

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「精神・神経疾患の分子病態理解に  
基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」  
研究課題「プルキンエ細胞変性の分子病態に  
基づく診断・治療の開発」

## 研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成27年3月

研究代表者：水澤 英洋  
（東京医科歯科大学  
脳神経病態学、特任教授／  
（独）国立精神・神経医療研究  
センター病院、院長）

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

プルキンエ細胞変性の病態を解明し、脊髄小脳変性症の診断・治療法の開発につなげるため、主に脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) 及び脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) を対象にして、細胞・マウス・下等生物等の疾患モデルを利用した研究を遂行した。

1. SCA6 病態に関連する遺伝子の mRNA 発現・スプライシング異常を同定するために、病態を再現する Sca6 モデルマウス小脳を用いて次世代シーケンシングやマイクロアレイなどのハイスループットデータの解析とその生物学的な解釈を実施した。酸化ストレスや神経炎症に関連する遺伝子群の発現が病態の非常に初期から変化することが明らかとなり、神経炎症の制御により病態を修飾できる可能性を示した。また SCA1, SCA7 などの他の SCA とも共通して病態初期より発現が減少する遺伝子群などが判明した。
2. MPI 型及び MPc 型スプライシングの生理学的な意義を明らかにするために、MPI のみ或は MPc のみを発現するスプライス変異ノックインマウス(それぞれ MPI-11QKI マウスと Ca<sub>v</sub>2.1-Ctm-KO マウス)を作製し、解析を行った。その結果、Ctm-KO ホモマウスは小脳失調を発症し、MPI 型チャンネルがアイソフォーム特異的に神経伝達において生理機能を果たしていることが判明した。しかしその小脳失調は非進行性で発症機序は SCA6 のそれとは異なっていると考えられること、また Ctm-KO ヘテロマウスは無症状であることから、MPI 型チャンネルの発現抑制が SCA6 の進行抑制に有用であることが示唆された。
3. SCA6 遺伝子エクソン 47 開始領域のスプライシング制御を調節しうる化合物を同定し、病態の治療法の開発につなげるために、神経毒性と直接関連する MPI 型スプライシングと関連しない MPc 型スプライシングをそれぞれ GFP 及び mCherry の蛍光でモニターできる Neuro2a 安定細胞株の樹立に成功した。このスプライシングレポーターシステムを用いて既存薬ライブラリー(1163 種)及び 9800 種の化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった。
4. MPI-118QKI マウスや患者脳を用いたプルキンエ細胞質内封入体の病理学解析及び MPI-118QKI マウスとカテプシン B 欠損マウスとの二重変異マウスの解析からエンドリソーム分解系・変異 Ca<sub>v</sub>2.1 のリソーム蓄積が SCA6 の病態に密接に関与することを明らかにした。
5. SCA31 変異アレルでは、当該ゲノム領域の (TGGAA)<sub>n</sub>(TAGAATAAAA)<sub>n</sub> リピート配列が挿入されている。SCA31 の病態を解明するために、培養細胞・マウス・ショウジョウバエでのモデル作製を行ない、これまでに RNA foci の形成及び細胞死を再現する細胞モデルの作製に成功した。患者ゲノムの解析から(TGGAA)<sub>n</sub> に毒性があり、BEAN 遺伝子方向の転写産物である(UGGAA)<sub>n</sub>が神経毒性に関与することが明らかとなった。
6. 遺伝学的解析・in vivo スクリーニングが比較的容易に行える系として、(UGGAA)<sub>n</sub>をショウジョウバエに過剰に発現し、複眼および神経細胞の細胞死と RNA 凝集体形成を示す SCA31 ショウジョウバエモデルの作製に成功した。別途(UGGAA)<sub>n</sub>と結合する蛋白を、本研究で 6 種類同定していたが、そのうちショウジョウバエで既に過剰発現するラインが存在する 3 種類の蛋白について、ショウジョウバエ同志の交配で検索したところ、(UGGAA)<sub>n</sub> の毒性がレスキューされた。さらに当該蛋白のどの部分が、細胞死制御に重要であるかも解明し、疾患の治療法に新しい概念を提供する結果を得た。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. Ishiguro T, Ishikawa K (Corresponding Author), 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. *Acta Neuropathol* 119(4):447-64, 2010 (DOI: 10.1007/s00401-009-0630-0)

概要: 本研究で重要な対象疾患である脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)について、患者脳で初めての詳細な変異蛋白解析を行った論文である。この論文で初めて患者の脳で特異的にチャンネル蛋白の C 末端断片が凝集し、核内にも移行していることが明らかになった。この成果に基づいた研究の発展が期待される。

2. Unno T, Wakamori M, Koike M, Uchiyama Y, Ishikawa K, Kubota H, Yoshida T, Sasakawa H, Peters C, Mizusawa H and Watase K. The development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(43):17693-8. 2012 (DOI: 10.1073/pnas.1212786109).

概要: 本研究で SCA6 のプルキンエ細胞死を再現し、若年から失調を発症するノックインマウスモデル(MPI-118Q KI マウス)の開発に世界で初めて成功した。MPI-118Q KI マウスの解析から、細胞質内封入体の形成と神経変性の発現にエンドリソソーム系を介したタンパク品質管理機構が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. SCA31 の治療標的の同定

概要: SCA31 において BEAN および TK2 遺伝子の(TGGAA)<sub>n</sub> の挿入が病因であることを明らかにし、その結合蛋白を同定し、ショウジョウバエモデルにてそれが治療の分子標的となることを見いだした。

2. SCA6 の新しい治療標的の同定

概要: SCA6 のマウス・モデルを作製し、発症機序として lysosomal system と神経炎症が重要で有り、新たな治療標的となりうることを示した。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ①「水澤」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
水澤 英洋	東京医科歯科大学 脳神経病態学・脳統合機能研究センター	教授	H21.10～
渡瀬 啓	東京医科歯科大学大学 脳統合機能研究センター	准教授	H21.10～
石川 欽也	東京医科歯科大学 脳神経病態学	講師	H21.10～
高橋 真	東京医科歯科大学 脳神経病態学	D4	H21.10～H23.3
海野 敏紀	東京医科歯科大学 脳神経病態学	D4	H21.10～H25.3
笠井沙由美	東京医科歯科大学大学 脳統合機能研究センター	研究補助員	H21.10～H21.11
大林正人	東京医科歯科大学 脳神経病態学	D4	H21.10～H24.3
新美祐介	東京医科歯科大学 脳神経病態学	D4	H21.10～H24.3
笹川広子	東京医科歯科大学大学 脳統合機能研究センター	研究補助員	H21.11～H26.9
相川 知徳	東京医科歯科大学大学 脳統合機能研究センター	特任助教	H22.4～
佐藤 望	東京医科歯科大学 脳神経病態学	特任助教	H22.4～H23.3
橋本祐二	東京医科歯科大学 脳神経病態学	D4	H22.4～H26.3
太田浄文	東京医科歯科大学 脳神経病態学	D4	H22.4～H26.3
尾崎 心	東京医科歯科大学 脳神経病態学	D4	H23.4～
曾我一将	東京医科歯科大学 脳神経病態学	D3	H24.4～
石黒太郎	東京医科歯科大学 脳神経病態学	特任助教	H22.4～H27.3
松尾 瞳	東京医科歯科大学 脳神経病態学	研究補助員	H22.4～H26.3

##### 研究項目

- ・プルキンエ細胞変性の分子病態に基づく診断・治療の開発

②「萩原」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
萩原 正敏	京都大学 医学研究科	教授	H21.10～
武内 章英	同上	准教授	H21.10～
黒柳 秀人	東京医科歯科大学 疾患生命科学部	准教授	H21.10～H22.12
片岡 直行	京都大学 医学研究科	特定准教授	H21.10～
小川 靖	東京医科歯科大学 疾患生命科学部	特任助教	H21.10～H22.3
奥野 友紀子	京都大学 医学研究科	特定助教	H21.10～
喜井 勲	京都大学 医学研究科	特定助教	H21.10～
渡辺 要平	京都大学 医学研究科	教務補佐員	H21.10～H23.2
楠本 華織	京都大学 医学研究科	教務補佐員	H24.1～H26.3
和根崎 圭子	京都大学 医学研究科	教務補佐員	H24.4～H26.3

研究項目

- ・ 神経変性原因遺伝子の選択的スプライシング制御機構解明と治療薬候補化合物探索

②「田中」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
田中 博	東京医科歯科大学 生命情報学	教授	H21.10～
茂櫛 薫	同上	助教	H21.10～
飯島 久美子	同上	D1～3	H25.4～H25.5

研究項目

- ・ 次世代シーケンサーおよびエクソンアレイを用いた網羅的転写産物解析手法についての研究

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 SCA 変異による RNA プロセッシング・遺伝子発現異常の網羅的解析

(東京医科歯科大・田中・水澤グループ)

##### (1)研究実施内容及び成果

RNA スプライシング異常を含めて、SCA 小脳において病態に関連する遺伝子の発現異常・分子パスウェイを解明し、またバイオマーカーの同定に繋げるために、SCA6 病態を再現する新規 Sca6-MPI-118Q KI マウス(研究項目 5 参照)や比較的高齢で運動失調を発症するが、明らかなブルキンエ細胞死は発症しない Sca6-84Q KI マウス(Watase, et al, PNAS, 2008)などの小脳由来の mRNA を用いて従来型の cDNA マイクロアレイ法によるトランスクリプトーム解析 として Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array を用いたマイクロアレイ解析を行なった。

6 週齢 Sca6-MPI-118Q ホモマウス(雄)の小脳 mRNA を抽出し、同腹野生型マウスをコントロールとして Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (45,037 プローブセット)を用いたマイクロアレイ解析を行なうとともにコントロールとして正常ヒト遺伝子をノックインした Sca6-MPI-11Q マウスについても、同様のマイクロアレイ解析を行った。Moderated t-statistics 法を用いて 118Q 導入マウスで発現変動を示し、かつ 11Q 導入時に発現変動を示さない遺伝子を抽出した結果、 $p < 0.01$  かつ発現倍差が 1.2 倍以上となる(fold change >1.2、FDR <0.25、スプライス変異による変化の可能性を除き、亢進 521、抑制 493 の候補遺伝子を得た。) 667 プローブセットを抽出した。発現変動を示す遺伝子群が集中する遺伝子機能を、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)法や KEGG パスウェイ上へのマッピングを行うことにより解析したところ、細胞接着系やシナプス伝達系の低下、リボソーム系の亢進などが見出された。発現変動遺伝子群が形成するタンパク質間相互作用ネットワークを検討したところ、EGF シグナル伝達系の低下により、FN1 や非線維性の IV 型コラーゲンファミリー(COL4A1/2/5)などの細胞外基質の発現が抑制されている可能性が示唆された。

