

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460074

研究課題名(和文) 遺伝子治療を目標としたCRAGの機能解析

研究課題名(英文) exploration of CRAG gene therapy for neurodegenerative diseases

研究代表者

稲留 涼子 (Inatome, Ryoko)

東京薬科大学・生命科学部・研究員

研究者番号：90408691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは以前、新規GTP結合タンパク質であるCRAGを同定し、CRAGが脊髄小脳変性症の原因タンパク質である異常伸長したポリグルタミンタンパク質(PolyQ)の分解を促進することを明らかにした。さらに、CRAGは転写因子SRFを活性化してc-fos依存的な抗レドックスシグナルを活性化して神経細胞死を抑制することを報告したが、その分子機構は不明であった。私たちはCRAG欠損マウスを作製し、解析を行った。CRAG欠損マウスは生後3週齢で致死を示し、様々な細胞において広範な細胞死が認められた。これらのことよりCRAGが様々な神経変性疾患へ応用への可能性が示されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that CRAG facilitated the degradation of expanded polyglutamine protein via the nuclear ubiquitin-proteasome pathway and suggested that targeted delivery of CRAG may be useful as a gene therapy for neurodegenerative diseases such as polyglutamine diseases. However, the physiological relevance of CRAG in vivo is unknown. Here, we analyzed CRAG KO mice. Both whole-body and neuron-specific CRAG KO mice spontaneously developed severe neurodegenerative phenotypes cell death and lethality, within 1 month of birth. Kainic acid-induced c-fos expression was intensively suppressed in the hippocampus in these KO mice. Furthermore, CRAG interacted with ELK1, a coactivator of SRF, leading to ELK1-dependent SRF-c-fos induction. We conclude that CRAG plays a critical role in neuronal development and survival, at least in part through ELK1-dependent SRF-c-fos activation, and therefore suggesting the usefulness of CRAG gene therapy for neurodegenerative diseases.

研究分野：生化学

キーワード：神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症とはなにか：

脊髄小脳変性症は原因遺伝子の翻訳領域にあるポリグルタミンをコードする CAG リピートが患者において異常に伸長する疾患である。ポリグルタミンが異常に伸長したタンパク質(PolyQ)は変性、凝集し細胞に毒性を与え、細胞死を引き起こす。脊髄や小脳の神経細胞が減少することにより、運動機能に障害が起こり、最終的に死に至る病気である。現在、脊髄小脳変性症の治療法は神経伝達物質の産生を促進することによる症状の緩和が主目的の対症療法であり、症状の原因を取り除く原因療法は確立されていない。CRAG による遺伝子治療は脊髄小脳変性症の原因療法として有効な可能性が高く、今後の研究をさらに進める必要がある。

CRAG による PolyQ の分解促進：

神経回路形成を制御する反発因子セマフォリンのシグナル伝達機構に参与する CRMP5 の結合分子として CRAG(CRMP5-Associated GTPase)は同定された(Inatome et al. J. Biol. Chem. 2000)。CRAG は UV 刺激依存的に核内構造体である PML body のリング状の形態変化が観察された。この PML body のリング状の形態変化が脊髄小脳変性症の患者において観察されることをヒントに CRAG と脊髄小脳変性症の原因タンパク質である PolyQ の関連についての研究が行われた。その結果、CRAG が PolyQ をユビキチンプロテアソーム系で分解促進することが発見された(Qin, Inatome et al. J. Cell Biol. 2006)。

CRAG 遺伝子導入による PolyQ モデルマウスの症状の劇的な改善：

CRAG が生体内で PolyQ を分解促進することを確認するために、小脳プルキンエ細胞に PolyQ を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、ポリグルタミン病モデルマウスを樹立した。CRAG を挿入したレンチウイルスベクターを小脳に注入し、小脳失調症状の改善を指標にその効果を検討した。CRAG の遺伝子導入によりモデルマウスの小脳において、劇的な PolyQ の減少が観察された。また、乱れた小脳のプルキンエ層構造の改善も同時に観察された。さらに、Rotarod 試験によって小脳失調運動の改善が示された(Torashima et al. EMBO R. 2008)。この研究成果は世界で初めての神経変性疾患の遺伝子治療の成功例であり、日本のみならず、世界においてもプレスリリースされた。

