

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860665

研究課題名(和文) 運動ニューロン疾患におけるエピジェネティクス異常の分子機構解明と治療法開発

研究課題名(英文) Epigenetic mechanism on the pathogenesis of motor neuron disease

研究代表者

近藤 直英 (Kondo, Naohide)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20725527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)は成人発症の神経筋変性疾患で、遺伝子内のCAG繰り返し配列の異常伸長により形成された異常タンパク質が運動ニューロンに集積し様々な転写障害を起こすことが分かっている。本研究はこの転写障害の原因として、エピジェネティックな修飾であるDNAメチル化の異常が遺伝子発現の不当な抑制を来しているのではないかという仮説を検証するものである。その結果、SBMAモデルマウス脊髄運動ニューロンにおいてDNAメチル化酵素1(Dnmt1)が異常発現していること、DNAメチル化酵素阻害剤であるRG108を細胞モデルおよびSBMAモデルマウスに投与することで病態が改善することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is an adult-onset neuromuscular disease caused by the expansion of a CAG repeat within the first exon of androgen receptor (AR) gene. DNA methylation is the fundamental silencing machinery for several genes with a CpG-rich promoter. The hypothesis of this study is an abnormal DNA hypermethylation in the CpG island of several gene promoters contributes to the transcriptional dysfunction of SBMA. Immunohistochemistry analysis revealed that DNA methyltransferase 1(Dnmt1) expression level of spinal motor neuron in SBMA model mouse was up-regulated compared with that of wild type mouse. RG108, a DNA methyltransferase inhibitor, improved the cell viability of the SBMA model cells. Intraventricular injection of RG108 also mitigated the mortality and motor dysfunction of the model mice. These results indicate that pharmacological blockade of DNA methylation is a therapeutic candidate for SBMA.

研究分野：神経内科学

キーワード：球脊髄性筋萎縮症 エピジェネティクス DNAメチル化 DNAメチル化酵素 DNAメチル化阻害剤 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの運動ニューロン疾患は成人以降に発症することから、その病態には環境因子が強く関わっていると考えられる。エピジェネティクスは遺伝子そのものの変化を伴わずに遺伝子発現を制御する生体に備ったメカニズムで、環境因子によりダイナミックに変化することが知られており、その主体は DNA メチル化とヒストンアセチル化である。近年、神経疾患の病態におけるエピジェネティクスの役割が注目されつつあるが、運動ニューロン疾患におけるエピジェネティクスの異常、特に DNA メチル化の異常についてはほとんど未解明な点が多い。DNA メチル化が遺伝子発現を制御する機序は、遺伝子プロモーター領域に CpG アイランドという CG 配列の集まった部位がある場合、この部位の C (シトシン) がメチル化されると当該遺伝子の発現が強く抑制されるというメカニズムである。

SBMA は成人発症の神経筋変性疾患で、神経および筋肉が進行性に変性を受ける難病である。運動ニューロン変性に関しては、アンドロゲン受容体遺伝子内の CAG 繰り返し配列の異常伸長により形成された異常タンパク質が脊髄前角の運動神経細胞に集積することが病態に重要な役割を果たしている。SBMA では原因となる遺伝子変異があるにもかかわらず発症までに数十年を要することからより環境因子やその介在点としてのエピジェネティクスが病態に強く関与している可能性が考えられる。さらに過去の研究において SBMA では異常タンパク質の集積により神経細胞において様々な転写障害が起こっていることが報告されているが、この転写障害の原因として DNA の異常メチル化が起こっているのではないかと仮説を着想した。

2. 研究の目的

SBMA における運動ニューロン変性の原因のひとつである転写障害の起こるメカニズムとして脊髄運動ニューロンにおいて DNA メチル化異常が認められるか否かを検証すること、また異常な DNA メチル化を是正する薬剤による治療効果を解析すること、さらには DNA メチル化異常やその治療薬のターゲットとなる遺伝子を同定し、実際に SBMA の病態に重要な役割を果たしている遺伝子であるかを確認することを目的に研究を行う。