また発現変動遺伝子に共通するプロモーター配列を TransFind、TFactS、PASTAA などのソフトウェアを用いて解析したところ、発現亢進遺伝子には Sp1 や低酸素応答因子である Arnt、発現減少遺伝子には Creb や Crebp1 などが共通して存在することが分かった。

以上の結果の中で、特に発現量の変化の程度が大きい 164 種については qPCR により確認を行ない、その多くについて発現の変化が検証できた。さらに以上の遺伝子発現変化のうち特に病態の初期変化と関係する変化を同定するために 6 週齢 Sca6-MPI-118Q ホモマウス(雄)の小脳 mRNA を用いた qPCR 解析、生後 15ヶ月齢の Sca6-84Q KI マウス小脳 mRNA を用いた microarray 解析を行なってその結果を比較し、SCA6 初期病態に関連するその候補遺伝子を絞り込んだ。その結果 36 種の遺伝子が同定できたが、その中には酸化ストレス関連遺伝子や

Neuroinflammation と関連する遺伝子が多く同定されており、分泌タンパクと考えられる因子もいくつか見出すことができた。組織学的な検索で Sca6-84Q KI マウス小脳においてプルキンエ細胞の変性の出現前から、ミクログリアの活性化が認められ、マーカー検索の結果それらのミクログリアの多くは Cd16/32 陽性、Cd86 陽性でいわゆる M1 様炎症誘発性・細胞障害性のミクログリアであった。これらの結果は SCA6 において病態の初期からミクログリアが活性化し、病態の進行に重要な役割を果たす可能性を示し、neuroinflammation を修飾することで病態の進行を制御できる可能性を示す。またミクログリアの活性化に関与する分子として toll-like receptors (TLRs)が知られているが、Sca6-84Q KI マウス小脳においては Tlr2 及び Tlr7 の発現亢進が病態の初期から認められ、これらを介した自然免疫反応がミクログリアの活性化に関与している可能性が考えられる。

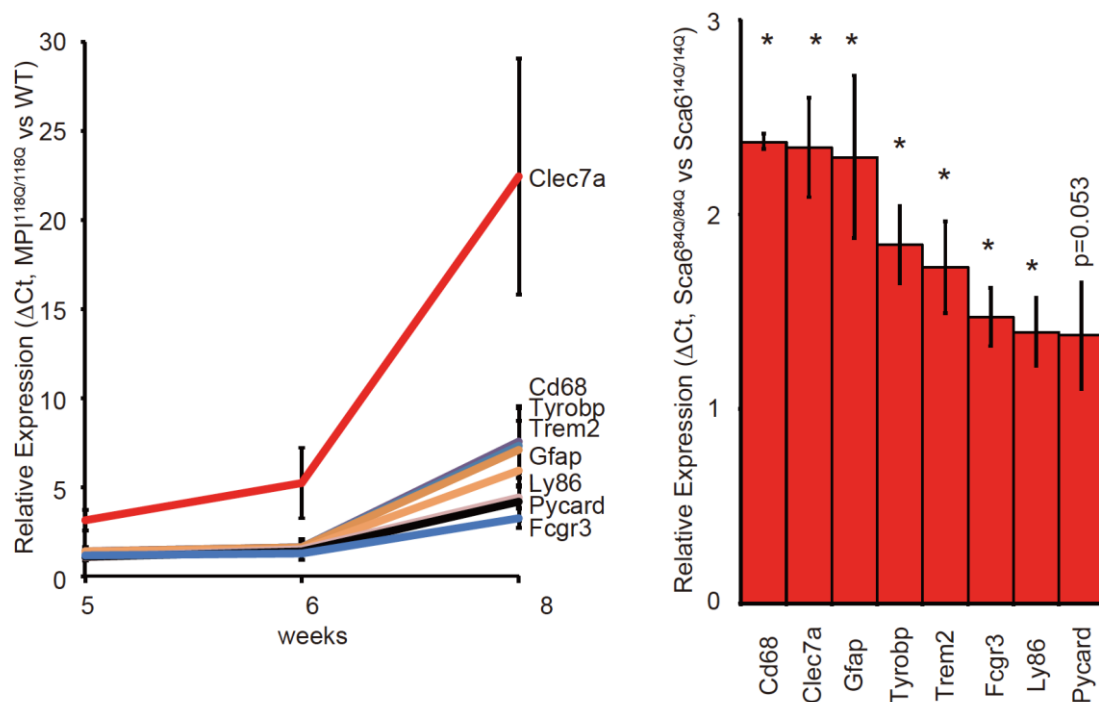


図 1 定量的 PCR 法によるマイクロアレイの結果（発現亢進群）の検証。マイクロアレイの結果 MPI-118QKI マウス小脳で発現亢進を認めた遺伝子群のうち Neuroinflammation と関連する遺伝子の発現を（左）生後 15 ヶ月齢の Sca6-84Q KI マウス小脳 mRNA（右）を用いて qPCR で検証した。プルキンエ細胞の変性の出現前にこれらの遺伝子の発現が上昇していることが確認できた。

マイクロアレイ解析とは別に、スプライシング異常の同定のために 6 週齢 Sca6-MPI-118Q ホモマウスの小脳 mRNA を抽出し、同腹野生型マウスをコントロールとして、次世代シーケンサー (Illumina 社 HiSeq 2000) を用いた RNA-seq 解析を行った。118Q ホモマウス、野生型マウスともに、1.5 億リード・150 億塩基の mRNA 配列情報が得られ、Tophat ソフトウェアを用いてマウスのゲノムおよびトランスクリプトームにマッピングを行った。さらに、cuffdiff ソフトウェアを用いて、発現変動遺伝子およびスプライシング異常を示す遺伝子の検討を行った。統計的検定により  $p < 0.01$ 、かつ 2 倍以上の発現変動が見られたものを抽出したところ、193 遺伝子に発現亢進、129 遺伝子に発現抑制が認められた。これらの遺伝子群に共通する機能を、遺伝子アノテーション解析ソフトウェア DAVID を用いて検討したところ、細胞接着やイオン輸送に関連する遺伝子群の亢進、免疫応答に関連する遺伝子群の抑制などが見られた。

また、Sca6-MPI-118Q と野生型で発現が異なっているスプライシングバリエントの検出を、Tophat および Multivariate Analysis of Transcript Splicing (MATS) などのソフトウェアを用いて行ったところ、いくつかの興味深いスプライシング変化を見いだした。例えば、核移行シグナル (NLS) を持つタンパク質を細胞核に運び込む importin 9 (Ipo9) は、WT ではエクソン 21 と 22 の間のイントロンがスプライスアウトされずに残るが、118Q ノックインマウスではスプライシングされる割合が高いことが見いだされた。また、mRNA の 3' 端の切断やポリ A 鎖伸長の制御に関与する cleavage stimulation factor 2 (Cstf2) は、エクソン 12 と 13 のイントロンが 118Q ノックインマウスで発現低下していることが分かった。このイントロンに対して配列データベースを検索したところ、生後 10 日のマウス小脳でこの領域を含む cDNA (アクセシオン番号 AK047255.1) が存在することから、小脳の発達や機能に何らかの関係があると予想された。

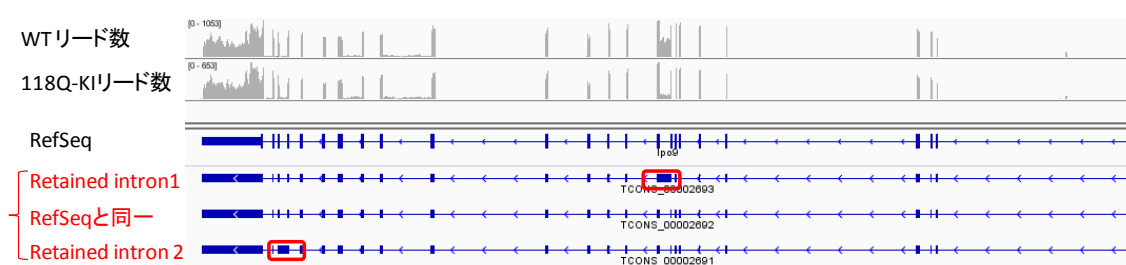


図 2 Sca6-MPI-118Q ホモマウスでスプライシング変化が見られる領域の例(Ipo9 遺伝子)

### 3. 2 SCA インタラクトーム解析 (東京医科歯科大・田中・水澤グループ)

SCA6 変異アレルでは  $Ca_v2.1$  電位依存性カルシウムチャネル遺伝子 (CACNA1A) エクソン 47 に存在する C 末端細胞質内領域ポリグルタミン (PolyQ) 鎖をコードする CAG リピートが異常伸長している。 $Ca_v2.1$  C 末端の PolyQ 鎖を含んだ C 末端領域断片がプロセッシングを受け核内に移行することが報告され、細胞質内・核内にかかわらず、この領域を介してタンパク間相互作用が存



在し、そのポリグルタミン伸長に伴う変化が病態に關与する可能性が高い。そこで Yeast two hybrid (Y2H) 法によりC末端領域のインタラクターの同定を試みるとともに他のSCA責任遺伝子産物のインタラクトームとの比較から相互作用ネットワークの解明を試みた。

その結果、RIMBP-1, RIMBP-2, PIN1, AXL tyrosine kinase, COPS5, CCG1, ACO2 の計7種の相互作用因子の同定に成功した。このうちPIN1, RIMBPについては免疫沈降法による相互作用の確認に成功した。

