

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 年度～2010 年度
 課題番号：20591008
 研究課題名 (和文) 神経変性疾患における DNA 修復能の検討と修復促進による治療基盤の確立
 研究課題名 (英文) Repairing DNA damages in neurodegenerative diseases
 研究代表者上野 聡 (UENO SATOSHI)
 奈良県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：40184949

研究成果の概要 (和文)：

若年性劣性遺伝性パーキンソン病 (ARJP) における異常遺伝子培養線維芽細胞では DNA 損傷の蓄積があり、正常 Parkin 遺伝子導入によって培養細胞生存率が向上することが判明した。Parkin が cyclin E を基質とすることを証明し、患者細胞では cyclin E の細胞内含量の上昇によって、細胞周期の制御に変調をきたし、異常中心体を持つ細胞頻度が増加した。これから、患者細胞の発がんリスクも上昇する可能性を示唆した。治療戦略のひとつとして、アンチセンス法によって ARJP 細胞の生存率を向上することができた。さらに、遺伝性小脳失調症 (SCA14) において、ProteinkinaseC γ が常染色体遺伝子小脳失調症の原因遺伝子アプラタキシンのリン酸化を亢進させ、核内欠乏をきたすことを証明した。

研究成果の概要 (英文)：

Parkin gene mutant failed to ubiquitinate cyclin E, leading to cell cycle deregulation. We have uncovered the nuclear pathway by which the Parkin mutant ubiquitinates cyclin E and may thus control the cell cycle, contributing to cell survival. Our observations may provide a molecular basis for the development of an antisense-mediated therapeutic procedure that would be specific, rational, and genetically based. In spinocerebellar ataxia (SCA14), causative gene mutant ProteinkinaseC γ caused to inhibit the nuclear entry of recessive-ataxia-related aprataxin. Decreased nuclear aprataxin increased oxidative stress-induced DNA damage and cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患においては、遺伝子異常にともなう蛋白合成過程の障害についての研究が多いなかで、DNA 損傷の分子機

序は明らかではない。また 遺伝子異常が確認されている種々の神経変性疾患、とくに Parkin 関連パーキンソン病 (ARJP)、SOD1 関連筋萎縮性側索硬化症、

アプラタキシン関連小脳失調症 (EAOH)、ポリグルタミン病である DRPLA (常染色体優性小脳失調症) などの発症機転について、それら各疾患に共通する DNA 修復異常を解明しようとする試みはない。

2. 研究の目的

遺伝性神経変性疾患において、その基盤となる異常の候補として DNA 修復障害に着目し、各種疾患に共通する機序を探索して治療開発への道を拓く。本研究では常染色体劣性遺伝型パーキンソン病 (ARJP)、筋萎縮性側索硬化症 (SOD1) および遺伝性小脳失調症 (SCA14)、眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早期発症型失調症 (EAOH) および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) を対象として、細胞死ストレス存在下で DNA 損傷、損傷細胞の生存と細胞周期の制御、さらに疾患に共通する DNA 修復障害の可能性について検討する。

3. 研究の方法

パーキンソン病異常遺伝子 Parkin に注目して、exon 4 欠失若年性劣性遺伝パーキンソン病 (ARJP) 患者細胞、EAOH (アプラタキシン 689insT)、DRPLA (アトロフィン 1 CAG 67) の各患者由来線維芽細胞に 405nm レーザー照射による DNA 切断、あるいは酸化ストレス下での DNA 損傷の修復機序を探った。

最初に GFP 融合 DNA 修復蛋白のクローニングおよび、DNA 修復をリアルタイムで定量することを検討した。標的修復酵素蛋白の特異的配列を持つプライマーを作製し、HeLa 細胞あるいはヒト神経芽細胞腫 SK-N-MC 細胞より RNA を抽出後逆転写し、fidelity の高いポリメラーゼにより、PCR 増幅、その断片を tag を有する、および tag のない pcDNA3 ベクターに挿入し、全長 cDNA をクローン化した。クローン化された cDNA も同様に dsRed 系や pcDNA3 に挿入した。また、配列をシーケンスにより確認した。

パーキンソン病 ARJP (Parkin exon4 欠失)、筋萎縮性側索硬化症 (SOD1 V7E)、EAOH (アプラタキシン 689insT)、DRPLA (アトロフィン 1 CAG 67) の各患者由来線維芽細胞および年齢性別をマッチさせたコントロール細胞の DNA 修復能をリアルタイムで定量した。405nm レーザーの出力を調節し、DNA 単鎖切断、二重鎖切断、塩基損傷を作製する事ができるが (PNAS 101;13738:2004)、それらは DNA 修復の最終段階として DNA ligase I (単鎖切断、塩基損傷)、ligase III (単

