

# 序 章

## 1. 神経変性疾患・ポリグルタミン病・Machado-Joseph 病について.

神経変性疾患とは、神経細胞群が系統的に脱落していく疾患である。長らくその原因が不明であったり、神経細胞の特徴として再生能力が著しく低いために根本的治療法が確立していないことが多い為、神経難病と呼ばれてきた。

神経変性疾患の代表的なものには、大脳皮質を病変の主座とする Alzheimer 病、大脳基底核を主座とする Parkinson 病や Huntington 病、小脳・脳幹等を主座とする脊髄小脳変性症、脊髄運動ニューロンを主座とする筋萎縮性側索硬化症等がある。このなかには遺伝性が明らかなものから、非遺伝性の孤発性のものまで存在する。

近年、分子生物学のめざましい進歩により、ポジショナルクローニングと呼ばれる技法を用いて、神経変性疾患のうち遺伝性の明らかな疾患における遺伝子異常の多くが解明されてきた。特に、遺伝子内における3塩基繰り返し配列の伸長により特徴づけられる疾患のグループであるトリプレット病が発見され、これらの変性疾患に共通する神経細胞死のメカニズムに関心が集まっている (1)。トリプレット病は、伸長している3塩基繰り返し配列がCAG(アミノ酸のグルタミンを示す)であるか、それとも、CAG以外であるかにより2つのグループに分けられる。前者ではその繰り返し配列が翻訳領域に存在するために、伸長したCAG繰り返し配列が翻訳され異常に長いポリグルタミン鎖を持つタンパクとして発現するのに対して、後者ではいずれも非翻訳領域に繰り返し配列が存在し、発現するタンパクそのものには異常がなくその発現量に変化があると推定されている。

1991年にFischbeckらが球脊髄性筋萎縮症の病理的变化がアンドロゲンレセプター遺伝子におけるCAGリピートの伸長によることを発見して以来 (1)、多数の遺伝性神経変性疾患が遺伝子のタンパクをコードする領域におけるCAGリピートの伸長によって引き起こされることがわかってきた (2)。CAGリピートは伸長ポリグルタミンをコードしているので、これらの疾患は現在、ポリグルタミン病として総称されている (3)。最近、この疾患の分類の中には、HD、DRPLA、SBMA、SCA1-3、6、7の少なくとも8つの疾患が含まれていることがわ

かっている。そして、ポリグルタミン病は、異常遺伝子の構造上の類似性に加えて、多くの類似性を有することが報告されてきており、このことは共通の病因の過程があることを示唆している (4)。少なくとも4つの主要な特徴がこれらの疾患に共通している。

第一には、神経においてのみ高度に細胞死を起こしやすいということである。伸長ポリグルタミンを含む変異タンパクは全身至るところに発現されていることが示されているにも拘わらず (5, 6)、明らかな細胞死は神経においてのみ認められてきた。

第二には、各ポリグルタミン病ごとに神経細胞死を起こす領域に選択性が認められることである。神経系において変異タンパクは広範に発現しているにも拘わらず、各疾患により特定の神経細胞群だけが選択的に変性を生じることが知られている (6, 7)。そして、この各疾患において細胞死を起こす神経の選択性の差異が、臨床症状の多様性の基礎にあると考えられている。

第三には、各疾患において最も影響を受けている神経領域にユビキチン陽性の神経核内封入体(NIIs)が存在していることである(8-12)。従って、NIIsの産生が細胞毒性の原因であるのか結果であるのかは明らかでないままであるが、NIIs形成は細胞死の病因に関連している可能性がある (13-16)。

第四には、変異タンパク発現の時期と比べて神経細胞死が遅延していることである。トランスジェニックアニマルモデルにおいても、タンパク発現開始と最初の神経障害出現の間の時間的隔差が報告されてきた (12, 17-20)。そして、このことはポリグルタミン病の発症時期が遅発性であることに非常に良く一致している。これらの特徴を共有していることは、ポリグルタミン病には細胞を死に至らしめる共通のメカニズムが存在していることを強く示唆している (14, 17)。

Machado-Joseph 病(Machado-Joseph's disease ; MJD/Spinocerebellar ataxia type 3; SCA 3)は、このポリグルタミン病に分類される常染色体優性遺伝の神経変性疾患である。病理学的には、小脳歯状核・赤核・淡蒼球内節・視床下核・黒質・橋被蓋・延髄薄束核・運動性脳神経核、脊髄では Clark 柱神経細胞・脊髄小脳路起始細胞・脊髄前角運動神経細胞等に病変の主座があり、同部位における神