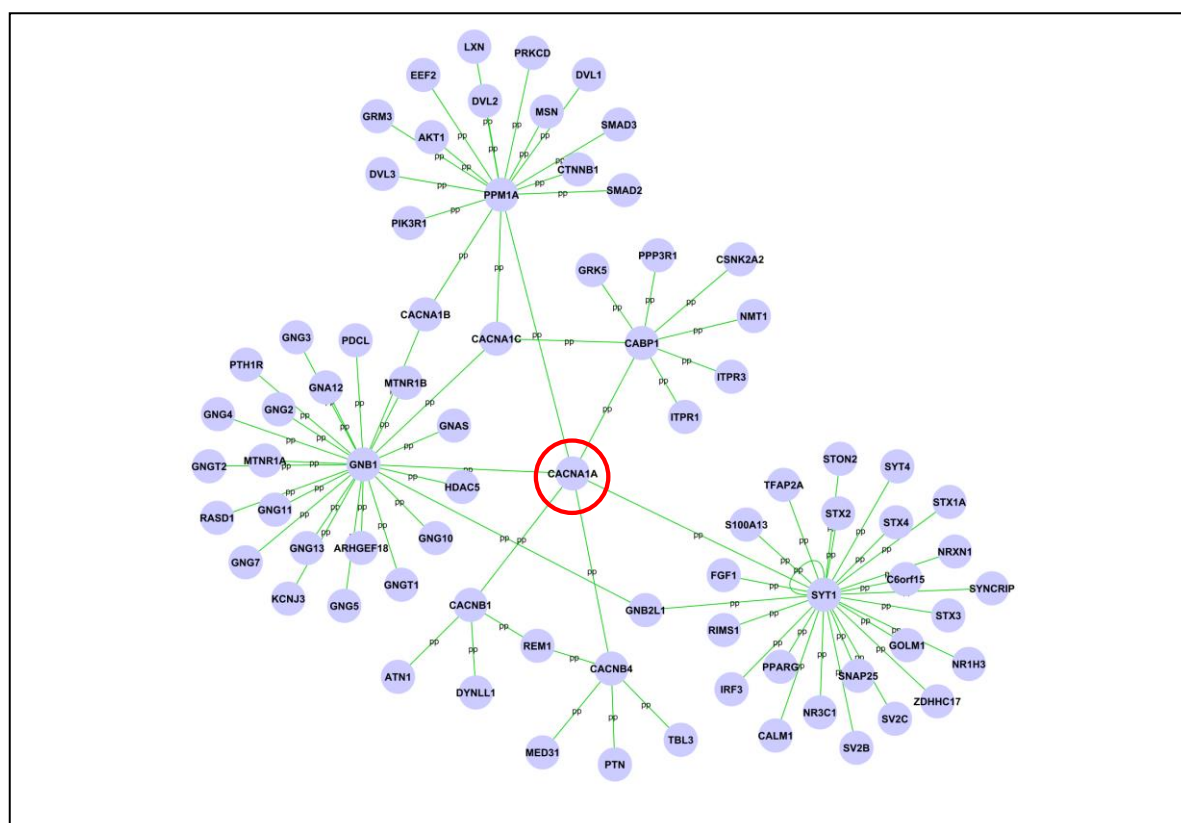


図3 CACNA1Aを中心とするインタラクトーム

バイオインフォマティクスの手法を用いて、既知の脊髄小脳変性症(SCA)に關わる遺伝子群について相互作用(インタラクトーム)解析を行なった。NCBIのウェブサイトから3つのタンパク質相互作用データベース(HPRD、BioGRID、BIND)の情報を統合したデータを取得し、電位依存性カルシウムチャネル Cav2.1 (CACNA1A)と3インタラクション以内で相互作用する遺伝子群を抽出した(図3)。

一方、SCA31においては、リピート配列と結合するタンパクが病態発症に關与している可能性が高い。我々はプロテオミクスの手法を駆使して、SCA31の変異配列(UGGAA)<sub>n</sub>と結合する蛋白を6つ検出し、そのうち、免疫組織化学的手法に用いることが出来る抗体が入手可能な2つの蛋白については、患者脳内でRNA fociとの共局在を探索した。その結果、RNA fociの頻度は少ないものの、(UGGAA)<sub>n</sub>結合蛋白が共局在する所見を確認できた。

### 3. 3 リピート RNA 結合化合物の開発・応用 (京都大・萩原グループ)

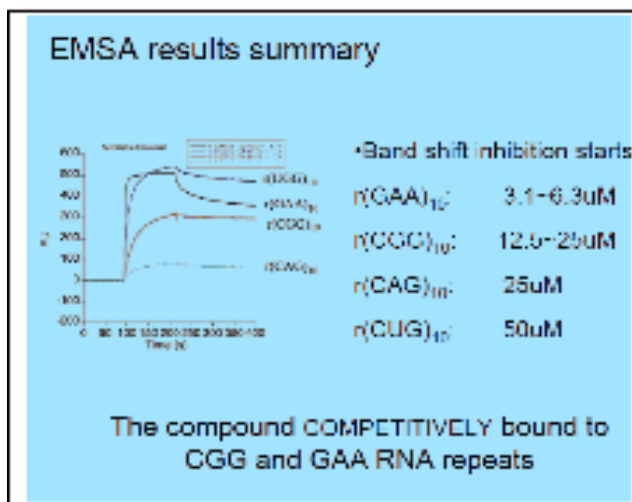


図 4 リピート RNA 結合化合物の EMSA 解析

SCA12 は CAG、SCA8 は CUG、SCA10 は ATTCT、SCA31 は TGGAA のそれぞれ繰り返し配列が伸長し、特定の RNA 結合蛋白がこの領域に結合することが病態に重要な意義を有すると考えられている。CAG、CUG、ATTCT、TGGAA の繰り返し配列 RNA を認識する化合物をスクリーニングし、これらの化合物投与により RNA 結合蛋白がこのリピート配列に集積することを防げれば、神経変性の進展を抑止させることが可能となると考え、CAG、CUG、ATTCT の繰り返し配列を認識する化合物をスクリーニングする系確立を試みた。

萩原グループでは以前図4に示すような *in vitro* で特定の繰り返し RNA に結合する化合物を開発していた。この際用いた RNA は繰り返し長が短く、実際の病態を反映していなかった。このため、スクリーニングには実際の病態に見合った繰り返し長の RNA を用いることにした。スクリーニングに必要な RNA プローブを大量かつ安定に供給するため、*in vitro* transcription のテンプレートとなりうるプラスミドの構築を試みた。しかしながら、病態に見合った繰り返し配列をもつプラスミドは大腸菌内で極めて不安定であり、目標とする繰り返し長をもつプラスミドを構築できなかった。このため、大量検体の同一条件検索を必要とする化合物の一次スクリーニングにはこの系が適さないと判断し中止した。

### 3. 4 Ca<sub>v</sub>2.1 遺伝子スプライス制御失調の SCA6 病態への関与 (東京医科歯科大・水澤グループ)

SCA6 変異アレルでは、CACNA1A C 末端細胞質内領域をコードするエクソン 47 に存在する CAG リピートが異常伸長している。CACNA1A 遺伝子エクソン 47 の 5' 領域には **AGGGCAGTAG** 配列があり、いずれの **AG** をアクセプターとするかによって MPI, MPc の 2 つの分子種が生じ、そ

のうち MPI のみがポリグルタミン (PolyQ) 鎖をコードする。MPc では C 末端の細胞内ドメインが短いチャンネルとなる。我々は MPI と MPc の機能分化・生理学的役割を個体レベルで解明するため、MPI のみ或は MPc のみを発現するスプライス変異ノックインマウス(それぞれ MPI-11QKI マウスと Ca<sub>v</sub>2.1-Ctm-KO マウス)を作製し、得られた変異マウスに関して行動学的・病理学的・生化学的・電気生理学的解析を進めた。MPI-11QKI ホモマウスは明らかな運動機能異常は示さず、小脳の病理学的解析でも明らかな異常を認めなかった。一方、ホモ Ca<sub>v</sub>2.1-Ctm-KO については、10 週齢で運動失調を認めたが、病理学的解析では明らかな小脳神経変性や小脳神経回路の発生異常は認められなかった。また Ctm-KO マウスは欠神発作を発症し、脳波異常が認められた。しかし単離プルキンエ細胞を用いて Ca<sub>v</sub>2.1 チャンネルの機能を電気生理学に解析したが Ca チャンネル電流の異常は認められずなかった。これらの結果は、i) MPI 型チャンネルがアイソフォーム特異的な分子間相互作用を介するなどして神経伝達において重要な生理機能を果たしていることを示唆する。SCA6 変異がそれら機能に変化を及ぼして partial loss of function の機構を介して病態に関与している可能性を検討するため Sca6 MPI-118Q KI マウスと Ca<sub>v</sub>2.1-Ctm-KO のコンパウンドヘテロマウスの行動解析をおこなったが、運動失調症状の悪化は認められず。CtmKO マウス小脳の遺伝子発現解析をおこなったが、Sca6 マウス小脳と似た変化はほとんど認められなかった。これらの結果は SCA6 病態において partial loss of function の機構の関与はほとんどなく、gain of function の機構が主体であることを示唆する。

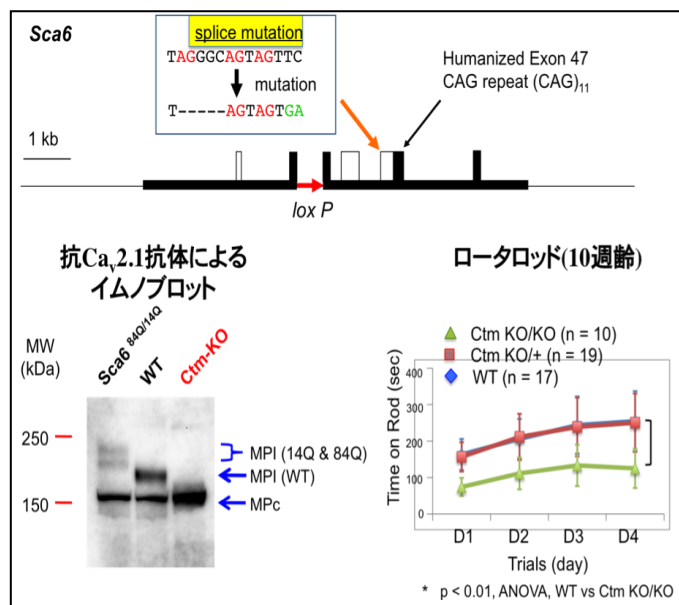


図5 Ca<sub>v</sub>2.1-Ctm-KO マウスの作製と解析

エクソン47の開始部にスプライスアクセプター変異を導入することにより、MPc アイソフォームのみを発現し、C末端部が長い(イムノブロット)MPI型チャンネルを発現しないCtm-KOマウスを作製した。

### 3.5 SCA6 スプライス制御機構の解明

(京都大・萩原グループ、東京医科歯科大・水澤グループ)

今回我々の注目している SCA6 変異アレルでは、CACNA1A エクソン 47 に存在する CAG リピートが異常伸長している。エクソン 47 の 5'領域には AGGGCAGTAG 配列があり、いずれの AG をスプライスアクセプターとするかによって MPI, MPc の 2 つの分子種が生じ、そのうち MPI のみがポリグルタミン (PolyQ) 鎖をコードし、凝集体を形成して病因となる。そこでスプライシングバリエーションの割合を何らかの処理によって MPc 側に偏らせることができれば、異常伸長 PolyQ 鎖を有する Ca<sub>v</sub>2.1 分子発現のフォワードフィードバックを断ち切ることができ、病態の治療または改善を目指すことができると考え、レポーター細胞を用いたスクリーニングに着手した。

我々は MPI 型スプライシングが起った際には GFP を、MPc 型スプライシングが起った際には mCherry を発現するレポーター細胞を構築し、ハイコンテンツ細胞イメージアナリシスシステムにて蛍光の変動を測定する系を確立した(図6)。ヒストンアセチル化とそれに伴う発現誘導を引き起こす、HDAC inhibitor である Trichostatin A (TSA) 処理と比較して GFP 低く、反対に mCherry の発現が向上することを MPc 型が優先して発現するとの判断基準とした。

