

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09335

研究課題名(和文)変異RNAリピート分子が起こす神経変性疾患の病態解明

研究課題名(英文) Exploring a pathogenic mechanism underlying neurodegenerative disorders caused by mutated RNA repeat

研究代表者

石川 欽也 (ISHIKAWA, Kinya)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30313240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症31型(SCA31)の病態を解明し、治療法の開発の鍵を見出すため、TK2からの産物(UUCCA)_nに焦点を当て、(UUCCA)_n結合蛋白「F」が関与する異常RNA代謝を探索した。RNAseqによる網羅的RNA発現解析を行った結果、確かに遺伝子挿入箇所に一致したリピートが得られており、患者の異常配列が発現していることが想定される結果であった。そのうえで、結合蛋白Fが制御する22遺伝子・25か所のエクソンで異常なsplicingが起きている可能性について検証するところまで至った。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) is caused by the presence of a penta-nucleotide repeat (TGGAA)_n in an intron shared by two genes, BEAN1 (brain expressed, associated with NEDD4) and TK2 (thymidine kinase 2). The critical repeat (TGGAA)_n is expressed as (UGGAA)_n in BEAN1 direction. In situ hybridization shows that abnormal RNA structures (RNA foci) in SCA31 patients' Purkinje cell nuclei consist of (UGGAA)_n. In this study, we undertook RNA expression analysis focusing on TK2-transcripts in RNA-seq data. We also examined protein F that was identified to bind with (UUCCA)_n, the TK2-direction mutant repeat. We found subtle protein F mislocalization in transgenic mice expressing (UUCCA)_n. Conventional RNA seq and exon array from human samples suggested only a mild splicing abnormality. Therefore, a single molecule RNA seq analysis was undertaken from human samples. Twenty-two genes whose splicing is regulated by protein F will be first analyzed for mis-regulation.

研究分野：神経内科学

キーワード：遺伝子 脳 神経疾患 RNA

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症には様々な疾患が含まれており、常染色体優性遺伝型、すなわち脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) では多くの原因が同定された。このうち脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) は本邦の SCA 中、第 3 または 4 位の頻度を有す神経変性疾患で、高齢発症かつ小脳 Purkinje 細胞 (PC) にほぼ限定した細胞死を示す (Neurology, 2005)。申請者らは全国多施設の神経内科専門医のご協力を得て、2009 年にこの疾患の原因を同定した。それは、第 16 番染色体長腕に位置する 2 つの遺伝子、*BEAN* および *TK2* が共有するイントロン領域に存在する 2.5~3.8kb の 5 塩基繰り返し配列の挿入である (Am J Hum Genet, 2009)。この挿入配列のうち、(TGGAA)_n だけが患者と健常者とで異なる配列であることから、これが SCA31 の原因と言える。(TGGAA)_n は、*BEAN* と *TK2* が互いに反対方向に転写されるため、2 つの変異転写産物 (UGGAA)_n および (UUCCA)_n として発現することで病態を起こすと考えられる。我々は *BEAN* の産物 (UGGAA)_n に結合する蛋白を複数見出し、そのうちの蛋白「A」は患者脳内で (UGGAA)_n が形成する異常な RNA 高次構造体 (RNA foci) と共局在することを発見した。最近、(UGGAA)_n はアミノ酸に翻訳され、患者 PC 細胞質に凝集していることと、ショウジョウバエではこの (UGGAA)_n が毒性を示し、その制御方法も発見した (研究開始当初当時投稿準備中、研究期間中に誌上掲載)。しかし、(UGGAA)_n 過剰発現マウスの症候は軽微で、蛋白 A は患者 PC 細胞内で局在を変えておらず、(UGGAA)_n と蛋白 A が関係する機序の他に、重要な機序がある可能性が推定できる。

