

「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」  
平成 21 年度採択研究代表者

平成 21 年度 実績報告
------------------

水澤 英洋

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授  
東京医科歯科大学脳統合機能研究センター長

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

## § 1. 研究実施の概要

本研究では脊髄小脳失調症において病態の中核となる小脳プルキンエ細胞変性や障害に関して、RNA 分子発現の異常から個体での発症にいたる病態経路を各種疾患モデルを用いて解明し、治療法を確立することを目指す。本年度はそのスタートにあたり、目的の達成のために各種新規動物モデルやスプライシングレポーター等の研究ツール開発、疾患遺伝子産物相互因子の同定などに重点をおいて研究を進めた。また並行して既存の Sca6-MPI-118Q ノックイン(KI)マウスの解析を行い、また RNA 発現異常の網羅的解析に向けた準備を行った。その結果、SCA6 について、2種類の Sca6 スプライス変異マウスの作製をほぼ終え、KI マウスの病理学的解析から軸索機能障害と SCA6 病態の関与を示唆する知見を得ることができ、SCA31 についても変異遺伝子を過剰発現するモデルマウスの作製に向けた導入遺伝子の構築をほぼ終えるなど着実に研究が進捗した。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「水澤」グループ

- ① 研究分担グループ長:水澤 英洋(東京医科歯科大学、教授)
- ② 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

① 研究分担グループ長:萩原 正敏(東京医科歯科大学、教授)

② 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

(3) 田中グループ

① 研究分担グループ長:田中 博(東京医科歯科大学、教授)

② 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

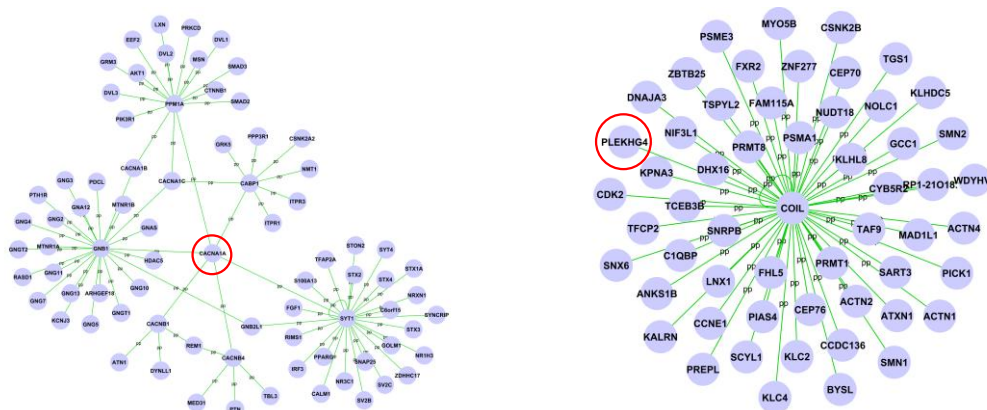
### § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### 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 (田中・水澤グループ)

予備実験として、正常マウスの小脳プルキンエ細胞層および海馬錐体細胞層をレーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション(LCM)で分離して mRNA を抽出し、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って、遺伝子発現の比較を行った。その結果、予想通り Long-term depression (長期抑圧)に関わる遺伝子群はプルキンエ細胞で発現が亢進し、逆に Long-term potentiation (長期増強)に関わる遺伝子群は海馬錐体細胞層で亢進していること、さらに、プルキンエ細胞特異的・錐体細胞特異的な遺伝子発現変動を確認することができた。

#### SCA 責任遺伝子産物のインタラクトーム解析(田中・水澤グループ)



脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)の責任遺伝子産物である  $Ca_v2.1$  チャネルと相互作用する因子を同定するために、ヒト  $Ca_v2.1$  チャネル C 末端領域を bait として yeast two hybrid 法にてヒト胎児脳由来のライブラリのスクリーニングを行った結果、2種類の因子の同定に成功した。そのうちの一種については、免疫沈降法により、相互作用の確認に成功した。本因子の過剰発現や発現低下は神経変性の原因となることが既に報告されており、SCA6 変異による相互作用の変化が脊髄小脳失調症 6 型の病態と関わっている可能性がある。また、脊髄小脳変性症(SCA)に関わる遺伝子群の相互作用(インタラクトーム)解析を、予備的に行った。3 つのタンパク質相互作用データベース(HPRD、BioGRID、BIND)の情報を統合したものを使用し、電位依存性カルシウムチャネル  $Ca_v2.1$  (CACNA1A)および Puratrophin-1 (PLEKHG4)と相互作用する遺伝子群を抽出した(前頁図)。今後、得られたネットワークに対してマイクロアレイの発現変動をマッピングし、中心的な役割を果たすサブネットワークを同定することを検討している。

#### SCA 病態を改善できる化合物の探索 (萩原グループ)

SCA12 は CAG、SCA8 は CUG、SCA10 は ATTCT 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が、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の立ち上げを行った。並行して、Vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子をモデルとして、スプライシングパターンを低分子化合物で制御して疾患治療へ応用するという本研究のコンセプトを試行した (文献 1)。

#### $Ca_v2.1$ 遺伝子スプライス制御失調の SCA6 病態への関与 (水澤グループ)

SCA6 患者小脳において、 $Ca_v2.1$  遺伝子のエクソン 47 領域の選択的スプライシングによって生ずる2種類のアイソフォーム(MPI,MPc)の発現比率に変化が認められるが、その病態への関与については明らかでない。同領域の選択的スプライシングの病態への関与を明らかにするために、MPIのみを発現するスプライス変異ノックインマウス(MPI-11QKI)、及び MPcのみを発現するスプライス変異ノックインマウス( $Ca_v2.1$ -Ctm-KO)の作製を行い、このうち MPI-11QKI マウスについてはホモ接合体を得た。

#### SCA6 モデルの病理学的解析に基づく病態解明 (水澤グループ)

我々は最近脊髄小脳失調症 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鎖を有する変異  $Ca_v2.1$  カルシウムチャネルを小脳プルキンエ細胞に発現し、比較的若齢より小脳失調を発症し、する Sca6-MPI-118Q マウスの作製に成功し、その病理学的解析を行ってきた。Sca6-MPI-118Q KI マウス PC 細胞で、若齢より軸索の腫大、非リン酸化ニューロフィラメントの異常蓄積、リン酸化タウの異常等が認められた。これらの結果は軸索機能障害が SCA6 病態に重要な役割を果たすことを示唆する。また Sca6-MPI-118Q KI マウス PC 細胞内凝集体のマーカー解析を行った。

## スプライスレポーターモデルによる SCA スプライス制御機構の解明とその修飾 (萩原・水澤グループ)

スプライシング・モニターベクターを導入した細胞株を樹立して、RNA 結合タンパク質の cDNA および siRNA ライブラリー化合物ライブラリーを整備し、スクリーニングの準備を行った。

## SCA31 のモデルマウス作製

SCA31は TGGAA, TAGAA, TAAAA などの 5 塩基繰り返し配列が伸長し、遺伝子 BEAN のイントロン内に挿入されていることを発見し報告した。特に TGGAA が重要で、患者脳内では UGGAA 配列などが凝集している。我々は患者の遺伝子変異部分を RNA として過剰発現するマウスを計画し、本年度、導入直前まで完成させた。また、培養細胞系も準備した。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Ladomery MR, Bates DO (2010). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms - a novel therapeutic strategy for angiogenesis. **J Biol Chem** 285, 5532-5540; doi: 10.1074/jbc.M109.074930