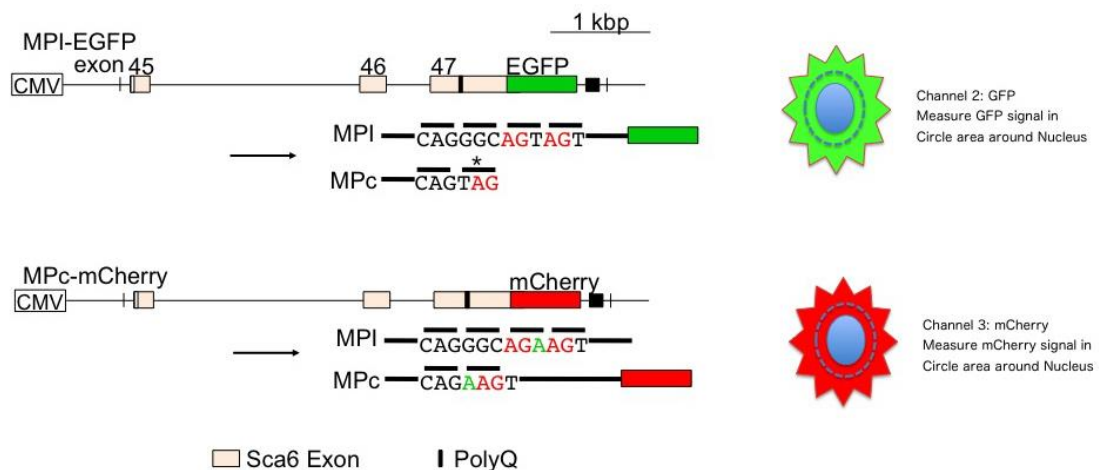


図6 Sca6 カラーレポーターシステムの概要

この細胞は細胞全体が蛍光蛋白により一様に蛍光を発する。ArrayScanVTi を用いて、各細胞ごとに核を囲む細胞質の EGFP、mCherry それぞれの蛍光シグナル平均強度を測定した。

まず、既存薬ライブラリーを用いた化合物スクリーニングを行った(スクリーニング詳細は図 3 参照)。上記条件で 1st スクリーニングを行ったところ、2038 化合物中より 16 個の候補化合物が得られた。2nd スクリーニングにより化合物の自家蛍光、及び単純な発現誘導によると思われる化合

物を除外し、最終的に 2 個の候補化合物に絞り込んだ。このうち候補化合物の一つは既に他遺伝子を用いた RNA スプライシング評価系において、異常スプライスアクセプターの生成によるスプライシング異常 (intron 包含) を改善する薬剤として報告されていた。また、当該レポーター細胞での実際のスプライシング変動を逆転写 PCR (RT-PCR) により確認したところ、化合物1処理では弱いながら Mpc 型 mRNA の増大がみられた。しかしながら本化合物では今のところ内在性 Sca6 mRNA でのスイッチングは確認されておらず、またレポーターの構造を変更すると Mpc 型 mRNA の増大がみられなくなる場合があることが判った。これは化合物1のスプライシングに与える効果が微弱なため、スプライシングを調節する他の要素の強弱に寄っては十分な効果が得られないものと考えられた。このため東京大・オープンイノベーションセンターより 9800 個の化合物供与を受けて化合物 1 を凌駕する化合物の探索を行った。1 次スクリーニングで 17 化合物を同定したが、再現性を検討したところ、これらの化合物による赤色蛍光上昇は化合物本体の自家蛍光、もしくは細胞死による自家蛍光であることが判り、レポーターでのスクリーニングにおいて化合物 1 を凌駕するものは得られなかった。

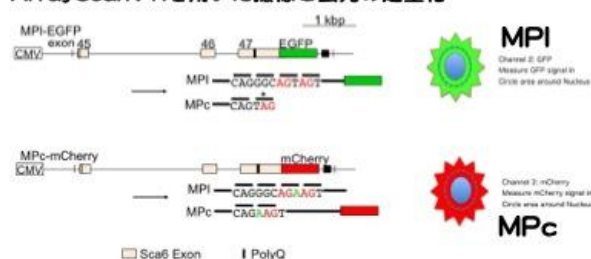
## Screening Strategy

### 1<sup>st</sup> Screening

Sca6 reporter cell に薬剤添加 (10 $\times$ M, final DMSO concentration: 0.1%)

24hもしくは48h

ArrayScanVTiを用いた撮像と蛍光の定量化



DMSOのみ投与時の蛍光量を0、1 $\times$ M Tricostation A (TSA)投与時の蛍光量を1としてNormalize.

Normalized GFP signalが1以下、Normalized mCherry signalが1以上のもを1st candidate として選択.

2038既存薬化合物より16化合物

9800東大提供化合物より17化合物

### 2<sup>nd</sup> Screening (特に化合物自体の蛍光による擬陽性を排除)

1) 1st candidate を段階希釈してSca6 reporter cell及び親株のNeuro 2a (レポーター発現無し) に投与

24hもしくは48h

2) Neuro 2aで濃度依存的蛍光増強が見られず、かつSca6 reporter cellにて1 $\times$ M TSA投与時と比較してGFPシグナルがより低く、mCherryシグナルがより高いものを選択

ヒット化合物を2化合物に絞り込み

図7 1<sup>st</sup> screening とカウンタースクリーニングのフローチャート



## ヒット化合物による各スプライシングバリエーション発現の変化

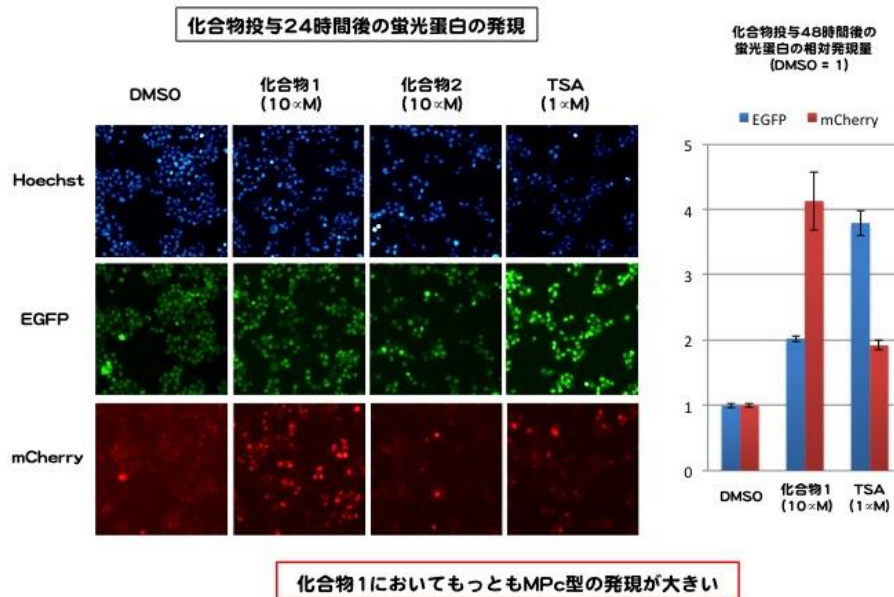


図8 ヒット化合物のレポーター細胞での評価。右：コントロール及びヒット化合物 24 時間処理での細胞の様子。左：48 時間処理後細胞での EGFP, mCherry の相対蛍光強度。

### 3.6 SCA6 モデルの病理学的解析に基づく病態解明 (東京医科歯科大学・水澤グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

変異 Ca<sub>v</sub>2.1 は患者 PC 細胞質内封入体を形成するが、その病態への関与は不明である。最近我々は脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)のプルキンエ細胞死を忠実に再現しうる新たなマウスモデルとして、伸長ポリグルタミン(118Q)を有する MPI を小脳に軽度に過剰発現し、比較的若齢より進行性の小脳失調を発症する Sca6-MPI-118Q マウスの作製に成功した。SCA6 の発症機構のうち、封入体形成の機構と病態への関与などを解明する目的で Sca6-MPI-118Q KI マウス小脳の封入体形成・小脳変性の経時的進行を病理学的に解析するとともに、封入体の細胞内局在を詳細に検討し、患者脳組織切片での病理学的解析を参照しつつ、細胞内小器官の機能特にエンドリソソーム系やオートファジー系などのタンパク分解系との関連を検討した。

Sca6-MPI-118Q KI マウス PC 細胞内封入体のマーカー解析を行った結果、封入体はユビキチン陰性でかつ種々のリソソームマーカー (cathepsin D・LAMP-1 等)と共局在することが明らかとなった。さらに凝集体形成や PC 変性におけるエンドリソソーム系の関与を明らかにするために、カテプシン B (Ctsb) KO マウスと MPI-118Q KI マウスの二重変異マウスの作製を行い、その解析を行なったところ。Ctsb KO マウスは明らかな表現型を示さないが、二重変異マウスでは、

MPI-118Q KI マウスと比較して変異  $Ca_v2.1$  の蓄積・封入体形成が亢進し、PC 変性・運動失調が悪化した。一方、MPI-118Q KI マウス小脳で小胞体ストレスの亢進やオートファジー誘導は認められず、エンドリソーム分解系・変異  $Ca_v2.1$  のリソーム蓄積が SCA6 の病態に関与することが明らかとなった。

### 3.7 SCA31 のモデルマウス・培養細胞の作製と解析 (東京医科歯科大学・水澤グループ)

SCA31 は 5 塩基(TGGAA)<sub>n</sub>(TAGAATAAAA)<sub>n</sub> が原因で起きる疾患である。この遺伝子変異は 2 つの異なる遺伝子 BEAN (brain expressed associated with NEDD4) と TK2 (thymidine kinase 2) で転写される。つまり、BEAN 方向からは (UGGAA)<sub>n</sub>(UAGAAUAAAA)<sub>n</sub> が、TK2 方向では (UUUUAUUCUA)<sub>n</sub>(UCCCA)<sub>n</sub> が発現する。一方、稀な健康日本人にも類似した配列が認められ、このような人々の脳内では、BEAN 方向から (UAGAAUAAAA)<sub>n</sub> が、TK2 方向からは (UUUUAUUCUA)<sub>n</sub> が発現する。

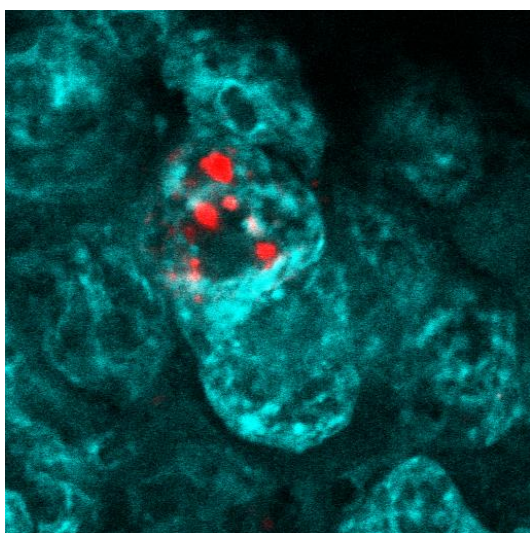


図9：培養 PC12 細胞に非コード型(UGGAA)<sub>n</sub> を一過性発現させた細胞モデル。この細胞で RNA プロブ(UUCCA)<sub>5</sub> を用いて FISH(fluorescent *in situ* hybridization)を行うと、(UGGAA)<sub>n</sub> が異常高次構造(RNA foci)を形成していることが確認できた。この細胞系では細胞死が招来される。一方、他の 5 塩基を発現させても RNA foci の形成や細胞死は生じない。