まずは SBMA モデルマウスを用いて脊髄運動ニューロンにおける転写障害の原因として DNA メチル化異常が起こっているか否かを検証する。DNA メチル化の指標である 5mC (5 メチルシトシン) や DNA メチル化酵素である Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の神経細胞での発現を経時的に解析することで病気のどの時期からどのような機序で DNA メ

チル化異常が発生するのかを明らかにする。また DNA メチル化を制御する薬剤の治療効果を検証するために、本研究では DNA メチル化酵素阻害剤である 5-aza-dC および RG108 の SBMA モデル細胞やモデルマウスに対する治療効果を解析する。治療効果を認めた場合は DNA メチル化阻害剤がどの遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランド内の DNA メチル化を阻害したのかを同定し、また実際に同定されや遺伝子の発現が 5-aza-dC や RG108 投与により回復するか否かを検証する。さらに同定された遺伝子が SBMA の病態にどのような役割を果たしているかを検証する。

3. 研究の方法

まず SBMA の主な病変部位である脊髄前角運動ニューロンにおいて DNA メチル化が過剰になっているか否か、また DNA メチル化を誘導する各種 DNA メチル化酵素の発現が過剰になっているか否かを検証するために、SBMA モデルマウスおよび野生型マウス脊髄組織の病理標本を、抗 5mC、抗 Dnmt1、抗 Dnmt3a、抗 Dnmt3b 抗体を用いて免疫組織化学を行い、各週齢における脊髄運動ニューロンの DNA メチル化の程度および DNA メチル化酵素の発現変化を比較解析した。さらに DNA メチル化測定キットを用いて、SBMA マウスおよび野生型マウスから抽出した DNA の DNA メチル化の程度を定量した。次に汎 DNA メチル化酵素阻害剤である 5-aza-dC および RG108 を段階的な濃度で SBMA モデル細胞に投与し、WST-8 アッセイを用いて細胞活性を解析した。さらに細胞実験でより効果の高かった RG108 については、2 週間持続投与が可能な浸透圧ポンプを使用し、発症前の 6 週齢から 8 週齢にかけて SBMA マウス脳室内へ持続投与した。マウスの解析は発症前、脳室内投与前の 6 週齢から 1 週間おきに体重、握力、ロータロッドなどのデータを取り評価した。RG108 治療実験で得られたマウスサンプルについては、さらに免疫組織化学やウエスタンブロット、定量 PCR を行い病理学的、生化学的解析を行うとともに、運動ニューロン疾患において転写障害が起こることが知られている複数の既知の分子について発現量の変化を確認した。また、コントロール治療として生理食塩水を投与した SBMA マウスと RG108 を投与した SBMA マウスの脊髄組織から抽出したメッセンジャー RNA を用いて cDNA マイクロアレイを行い、網羅的に遺伝子発現の変化を解析し、DNA メチル化阻害剤 RG108 により遺伝子発現が上昇する遺伝子を同定した。

4. 研究成果

野生型マウスと比較して SBMA モデルマウス脊髄運動ニューロン核において Dnmt1 の発現が亢進していることが分かった (図 1)。一方で Dnmt3a および Dnmt3b の発現

には有意な差は認められなかった。

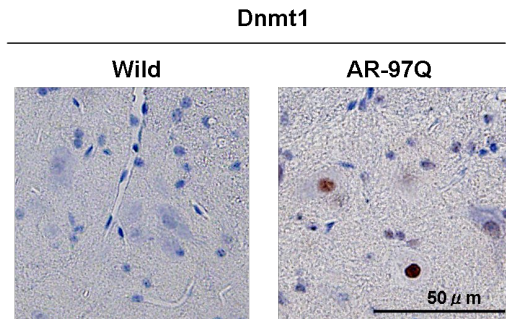


図1 . SBMA モデルマウス(AR-97Q)脊髄前角運動ニューロン核内では野生型マウス(Wild)に比べてDnmt1が高発現している。

また、SBMA モデル細胞を 5-aza-dC および RG108 で処理すると両薬剤ともある濃度以上になると細胞活性が有意に改善することが示された(図2)。さらにRG108を投与した SBMA モデル細胞から抽出したタンパク質サンプルを用いてウエスタンブロット解析を行い DNA メチル化酵素のうち特にDnmt1 の発現が抑えられていることを確認した。

