

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19591001

研究課題名 (和文) Tdp1 ノックアウトマウスを用いた神経変性機構の解明

研究課題名 (英文) Pathogenesis of SCAN1, analysis of Tdp1 knockout mice

研究代表者

高嶋 博 (HIROSHI TAKASHIMA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号 80372803

研究成果の概要：

我々は、末梢神経障害と小脳失調を示す疾患 (SCAN1) の原因として、TDP1を同定した。TDP1は、DNAの転写や複製時に働く酵素であり、とくに一本鎖DNAの修復に関与している。本研究は、この原因遺伝子Tdp1の欠失マウスを解析し、神経変性を明らかにしようとするものである。その結果モデルマウスには、明らかな神経症状の発症はみられず、DNA障害性の抗癌剤に対して強い過敏性があった。さらに、SCAN1患者変異(His493Arg)の有害性も確認した。一本鎖DNA修復障害による神経変性の一機序について解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科

キーワード： (1) 脊髄小脳変性症 (2) ニューロパチー (3)SCAN1
 (4) DNA 修復 (5) 神経変性 (6)ノックアウトマウス
 (7) TDP1 (8) 一本鎖 DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

我々は、Charcot-Marie-Tooth 2型の Motor and sensory neuropathy と小脳失調を示す疾患 (spinocerebellar ataxia with axonal

neuropathy: SCAN1) の原因として、Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1:TDP1) を同定した。本疾患は、小脳症状と軸索型

neuropathy を伴う疾患で、脊髄前角細胞、後根神経節細胞、プルキンエ細胞などの大型の神経細胞の変性が推定されている。TDP1 は、DNA の転写や複製時に働くトポイソメラーゼ I 関連の酵素であり、DNA に結合したトポイソメラーゼを、DNA から取り除く酵素が TDP1 である。TDP1 は、DNA の修復機構の異常、特に Single strand break repair(SSBR)の XRCC1 complex として塩基除去修復 (Base excision repair(BER))の一員として働き、さらにトポイソメラーゼ以外の SSBR においても働くことが、明らかとなってきた。これまでの研究で Tdp1 ノックアウトマウスの病態の一部が判明しているが、より詳細な検討が必要であり、今回の検討となった。さらに本研究は、SCAN1 とその原因 TDP1 を通じて、SSBR 関連の類縁疾患の神経変性のメカニズムの解明に重要な役割を果たすであろう。

2. 研究の目的

TDP1 ノックアウトマウスモデルの解析および SCAN1 患者の TDP1 遺伝子変異(H493R)の特殊性について解析し、SCAN1 の発症機構を総合的に検討する。

3. 研究の方法

TDP1 異常症 SCAN1 のノックアウトモデルによる解析マウスの作製は、Bay Genomics 社の ES cell line XD105 が用いられ、XD105 ES cell は、*Tdp1* のイントロン 11 に pGT1Lxf 配列が導入され、exon 12 以降の発現を抑制し、活性中心の半分が欠落するように設計された。ノックアウトマウスモデルは、体重測定、運動能力、電気生理学的解析（坐骨神経の振幅および潜時の測定）、病理学的検索—小脳、脊髄、末梢神経の病変の存在確認。神経系やそれ以外の部位の病理学的異常の検出をおこなった。また、Topoisomerase I を阻害し、single strand breaks (SSB) をつくる CPT-11、

フリーラジカル産生により single strand break (SSB), double strand break (DSB) をつくる Bleomycin、Topoisomerase II を阻害し、DSBをつくる etoposide の投与を行い、その影響を観察した。さらに SCAN1 患者皮膚培養細胞への camptothecin(CPT)の影響を enzyme assay で、ノックアウトマウス由来 mouse embryonic fibroblasts(MEFs)への TDP1 H493R 発現の影響を Alkaline comet assay により検討した。

4. 研究成果

(1) Tdp1 ノックアウトモデルの解析

P0, P270 期のマウス Wild type, ノックアウトマウスについて検討したが、体重、脳の重量に、差は認めなかった。組織学的にも、神経細胞に明らかな異常は認めていない。また、ノックアウトモデルはコントロールに比し、CPT-1, Bleomycin 投与により、優位に臓器障害と運動障害、致死性を認めた。Etoposide では、差はみられなかった。

(2) SCAN1 患者皮膚培養細胞への camptothecin(CPT)の影響

SCAN1 患者において TDP1H493R-DNA complex の増加を認めた。

(3) Alkaline comet assay(H493R の DNA 損傷への影響)

ノックアウトマウス由来 MEFs に H493R TDP1 を発現させることにより、CPT 投与時に mean comet moment の増加を認め、より single strand DNA break が蓄積していることが示唆された。