このような複雑な遺伝子発現が見られる SCA31 の病態を簡便に検証し、かつ将来の治療薬探索を行える系を確立する目的で、本疾患においてまだ存在しない培養細胞モデルを作製した。

培養 HEK および PC12 細胞において、対照とした(UAGAAUAAAA)<sub>n</sub> や(UUUUAUUCUA)<sub>n</sub>、および(UGGAA)<sub>n</sub> と(UCCCA)<sub>n</sub> の 4 種類の RNA が発現する一過性発現細胞を作製し、毒性などを検討した結果、(UGGAA)<sub>n</sub> においてのみ RNA の異常構造物 RNA foci が検出でき、また細胞死も複数の検出系で確認された。安定化発現細胞でも同様の結果を認め、BEAN1 方向の転写産物が特に毒性が強く、患者ゲノムに存在する(TGGAA)<sub>n</sub> が確かに病態に関係することを示唆する結果を得た(Niimi Y. et al. *Neuropathology*, 33(6):600-11, 2013)。

加えて、*in vivo* での検証及び SCA31 疾患モデル作製に向けて、平成 24 年度までに floxed (UGGAA)<sub>n</sub> マウスおよび floxed (UAGAAUAAAA)<sub>n</sub> マウスを完成させた(特許出願予定)。平成 25 年度末に三重大学から L7-Cre knock-in マウスの供与を受け、プルキンエ細胞特異的にリポート

配列を発現するラインの当施設での樹立を開始した。

また、SCA31 の原因遺伝子の 1 つである BEAN1 の機能が不明であるため、ノックアウトマウスの作製を平成 22 年度より手掛けた。

### 3. 8. MSAモデルをツールとした研究 (東京医科歯科大・水澤グループ)

MSA の病態に関与すると推定されている乏突起神経膠細胞特異的蛋白 p25 $\alpha$  に対する抗体を本研究で作製し、その特異性を確認した後に、プルキンエ細胞に強い変性脱落を来した MSA 患者脳と、対照脳での発現解析を行った。その結果、確かに MSA 患者での同蛋白の細胞内局在異常を見出し、同蛋白は乏突起神経膠細胞で局在を変化させ、核からは減少し、細胞質の特にミトコンドリアに異常集積する変化を認めた。この成果は、これまで報告されている  $\alpha$ synuclein 蛋白の異常発現より先行する証拠を確認した。以上の結果を 2014 年に誌上発表した(Ota K. et al, Acta Neuropathol Commun Sep 11;2(1):136. (Epub))。

### 3. 9. 下等動物モデルの作製・解析と分子治療法の解明

(東京医科歯科大学水澤グループ・京都大学萩原グループ)

SCA31 の原因である(TGGAA) $_n$  から、先述の通り(UGGAA) $_n$  と(UUCCA) $_n$  の転写産物が生じる。(UGGAA) $_n$  を複眼および中枢神経系に発現するショウジョウバエを作製し、変性や機能障害を確認した。さらに、この毒性を制御する因子を複数見出した。一方、(UUCCA) $_n$  についても複眼での発現を行ったが、複眼変性を起こさなかった。



## § 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 1件、国際(欧文)誌 42件)

1. Aikawa T, Mogushi K, Iijima-Tsutui K, Ishikawa K, Sakurai M, Tanaka H, Mizusawa H and Watase K. Loss of MyD88 alters neuroinflammatory response and attenuates early Purkinje cell loss in a spinocerebellar ataxia type 6 mouse model. *Hum Mol Genet.* 2015 24(17): 4775-4779. doi: 10.1093/hmg/ddv182.
2. Ota K, Obayashi M, Ozaki K, Ichinose S, Kakita A, Tada M, Takahashi H, Ando N, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. Relocation of p25 $\alpha$ /tubulin polymerization promoting protein from the nucleus to the perinuclear cytoplasm in the oligodendroglia of sporadic and COQ2 mutant multiple system atrophy. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Sep 11;2(1):136. [Epub ahead of print]
3. Furukawa F, Ishibashi S, Sanjo N, Yamashita H, Mizusawa H. Serial magnetic resonance imaging changes in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with valine homozygosity at codon 129 of the prion protein gene. *JAMA Neurol.* 2014 Sep 1;71(9):1186-7. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.548.
4. Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H, and Muto Y. RBFOX and SUP-12 sandwich a guanine base to form a stable complex and regulate tissue-specific splicing. *Nat Struct Mol Biol.* doi:10.1038/nsmb.2870, 2014.
5. Yasui K, Yabe I, Yoshida K, Kanai K, Arai K, Ito M, Onodera O, Koyano S, Isozaki E, Sawai S, Adachi Y, Sasaki H, Kuwabara S, Hattori T, Sobue G, Mizusawa H, Tsuji S, Nishizawa M, Nakashima K. A 3-year cohort study of the natural history of spinocerebellar ataxia type 6 in Japan. *Orphanet J Rare Dis.* 2014 Jul 23;9(1):118.
6. Yamamoto M, Onogi H, Kii I, Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T, and Hagiwara M.. CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. *J Clin Invest.* 124(8):3479–3488, 2014.
7. Tanaka N, Nanri K, Taguchi T, Tanaka N, Fujita T, Mitoma H, Kawata A, Mizusawa H. The utility of voxel-based morphometry in the diagnosis of spinocerebellar degeneration. *Brain Nerve.* 2014 Jun;66(6):699-704. (日本語)
8. Kurihara T, Sakurai E, Toyomoto M, Kii I, Kawamoto D, Asada T, Tanabe T, Yoshimura M, Hagiwara M, Miyata A. “Alleviation of behavioral hypersensitivity in mouse models of inflammatory pain with two structurally different casein kinase 1 (CK1) inhibitors. *Mol Pain.* 10(1):17. 2014 (DOI:10.1186/1744-8069-10-17)
9. Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hattori N. The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2014 Jan 25. pii: S0197-4580(14)00039-6. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.022.
10. Niimi Y, Takahashi M, Sugawara E, Umeda S, Obayashi M, Sato N, Ishiguro T, Higashi M, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. Abnormal RNA structures (RNA foci) containing a penta-nucleotide repeat (UGGAA)<sub>n</sub> in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis. *Neuropathology.* 2013 Apr 22. doi: 10.1111/neup.12032.
11. Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K,

Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee VM, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Ozelius L, Foroud T, Tsuji S. *New England Journal of Medicine*. 369(3):233-44, 2013.

12. Gammons MV, Fedorov O, Ivison D, Du C, Clark T, Hopkins C, Hagiwara M, Dick AD, Cox R, Harper SJ, Hancox JC, Knapp S, Bates DO. "Topical antiangiogenic SRPK1 inhibitors reduce choroidal neovascularization in rodent models of exudative AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54(9):6052-62, 2013. (DOI:10.1167/iops.13-12422).

13. Pozo N, Zahonero C, Fernandez P, Linares JM, Ayuso A, Hagiwara M, Perez A, Ricoy JR, Hernandez-Lain A, Sepulveda JM, Sanchez-Gomez P. "Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *J Clin Invest*. 123(6):2475-87. 2013. (DOI:10.1172/JCI63623)

14. Kuroyanagi H, Watanabe Y, Suzuki Y, & Hagiwara M. Position-dependent and neuron-specific splicing regulation by the CELF family RNA-binding protein UNC-75 in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* (2013). doi:10.1093/nar/gkt097.

15. Dong Z, Noda K, Kanda A, Fukuhara J, Ando R, Murata M, Saito W, Hagiwara M, Ishida S. Specific inhibition of serine/arginine-rich protein kinase attenuates choroidal neovascularization. *Mol Vis*. 19:536-43, 2013.

16. Kuroyanagi H, Watanabe Y, and Hagiwara M. CELF family RNA-binding protein UNC-75 regulates two sets of mutually exclusive exons of the *unc-32* gene in neuron-specific manners in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*. 9(2): e1003337. doi: 10.1371/journal.pgen.1003337.

17. Takahashi M, Obayashi M, Ishiguro T, Sato N, Niimi Y, Ozaki K, Mogushi K, Mahmut Y, Tanaka H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Yamada M, Takahashi H, Kato T, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H and Ishikawa K. Cytoplasmic location of  $\alpha 1A$  voltage-gated calcium channel C-terminal fragment ( $Ca_v2.1$ -CTF) aggregate is sufficient to cause cell death. *PLoS ONE*. 8(3): e50121, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0050121. Epub 2013 Mar 7.

18. Unno T, Wakamori M, Koike M, Uchiyama Y, Ishikawa K, Kubota H, Yoshida T, Sasakawa H, Peters C, Mizusawa H and Watase K. Development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109(43):17693-8. 2012 (DOI: 10.1073/pnas.1212786109).

19. Kataoka N, Dobashi I, Hagiwara M, Ohno M. hDbr1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein with a protein phosphatase-like motif essential for debranching activity. *Sci Rep*. 3:1090, 2013.

20. Ohno G, Ono K, Togo M, Watanabe Y, Ono S, Hagiwara M, Kuroyanagi H. Muscle-specific splicing factors ASD-2 and SUP-12 cooperatively switch alternative pre-mRNA processing patterns of the ADF/cofilin gene in *C. elegans*. *PLoS Genet* 8(10) e1002991. 2012 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1002991).

21. Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima Y, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama S, Mori O, Eishi Y and Mizusawa H. Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology*, 32(6): 595-603, 2012 (DOI: 10.1111/j.1440-1789.2012.01302.x).

