

「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

H23 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

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. 研究実施体制

(1) 水澤グループ

① 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)

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 主たる共同研究者: 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 主たる共同研究者: 田中 博 (東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所、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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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)

前年度に引き続き、6 週齢 Sca6-MPI-118Q ホモマウスの小脳 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た。

また、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 667 プローブセットを抽出した。これらの遺伝子群を、ヒトのタンパク質間相互作用ネットワークにマッピングしたところ、EGFR やフィブロネクチン(Fn1)を中心とした遺伝子群に発現低下が見られ、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、細胞死が起こ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。これらの遺伝子群を含め、いくつかの有用な遺伝子について、qRT-PCR により再現性が確認されたものを中心に、今後より詳細な検討を進めていく予定である。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、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を行い、マイクロアレイで発現変動の見られた遺伝子を中心にスプライシング異常の可能性を検討した。

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)

前年度までに Y2H 法で同定した相互作用因子のうち Pin1, Aco2 については免疫沈降法による相互作用の確認が不調に終わった。現在残りの因子についての解析の準備を進めている。

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) の解析を行ってきた。MPI-11QKI ホモマウスは生後2年まで明らかな異常は認められなかった。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) については、1)ホモマウスが生後週齢より運動失調を呈すること。2)小脳で明らかな PC 変性は認められず、何らかの機能的変化が運動失調の原因であることが判明した。これらの結果は、Cav2.1 C 末端部が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。現在さらに詳細な病理学的解析をすすめて、本マウスにおける Cav2.1 チャネルプレシナプス局在の異常やインタラクター分子の発現異常の有無を検討するとともに電気生理学的に小脳シナプス伝達異常の解析を行なう準備を進めている。

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 細胞内凝集体形成や PC 変性におけるリソゾ

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、その解析を行なった。その結果、二重変異マウスでは、MPI-118Q KI マウスと比較して変異 $Ca_v2.1$ の蓄積が亢進し、PC 変性・運動失調が悪化したことからリソソーム機能・変異 $Ca_v2.1$ のリソソーム蓄積が SCA6 の病態に関与することが明らかとなった。

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)

SCA6 遺伝子 MPI 型及び MPc 型選択的スプライシングを蛍光色の変化によりモニターできるスプライシング・モニター細胞株の (Ex47-PC12) 樹立に成功した。Ex47-PC12 ではほぼ PC 細胞と同様の発現比率の MPI 型及び MPc 型スプライシングを示した。加えて、伸長 CAG リピートを発現し、MPI 型選択的スプライシングを Venus(緑色) で *in vivo* でモニターできる、MPI レポーターマウスの作製を行ない、F1 マウスを得た。また萩原グループは、新規に開発したスプライシングレポーターモニターシステムの有効性を検討するため、家族性自律神経失調症の原因遺伝子 IKBKAP の exon20 とその両側の flanking intron を組み込んだスプライシング・モニターベクターを構築した。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。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(3)のスクリーニングを行なった結果、複数の RNA 結合蛋白が IKBKAP の exon20 のスプライシングを制御しており、その発現量がスプライシングのパターンを規定していることなどが判明した。このように、新規スプライシングモニターシステムの有効性が明らかとなったので、脊髄小脳変性症 6 型 (SCA6) 原因遺伝子 P/Q-型 $Ca_v2.1$ カルシウムチャネル遺伝子 (CACNA1A) のエクソン 47 領域を含む領域を、独自のスプライシング・モニターベクターに組み込み、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 のモデルマウス・培養細胞の作製 (水澤グループ)

本年度は SCA31 の原因の変異であるモデル細胞を確立した。変異である様々な 5 塩基繰り返し配列の複合体のうち、主要な毒性成分が予想通り(TGGAA)_n であることを培養細胞での細胞死実験とヨーロッパ人での SCA31 頻度解析(6)によって明らかにした。次に安定化培養細胞株を作製し、(TGGAA)_n の発現系でのみ、患者と同様の RNA の異常構造物(Foci)が出現することを確認した。さらに、患者脳の病理学的解析では、小脳プルキンエ細胞の萎縮が軽度である細胞で、(TGGAA)_n の転写産物に対応する(UGGAA)_n で構成される RNA foci が多く形成されていることを発見した(Niimi Y. et al.論文投稿準備中)。これは RNA foci の形成がプルキンエ細胞変性の比較的初期に起きていることを示唆している。この細胞モデルでの遺伝子発現プロファイリングを開始した。平成 24 年度初頭に解析を完成させ、別途同定したインターラクターの関与を探る。