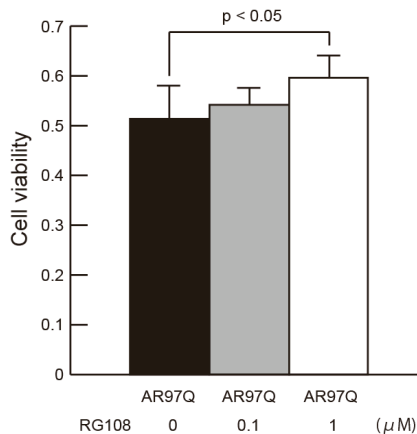


図2 .WST-8 アッセイにてRG108 処理により SBMA モデル細胞の細胞活性が有意に改善することが示された。

次に浸透圧ポンプを用いて SBMA モデルマウス脳室内へ RG108 を発症前である 6 週齢から 2 週間持続投与したところ、マウスの運動機能および体重減少の有意な改善を認めた(図3)。また治療を行ったマウス脊髄から抽出したサンプルのウエスタンブロットによりRG108がDnmt1の発現を抑制していることが確認された(図4)。さらにRG108治療群の脊髄組織とコントロール SBMA マウスの脊髄組織から抽出したタンパク質サンプルを用いて、まずは SBMA マウスにおいて発現の抑制が起こっていることが知られている各種ヒートショックプロテイン(Hsp)の発現変化を解析したところ、コント

ロール治療 SBMA マウスの脊髄に比べてRG108 治療 SBMA モデルマウス脊髄ではHsp70 の発現量が有意に上昇していることが確認された。さらに確認のため本研究のサンプルを用いて野生型マウス脊髄と SBMA モデルマウス脊髄における Hsp70 の発現量を比較したところ、SBMA モデルマウス脊髄では野生型に比べ Hsp70 の発現量が低下していることが確認された。以上の結果はHsp70 の発現が SBMA になることで抑制され RG108 治療を行うことで回復することを示唆しており、本研究の仮説に合致する変化であると考えられた。しかし、このデータをもとにコントロール治療 SBMA マウスとRG108 治療 SBMA マウスから抽出したDNA を定量性の高い DNA メチル化解析であるパイロシーケンス解析にかけたところ、Hsp70 および Hsp70 の発現を誘導する転写因子である Hsf-1 のプロモーター領域の CpG アイランドには有意な DNA メチル化変化が無いことが判明した。この結果からHsp70 はRG108 治療により有意に発現が上昇するものの、そのメカニズムは Hsp70 のプロモーター領域 CpG アイランドでの DNA メチル化変化ではなく、他の遺伝子の DNA メチル化変化の二次的な変化であると考えられた。

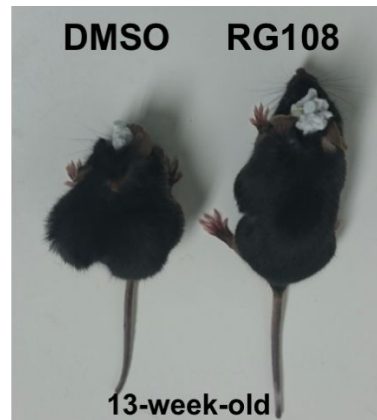


図3 . RG108 を脳室内投与した SBMA モデルマウス(右)はコントロール治療 SBMA マウス(DMSO)に比べて体重減少が抑制された。

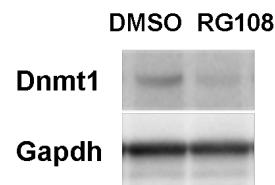


図4 . RG108 を脳室内投与した SBMA モデルマウス脊髄ではコントロール治療 SBMA マウス(DMSO)脊髄に比べて Dnmt1 の発現量が抑制されていた。