22. 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 deletion, the mutation for spinocerebellar ataxia type 15, in Japan screened by gene dosage. *Journal of Human Genetics* 57 (3): 202-206, 2012 (DOI: 10.1038/jhg.2012.5.).
23. Saitoh, N., Sakamoto, C., Hagiwara M, Agredano-Moreno LT, Jiménez-García LF, Nakao M. (2012) The distribution of phosphorylated SR proteins and alternative splicing are regulated by RANBP2. *Mol Biol Cell*. 23(6):1115-28.
24. Kusano-Kitazume A, Sakamoto N, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M. (2012) Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(3):1315-2
25. Takai-igarashi, T., Akasaka, R., Maruyama, T., Inoue, K., Suzuki, K, Eguchi, M., Yoshida, M., Bando, M, Takasaki, M., Sakota, M., Furukawa, T., Maejima, T., Konagaya, A., Matsuura, H., Suzumura, T., Tanaka, H. On experiences of i2b2 (Informatics for Integrating Biology and the Bedside) database with Japanese Clinical Patients' data. *Bioinformatics*. *Bioinformatics*. 2011;6(2):86-90.
26. Kataoka N, Diem MD, Yoshida M, 4, Hatai C, Dobashi I, Dreyfuss G, Hagiwara M, and Ohno M. (2011) Specific Y14 domains mediate its nucleo-cytoplasmic shuttling and association with spliced mRNA. *Sci Rep* 1:92, 2011
27. Johnson TA, Niimura Y, Tanaka H, Nakamura Y, Tsunoda T. hzAnalyzer: detection, quantification, and visualization of contiguous homozygosity in high-density genotyping datasets. *Genome Biol*. 2011;12:R21. (doi: 10.1186/gb-2-11-12-3-r21)
28. Anwar A, Hosoya T, Leong KM, Onogi H, Okuno Y, Hiramatsu T, Koyama H, Suzuki M, Hagiwara M, Garcia-Blanco MA. The Kinase Inhibitor SFV785 Dislocates Dengue Virus Envelope Protein from the Replication Complex and Blocks Virus Assembly. *PLoS One*. 6(8):e23246., 2011
29. Debdab M, Carreaux F, Renault S, Soundararajan M, Fedorov O, Filippakopoulos P, Lozach O, Babault L, Tahtouh T, Baratte B, Ogawa Y, Hagiwara M, Eisenreich A, Rauch U, Knapp S, Meijer L, Bazureau JP. Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. *J Med Chem*. 54(12):4172-4186, 2011
30. Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano, H, Ota, M, Itoh K, Hagiwara M, and Matsuo M (2011) Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the *dystrophin* gene. *Nature Commun* 2, 308. (DOI: 10.1038/ncomms1306)
31. Ninomiya K, Kataoka N, and Hagiwara M. (2011) Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. *J Cell Biol*. 195(1):27-40 (doi: 10.1083/jcb.201107093)
32. Amin EM, Hua J, Cheung MK, Ni L, Kase S, Ren-nel ES, Gammons M, Nowak DG, Saleem MA, Hagiwara M, Schumacher VA, Harper SJ, Hinton D, Bates DO, Lodomery MR (2011) WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* 20(6):768-780. (DOI 10.1016/j.ccr.2011.10.016)
33. 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. *Neurology*, 2011 Nov 15; 77 (20):

1853-5. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182377e3a

34. 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. *Acta Neuropathol* 119(4):447-64, 2010 (DOI: 10.1007/s00401-009-0630-0)

35. Sims-Lucas, S., Cusack, B., Baust, J., Eswarakumar, V.P., Hagiwara, M., Takeuchi, A., and Bates, C.M. (2010). Fgfr1 and the IIIc isoform of Fgfr2 play critical roles in the metanephric mesenchyme mediating early inductive events in kidney development. *Dev Dyn* 240, 240-249. (DOI 10.1002/dvdy.22501)

36. Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, and Hagiwara M (2010) Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nature Commun.* 1, Article number: 86, (DOI: 10.1038/ncomms1090)

37. Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, and Watanabe M.(2010) Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agents Chemother.* 54, 3179-3186. (DOI:10.1128/AAC.00113-10)

38. Kii I, Shiraishi A, Hiramatsu T, Matsushita T, Uekusa H, Yoshida S, Yamamoto M, Kudo A, Hagiwara M, and Hosoya T. (2010) Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules. *Org Biomol Chem.* 8, 4051-4055. (DOI: 10.1039/c0ob00003e)

39. Takeuchi A, Hosokawa M, Nojima T, Hagiwara M (2010) Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative splicing. *PLoS One* 5, e10946. (DOI:10.1371/journal.pone.0010946)

40. Kuroyanagi H, Ohno G, Sakane, H, Maruoka, H, and Hagiwara M (2010) Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation in vivo using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Nature Protoc.* 5, 1495-1517. (doi:10.1038/nprot.2010.107)

41. Shimokawa K, Mogushi K, Shoji S, Hiraishi A, Ido K, Mizushima H, Tanaka H. iCOD: an integrated clinical omics database based on the systems-pathology view of disease. *BMC Genomics.* 2010;11 Suppl 4:S19.

42. Hase T, Niimura Y, Tanaka H. Difference in gene duplicability may explain the difference in overall structure of protein-protein interaction networks among eukaryotes. *BMC Evol Biol.* 2010;10:358.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

①査読審査の入る proceedings 等

1. Watase, K. SCA6: lessons from faithful knock-in mouse models. 2014. *Neurology and Clinical Neuroscience, in press*, DOI: 10.1111/ncn3.137.

2. Ogawa Y, Hagiwara M. Challenges to congenital genetic disorders with "RNA-targeting" chemical compounds. *Pharmacol Ther.* 134(3):298-305, 2012.

3. Kuroyanagi H., Takeuchi A., Nojima T., and Hagiwara H. (2012) Single-Cell Detection of

Splicing Events with Fluorescent splicing Reporters in Alternative pre-mRNA Splicing: Theory and Protocols Stamm S., and Smith C., and Luhrmann R. Wiley-Blackwell, Weinheim. 298-310.

②その他

1. 板東 杏太、水澤英洋: 初期の脊髄小脳変性症に対するリハビリテーションについて. 難病と在宅ケア10 20(7):26-29, 2014 日本プランニングセンター
2. 萩原正敏、「より多様なウイルスに効く次世代抗ウイルス薬を開発 萩原正敏教授(京都大学大学院医学研究科)に聞く」月刊「化学」Vol.69 No.9(2014) P.73
3. 木村亮、萩原正敏、「RNA病」(2014) 分子精神医学 Vol.14 No.2 2014年4月(別刷)P.62-63
4. 大江賢治、萩原正敏、「選択的スプライシングを標的とした低分子化合物の医薬品開発」BIO Clinica BIOLOGY TOPICS 2014年3月号 P.95-99
5. 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症の分類. 日本臨床別冊 神経症候群(第2版)II, 330-335, 2014.
6. 渡瀬 啓, 水澤英洋. Spinocerebellar ataxia type 6. 日本臨床別冊 神経症候群(第2版)II, 350-354, 2014.
7. 佐藤 望, 石川欽也, 水澤英洋. 16q-ADCA(SCA31). 日本臨床別冊 神経症候群(第2版)II, 365-368, 2014.
8. 石川欽也, 水澤英洋. 周期性失調症II型. 日本臨床別冊 神経症候群(第2版)II, 452-455, 2014.
9. 石川欽也. 自律神経障害の治療. 今日の治療指針 2014. 868-869. 医学書院.
10. 喜井勲、萩原正敏、「キナーゼの多彩な立体構造を標的とした創薬」実験医学 vol.32 No.2 (増刊)2014年1月(別刷)P.133-139
11. 石川欽也、新美祐介. 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の病態. 特集 RNA biology からみた神経変性疾患の病態機序. 医学のあゆみ. 247 巻 5 号 2013 年 11 月 2 日出版.
12. 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31). 特集 脊髄小脳変性症研究の進歩. 神経内科. 78(3): 253-256, 2013.
13. 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症. In: 北川泰久、寺本 明、三村 將 監修、飯森眞喜雄、内山真一郎、片山容一、岸本年史、水澤英洋 編集、「神経・精神疾患診療マニュアル」日本医師会雑誌. 第 142 巻・特別号(2), S208-S209, 2013
14. 新美祐介, 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の分子病態について. 特集 脊髄小脳変性症研究の進歩. 神経内科 78(3): 265-270, 2013.
15. 石川欽也, 水澤英洋. 試験的治療. テーマ「多系統萎縮症(MSA)のすべて」Clinical Neuroscience. 2013 年 3 月号(vol. 31) 362-363.
16. 橋本祐二, 石川欽也, 水澤英洋. 小脳徴候. テーマ「多系統萎縮症(MSA)のすべて」Clinical Neuroscience. 2013 年 3 月号(vol. 31) 298-300.

17. 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症の治療. 薬物治療を中心に. In: 辻 省次 総編集、西澤正豊 専門編集,「小脳と運動失調. 小脳はなにをしているのか」アクチュアル 脳・神経疾患の臨床. 中山書店, 東京, 2013:224-232.
18. 萩原正敏、「新しい構造生命科学の未来を拓くために何をなすべきか」(2012) 学術の動向12月号 P.46-61
19. 萩原正敏、片岡直行:実験医学 2012 増刊 P.46-52 疾患克服をめざしたケミカルバイオロジー「RNA を標的とした新しい創薬戦略」
20. 萩原正敏:シグナル伝達キーワード辞典 P.53-54 「cAMP シグナリング」
21. 武内章英、萩原正敏 「可視化スプライシング・レポーターシステムで開く哺乳類の mRNA 制御の世界」(2012) 細胞工学 VOL.31 No.6 2012 年6月号
22. 渡瀬 啓, 水澤英洋. 脳神経疾患の分子標的薬研究. 2012. 日本臨床 70 巻増刊号 8 分子標的薬 がんから他疾患までの治療をめざして: 360-364.
23. 渡瀬 啓, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6). 2012. 最新医学 67(5):1082-1088
24. 石川欽也, 水澤英洋. Non-coding RNA repeat と神経変性疾患:脊髄小脳失調症を中心に. 2012. BIO Clinica 27(10):921-924.
25. 石川欽也, 佐藤 望, 新美祐介, 網野猛志, 融 衆太, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型. 特集 脊髄小脳変性症(SCD)の Up-To-Date. 2012. 最新医学 67(5): 1089-1095

### (3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

#### ① 招待講演 (国内会議 32 件、国際会議 23 件)

1. 水澤英洋: 招待講演 ビデオセッション 内科疾患における movement disorders. 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 京都ホテルオークラ. 京都 2014 年 10 月 3 日
2. 水澤英洋: 講演 脳を守る 運動失調症をきたす小脳の病態とその診断・治療. 第 22 回脳の世紀シンポジウム. 有楽町朝日ホール、東京、2014 年 4 月 11 日
3. 萩原正敏(京都大学)、「トランスクリプトーム創薬による遺伝病の克服」、第 4 回前立腺生物学シンポジウム、伊勢志摩、2014 年 6 月 27 日、三重
4. 萩原正敏(京都大学)、「家族性自立神経失調症を標的とするトランスクリプトーム創薬」、千里ライフサイエンス新適塾『脳はおもしろい』第 4 回会合、大阪、2014 年 4 月 11 日
5. 萩原正敏(京都大学)、「京大医学研究科におけるティッシュリソースセンター構想」、京大病院がんセンターバイオバンクシンポジウム、京都、2014 年 2 月 3 日
6. 萩原正敏(京都大学)、「網羅的スプライシング暗号解析に基づく RNA 病の解明と治療技術の探索」、平成 25 年度セルイノベーション公開シンポジウム 次世代シーケンス解析技術の超微量化と創薬・医療分野への応用に向けて、東京、2014 年 1 月 28 日
7. 萩原正敏(京都大学)、Prospective nivel therapeutics for tauopathies, Asia Aging Core for