CRAG による SRF を介した AP-1 の活性化：

転写因子 activator protein 1(AP-1)は主に c-fos と c-jun のヘテロ二量体(c-fos/c-jun)か c-jun と c-jun のホモ二量体(c-jun/c-jun)から構成される。神経細胞において

c-fos/c-jun が神経細胞の保護に働き、c-jun/c-jun が神経細胞死を誘導することが報告されている。これまでに PolyQ が c-jun を活性化し細胞死を誘導することが報告されてきたが、PolyQ による AP-1 の活性化が神経細胞死もしくは神経細胞の保護に働くかはまだ結論がついていなかった。このような状況下、私達は PolyQ の毒性に対して CRAG が転写因子 SRF を活性化し、c-fos の誘導を起さることを見いだした。CRAG による c-fos の増加は c-fos/c-jun の AP-1 を増加させ、細胞保護に働くことを報告した (Nagashima et al. J. Biol. Chem. 2011)。CRAG による SRF を介した AP-1 の活性化により、CRAG は PolyQ の分解と同時に神経細胞の保護に働くことが解明され、CRAG による遺伝子治療の可能性が大いに高まった。

2. 研究の目的

脊髄小脳変性症は治療法が確立されていない神経変性疾患である。申請者らにより同定された CRAG は脊髄小脳変性症の原因タンパク質である異常伸長したポリグルタミンタンパク質(PolyQ)の分解を促進することが分かった。さらに CRAG は転写因子 SRF を活性化し、c-fos 依存的な AP-1 の活性化をすることで神経細胞保護することが判明した。これらの研究成果により CRAG を用いた遺伝子治療が脊髄小脳変性症の新たな治療法として期待できる。

本申請課題は、CRAG の生体内における役割をより詳細に解明し、脊髄小脳変性症の治療の確立への基盤をつくることを目的とする。CRAG の小脳プルキンエ細胞特異的なノックアウトマウス(小脳 CRAG KO)を作製し、解析を行う。さらに CRAG を様々なウイルスベクターを用いて小脳に発現させる検討を行い、治療に向けた CRAG の導入方法を改善し、CRAG を用いた遺伝子治療の基盤をつくる。

CRAG は PolyQ を分解促進し、神経細胞保護に働くことは *in vivo*、*in vitro* で証明された。しかしながら、CRAG の小脳における生理的な役割はいまだに解明されていない。本申請課題では小脳特異的に CRAG をノックアウトし、小脳における生理的な機能を解明する。これまでの研究成果により、CRAG は変性タンパク質の分解や神経細胞の保護に働くことが判明したので、CRAG を欠損すれば、変性タンパク質の蓄積や細胞死の亢進が期待される。CRAG の発現量の低下が脊髄小脳変性症の一つの要因であることを解明したい。

さらに、これまではレンチウイルスベクターを用いて CRAG を生体の脳に発現させたが、より高い発現を誘導できるウ

イルスベクターの探索を行い、より高い効率の CRAG の遺伝子導入の系を確立し、CRAG による遺伝子治療の基盤をつくる。

3. 研究の方法

小脳プルキンエ細胞特異的な CRAG ノックアウトマウス(小脳 CRAG KO)の作製：現在、私達は CRAG のコンディショナルノックアウトマウスの作製に必要な CRAG 遺伝子が loxP に挟まれた CRAG flox/flox マウスを保持している。CRAG flox/flox マウスと Pcp2 プロモーターに制御された小脳プルキンエ細胞特異的に CRE を発現するマウス(Cg-Tg(Pcp2-cre)3555Jdhu/J)を用いて小脳プルキンエ細胞特異的な CRAG ノックアウトマウス(小脳 CRAG KO)を作製する。小脳プルキンエ細胞で特異的に CRAG が消失できたかを免疫組織染色法、in situ hybridization 法を用いて確認する。

小脳 CRAG KO の組織学的な解析：小脳の構造は生後約 1 ヶ月で成体とほぼ変わらない構造となる。小脳の形成に CRAG が関与するか検討するために、生後 7 日、生後 14 日、生後 1 ヶ月で形態学的解析を行い、CRAG が小脳プルキンエ細胞の分化に関与するか検討する。まずは HE 染色や Nissel 染色を用いて形態学的に野生型と差があるか検討する。次にプルキンエ細胞の樹上突起のマーカーとなる calbindin の抗体で免疫組織染色を行い、樹上突起形成に野生型と差があるか検討する。

小脳プルキンエ細胞の初代培養細胞を用いた解析：小脳プルキンエ細胞をマウスから取り出し、初代培養を行う。レンチウイルスを用いて CRAG をノックダウンすることで神経突起形成に変化が見られるか検討する。また、CRAG をノックダウンした際、細胞死がおきやすいか様々なストレスを与え検討する。

