

「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

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

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(PC)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。本年度は昨年度に引き続き、各種新規動物モデル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 Sca6-MPI-118Q ノックイン(KI)マウスの RNA 発現異常の網羅的解析に向けて、まず小脳由来 RNA を用いた cDNA マイクロアレイ解析を開始した。これらの結果、SCA6 について、2種類の Sca6 スプライス変異マウスの作製を終え、一部解析を開始し始めた。一方小脳cDNA マイクロアレイ解析から、SCA6 PC 変性と関連する候補分子経路に関する知見が得られ、さらに KI マウスの病理学的解析からはリソゾーム機能の SCA6 病態への関与を示唆する知見を得ることができた。さらに我々はこれまでに、蛍光色の変化により非常に鋭敏にかつ迅速にスプライシングの状態を反映するスプライシング・モニターシステムの開発に成功している。本年度は、脊髄小脳変性症の病態の鍵となるRNA結合蛋白の解明を進めるとともに、上記スプライシング・モニターシステムを応用して、SCA6 スプライシング・モニターベクターの開発を行い、このスプライシング・モニター細胞株を樹立中である。この SCA6 スプライシング・モニター細胞を用い RNA 結合タンパク質の siRNA ライブラリーや化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、制御因子や治療薬候補化合物を探索する準備を進めている。SCA31 についても変異遺伝子を過剰発現するモデルマウスについて F₀ マウスの作製に成功し、リピート RNA と結合能を有する候補蛋白を同定す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 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科、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 (京都大学大学院医学研究科、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 (東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部、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)

6 週齢 Sca6-MPI-118Q ホモマウス(雄、C57BL バックグラウンドに7回バッククロス済み)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った。moderated t-statistics 法を用いて解析した結果、 $p < 0.01$ かつ発現倍差が 1.5 倍以上となる 378 遺伝子を同定した。また、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(6)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。さらに、タンパク質相互作用ネットワークのデータを用いて、発現変動遺伝子間の関係を可視化し、検討を行った。これらの遺伝子群に特に着目し、治療ターゲット遺伝子として更なる検証実験を行うべき候補のスクリーニングを進めた。また、Sca6-MPI-118Q マウスにおけるスプライシング異常のターゲット遺伝子探索のため、エクソンアレイや次世代シーケンサー(RNA-seq)を用いた解析(7)の準備を行った。

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)

前年に引き続き、脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)の責任遺伝子産物である Cav2.1 チャンネルと相互作用する因子を同定するために、ヒト Cav2.1 チャンネル C 末端領域を bait とする yeast two hybrid スクリーニングを行った結果、昨年度同定した 2 因子に加えて計 7 因子の同定に成功した。

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。

Cav2.1 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 では伸長 CAG リピートは選択的スプライシングを受けるエクソン(Cav2.1 遺伝子のエクソン 47)に存在する。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)の機能分化、病態への関与に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(Cav2.1-Ctm-KO)の作製と解析を行った。MPI-11QKI ホモマウスは生後 6ヶ月まで明らかな運動機能異常は示さず、生後 7 週齢マウスの小脳の病理学的解析では明らかな異常は認められなかった。ホモ Cav2.1-Ctm-KO については、ビデオ映像による行動の分析で、行動の緩慢さや軽

度の失調歩行を認めた。これらの結果は、*Cav2.1* C 末端部が何らかの重要な生理機能を果たし、SCA6 では変異によるそれらの機能変化が病態に関わる可能性を示唆する。今後さらに詳細な解析を進める予定である。

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)

昨年度、我々は *Sca6*-*MPI-118Q* KI マウスの PC 細胞内凝集体がユビキチン陰性でかつ種々のリゾームマーカーと共局在することを見出したが、今年度は凝集体形成や PC 変性におけるリゾ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、その解析を開始した。現在までに二重変異マウスでは、*MPI-118Q* KI マウスと比較して PC 変性がさらに顕著となり、運動失調も悪化することが明らかとなっており、変異チャンネルの蓄積や分解に *Ctsb* が関与している可能性等について現在検討を加えている。

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)

脊髄小脳変性症では、いくつかの遺伝子に疾患特異的な異常なスプライシング制御が観察されており、神経系特異的なスプライシング制御の異常が病態に関わると考えられている。この異常なスプライシングの制御機構を明らかにすることにより、疾患メカニズムの解明と、さらにこの異常を是正する事により治療に結びつく可能性が高い。これまで我々は、蛍光色の変化により非常に鋭敏にかつ迅速にスプライシングの状態を反映するスプライシング・モニター系を開発し、この系を用いてまだ謎の多いスプライシング制御機構の解明に従事してきた(3, 4, 5)。今研究では、脊髄小脳変性症 6 型 (SCA6) 原因遺伝子のスプライシングモニター系の開発と、それを用いた疾患メカニズムの解明と治療薬の探索を目的としている。

研究方法 今年度は、脊髄小脳変性症の病態の鍵となる RNA 結合蛋白の解明を進めるとともに、上記スプライシング・モニターシステムを応用して、SCA6 スプライシング・モニターベクターの開発を行い、このスプライシング・モニター細胞株を樹立中である。この SCA6 スプライシングレポーターが正常の細胞で内在性の *CACNA1A* 遺伝子のスプライシング制御を忠実に反映するかどうかを確認した後、RNA 結合タンパク質の siRNA ライブラリーおよび cDNA ライブラリーを導入して病態の鍵となる制御因子の検索と進め、化合物ライブラリーのスクリーニングを行って治療薬候補化合物を探索する準備を進めた。