Longevity(AACL) 韓国 Jeju, 2014 年 9 月 24 日

8. 萩原正敏(京都大学)、Challenges to cure genetic diseases with RNA-targeting chemical compounds, 京都大学・台湾大学共催シンポジウム、京都、2014 年 9 月 2 日
9. 萩原正敏(京都大学)、Challenge to Cure Hereditary Diseases with "RNA-targeting" Chemical Compounds, International Conference on Chemical Biology 2014、インド、2014 年 2 月 7 日
10. 萩原正敏(京都大学)、「先天性難治疾患の治療を可能にするトランスクリプトーム創薬戦略」、第 2 回創薬・医療技術基盤プログラムワークショップ「理研創薬の現状と将来」、埼玉、2013 年 11 月 29 日
11. 石川欽也、橋本祐二、曾我一將、太田浄文、水澤英洋。「新しい治療戦略 多系統萎縮症に対するリファンピシン臨床試験」、第 31 回日本神経治療学会総会、東京、2013 年 11 月 22 日
12. 萩原正敏(京都大学)、「広汎性発達障害に対するエピゲノム創薬」、第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会シンポジウム「エピジェネティクスと精神薬理との接点」、沖縄、2013 年 10 月 25 日
13. 萩原正敏(京都大学)、「先天性難治疾患に対する創薬の試み:TRNDK」、第 1 回創薬等支援技術基盤プラットフォーム公開シンポジウム、東京、2013 年 9 月 24 日
14. Kinya Ishikawa. Spinocerebellar ataxia type 31: another story of RNA-mediated repeat disease. Seminars of the German Center for Neurodegenerative Diseases. ドイツ・ミュンヘン、2013 年 9 月 20 日
15. 石川欽也。「遺伝性脊髄小脳変性症の診断:臨床と遺伝子検査」、第 78 回長崎神経懇話会、長崎、2013 年 6 月 21 日
16. 萩原正敏、「京都大学におけるセレンディピティ創薬の試み」、公開シンポジウム「オールジャパンでの創薬支援体制の構築に向けて」、大阪、2013 年 5 月 17 日
17. Kei Watase. SCA6: lessons from mouse models. East Asian Neurology Forum, 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Tokyo, May 13<sup>th</sup>, 2013.
18. 萩原正敏(京都大学)、「RNA を標的とする創薬によって難治疾患へ挑む;ダウン症からアルツハイマー病治療薬へ」いなべ市医師会学術講演会、三重(いなべ)、2013 年 3 月 30 日
19. 萩原正敏(京都大学)、「医薬連携によるワンストップ創薬」日本薬理学会アカデミア創薬シーズ探索シンポジウム、博多、2013 年 3 月 22 日
20. 萩原正敏(京都大学)、「mRNA を標的とした新しい創薬研究の展開」長野哲雄教授定年退職記念シンポジウム「ケミカルバイオロジーの大展開」東京、2013 年 3 月 16 日
21. 石川欽也。脊髄小脳失調症 31 型(SCA31) その発見から臨床、病理、病態研究まで。平成 24 年度愛知医科大学加齢医学研究所セミナー。愛知県。2013. 2. 22.
22. 萩原正敏(京都大学)、「RNA を標的とする創薬で難病に挑む」、未来の研究プロジェクト Winter Seminar 2013、京都、2013 年 2 月 16 日
23. 萩原正敏(京都大学)、「RNA を標的とする創薬によって難治疾患へ挑む」臨床中核拠点シ

ンポジウム、京都、2013年2月9日

24. 萩原正敏(京都大学)、「プロテオームの多様性創出のメカニズムについて」JHUPO サテライトシンポジウム、京都、2013年1月18日

25. 萩原正敏(京都大学)、Development of DYRK1A inhibitors for novel therapeutics of Alzheimer's disease. 6<sup>th</sup> Asian Aging Core for Longevity (AACL) conference in Kyoto (Aging Research Forum between Japan and Korea)、京都、2013年11月2日

26. 萩原正敏(京都大学)、Visualization and manipulation of pre-mRNA processing. 「時空間情報イメージング研究教育推進拠点」キックオフシンポジウム、京都、2013年5月23日

27. 萩原正敏(京都大学)、Challenges to congenital genetic disorder with "RNA-targeting" chemical compounds, SLAS2013 2<sup>nd</sup> Annual Conference & Exhibition, ORLAND,FL,USA. 2013年1月14日

28. 萩原正敏(京都大学)、「スプライシング異常による疾患とその治療の可能性」、オミックス医療研究会 創薬PG×分科会&データベース分科会シンポジウム、2012年12月26日、横浜

29. 萩原正敏(京都大学)、Novel DYRK1A inhibitor applicable for Alzheimer disease, AACL – 2012 Seoul Symposium, Nov.23-24, 2012. Seoul

30. 萩原正敏(京都大学)、「RNA を標的とする創薬で難病に挑む」、京大医療薬剤学研究会、2012年11月17日、京都

31. 萩原正敏(京都大学)、Chemical targeting of RNA processing for new therapeutics of congenital diseases, THE 1<sup>st</sup> official of the INTERNATIONAL CHEMICALBIOLOGY SOCIETY, Oct.4-5, Cambridge, USA.

32. 萩原正敏(京都大学)、「Neural development and splicing code」、第35回日本神経科学大会「RNA 結合タンパクと病態シンポジウム」、2012年9月21日、名古屋

33. 萩原正敏(京都大学)、「RNA を標的とする創薬によって難治疾患に挑む」、第36回阿蘇シンポジウム、2012年8月3日、熊本

34. 石川欽也. ハンチントン病の診断と治療. 日本ハンチントン病ネットワーク総会. 東京. 2012.6.23

35. Ishikawa K. A non-coding penta-nucleotide (UGGAA)<sub>n</sub> is essential for SCA31 pathogenesis. The 7<sup>th</sup> International Conference on Unstable Microsatellite and Human Disease. Ste.Odile, France. June 12<sup>th</sup>, 2012.

36. 萩原正敏(京都大学)、Challenges to Congenital Genetic Disorders with "RNA-targeting" Chemical Compounds, The 22<sup>nd</sup> CDB Meeting, June 11, 2012. Kobe

37. 萩原正敏(京都大学)、New chemical therapeutics of congenital genetic disorders targeting pre-mRNA. 日本ケミカルバイオロジー学会第7回年会、国際シンポジウム「新規疾患治療にむけたケミカルバイオロジー研究からの挑戦」2012年6月9日、京都

38. 萩原正敏「RNA を標的とする創薬によって難治疾患に挑む第36回阿蘇シンポジウム」阿蘇リゾートグランヴィオホテル 2012.8.3 熊本



39. 萩原正敏(京都大学)、「先端的異分野融合を核とした構造生命科学の飛躍に向けて」日本学術会議公開シンポジウムライフサイエンス研究推進のための構造生命科学のミッション@東京、学術会議大講堂. 2012.1.9
40. Masatoshi Hagiwara, Moduration of Pre-mRNA Splicing Patterns with Synthetic Chemicals and Their Clinical Applications, The UEHARA Memorial Foundation Symposium, Chembiomolecular Science: at Frontier of Chemistry and Biology, June6-8, 2011, Tokyo, Japan
41. 田中 博. オミックス・サイエンスの展開と神経病理学. 第 52 回日本神経病理学会総会学術研究会. 京都. 2011.6.4
42. Masatoshi Hagiwara, Visualization of Alternative Splicing with Multi-color Splicing Reporters and Their Application for Screen of Trans-acting Factors and Small Chemicals, The 16th Annual Meeting of the RNA Society / The RNA Society of Japan 13<sup>th</sup> Annual Meeting Kyoto, Japan June14-18, 2011.
43. Masatoshi Hagiwara, Visualization of alternative splicing and the therapeutic manipulation with chemical compounds, US-Japan Conference at City of Hope, August 4-5, USA
44. Masatoshi Hagiwara, New therapeutics by alteration of mRNA expression and processing with small chemicals", *International Chemical Biology Conference, October 11-12, USA, 2011*
45. Masatoshi Hagiwara, New RNA-targetting therapeutics with protein kinase inhibitors, Protein kinases regulating RNA splicing, November 12-16, 2011, France.
46. Decipherment of splicing code and its manipulation for new therapeutics. RNA symposium (National Cheng Kung University 台南)
47. 萩原正敏「新しい分子イメージング技術による創薬」第5回ケミカルバイオロジー国際シンポジウム 東京医科歯科大学 Feb.23th, 2010
48. Hagiwara.M ‘ Visualizatio and manipulation of RNA splicing to cure RNA diseases’ Gorodon Research Conference in New port, RI July 18-23, 2010.
49. Hagiwara.M ‘How can cells recover form the stress-induced suppression of pre-mRNA splicing?’ The 6<sup>th</sup> International Forum on ‘Oxidative Stress and Aging’ Noyori Conference Hall, Nagoya University , Japan September6-7<sup>th</sup> 2010.
50. Hagiwara.M, Development of Novel Protein Kinase Inhibitors for New Therapeutics of Incurable Diseases. ICGEB RNA Processing in Biology and Medicine Oct.22th 2010, Beijing
51. Tanaka, H. Current state and futures of systems pathology. 2010 Translational Research Excellence Conference (TRX10). Brisbane Convention & Exhibition Centre, Brisbane, Australia. October 11-13, 2010.
52. Hagiwara.M,「Visualization and manipulation of mRNA splicing to cure human diseases」Emory University, Atlanta, GA July 23th, 2010.
53. Hagiwara.M,「Visualization and manipulation of mRNA splicing to cure human diseases」ハノイ医科大学セミナー, Aug 24<sup>th</sup>2010
54. 田中博. 次世代オミックス医療のインパクト. JBIC バイオ関連基盤技術研究会. 東京. 2010.6.24

55. 田中博. オミックス情報に基づいた統合医療データベース—個別化医療の到来. 千里ライフサイエンスセミナー(パーソナルゲノム時代の統合医療データベース戦略). 大阪. 2010.5.21

② 口頭発表 (国内会議 12 件、国際会議 3 件)

1. Ishiguro T, Fujikake N, Sato N, Mizusawa H, Wada K, Nagai Y, Ishikawa K. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes neurodegeneration in *Drosophila*. The Society for Neuroscience. アメリカ合衆国・サンディエゴ、2013 年 11 月 12 日

2. Ishikawa K, Sato N, Ozaki K, Hatsuta H, Murayama S and Mizusawa H. Gene expression alterations in the human aging cerebellum. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 56<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry, The 23<sup>rd</sup> Annual Conference of the Japanese Neural Network Society, Neuro2013. Kyoto, June 22, 2013.

3. Kinya Ishikawa. SCA31. シンポジウム Non-coding repeat expansion disorders. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 6 月 1 日, 東京.

4. 橋本祐二, 石川欽也, 本多武尊, 中尾誠, 永雄総一, 水澤英洋. プリズム適応を用いた小脳運動学習の定量化. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 30 日, 東京.