ウイルスベクターを用いた CRAG の遺伝子導入：これまでレンチウイルスを用いて CRAG を生体の小脳に遺伝子導入してきた(Torashima et al. EMBO R. 2008)。しかしながら、臨床試験の実施件数、ウイルス自体の病原性の有無などから判断して、レンチウイルスベクターと比較してアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の方が安全性が高い。まずは AAV2 に GFP を挿入したベクターを使用して、小脳への発現効率を確認する。次に AAV2 に CRAG を挿入したベクターを用いて CRAG の発現量を確認する。

Neuro2A 細胞を用いた CRAG の SRF 活性化メカニズムの解明：これまでの研究で CRAG が転写因子 SRF を活性化し、細胞保護に働くことを報告した(Nagashima et al. J Biol Chem. 2011)。しかしながら、CRAG による SRF の活性化メカニズムの詳細は未だに明らかになっていない。SRF の活性化

メカニズムは主に Elk-1 を介した c-fos や egr1 などを誘導する経路と MAL を介した actin などを誘導し actin dynamics を引き起こす経路が報告されている(Posern et al. Trends Cell Biol. 2006)。CRAG がどちらの経路に関与するかを詳細に解析する。

小脳 CRAG KO の組織学的な解析：加齢したマウスの CRAG が欠損した細胞では変性タンパク質が蓄積し、細胞死が亢進する可能性が考えられる。したがって、生後 6 ヶ月、生後 1 年の形態学的解析、変性タンパク質の蓄積や細胞死を免疫組織染色で観察する。

小脳 CRAG KO の行動解析：小脳 CRAG KO では小脳失調症状以外にもその行動に以上が見られるかもしれない。よって所属機関および外部研究機関の研究者と連携して現在知られている様々な行動解析の試験を行う。

小脳 CRAG KO の運動機能の解析：小脳 CRAG KO では小脳失調症状が観察できると予想される。したがって、マウスの運動機能の rotarod test を行い、小脳 CRAG KO の運動機能を測定する。

小脳 CRAG KO の電気生理学的な解析：小脳 CRAG KO ではプルキンエ細胞が正常な機能を有しているかどうか電気生理学に解析する。

ウイルスベクターを用いた小脳 CRAG KO に CRAG のレスキュー実験：in vivo において小脳に AAV2 を用いて CRAG を発現させ、小脳プルキンエ細胞に CRAG を発現させ、機能解析のレスキュー実験を行う。

小脳プルキンエ細胞の初代培養細胞を用いた解析：小脳 CRAG KO のプルキンエ細胞をマウスから取り出し、初代培養を行う。レンチウイルスを用いて CRAG を発現させ、神経突起形成や細胞死をレスキューできるか検討する。

4. 研究成果

脊髄小脳変性症は治療法が確立されていない神経変性疾患である。私たちは以前、新規 GTP 結合タンパク質である CRAG を同定した。CRAG は、脊髄小脳変性症の原因タンパク質である異常伸長したポリグルタミンタンパク質(PolyQ)の分解を促進することを明らかにしたが、その分機構は不明であった。さらに最近、CRAG は転写因子 SRF を活性化して c-fos 依存的な AP-1 を活性化して神経細胞の生存を高めることを報告したが、その分子機構も不明である。私たちは CRAG 欠損マウスを作製し、解析を行った。CRAG 欠損マウスは生後 3 週齢で致死を示し、様々な細胞において広範な細胞死が認められた。さらにグリオシスが認められ、神経細胞死の痕跡と考えられた。以上の結果より、CRAG は神経細胞の生存に必須の分子であることが明らかとなった。興味深いことに、CRAG は筋萎縮性側索硬

化症の原因遺伝子産物を分解する活性も認められた。したがって、CRAG が脊髄小脳変性症だけでなく、ALS など様々な神経変性疾患に応用できる可能性が示された。また、CRAG による SRF の活性化機構において、CRAG は ELK1 と結合して SRF を活性化することが明らかとなった。

