

「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

H25 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. 研究実施の概要

脊髄小脳変性症6型(SCA6)や31型(SCA31)は本邦で頻度が高い優性遺伝性神経変性疾患で、患者は中年以降に発症する進行性の運動失調を示し、有効な治療法は存在しない。我々はこれらの疾患の病理学的特徴であるプルキンエ細胞死に着目して、そのメカニズムを解明し、治療法の開発を目指した研究を進めてきた。本年度は主に以下のような研究を実施した。

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

SCA6 の病態と関連する遺伝子発現の変化を解明するために、ヒトと同様の変異を有する SCA6 ノックイン(KI)マウスモデルの小脳から mRNA を抽出し、網羅的に解析をおこなった。その結果、SCA6 小脳に特徴的な変化として発症の早期から神経炎症応答に関連する遺伝子の発現が亢進していることが確認できた。そこで神経炎症応答を制御する遺伝子を先天的に欠くノックアウトマウスと SCA6 KI マウスと交配させ、2重変異マウスを作製することにより、神経炎症応答の亢進を抑制することで病態の進行を抑制できるかどうかの検討を開始した。

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

SCA6 の原因は、Cav 2.1 遺伝子のエクソン 47 に存在する CAG リpeat配列の異常伸長である。エクソン 47 の 5' 領域には2つの AG をスプライスアクセプター配列があり、そのため MPI, MPc の 2 つの mRNA 分子種が生じるが、そのうち MPI のみがポリグルタミン (PolyQ) 鎖を有し神経毒性を発揮するチャンネルに翻訳される。従って、薬剤により MPI, MPc の産生比率を MPc 側に偏らせれば病態の進行を抑制することが期待できる。我々は赤色/緑色の蛍光の発現を指標にして、MPI, MPc の産生比率を簡便にモニターできる細胞を樹立し、この細胞を用いて有効な薬剤・化合物の探索を行ってきた。その結果、現在までに2種の候補化合物を同定することができた。今後新たな化合物ライブラリーのスクリーニングを進めるとともに、同定した候補化合物の有効性を他のモデルを用いて検証する。

SCA31 の培養細胞の作製と解析

SCA31 の原因は *BEAN1* 遺伝子及び *TK2* 遺伝子が共有するイントロン領域内の TGGAA リpeat配列を含む複雑な遺伝子配列の伸長である。本年度この領域からの転写産物(UGGAA)_n が細胞モデルにおいて確かに異常な RNA の構造を形成し、さらに細胞死を起こすこと (=細胞毒性を有する) を証明した。

SCA のショウジョウバエモデルの作製と解析

SCA31 で認められる神経細胞死を再現する動物モデルとして、(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、変性や機能障害の再現が確認できた。現在このモデルを利用して、神経毒性を抑制する修飾因子の探索を行なっている。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報

1. 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.
2. 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)
3. 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)_n in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis. *Neuropathology*. 2013 Apr 22. doi: 10.1111/neup.12032.
4. 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.
5. 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/iovs.13-12422.
6. Pozo N, Zahonero C, Ferna'ndez P, Lin~ares JM, Ayuso A, Hagiwara M, Pe'rez A, Ricoy JR, Herna'ndez-Lai'n A, Sepu'lveda JM, Sa'nchez-Go'mez P. "Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *J Clin Invest*. 123(6):2475-87. 2013. (DOI:10.1172/JCI63623)