鎖切断)、ligase IV (二重鎖切断) によって切断端が結合し終了する。GFP-または dsRed2/monomer-ligase I, -ligase III, -ligase IV が損傷部位に集積した後、離散・分解を見る事で DNA 修復の終結を観察した。

さらに、遺伝性小脳失調症 (SCA14) において、ProteinkinaseC による常染色体遺伝子小脳失調症の原因遺伝子アプラタキシンのリン酸化について解析した。

4. 研究成果

ARJP における異常遺伝子培養線維芽細胞では DNA 障害ストレス下では DNA 損傷の蓄積があり、正常 Parkin 遺伝子導入によって培養細胞生存率が向上することが判明した。Parkin が cyclin E を基質とすることを証明し、患者細胞では cyclin E の細胞内含量の上昇によって、細胞周期の制御に変調をきたし細胞死にいたることを証明した。

さらに、DNA 修復機構の一つにヌクレチド除去修復がある。モデル DNA 損傷として紫外線誘発の 2 種類のピリミジン 2 量体型損傷をもちいて異常遺伝子培養線維芽細胞を解析したが、この損傷修復には異常を認めなかった。この結果から患者由来細胞では酸化ストレス高感受性はヌクレチド除去修復低下とは無関係であることが判明した。次に、患者由来の細胞周期制御に異常をきたす患者細胞では、酸化ストレスによって異常中心体を持つ細胞頻度が増加した。これから、患者細胞の発がんリスクが上昇する可能性を示唆した。本研究では、ストレス刺激にたいして細胞の「生き残り」を賭けた細胞周期の変動が、逆説的に細胞死を招くという新しい知見を得た。しかしながら、その「生き残り」に成功して、細胞ががん化する可能性も提示した。

つぎに、遺伝子異常が確認されている ARJP にくわえ SOD1 関連筋萎縮性側索硬化症、小脳失調症、ポリグルタミン病に共通する DNA 修復異常の有無について解析を進めた。その結果、遺伝性小脳失調症 (SCA14) において、ProteinkinaseC が常染色体遺伝子小脳失調症の原因遺伝子アプラタキシンのリン酸化を亢進させ、核内欠乏をきたすことを証明した。この事実は、種々の小脳失調症においても、それら基盤には遺伝子アプラタキシンを例とするように共通の遺伝子が関与する可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Asai H, Hirano M, Kiriya T, Ikeda M, Ueno S. Naturally- and experimentally-designed restorations of the Parkin gene deficit in autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 1;391(1):800-5. Epub 2009 Nov 27.
- ② Asai H, Hirano M, Shimada K, Kiriya T, Furiya Y, Ikeda M, Iwamoto T, Mori T, Nishinaka K, Konishi N, Udaka F, Ueno S. Protein kinase C gamma, a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 1;18(19):3533-43. Epub 2009 Jun 26.
- ③ 平野牧人, 森 俊雄, 上野 聡, 総説 神経疾患と塩基除去修復、放射線生物研究、査読有、44 巻、2009、285-293.
- ④ Deng HX, Jiang H, Fu R, Zhai H, Shi Y, Liu E, Hirano M, Dal Canto MC, Siddique T. Molecular dissection of ALS-associated toxicity of SOD1 in transgenic mice using an exon-fusion approach. *Hum Mol Genet*. 査読有, 2008, 17(15):2310-9. Epub 2008 Apr 18. Erratum in: *Hum Mol Genet*. 2009 Feb 1;18(3):594.
- ⑤ Kiriya T, Hirano M, Asai H, Ikeda M, Furiya Y, Ueno S. Restoration of nuclear-import failure caused by triple A syndrome and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 374, 2008, 631-634
- ⑥ Nishiwaki T, Kobayashi N, Iwamoto T, Yamamoto A, Sugiura S, Liu YC, Sarasin A, Okahashi Y, Hirano M, Ueno S, Mori T. Comparative study of nucleotide excision repair defects between XPD-mutated fibroblasts derived from trichothiodystrophy and xeroderma pigmentosum patients. *DNA repair*. 査読有, 7, 2008, 1990-1998.
- ⑦ Kiriya T, Hirano M, Asai H, Furiya Y, Kanbayashi T, Ikeda M, Ueno S. Identification of a nuclear localization signal of XRCC1 overcoming impaired nuclear import in triple A syndrome. *Ann Neurol*. 査読有, 64, 2008, S12.
- ⑧ Asai H, Hirano M, Furiya Y, Udaka F, Morikawa M, Kanbayashi T, Shimizu T, Ueno S. Cerebrospinal fluid-orexin levels and sleep attacks in four