一方、モデルマウス作製は昨年度作製した(TGGAA)_n を含む変異型および正常対照リピート型

の2種類について、それぞれが lox p 配列で挟まれた floxed マウスを樹立した(変異マウス4ライン、対照マウス6ライン)。震災の影響があり繁殖がスムーズでないが、なんとか F1 世代の樹立を数ラインで達成した。さらに、プルキンエ細胞で選択的に導入遺伝子が発現するように L7/pcp2-Cre マウスとの掛け合わせを準備している。

SCA31 変異遺伝子結合蛋白の探索(水澤グループ)

昨年度から今年度にかけて、(UGGAA)_n および対照リピート配列に対する結合蛋白を、TOF-MASS 解析を用いて行い、(UGGAA)_n 特異的、もしくは同配列優位に結合するインターラクターを6種類同定した。これらはいずれも RNA 結合蛋白であることが知られており、SCA31 の病態への関与が有望視される。上記培養モデル細胞で、RNA foci と共局在することも確かめ、目下培養細胞での細胞死への経路にどのように関与するかの仮説を立てるため、培養細胞での網羅的 RNA 発現解析を行っている。また、後述するショウジョウバエでの細胞死への関与を解明する研究をスタートさせた。

SCA のショウジョウバエモデルの作製と解析(水澤・萩原グループ)

萩原グループとの協議を経て、今年度ショウジョウバエに変異型(UGGAA)_n および対照型リピートをそれぞれ過剰発現させたトランスジェニック・ショウジョウバエを作製した。目下複眼に発現させた範囲では、(UGGAA)_n を発現する複数のラインで明瞭な細胞障害が確認されたが、対照型では全く異常が見られず、ヒトでの遺伝子解析結果を追認する結果を得ている。さらに、ハエでの細胞障害の程度は、(UGGAA)_n のリピート長と相関していた。現在、RNA の毒性が主体であるのか、変異 RNA からタンパクが発現するために毒性が起きるのか、あるいは、インターラクターの関与がどの程度あるのかを解明するため、追加のショウジョウバエモデルの作製を進めている。また、細胞障害を抑制するコンパウンド探索を、萩原グループおよび永井義隆国立精神神経研究医療センター室長と共同して行う計画である。

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

種々の方法を試みたが、遺伝子導入効率が悪く細胞死の解析研究に不適切と判断せざるを得ず、いったん断念することにした。

MSA のモデルマウス作製とその解析

我が国でも世界的にも最も頻度が高いプルキンエ細胞変性を来す多系統萎縮症(MSA)について、その根本原因は不明であるものの病態の上流に位置すると考えられるオリゴデンドログリア細胞特異的蛋白 p25 α (別名 TPPP)について研究を進めた。今年度同蛋白に対するモノクローナル抗体を完成させた。また、本研究課題で前年度作製したポリクローナル抗体も用いて、患者脳での同蛋白発現を免疫組織化学的に検索している。

一方、p25 α の過剰発現モデルマウスの作製を試みた。本年度 p25 α の floxed マウスの樹立を

目指したが、これまで 3 回マイクロインジェクションによって遺伝子導入を行ったものの、成功せず、来年度引き続き、別施設で導入を試みることにした。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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, T. On experiences of i2b2 (Informatics for Integrating Biology and the Bedside) database with Japanese Clinical Patients' data. *Bioinformatics*. *Bioinformatics*. 2011;6(2):86-90.
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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, Ladomery 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)
6. 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

7. Ohbayashi 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 (*ITPR1*) deletion, the mutation for spinocerebellar ataxia type 15 (SCA15), in Japan screened by gene dosage. *J Hum Genet*, Mar;57(3):202-6. doi: 10.1038/jhg.2012.5. Epub 2012 Feb 9.
8. Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima Y, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama M, Mori O, Eishi Y, 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*, 2012 Mar 7. doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01302.x. [Epub ahead of print]

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)