

「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

H24 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 生体構造医学講座、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 (東京医科歯科大学難治疾患研究所生命情報学 教授) (主たる共同研究者)

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)

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、病態を再現するモデルマウス小脳・プルキンエ細胞由来の RNA を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行っている。

前年度、6週齢 Sca6-MPI-118Q ホモマウス(過伸長 CAG リピートを有し、SCA6 病態を再現し、プルキンエ細胞変性を発症するノックインマウス)⁴⁾ 及び正常ヒト遺伝子をノックインした Sca6-MPI-11Q マウスの小脳 mRNA のマイクロアレイ解析で得られた結果について、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。さらに特に病態の初期変化と関係する遺伝子発現変化を同定するために 5 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(老齢で運動失調を発症する)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。これらの結果は、SCA 病態の初期から、酸化ストレスや Neuroinflammation が亢進していることを示唆しており、今後それらを遺伝学的・薬理的に修飾することで治療につながるかどうか検証するとともに、分泌性因子についてはバイオマーカーとなりうるかどうかの検討を行う。マイクロアレイ解析以外では、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。

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)

相互作用候補分子のうち、Pin1 については培養細胞への一過性過剰発現で相互作用を確認できたが、マウス脳組織での相互作用の確認や他の候補分子の相互作用の確認は不調に終わった。このため、新たなアフィニティ精製用 Cav2.1 抗体の作製と薬剤誘導により Cav2.1 分子を発現す

る新たな細胞株の作製を開始した。

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 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(Ca_v2.1 遺伝子のエクソン 47)に存在する。エクソン 47 開始部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)の機能分化とそれらの SCA6 病態への関与を明らかにするために、今年度は昨年度に引き続いて Ctm-KO マウス(ポリグルタミン鎖とその周辺配列を発現せず、C 末端部が短い MPc 型チャンネルのみを発現するスプライス変異ノックインマウス)の解析を進めた。ホモ Ctm-KO マウスは、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 Sca6 MPI-118Q KI マウスと Ca_v2.1-Ctm-KO の複合ヘテロマウスは、Sca6 MPI-118Q KI マウスと比較して生後 3 ヶ月齢までは行動実験・病理学的解析で明らかな差異を示していない。今後 Ca_v2.1-Ctm-KO マウス小脳の電気生理学的解析を進めて、機能的意義の解明を進めるとともに、Ca ナドメインに着目して解析を進める予定である。

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、このスプライシング制御機構を明らかにする事から、疾患メカニズムの解明と治療への応用を目指す。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・モニターシステムを開発し、スプライシング制御の分子機構の解明に応用している^{2), 5)}。本年度は、昨年度樹立に成功した SCA6 スプライスレポーター細胞株 (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)

を用いて、SCA6 治療薬の取得を目指した化合物のスクリーニングを実施し、1st スクリーニングを行ったところ、1163 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った。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る。このことは当該遺伝子でのスプライシング制御メカニズムと Sca6 遺伝子でのそれが同一の機構を用いていることを示唆しており、今後の Sca6 スプライシング制御機構を理解する一助となる。また、今回用いたライブラリーに含まれる化合物はすべて毒性試験済みの化合物であり、臨床試験に持ち込むまでの時間がおおいに短縮されることが見込まれる。

SCA31 のモデルマウス・培養細胞の作製 (水澤グループ)

SCA31 の原因である 5 塩基リピート(TGGAA)_n は、2 つの異なる遺伝子 BEAN1 (brain expressed associated with NEDD4)と TK2 (thymidine kinase 2)によって異なる 2 方向に転写される。すなわち、(UGGAA)_nと(UUCCA)_nの転写産物が生じる。培養 HEK および PC12 細胞において、コントロールとした(UAGAAUAAAA)_n や(UUUUAUUCUA)_n、および(UGGAA)_nと(UUCCA)_n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)_n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)_nが確かに病態に関係することを示唆する結果を得た²⁾。

モデルマウス作製として、ひとつは BEAN1 のノックアウトマウスを手掛けた。平成 24 年度 9 月に、ターゲットコンストラクトを持ち高い寄与率を示唆するキメラマウスが 3 匹当該研究施設に搬入され、その後野生型マウスとの交配を行っている。しかし、2013 年 3 月の時点でまだノックアウトヘテロマウスを得ていない。

SCA31 変異遺伝子結合蛋白の探索 (水澤グループ)

SCA31 の変異配列と推察している(UGGAA)_nに結合する蛋白を平成 23 年度に 6 つ検出した。それら蛋白(非公開)は、核内である共通する機構に関与している。平成 24 年度はこれらについて培養細胞および患者脳内での発現を検証した。培養細胞では RNA foci との共局在を確認し、現在マイクロアレー解析を終了し、下流効果の検証を行っている。一方、患者脳内でも RNA foci との共局在を確認した。すなわち、(UGGAA)_nの下流分子機構に結合蛋白が関与する際の分子機序が明らかになりつつある。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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.
2. 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.
3. Niimi Y, Takahashi M, Sugawara E, Umeda S, Obayashi M, Sato N, Ishiguro T,

- Higashi M, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K(corresponding author). Abnormal RNA structures (RNA foci) containing a penta-nucleotide repeat (UGGAA)_n in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis. *Neuropathology* 2013, *in press*.
4. 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 (Cav2.1-CTF) aggregate is sufficient to cause cell death. *PLoS ONE*. 8(3): e50121, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0050121. Epub 2013 Mar 7.
 5. 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).
 6. 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).
 7. 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).
 8. 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.).

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)