patients with Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 査読有, 2009 May;111(4):341-4. Epub 2008 Dec 20.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Asai H, Hirano M, Kiriya T, Ikeda M, Horikawa H, Ueno S: Spontaneous and Experimental Exon Skipping Restores the Parkin Gene Deficits in Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism. 135th Annual Meeting of the American Neurological Association, September 12-15, 2010, San Francisco, U.S.A
- ② 浅井宏英、平野牧人、桐山敬生、池田真徳、上野 聡: 常染色体劣性遺伝パーキンソンニズムの parkin 機能欠損に対するアンチセンス治療の検討、第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 20 日、東京
- ③ 平野牧人、森 俊雄、池田真徳、浅井宏英、桐山敬生、降矢芳子、上野 聡: DNA 単鎖切断修復蛋白アプラタキシンと神経疾患～常染色体優性・劣性小脳失調症と AAA 症候群～. 第 52 回日本放射線影響学会大会、2009 年 11 月 11-13 日、広島
- ④ Asai H, Hirano M, Ikeda M, Ueno S: Kinase activities of mutant protein kinase C gamma, a protein causative for spinocerebellar ataxia type 14, and neuronal cell death under oxidative stress. The 134th Annual Meeting of American Neurological Association, Baltimore, October 11-14, 2009.
- ⑤ Hirano M, Asai H, Kiriya T, Ikeda M, Furiya Y, Ueno S: Aggregate formation and activities of mutant protein kinase C gamma, a protein causative for spinocerebellar ataxia type 14. The 134th Annual Meeting of American Neurological Association, Baltimore, October 11-14, 2009.
- ⑥ 平野牧人, 浅井宏英, 桐山敬生, 池田真徳, 降矢芳子, 上野 聡: 遺伝性脊髄小脳変性症 14 型の原因となる変異 protein kinase C γ 活性と蛋白凝集の関連. 第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月 20-22 日、仙台
- ⑦ 桐山敬生、平野牧人、浅井宏英、池田真徳、降矢芳子、上野 聡: DNA 修復蛋白 XRCC1 の核局在シグナルを用いた Aprataxin と SOD1 の核内輸送. 第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月 20-22 日、仙台
- ⑧ 浅井宏英、平野牧人、桐山敬生、池田真徳、降矢芳子、上野 聡: 酸化ストレス下における遺伝性脊髄小脳変性症 14 型の原因となる 変異 protein kinase C γ 活性と細胞死の関連. 第 50 回日本神経

- 学会総会、2009年5月20-22日、仙台
- ⑨ 平野牧人、浅井宏英、桐山敬生、池田真徳、降矢芳子、森 俊雄、安井 明、上野 聡：酸化的 DNA 損傷修復系への小脳失調原因蛋白アプラタキシンの機能的関与。第 51 回日本放射線影響学会、2008年11月19-21日、小倉
- ⑩ Hirano M, Asai H, Aoki M, shimada K, Fuiya Y, Kiriyaama T, Ikeda M, Konishi N, Itoyama Y, Ueno S: In Vivo DNA Damage Accumulation in Aprataxin-Related Ataxia. 133rd Annual Meeting of the American Neurological Association, Salt Lake City, UT, September 21-24, 2008.
- ⑪ 平野牧人 上野 聡他 7 名、眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型脊髄小脳失調症における DNA 損傷の蓄積 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 5 月 16 日 横浜

[図書] (計 1 件)

- ① 上野 聡 平野牧人他 41 名：創元社、医療の最先端－奈良医大からの発信－、2008 年、208 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 聡 (UENO SATOSHI)
奈良県立医科大学 医学部 教授
研究者番号：4 0 1 8 4 9 4 9

(2) 研究分担者

森 俊雄 (MORI TOSHIO)
奈良県立医科大学 医学部 研究教授
研究者番号：1 0 1 1 5 2 8 0

(3) 研究分担者

平野 牧人 (HIRANO MAKITO)
近畿大学医学部附属病院 准教授
研究者番号：5 0 3 4 7 5 4 8