さらに興味深いことには、CRAG は電子顕微鏡解析にて高電子密度を示す核内封入体を形成して、変性タンパク質を毒性の弱い凝集塊を形成することを見出した。この CRAG による核内封入体を形成は生体内においても観察された。この核内封入体は様々なシグナル伝達の場合として働く可能性が示唆されている。以上の結果より、CRAG は神経細胞の生存に必須の分子であることが明らかとなった。興味深いことに、CRAG は筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子産物を分解する活性も認められた。したがって、CRAG が脊髄小脳変性症だけでなく、ALS など様々な神経変性疾患に応用できる可能性が示された。

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 2 件)

- (1) Nagashima, S., Tokuyama, T., Yonashiro, R., Inatome, R., and Yanagi, S.
Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases.
J. Biochem. 155(5), 273-279 (2014)
doi: 10.1093/jb/mvu016
- (2) Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H.M., Fukuda, T., Matsushita, T., Inatome, R., and Yanagi, S.
MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2.
Mol. Cell 51, 20-34 (2013)
doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.023

[学会発表](計 13 件)

- (1) Tokuyama, T., Nagashima, S., Matsushita, N., Takeda, K., Inatome, R., and Yanagi, S.: Generation and Analysis of MITOL Conditional Knockout Mice. The International Symposium on Mitochondria 2013. 2013, 11/7, Tokyo
- (2) 長島 駿, 杉浦 歩, 徳山剛士, 武田啓佑, 稲留涼子, 柳 茂: Role of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial dynamics and diseases. 86 回日本生化学会大会 2013 9/11. 横浜
- (3) Nagashima, S., Takeda, K., Konishim, T., Inatome, R., and Yanag, S.: Role of

MITOL in neuron. 11th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine ASMRM 2014, 2014, 11/14-15, Taipei

- (4) 柳 茂, 福田 敏史, 稲留涼子, 長島駿: CRAG による SRF 活性化を介した神経細胞の生存シグナル機構 第 37 回日本神経科学学会大会. 2014, 9/11, 横浜
- (5) 柳 茂, 徳山剛士, 武田啓佑, 稲留涼子, 長島 駿: ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL による MAM 制御機構と破綻による疾患 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム「膜局所場研究と医療イノベーションとの接点」. 2014, 10/15, 京都
- (6) 長島 駿, 稲留涼子, 柳 茂: 神経回路形成関連分子 CRAG による生存シグナルと神経変性疾患への応用 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム「病態メカニズムへのオートファジーの多様な関与」. 2014, 10/18, 京都
- (7) 柳 茂, 徳山剛志, 武田啓佑, 稲留涼子, 長島駿: ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL による老化制御機構 第 36 回基礎老化学会シンポジウム 日本基礎老化学会—日本ミトコンドリア学会 Joint Meeting「ミトコンドリアと老化の接点を考える」. 2014, 10/25, 東京
- (8) 武田啓佑, 長島 駿, 徳山剛士, 稲留涼子, 柳 茂: MITOL による小胞体-ミトコンドリア接着の制御と細胞死 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会 セクション 2「ミトコンドリアと酸化ストレス」. 2014, 12/3, 福岡
- (9) 坪井健吾, 福田敏史, 佐藤愛梨花, 谷本悠祐, 稲留涼子, 柳 茂: CAMD1 遺伝子ノックアウトマウスにおける学習・記憶の行動学的解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014, 11/27, 横浜
- (10) 高橋智彦, 福田敏史, 上原茉莉, 佐藤真李子, 稲留涼子, 柳 茂: CAMD1 ノックアウトマウスにおける脳内モノアミンレベルおよび抗うつ・不安様行動の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014, 11/27, 横浜
- (11) 玉井 勇, 長島 駿, 福田敏史, 稲留涼子, 柳 茂: CRAG によって形成される MitoTracker 陽性の核内封入体の解析 BMB 2015 第 88 回日本生化学会大会合同大会・第 38 回日本分子生物学会年会. 2015, 12/4, 神戸
- (12) 福田敏史, 高橋智彦, 稲留涼子, 柳 茂: CAMDI ノックアウトマウスにおける脳内モノアミンと情動行動. Brain monoamine and emotional behavior in CAMDI-knockout mice. 第 38 回日本神経科学大会. 2015, 7/29, 神戸

- (13) 玉井 勇、長島 駿、福田敏史、稲留
涼子、柳 茂：C-RAG によって形成さ
れる MitoTracker 陽性の核内封入体の
解析 BMB 2015 第 88 回日本生化学
会大会合同大会・第 38 回日本分子生物
学会年会. 2015, 12/3, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲留 涼子 (INATOME RYOKO)
東京薬科大学・生命科学部・研究員
研究者番号：90408691

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：