考察：我々が TDP1 の異常が、SCAN1 の原因となることを報告して以来、H493R 以外の遺伝子異常の症例は報告されていない。それゆえ、我々は TDP1 H493R が特殊な negative/toxic

な作用を持つのではないかと考え検討した。実際、Tdp1 ノックアウトマウスモデルにおいては長期間明らかな異常兆候が見いだせず、loss-of-function のみでは明らかな発症はみられなかった。一方、SSBR 阻害の抗癌剤に対しては明らかな過敏性があり、発症はしないもののノックアウトマウスは SSBR システムの問題があり、潜在的な異常があることは確認できた。

われわれは、SCAN1 患者皮膚培養細胞で H493R TDP1 における DNA-TDP1 複合体の蓄積を確認し、comet assay で Tdp1 null の状況下での TDP1 H493R の存在が single strand break の蓄積を加速させることを確認した。SCAN1 はこの酵素活性の低下という 1 面と、TDP1H493R が長く DNA に結合し DNA 修復を阻害するという特殊な異常が重なることにより、発症することが推定され、このことが常染色体劣性遺伝病において引き起こされているということから、通常の常染色体優性疾患にみられる dominant negative や toxic mutation ではなく、また loss-of function でもない新病態ということで、このような例を” recessive neomorphic mutation” と名付け報告した。本研究では、ニューロパチーや小脳失調症の病態の解明だけでなく、新しい遺伝子メカニズムの可能性も示した。

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 6 件)

- (1) Hirano R, Takashima H, Okubo R, Okamoto R, Maki Y, Ishida S, Suehara M, Hokezu Y, Arimura K. Clinical and

Genetic Characterization of 16q-Linked Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxia in South Kyushu, Japan. **J Hum Genet**, 査読有り 2009; in press ePub

- (2) Yuan J, Takashima H, Higuchi I, Arimura K, Li N, Zhao Z, Shen H, Hu J. Genetically confirmed patients with Merosin-deficient congenital Muscular dystrophy in China. **Neuropediatrics**, 査読有り 39; ,2008, 264-267.

- (3) 高嶋 博 シャルコー・マリー・トゥース病の現状と展望; **Charcot-Marie-Tooth病の病態と治療** 基礎医学的に見た, 難病と在宅ケア 査読無し 14巻6号, 2008, 40-44

- (4) 高嶋 博 遺伝性ニューロパチーの診断と病態 **Peripheral Nerve 末梢神経**, 査読無し 6, 2007, 145-151

- (5) 高嶋 博 有村公良 遺伝性ニューロパチーの進歩 **Clinical Neuroscience** 査読無し 25(7) 2007, 752-754

- (6) Hirano R, Interthal H, Huang C, Nakamura T, Deguchi K, Choi K, Bhattacharjee MB, Arimura K, Umehara E, Izumo S, Northrop JL, Salih MA, Inoue K, Armstrong DL, Champoux JJ, Takashima H, Boerkoel CF. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? **EMBO J**. 査読有り 2007 26(22):4732-43

[学会発表] (計4件)

- (1) 平野隆城、高嶋 博ら *TDP1*
(Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I) 異常症SCAN1とその病態解析 -A model of recessive neomorphic mutation?- 厚生労働省 精神・神経疾患研究委託 難治性ニューロパチーの病態に基づく新規治療法の開発 2007年12月5日 東京
- (2) 高嶋 博 神経生理診断医に必要な Charcot-Marie-Tooth病の分類と遺伝子診断 第37回日本臨床神経生理学会講演 2007年11月21日 宇都宮
- (3) 高嶋 博 遺伝性ニューロパチーの診断と病態 第18回日本末梢神経学会学術集会 教育講座 2007年8月25日 弘前
- (4) 高嶋 博 分子生物学 -遺伝性ニューロパチーの展開- 第48回日本神経学会総会 第4回生涯教育セミナー 2007年5月15日名古屋

[図書] (計1件)

高嶋 博 有村公良: 中外医学社, *Annual Review 神経 2007*
常染色体性劣性遺伝形式の末梢神経障害および小脳失調症を示す疾患一; 2007 208-213

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高嶋 博 (TAKASHIMA HIROSHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 80372803

(2) 研究分担者

有村公良 (ARIMURA KIMIYOSHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 20159510

(3) 連携研究者

梅原藤雄 (Fujio Umehara)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号 20271140

(4) 研究協力者

平野隆城 (Ryuki Hirano)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・研修登録医

中村友紀 (Tomonori Nakamura)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生

岡本裕嗣 (Yuji Okamoto)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・研修登録医

橋口昭大 (Akihiro Hashiguchi)
鹿児島大学・大学院医学研究科・大学院生

Cornelius F. Boerkoel
British Columbia 大学・医科遺伝学・准教授