-HA-ataxin1Q76



図 3 SCA1 疾患モデルマウスの作出

作成した transgene を用いて SCA1 疾患モデルマウスの作出を行った。上図は完成した transgene である。矢印に挟まれた領域が 76 回に伸張させた CAG リピート部位である。この transgene を用いて小脳ブルキンエ細胞のみに ataxinQ76 が発現する 2 系統の Tg マウスが誕生した。

図 4 脊髄小脳変性症のある家系



この病気は、常染色体優性遺伝形式をとり、世代を経ることにより CAG リピート回数は増幅し、発症年齢が早くなり症状もより重篤化する (anticipation) が特徴的である。すなわち、両親のどちらかが発症した場合、その子供は 50% の確率で罹患し、さらに早期発症、症状が重篤化するという悲劇的な現象が起きる。世代を重ねるごとに CAG リピートが増幅するメカニズムについては不明である。

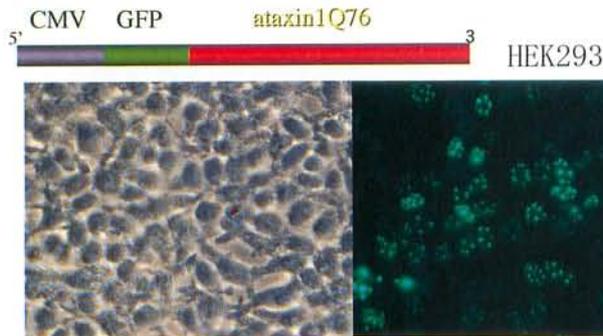
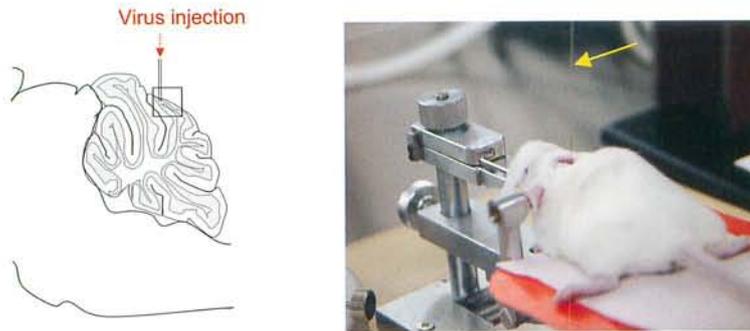


図5 レトロウイルスベクターの導入

ニードルを介して小脳上部のクモ膜下腔にインジェクションを行う。左の図は HEK293 細胞に ataxin1Q76 を導入したもの。緑色に見えるのが凝集したポリグルタミンである。ataxin1Q76 の毒性が確認できた。

References:

1. Sandro, B. et al. Identification and characterization of the gene causing type1 spinocerebellar ataxia. *Nature Genetics*. 7, 513-520(1994)
2. Skinner, P. J. et al. Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature*. 389, 971-974(1997)
3. Fernandez-Funez, P. et al. Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*. 408, 101-106(2000)
4. Klement, I. A. et al. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation:role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell*. 95, 41-53(1998)
5. Habin, Xia. et al. RNAi suppress polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nature Medicine*. 10, 816-821(2004)
6. Cummings, C.J. et al. Chaperon suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nature Genetics*. 19, 148-154(1998)
7. Matsumoto, M. et al. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *The ENBO Journal*. 23, 659-669(2004)
8. Mhirabayashi, M. et al. VCP/P97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuole, and cell death, Phenotype relevant to neurodegeneration. *Cell Death and Differentiation*. 8, 977-984(2001)
9. Qin, Q. et al. A novel GTPase, CRAG, mediates promyelocytic leukemia protein-associated nuclear body formation and degradation of expanded polyglutamine protein. *J Cell Biol*. 172, 497-504(2006)
10. Torashima, T. et al. In vivo transduction of murine cerebellar Purkinje cells by HIV-derived lentiviral vectors. *Brain Res*. 12, 11-22(2006)