一方、申請者らは *TK2* の転写産物として発現する (UUCCA)_n の結合蛋白も複数同定した。その中の結合蛋白「F」は、PC で欠乏すると、全く別の PC 細胞変性による小脳性疾患をヒトで起こす。さらに、患者脳での RNA-seq と RT-PCR で、この結合蛋白 F が制御する 3 つの下流遺伝子に、スプライス異常を検出した。このため、(UUCCA)_n と蛋白 F が SCA31 の病態に関与している可能性がある。今後、どの(あるいは複数の)スプライス異常が PC 細胞障害を来すのかを究明し、治療法探索にも応用したい。そこで、もし (UUCCA)_n をプルキンエ細胞に過剰発現させて下流の分子機序が究明でき、患者脳にもそれと同じ現象が確認できれば、SCA31 の病態の謎がかなり把握できることになる。

2. 研究の目的

(UUCCA)_n の病態への寄与度を解明するため、(UUCCA)_n を過剰発現するマウスを完成させ、その表現型を解析して変異 RNA の毒性を検証する。脳内での遺伝子発現の異常 (スプライス異常と発現量変動) を明らかにする。

3. 研究の方法

別研究で着手し本研究で引き続き研究する (UUCCA)_n を過剰発現するマウスを完成させるとともに、患者脳とモデルマウス脳における RNA 発現異常を RT-PCR 法や in situ hybridization 法を用いて検証する。また本研究では主に蛋白 F に対する免疫組織化学的検証を行い、RNA 高次構造異常 (RNA foci) との関係性を調べる。さらに、患者脳でのスプライス異常を microarray (exon array) と RNA seq で検証する。

BEAN 方向の産物 (RNA) に対する結合蛋白 A のプルキンエ細胞での低下があるか、別研究で途中まで開発したプルキンエ細胞での蛋白 A の conditional KO マウスを維持し、同蛋白 A の発現低下が生じる時期とその時点でのプルキンエ細胞脱落を検証する。そして、その成果を応用して可能ならば蛋白 F の低下が起きる場合の RNA 発現異常を、RNA seq の結果から導き出せるか試みる。

また、SCA31 の患者脳では (UGGAA)_n と (UUCCA)_n の両方が発現しており、モデル動物では得られにくい真の RNA 発現異常がみられるはずである。しかし、SCA31 患者脳ではプルキンエ細胞が相当脱落しており、患者脳を用いることの方法論的な限界も存在する。このようなことから、これまで得られた剖検脳の中で最も病理学的変化が弱い患者の小脳を用いて、long read の RNA-seq を実施し、splice 変異がどのように起きているかを検証することにした。特にこれまでの研究結果から splice 異常を起こしている候補遺伝子や蛋白 A、蛋白 F それぞれがスプライシングを制御する遺伝子に着目して、患者脳での long read RNA-seq を行う。

4. 研究成果

本研究では (UUCCA)_n を過剰発現するマウスでの蛋白 F に関する発現解析を実施した。その結果、蛋白 F は同マウスでは局在変化を示すものの非常に軽微であり、2 歳齢に近い高齢マウスで解析しても、蛋白 F の局在は大きな変化を起こしていなかった。このことは、患者脳での変化とは異なる結果であった。RNA foci と蛋白 F の共局在については、確かに共局在するものもあれば、共局在が不明瞭なものも見られた。

このマウスの行動解析を別研究課題で行ったが、表現型は非常にマイルドであった。このことから、十分な量の蛋白 F の隔離 (sequestration) が起きていないために、症状が軽微にとどまっている可能性も残った。患者での罹病年限を考慮すると、患者での局在変化が長年の経過で起きている可能性も考えられる。このようなことを考えると、モデルマウスでの所見が直ちに蛋白 F の関与を否定するものではないと思われ、慎重に研究を重ねて異議を検討する必要があると思われた。

患者脳での microarray によるスプライス

異常の検証については、これまでに3つの遺伝子について確かにスプライス異常が起きている可能性がみられた。ただし、その異常が病態にどの程度関与するかは、同遺伝子のノックアウトモデルなどがなく、直ちに推定できるものではなかった。今回の研究でさらに3つの遺伝子についてスプライス異常が起きている可能性が示唆された。このため、以前に実施した100塩基のリード長での結果で対応するものがあるかを調べ、また、蛋白Fによる制御を検証した。しかし、いずれの遺伝子でもスプライス異常を肯定できなかった。患者脳でのmicroarrayの結果に戻ると、患者の個体差や部位による違いを反映しているバリエーションの範囲である可能性も示唆された。以上のようなことから、100塩基長のRNA-seqの限界も感じられたため、3年目にlong read RNA-seqを実施することを着想した。