経の損失とグリオーシスによって特徴づけられている。また、臨床的には、小脳失調・錐体路徴候・眼筋不全麻痺を中核症状とする疾患である。

## 2. Machado-Joseph 病の分子生物学.

MJD が最初に報告されたのはポルトガルのアゾレという家系であるが、現在ではアゾレ家系でない家系が世界各国に存在することがわかっており、最も多い遺伝性脊髄小脳変性症の一つであるとされている。我が国においても、最も頻度の高い遺伝性脊髄小脳変性症であり、遺伝子学的にも解明が進み、1993年、Takiyamaらは、マイクロサテライトDNA多型(loci D14S55 and D14S48)にジェネティックリンケイジさせる方法を用いて、MJD 遺伝子が第14番染色体長腕(14q24.3-q32)にあることを発見した。また、MJD は、その遺伝子によってコードされた蛋白である ataxin-3 の C 末端においてポリグルタミンの伸長を有している (21)。正常のヒトでは 10-40 リピートであるが (22)、MJD の患者においては、このリピートの領域が 55-84 に伸長している (22)。他のポリグルタミン病と同様に、CAG リピート長と臨床症状の重症度は相関し、発症年齢との間には逆相関の関係がある。このようにポリグルタミン病において、CAG リピートは極めて重要な意味を持つが、1994年、Kawaguchi らはサザンプロット法とゲノミッククローニングを使って、CAG リピートの遺伝子が 14q32.1 に位置することを突き止めた (23)。

近年、ポリグルタミン病患者の脳の病理標本、及びポリグルタミン病のモデルとなる異常遺伝子を過剰発現させた培養細胞、さらにトランスジェニックマウスの脳組織において、核内や細胞質内に病的遺伝子産物由来の凝集体が発見され、病因とのかかわりが注目されている (9, 24)。これまで、複数の論文が、この凝集体形成と細胞死が、伸長ポリグルタミン鎖を持つ全長変異タンパクを発現させた場合よりも短縮型 (truncated forms) 変異タンパクを発現させた場合において顕著に見られたことを報告している (11, 12, 17, 25, 26)。しかもポリグルタミンタンパクはインビトロで複数のプロテアーゼの基質となることが確認され、細

胞内で切断を受けていることが予想される(26-28)。凝集体はユビキチン化されていることからプロテアソームを介して分解される可能性も指摘されている (29, 30)。また疾患遺伝子とは全く無関係のタンパクをコードする遺伝子内に、伸長した CAG リピートを挿入して強制発現させ、凝集体形成と細胞死を観察した報告もある (10)。さらに, Kakizuka らは, MJD において細胞死を誘導するのはインピトロでもインピボでも, 全長 MJD タンパクよりむしろ伸長ポリグルタミンそれ自体だけのほうがより有効であることを示した (31)。そして, もとの疾患遺伝子は異なっても最終的にタンパクプロセッシングによってポリグルタミンを含むフラグメントが露出され細胞内に蓄積することが凝集体形成, 引いては細胞死に繋がるのではないかとの仮説が提示されている (17, 28)。但し, 最近では, 凝集体形成そのものよりもむしろ変異タンパクの核内への移行が細胞死にとって本質的であることを強調している報告が多い (11, 13, 28, 30)。以上のように, MJD の分野では日本人研究者が極めて大きい貢献をしてきている。

我々のグループでも従来より, 遺伝性脊髄小脳変性症の中で最も頻度の高い MJD をモデル細胞系として, ポリグルタミン病の細胞死のメカニズムを探る研究を行ってきたが, 今回の研究では, このモデル系を用いて凝集体形成と細胞死に影響を及ぼす物質のスクリーニングを行い, 伸長ポリグルタミンが神経変性を引き起こす分子生物学的メカニズムを探ることを目的とした。