研究結果・結論 エクソンの選択的使用に応じて GFP/RFP 等の異なる蛍光タンパク質が発現するようレポーターミニジーンをデザインしており、生体内における細胞ごとの選択的スプライシングパターンの解析が可能である。最近、種々の技術的改良を重ね哺乳類の組織特異的あるいは発生時期依存的なスプライシングを可視化することができるようになった(特許出願済み)。このスプライシングレポーター系は、ウイルス感染によって変化するスプライシングや癌特異的なスプライシングなどの制御機構解析や、スプライシングパターンに影響を与える化合物のスクリーニング等に適用可能である。今年度は、このスプライシング・モニター系を用いて、PKM のスプライシング制御因子を同定することに成功し、このスプライシングモニターの有効性を検証することができた。また

スプライシングを制御する化合物スクリーニングの検索も行い、脊髄小脳変性症 6 型治療薬の開発も可能であることが判明した。この SCA6 スプライシングレポーターを組み込んだ細胞を樹立して疾患モデルとしての機能を確認した後、RNA 結合タンパク質の siRNA ライブラリーや化合物ライブラリーのスクリーニングを行うことで、制御因子の同定による疾患メカニズムの解明と治療薬候補化合物探索による疾患治療薬のシーズの探索を行い、脊髄小脳変性症 6 型治療薬の開発を進める予定である。

SCA31 のモデルマウス・培養細胞の作製(水澤グループ)

SCA31 の病態に最も重要と考えられる BEAN 遺伝子挿入型遺伝子変異を、RNA として過剰発現するコンストラクトを完成させ、マウス受精卵にマイクロインジェクションし、12 月末にそのファウンダーマウス(F0)を得た。また、対照型コンストラクトを発現するマウスも平成 23 年 2 月に得た。正しく導入された F0 を得た後、目的遺伝子を発現するマウスを得た。また BEAN 遺伝子の機能解析の目的で、同遺伝子のノックアウトコンストラクトの作製を進めた。

また、変異遺伝子 RNA を安定発現する培養細胞株を作製した。年度内に本細胞での RNA 発現を確認したが、凝集体の形成までは確認できなかったため、来年度に持ち越した。凝集体が形成されれば萩原グループと協力し、凝集阻止化合物の探索を行う。この他、出生直後マウスから小脳 Purkinje 細胞を培養することに成功し、培養小脳組織での遺伝子発現の解析を行った。今後、SCA 遺伝子の導入による Purkinje 細胞などの小脳由来の神経細胞での遺伝子発現変化の解析に発展する計画である。

SCA31 変異遺伝子結合蛋白の探索(水澤グループ)

変異遺伝子 UGGAA に結合する蛋白を、プルダウンアッセイ、MALDI-TOF 質量分析法で探索し、結合能を有する候補蛋白を数種類発見した。今後結合性の確認と脳内での発現、患者脳での意義の検討を進める。また、より存在量の少ない結合蛋白の探索を進める。

SCA の下等動物モデルの作製と解析(水澤・萩原グループ)

まず SCA31 変異遺伝子を導入した一過性培養細胞で確かに RNA 凝集体が形成されることを確認した。次に変異遺伝子が蛋白に翻訳される可能性を検証している。次にトランスジェニック・ショウジョウバエ作製へと進める。RNA 結合タンパク質の役割や制御機構の保存性がよくないことが判明したため、線虫を用いた SCA31 病態モデルは、哺乳類の細胞株を用いた病態モデルを作製する方法に切り替える事として、現在開発中である。

マウス子宮内胎児エレクトロポレーション法を用いた SCA 遺伝子産物の機能解析

SCA 変異遺伝子をマウス子宮内胎児に導入する実験を重ねた結果、大脳皮質をターゲットに行った場合でも胎児への導入効率がとても低いことが判明した。このため、小脳 Purkinje 細胞への導入はさらに困難と予想され、導入効率を上げる工夫を進めた。

MSA のモデルマウス作製とその解析

本年度まず MSA の初期病態に重要と考えられる p25 α を認識するウサギ・ポリクローナル抗体を作製した。免疫組織化学では本抗体はヒト脳白質における乏突起神経膠細胞の細胞質と、一部核を認識した。マウスに p25 α を過剰発現するコンストラクトを完成させた。またラット・モノクローナル抗体を作製するため、今年度はレコンビナント p25 α 蛋白を ELISA で認識する血清を作製した。次年度にトランスジェニックマウスの作製と免疫組織化学的にも認識する抗血清をスクリーニングする。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. 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. *Neuropathology* Jul 27. Epub, 2010.
2. 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 α 1A 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)
3. Sims-Lucas, S., Cusack, B., Baust, J., Eswarakumar, V.P., Masatoshi, H., 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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.

7. Tanaka H. Omics-based medicine and systems pathology. A new perspective for personalized and predictive medicine. Methods Inf Med. 2010;49:173-85.

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)