5. Kinya Ishikawa. SCA31 and non-coding repeat expansion disorders. プレナリーセッション Neuroscience Frontier Symposium 1. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 30 日, 東京.

6. 萩原正敏. 「スペックルズ・パラスペックルズに局在する RNA 結合蛋白の機能」、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日、福岡

7. 石川欽也, 高橋 真, 大林正人, 佐藤 望, 山田光則, 高橋 均, 加藤丈夫, 江石義信, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)における転写因子 CREB に関する研究. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会. 新潟. 2012. 6. 29.

8. 石黒太郎, 石川欽也, 藤掛伸宏, 永井義隆, 水澤英洋. SCA6 トランスジェニックショウジョウバエによる Ca<sub>v</sub>2.1 の CTF 毒性の検証. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012. 5. 25.

9. Niimi Y, Ishikawa K, Sato N, Mizusawa H. RNA mediated cell death is important in a cultured cell model of spinocerebellar ataxia type 31. The 2<sup>nd</sup> International Conference of Neural Tissue and Cell Culture. Tokyo, Japan. June 16, 2012

10. 新美祐介, 高橋 真, 大林正人, 佐藤 望, 網野猛志, 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)の分子病態の探索. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012. 5. 25.

11. 林正人, 石川欽也, 佐藤 望, 橋本祐二, 太田浄文, 新美祐介, 松浦 徹, 阿部康二, 水澤英洋. Non-coding repeat 病の日本の脊髄小脳失調症患者に占める割合. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012. 5. 25.

12. 太田浄文, 橋本祐二, 新美祐介, 大林正人, 石黒太郎, 佐藤 望, 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)における小脳歯状核の MRI 信号変化と病理学的対応. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012. 5. 24.

13. 石川欽也, Dürr A, Klopstock T, 佐藤 望, Stevanin G, Brice A, 水澤英洋. 欧州人での

SCA31 遺伝子 5 塩基リピート. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012. 5. 23.

14. 佐藤 望, 石川欽也, 新美祐介, 網野猛志, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型の分子遺伝学的診断法についての検討. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012. 5. 23.

15. 尾崎 心, 三條伸夫, 石川欽也, 池田篤平, 服部高明, 加藤 剛, 横田隆徳, 大川 淳, 山田正仁, 水澤英洋. 表層シデローシス(superficial siderosis)に対する治療法の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012. 5. 23.

③ ポスター発表 (国内会議 12 件、国際会議 7 件)

1. 萩原純也、森岡勝樹、茂櫛薫、渡瀬啓、水澤英洋、田中博. "Analysis of alternative splicing in the cerebellum of spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice", CBI学会 2014 年大会、東京、タワーホール船堀、2014 年 10 月 27 日-30 日

2. Tomonori Aikawa, Taisuke Miyazaki, Takayasu Mikuni, Ryuichi Shigemoto, Minoru Wakamori, Masanobu Kano, Masahiko Watanabe, Hidehiro Mizusawa and Kei Watase. Functional role of the cytoplasmic terminal tail of Ca<sub>v</sub>2.1 channel. International Symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014". Tokyo, March 17<sup>th</sup>, 2014.

3. Ishiguro T, Fujikake N, Sato N, Mizusawa H, Wada K, Nagai Y, Ishikawa K. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes neurodegeneration in Drosophila. The 8<sup>th</sup> Brain Research Conference. RNA Metabolism in Neurological Disease. アメリカ合衆国・サンディエゴ、2013 年 11 月 7 日・8 日

4. 萩原純也、森岡勝樹、茂櫛薫、渡瀬啓、水澤英洋、田中博. "Analysis of gene expression patterns in the cerebellum of spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice using RNA-seq", CBI学会 2013 年大会、東京、タワーホール船堀、2013 年 10 月 28 日-31 日

5. Ishikawa K, Obayashi M, Stevanin G, ... (19 名), Durr A, Mizusawa H, Brice A. A transcontinental study on SCA36: expanding the genotype and phenotype. The World Congress of Neurology, Vienna, Austria. 2013 年 9 月 25 日

6. Tomonori Aikawa, Kaoru Mogushi, Kumiko Iijima, Hiroshi Tanaka, Hidehiro Mizusawa and Kei Watase. Early neuroinflammatory response in the cerebellum of SCA6 mouse models. CAG Triplet Repeat Disorders, Gordon Research Conference. Waterville Valley Resort, NH, USA, June 24<sup>th</sup>, 2013.

7. 相川知徳、茂櫛 薫、飯島久美子、田中 博、水澤英洋、渡瀬 啓. Cav2.1 脊髄小脳変性症 6 型モデルマウスの網羅的遺伝子発現解析. 第 36 回日本神経科学大会. 京都. 2013. 6.21.

8. 相川知徳、宮崎太輔、三國貴康、重本隆一、若森 実、狩野方伸、渡邊雅彦、水澤英洋、渡瀬 啓. Ca<sub>v</sub>2.1 カルボキシル末端細胞質内ドメインの病態生理学的意義の検討発表者、第 54 回日本神経学会総会、東京、2013. 5. 31.

9. 新美祐介、高橋 真、大林正人、佐藤望、網野猛志、石黒太郎、石川欽也、水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)における RNA foci 形成の病理学的検討. 第 54 回日本神経学会学術大会、2013 年 5 月 30 日、東京.

10. 太田浄文、石川欽也、大林正人、尾崎 心、柿田明美、高橋 斉、水澤英洋. GCI を形成する多系統萎縮症の oligodendroglia では、TPPP が書くなら消失する. 第 54 回日本神経学会学術

大会、2013年5月30日、東京。

11. Kei Watase, Toshinori Unno, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Minoru Wakamori, Kinya Ishikawa, Hiroko Sasakawa, Hidehiro Mizusawa. Lysosomal contribution to the Purkinje cell degeneration in mouse models of spinocerebellar ataxia type 6. 24<sup>th</sup> Biennial Meeting, International Society for Neurochemistry / American Society for Neurochemistry, Cancun, Mexico, April 21<sup>st</sup>, 2013.

12. 相川知徳、宮崎太輔、三國孝康、重本隆一、狩野方伸、渡邊雅彦、水澤英洋、渡瀬 啓。Cav2.1 カルボキシル末端部位を欠損したマウスの作製。第35回日本神経科学大会。名古屋。2012. 9.18.

13. 山下 力, 李 元哲, 船山 学, 吉野浩代, 富山弘幸, 市川 忠, 江原義郎, 石川欽也, 水澤英洋, 服部信孝. 日本人 Parkinson 病患者における polyglutamine(polyQ)鎖リピート数の調査。第53回日本神経学会学術大会。東京。2012. 5. 25.

14. 大森博之, 原 暁生, 内野 誠, 石川欽也. 脊髄小脳失調症6型と31型合併症例の臨床的特徴について。第53回日本神経学会学術大会。東京。2012. 5. 25.

15. 橋本祐二, 石川欽也, 太田浄文, 新美祐介, 大林正人, 石黒太郎, 佐藤 望, 水澤英洋. 原因未同定優性遺伝性脊髄小脳変性症(SCA)における SCA8 遺伝子異常伸長の頻度。第53回日本神経学会学術大会。東京。2012. 5. 25.

16. 海野敏紀、水澤英洋、渡瀬 啓。Yeast two hybrid 法による Ca<sub>v</sub>2.1 チャンネル C 末端ドメイン相互作用分子の同定。第53回日本神経学会学術大会。東京。2012. 5. 25.

17. 相川知徳、海野敏紀、水澤英洋、渡瀬 啓。SCA6 遺伝子エクソン 47 のスプライスパターンを再現する細胞系の確立。第53回日本神経学会学術大会。東京。2012. 5. 25.

18. Ishikawa K, Dürr A, Klopstock T, Sato N, Stevanin G, Brice A, Mizusawa H. Diverse and unstable pentanucleotide repeats at the spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) locus in Caucasians. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting, The American Academy of Neurology. New Orleans, Louisiana. April 25<sup>th</sup>, 2012.

19. Ota K, Ishikawa K, Mizusawa H. Evaluation of intensity signal in dentate nucleus on T2-weighted imaging to diagnose patients with cerebellar ataxia. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting, The American Academy of Neurology. New Orleans, Louisiana. April 25<sup>th</sup>, 2012.

#### (4)知財出願

##### ①国内出願 (4件)

①発明の名称:FD 薬スクリーニング Molecules, method for screening molecules as medicines for familial dysautonomia

発明者:萩原正敏、吉田優、細谷孝充

出願人:国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日:2013年7月12日(特願 2013-146891)

②発明の名称:スクリーニング方法、タンパク質の不安定性及び/又は安定性を誘導する物質、及び、タンパク質の活性評価

発明者:萩原正敏、喜井勲、細谷孝充、隅田有人、吉田優

出願人:国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日:2012年6月6日(特願 2012-129094)  
出願人:国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学

③発明の名称:抗ウイルス組成物

発明者:萩原正敏、奥野友紀子、細谷孝充、小野木博、吉田優  
出願人:国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社キノ  
ファーマ

日本出願日:2012年3月15日(特願 2012-58340)

④発明の名称:遺伝性疾患の予防・改善剤

発明者:萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田篤史  
出願人:国立大学法人神戸大学 国立大学法人東京医科歯科大学

日本出願日:2010年6月28日(特願 2010-146699)

②海外出願(1件)

1. 発明の名称:Transgenic reporter system that reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing in mammalian organisms.

発明者:Masatoshi Hagiwara, Akihide Takeuchi

出願人:Kyoto university

PCT 出願日:2011年5月31日(PCT/JP2011/003059(国際出願番号))

(5)受賞・報道等

マスコミ(新聞・TV等)報道

① ダウン症の原因遺伝子抑制 2010.10.03 読売新聞2面

② CDK9 阻害剤「FIT-039」はさまざまな DNA ウイルスの複製を阻害する  
従来の抗ウイルス薬はウイルスのタンパク質を薬効標的としているため、薬が効かない「耐性」を獲得したウイルスの出現が臨床現場で問題となっている。萩原グループは、宿主キナーゼ「CDK9」の活性阻害を介した抗ウイルス剤「FIT-039」を見出した。「FIT-039」は広汎な抗ウイルススペクトラムを有し、副作用が少ない性質を持つ。現在京都大学医学部附属病院と連携して臨床研究の準備を進めている。  
掲載誌:朝日新聞(7月9日夕刊 10面)、京都新聞(7月9日夕刊 10面)、産経新聞(7月9日夕刊 8面)、日刊工業新聞(7月11日 17面)、日本経済新聞(7月10日 14面)、読売新聞(7月21日 16面)、科学新聞(8月8日 2面)

## § 5 研究期間中の活動

### 5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2010年2月 20日	CBIR若手インスパイアシン ポジウム(CBIR:脳統 合機能研究センター)	東京医科歯 科大学	100名	東京医科歯科大学の神経 グループの研究発表会で本 研究課題の一部を発表