## 引用文献

1. Spada, L., Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E. and Fishbeck, K. H. (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 353, 77-79.
2. Andrew, S. E., Goldberg, Y. P. and Hayden, M. R. (1997) Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 2005-2010.
3. Koshy, B. T. and Zoghbi, H. Y. (1997) The CAG/polyglutamine diseases: gene products and molecular pathogenesis. *Brain Pathol.*, 7, 927-942.
4. Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M. and Finch, J. T. (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5355-5358.
5. Sharp, A. H., Loev, S. J., Schilling, G., Li, S. H., Li, X. J., Bao, J., Wagster, M. V., Kotzok, J. A., Steiner, J. P. and Lo, A. (1995) Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron*, 14, 1065-1074.
6. Paulson, H. L., Das, S. S., Crino, P. B., Perez, M. K., Patel, S. C., Gotsdiner, D., Fishbeck, K. H. and Pittman, R. N. (1997) Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann. Neurol.*, 41, 453-462.
7. Reddy, P. S. and Housman, D. E. (1997) The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 364-372.
8. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davis, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. and Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear

inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 277, 1990-1993.

9. Paulson, H. L., Perez, M. K., Trotter, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Vig, P., Mandel, J.-L., Fishbeck, K. H. and Pittman, R. N. (1997) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, 19, 333-344.
10. Ordway, J. M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.-A., Bernstein, E. M., Cearley, J. A., Wiener, H. W., Dure IV, L. S., Lindsey, R., Hersch, S. M., Jope, R. S., Albin, R. L. and Detloff, P. J. (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and progressive late-onset neurological phenotype in the mouse. *Cell*, 91, 753-763.
11. Klement, I. A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S. M., Clark, H. B., Zoghbi, H. Y. and Orr, H.T. (1998) Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell*, 95, 41-53.
12. Warrick, J. M., Paulson, H. L., Gray-Board, G. L., Bui, Q. T., Fishbeck, K. H., Pittman, R. N. and Bonini, N. M. (1998) Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 93, 939-949.
13. Sisodia, S. S. (1998) Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell*, 95, 1-4.
14. Ross, C. (1997) Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron*, 19, 1147-1149.
15. Lunkes, A. and Madel, J. L. (1997) Polyglutamines, nuclear inclusions and neurodegeneration. *Nature Med.*, 3, 1201-1202.

16. Davies, S. W., Beardsall, K., Turmaine, M., DiFiglia, M., Aronin, N. and Bates, G. P. (1998) Are neuronal intranuclear inclusions the common neuropathology of triplet -repeat disorders with polyglutamine -repeat expansion? *Lancet*, 351, 131-133.
17. Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S. and Kakizuka, A. (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genet.*, 13, 196-202.
18. Burchright, E. N., Clark, H. B., Servadio, A., Matilla, T., Feddersen, R. M., Yunis, W. S., Duvick, L. A., Zoghbi, H. Y. and Orr, H. T. (1995) SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell*, 82, 937-948.
19. Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davis, S. W. and Bates, G. P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87, 493-506.
20. Jackson, G. R., Salecker, I., Dong, X. Z., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P. W., Macdonald, M. E. and Zipursky, S. L. (1998) Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron*, 21, 633-642.
21. Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., Shimazaki, H., Soutome, M., Endo, K., Ohta, S., et al. (1993) The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet.*, 4(3), 300-304.
22. Paulson, H. L. (1998) Analysis of Triplet Repeat Disorders:



Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

23. Kawaguchi, T., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Mishimura, M., Akiguchi, I., Kimjura, J., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet.*, 8, 221-228.

24. Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrach, H., Wanker, E. E. (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, 90, 549-558.

25. Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi-Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S. U. et al. (1998) Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nature Genet.*, 18, 150-154.

26. Igarashi, S., Koide, R., Shiomohata, T., Yamada, M., Hayashi, Y., Takano, H., Date, H., Oakaya, M., Sato, T., Sato, A. et al. (1998) Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nature Genet.*, 18, 111-117.

27. Goldberg, Y. P., Nicholson, D. W., Rasper, D. M., Kalchman, M. A., Koide, H. B., Graham, R. K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N. A., Vaillancort, J. P. and Hayden, M. R. (1996) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nature Genet.*, 13, 442-449.

28. Wellington, C. L., Ellerby, L. M., Hackam, A. S., Margolis, R. L., Trifiro, M. A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G. S., Prop, S. S., Bromm, M. et al. (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.*, 10, 9158-9167.
29. Alves-Rodrigues, A., Gregori, L., Figueiredo-Pereira, M. E. (1998) Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. (Review) *Trends Neurosci.*, 21, 516-520.
30. Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. and Greenberg, M. E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95, 55-66.
31. Kakizuka, A. (1998) Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends Genet.*, 14, 396-402.