次にコントロール治療群と RG108 治療群の脊髄組織から抽出したメッセンジャーRNAを用いて cDNA マイクロアレイを行い RG108 治療により発現が有意に上昇する 16 の遺伝子を同定した。同定した 16 の遺伝子について、野生型マウス、コントロール治療 SBMA マウス、RG108 治療 SBMA マウスの 3 群の脊髄組織からメッセンジャーRNA を抽出し定量 PCR を行い、野生型と比較してコントロール治療 SBMA マウスで発現量の低下、つまり転写障害を示唆する変化を認め、さらに RG108 治療により cDNA マイクロアレイの結果と同様遺伝子発現の上昇、つまり転写障害の回復を示唆する変化がみられた遺伝子を絞り込んだ。さらに各種データベースを利用して、絞り込んだ遺伝子のうち、実際にプロモーター領域に CpG アイランドを有することが確認された遺伝子を DNA メチル化解析対象とした。

cDNA マイクロアレイにて同定した 16 の遺伝子から最終的に絞り込まれた複数の遺伝子については、実際に遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドにおける DNA メチル化が変化しているか否かをメチル化 PCR および、より定量性のある DNA メチル化解析であるパイロシーケンス解析にて分析を行った。また同時にプロモーター領域 CpG アイランドに DNA メチル化変化が確認された遺伝子については SBMA モデル細胞を用いたノックダウン実験および過剰発現によるレスキュー実験を行い SBMA の病態における役割を検証した。

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 4 件)

1. Ding T, Adachi H, Katsuno M, Sahashi K, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Sobue G. BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, induces mutant ataxin-1 degeneration through the activation of heat shock factor-1. **Neuroscience** 327:20-31,2016.
doi:10.1016/j.neuroscience.2016.03.064 査読有

2. Ding Y, Adachi H, Katsuno M, Hung Z, Jiang YM, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Funakoshi H, Nakamura T, Sobue G. Overexpression of hepatocyte growth factor in SBMA model mice has an additive effect on combination therapy with castration. **Biochem Biophys Res Commun** 468:677-683, 2015.
doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.015 査読有

3. Sahashi K, Katsuno M, Hung G, Adachi H, Kondo N, Nakatsuji H, Tohnai G, Iida M, Bennett CF, Sobue G. Silencing neuronal mutant androgen receptor in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. **Hum Mol Genet** 24:5985-5994, 2015. doi:10.1093/hmg/ddv300 査読有

4. Kondo N, Ito Y, Yamashita H, Azuma F, Nokura K, Yasuda T, Sobue G. Hemodialysis-related portal systemic encephalopathy. **Intern Med.** 54:1113-1117, 2015.
doi:10.2169/internalmedicine.54.0267 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Sahashi K, Iida M, Nakatsuji H, Tohnai G, Sobue G. Role of aberrant DNA methylation in the pathogenesis of spinal and bulbar muscular atrophy. 第 8 回 NAGOYA グローバルリトリート, あいち健康プラザ, 愛知県 知多郡, 2016.2.12.

2. 近藤直英, 勝野雅央, 足立弘明, 佐橋健太郎, 飯田円, 中辻秀朗, 藤内玄規, 祖父江元. DNA メチル化阻害剤による球脊髄性筋萎縮症の治療法開発. 第 33 回日本神経治療学会総会, 名古屋国際会議場, 愛知県 名古屋市 2015.11.26-28.

3. 近藤直英, 勝野雅央, 足立弘明, 佐橋健太郎, 飯田円, 中辻秀朗, 藤内玄規, 祖父江元. DNA メチル化阻害剤(RG108)による遺伝性運動ニューロン疾患治療. 第 5 回名古屋大学, 生理学研究所合同シンポジウム, 生理学研究所, 愛知県 岡崎市 2015.9.19.

4. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Sahashi K, Iida M, Nakatsuji H, Tohnai G, Sobue G. Epigenetic treatment of polyglutamine-induced motor neuron disease. 第 56 回日本神経学会学術大会, 朱鷺メッセ, 新潟県 新潟市 2015.5.20-23.

[図書](計 1 件)

1. Nakai Akira (Ed.), Chapter11 Kondo Naohide, Katsuno Masahisa, Riku Yuichi, Sobue Gen. Heat Shock Factor, Chapter 11 HSF Inhibits the Progression of Age-Related Neurodegenerative Diseases. Springer, 2016, 292(213-242)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

近藤 直英 (Kondo ,Naohide)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 20725527

(2)研究分担者 なし