一方、発現量の変動について着目したところ、45個の遺伝子において2倍以上の発現の変動(低下・上昇)を同定した。このうち、発現低下を示す遺伝子は、すでに他の脊髄小脳変性症の原因遺伝子として知られている遺伝子も複数含まれていた(ITPR1, CACNA1Gなど)。発現上昇をきたしている遺伝子は、神経免疫にかかわる分子や酸化ストレス応答に関わる遺伝子群が複数検出された。このうち、我々はZNF遺伝子ファミリーの遺伝子発現上昇を見出した。定量的RT-PCR法でもmicroarrayの結果と同じく発現上昇を認めた。この遺伝子がコードするZNF蛋白に対する抗体が市販されていたため、それを用いて実施した患者脳での免疫組織化学的検索では、プルキンエ細胞では発現が弱く、周辺の小型神経細胞でプルキンエ細胞より強く染色された(図1)。

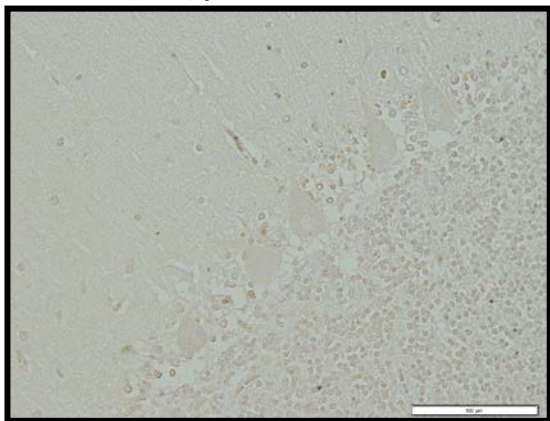


図1 ZNF蛋白に対するSCA31患者小脳での免疫組織化学。淡い染色性が顆粒細胞やプルキンエ細胞層の小型細胞核に見られる。

このようなことから、小脳変性によって、他の神経細胞でのZNF遺伝子の発現亢進が起きている可能性が示唆された。このZNF遺伝子は、他の神経疾患ではほとんど報告がないため、高い新規性が考えられ、SCA31で特有の所見である可能性も考えられた。したがって、今後はより多くの剖検脳を用いてのqRT-PCRを実施し、有意差がある所見かどうかを検証することにした。確認された場合、病態への関与や創薬のシーズとしての手掛かりになることが期待される。

BEAN方向の変異遺伝子(UGGAA)_nに結合する蛋白Aが、どのようにSCA31の病態に関与するかについて、プルキンエ細胞でのみ蛋白Aがノックアウトされるconditional KOマウス(蛋白AとL7-Creのダブルトランスジェニックマウス)を作製し、蛋白Aがプルキンエ細胞でだけ脱落することによって、同細胞がどの時期にどのように変性するかを検証した。図2が対照マウスである。

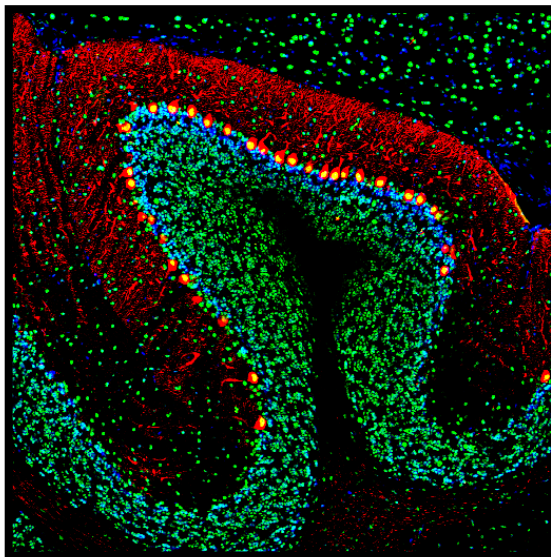


図2 遺伝子A floxedマウス(32週齢マウス)の小脳組織像。蛋白A(緑)、calbindinD28k(赤)、Hoechst(青)。多数あるプルキンエ細胞(赤)の核に蛋白Aが認められる。

緑が「蛋白A」、赤が小脳においてはプルキンエ細胞に特異的なマーカーになる「calbindinD28k」、青がヘキスト(核染色マーカー)である。32週齢の対照マウスでは、明確なプルキンエ細胞の脱落はない。一方、生後34週齢のcKOマウスでは、明瞭にプルキンエ細胞の脱落がみられた(図3)。

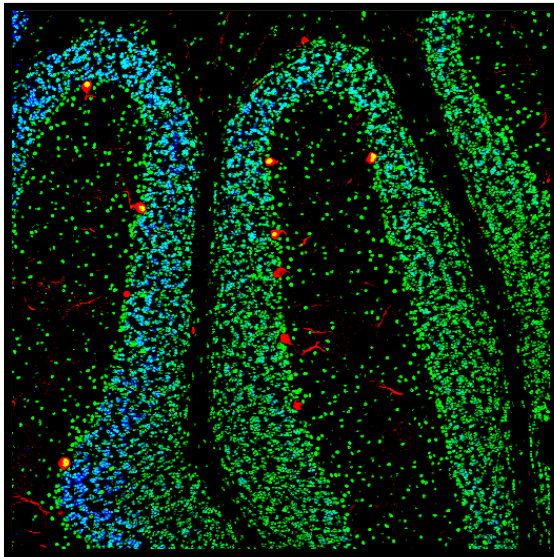


図3 遺伝子Aのプルキンエ細胞でのコンディショナル・ノックアウトマウス(34週齢). 残存プルキンエ細胞数が著明に減少している。

また、プルキンエ細胞の減少を反映して歩行障害を呈するに至っていた。一方、4週齢の組織検査では、プルキンエ細胞のマーカーである calbindin D28k の染色性は、明確な異常を見出せず、わずかに focal な異常を呈している可能性が残る程度であった。

この結果を受けて、生後8週齢と16週齢程度で6匹ずつ対照型と cKO マウスを準備し、詳細な行動解析とマウス小脳プルキンエ細胞層での RNA 発現解析を実施することにした。順次交配を実施し、genotype 決定後、歩行解析を実施するところで研究機関の終了となった。

一方研究期間中に、別研究の延長でショウジョウバエの複眼および神経細胞にそれぞれ (UGGAA)_n を発現させると、細胞障害を起こし、複眼では器官形成異常や複眼変性を、神経系に発現させるとショウジョウバエの行動能力低下を認めた。複眼変性をきたすショウジョウバエと、(UGGAA)_n 結合蛋白である蛋白Aを過剰発現するショウジョウバエとを掛け合わせると、(UGGAA)_n の毒性が明瞭に緩和される成果を認めた。この成果を Neuron 誌に掲載した(文献①)。

以上の成果から、蛋白AがSCA31に関与する病態として、以下の2つを考えた。1つ目は(UGGAA)_nに蛋白Aが結合することによってプルキンエ細胞では相対的な蛋白Aの低下状態になり、cKOマウスで見られた状況のようなプルキンエ細胞変性を来してSCA31発症に至るといふ仮説である。患者脳での蛋白Aに対する免疫組織化学的検討では、図4の→のようにプルキンエ細胞では明確な低下を示していない。

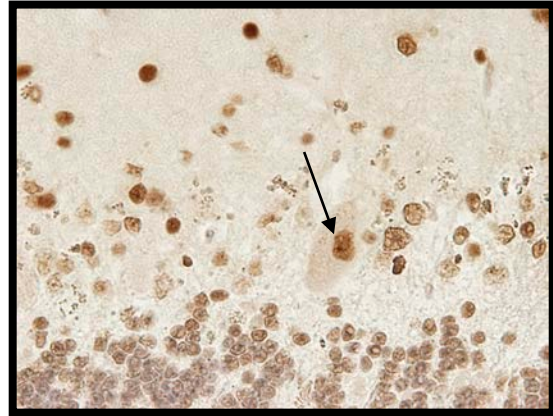


図4 SCA31患者小脳組織における蛋白Aに対する免疫組織化学. プルキンエ細胞の核(→)では蛋白Aの染色性は明確な低下は示していない。

以上のことから、蛋白Aがプルキンエ細胞核内で微妙に低下している可能性を今後検証する必要があると考えた。そのために、例えば我々が有する(UGGAA)_nを過剰発現するモデルマウスでのプルキンエ細胞での蛋白A発現量の定量や、(UGGAA)_nを過剰発現するモデルマウスでの補充によって病態が緩和されるかどうかの検証が必要と考えた。

2つ目の可能性としては、蛋白Aの機能低下によって、同蛋白が関わる下流遺伝子の制御が正常ではなくなって異常が起きる可能性を上げる。この仮説の検証は容易ではないが、脳内の下流遺伝子発現の解析などが必要と考えた。

以上のような研究から、これまでのRNA発現解析は100塩基長のショートナリドから得られる解析にとどまっていたことに立って、最近開発されたロングリード、単一分子のシーケンスをPacific Bio社の次世代シーケンサーを用いて実施することでこれまでの欠点を克服することにした。解析は外注で実施し、ゲノム情報にRNA配列をマッピングして、対応する箇所の異常を検証する方法をとった。その結果、SCA31ゲノム領域に相当するヒト第16番染色体長腕のBEANとTK2遺伝子が重複するイントロンにおいて、「挿入変異」の前後がマッピングされ、それに続くRNA配列の部分でマッピングされない箇所を見出した。ただし、その周辺の領域でもマッピングされない領域が存在した。この手法では最初にRNAをサイズによって分画化するため、他の分画に少量存在する可能性や、分画は同じでも量的に少ないために容易にはマッピングされなかった可能性などを検討した。

また、これまでの方法で蛋白Aが制御する下流遺伝子20個、蛋白Fが制御する別の遺伝子23個を見出しているため、これらについて逐次スプライス異常が起きていないかを検証する。このような遺伝子にもし異常が

見られ、特に蛋白 A の下流遺伝子では conditional KO マウスでも検証する予定である。

Pacific Bio による RNA-seq はまだ世界的にも事例が少なく、神経変性疾患での応用も我々が知る限りまだされていない。このため、インパクトの上でも重要な研究といえる。また、SCA31 の病態を探索するうえでも新たなシーズの発見につながる重要な解析であると考えており、早い時期に結論を出したいと考えている。

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 1 件)

①Ishiguro T, Sato N, Ueyama M, Fujikake N, Sellier C, Kanegami A, Tokuda E, Zamiri B, GallDuncan T, Mirceta M, Furukawa Y, Yokota T, Wada K, Taylor JP, Pearson CE, Charlet-Berguerand N, Mizusawa H, Nagai Y, Ishikawa K. Regulatory Role of RNA Chaperone TDP-43 for RNA Misfolding and Repeat-Associated Translation in SCA31. Neuron, 査読あり、94; 2017, 108-124. e7. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.046. Epub 2017 Mar 23.

[学会発表] (計 1 件)

①Taro Ishiguro, Nozomu Sato, Morio Ueyama, Nobuhiro Fujikake, Chantal Sellier, Akemi Kanegami, Eiichi Tokuda, Bitu Zamiri, Terence Gall-Duncan, Mila Mirceta, Yoshiaki Furukawa, Takanori Yokota, Keiji Wada, J. Paul Taylor, Christopher E. Pearson, Nicolas Charlet-Berguerand, Hidehiro Mizusawa, Yoshitaka Nagai* & Kinya Ishikawa*. Regulatory Role of RNA Chaperone TDP-43 in RNA Misfolding and Repeat-Associated Translation in SCA31. The Annual Meeting of the Society of Human Genetics, 2017. 米国 Orlando, 2017 年 10 月 18 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：脳機能評価システム及び脳機能
発明者：石川欽也、水澤英洋、永雄総一、本多武尊、橋本祐二
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学
種類：特許
番号：第 6218286 号
取得年月日：2017/10/06
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

① 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学分野 (神経内科学)

<http://www.tmd.ac.jp/med/nuuro/>

② 東京医科歯科大学医学部附属病院 長寿・健康人生推進センター

<http://www.tmd.ac.jp/medhospital/chouju/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川欽也 (ISHIKAWA, Kinya)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：30313240