

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04250

研究課題名(和文) 有棘赤血球舞蹈病とマイトファジー 分子レベルの病態機序解明と神経変性予防法の開発

研究課題名(英文) Chorea-acanthocytosis and mitophagy: clarifying the molecular mechanisms of the disease and developing methods to prevent neurodegeneration

研究代表者

佐野 輝 (Sano, Akira)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30178800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの品質保持のために障害を受けたミトコンドリアに対して選択的なオートファジー(マイトファジー)が促進されることが知られている。有棘赤血球舞蹈病の責任蛋白質である chorein は、マイトファジーを介したミトコンドリアの品質管理機構に関与しており、有棘赤血球舞蹈病においては神経系細胞でその機構が破綻することによって神経変性をきたしている可能性が示唆された。有棘赤血球舞蹈病患者の多くは認知機能の低下を含めた多彩な精神症状を呈することが明らかとなり、東京と西日本に多い遺伝子変異が全体の55.1%を占め、一部の創始者効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有棘赤血球舞蹈病は、国際的には日本人に多いとされる稀な遺伝性神経変性疾患である。今回の研究で、有棘赤血球舞蹈病が認知機能障害を含む多彩な精神症状を呈することが明らかとなった。また、有棘赤血球舞蹈病の病因にミトコンドリアの品質維持機構の破綻が関与している可能性が示唆された。有棘赤血球舞蹈病が多彩な精神症状を呈することからも、chorein とマイトファジーが他の精神神経疾患と関連する可能性と、その破綻した機構の回復が多くの精神神経疾患の分子的な治療の一端となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Selective autophagy for impaired mitochondria is known as mitophagy, by which mitochondrial quality is preserved. Chorein, a protein responsible for chorea-acanthocytosis, was suggested to be involved in mitophagy-mediated mitochondrial quality control mechanisms. It was suggested that the neurodegeneration in chorea-acanthocytosis may be due in part to a disruption of mitophagy.

We found that patients with chorea-acanthocytosis exhibited a variety of psychiatric symptoms, including cognitive decline. Approximately 55% of the mutations in Japanese patients with ChAc carried two major mutations. These mutations were localized in Tokyo and west side of Japan and the partial founder effects were suggested.

研究分野：分子精神神経医学

キーワード：有棘赤血球舞蹈病 マイトファジー

1. 研究開始当初の背景

有棘赤血球舞蹈病 (chorea-acanthocytosis; ChAc) は Huntington 病類似の精神神経症状と有棘赤血球症を呈する稀な遺伝性神経変性疾患であり、申請者らは世界に先駆け病因遺伝子 *CHAC/VPS13A* を同定し、遺伝子産物を chorein と命名した。ヒト ChAc は稀少であるため、モデル動物による研究が必要不可欠であるが、私達はいち早く遺伝子改変モデルマウスを作成し、有棘赤血球症、線条体神経変性、運動・行動障害を来すことを証明した。また ChAc は国際的にみても日本からの報告が半数以上を占め、比較的日本人に多い疾患で、私たちは日本人症例のみならず国際的な臨床例および剖検例の分子遺伝学的側面からの研究を加えた報告を私たちの手で行ってきた。私たちが行った研究で、chorein 蛋白質の機能としては、脳などの臓器に発現が豊富であること、GABA 受容体関連蛋白質との関連発現やドパミン神経分泌機構への関わること、更に機能的分子的結合蛋白質として β -adducin と β -actin の同定などを行ってきたが、chorein 機能喪失による神経変性機構の詳細は不明のままであった。

私達は予備的研究の中で、chorein を強制発現させた細胞ではミトコンドリア膜電位消失刺激による細胞死が抑制されることを発見した。この事実は、chorein はミトコンドリア膜の安定化に寄与し、chorein 機能喪失の ChAc の分子病態にミトコンドリア関連神経細胞死が関わる可能性を示唆するものがあった。

2. 研究の目的

Parkinson 病や Huntington 病などの神経変性疾患において、原因となる異常な蛋白質の蓄積はオートファジーの中でもミトコンドリア分解に關与するマイトファジーを誘導して発症が抑えられることが明らかにされてきた。私達は本研究で、マイトファジー誘導性細胞死に chorein が関わる機構について分子的に検討を行うこととした。培養細胞に対してミトコンドリア膜電位消失刺激を加えた時に、chorein と結合する蛋白質の変化を捉え、免疫沈降法や引き続いてのプロテオーム解析の結果から chorein -ミトコンドリア細胞死関連蛋白質群を同定する。さらに、ChAc は世界で 1000 症例程と推定されている。日本人 ChAc については 100 症例以上の報告があり日本人に比較的多い疾患と考えられるが、原因遺伝子変異の分布などは明らかにされていない。ChAc 家系列の患者において血液サンプルを集積し、*VPS13A* 遺伝子変異、発症年齢、発症時の症状、経過における運動障害に加えてうつ病、幻覚妄想、認知症、強迫性障害や人格変化などの精神症状を網羅した精神・神経症状としての表現型のデータベースを構築する。

3. 研究の方法

全長 *VPS13A*-cDNA を強制発現させた安定発現細胞株において脱共役剤によるミトコンドリア膜電位消失刺激を与えることでマイトファジーを誘発させ、chorein が相互作用する蛋白質を同定し、その変化を明らかにする。

遺伝子的にも均一な安定発現細胞株を樹立し、大量に培養し材料とする。Chorein 相互作用性の結合蛋白質を精製する具体的な手順としては、まず chorein を強制発現させた培養細胞を回収し、可溶化剤含有の各種の濃度で chorein 可溶化の程度や結合蛋白質の回収率などを検定しつつ、最適の可溶化条件を選択し、chorein をもっとも含有すること確認した遠心清画分を次の段階への出発材料とする。同上清に対して tag 蛋白質の抗体を固定化したカラムで全長 chorein を含む画分を回収し、この画分を SDS-PAGE で展開し、蛋白染色で検出さ

れる特異的バンドをゲルから回収し、トリプシン処理後に質量分析解析を行い、データベースと比較して当該蛋白質を同定し、ウェスタンブロット法を用いて免疫学的に同定した蛋白質を確認する。同定された chorein 結合蛋白質（候補）に対する抗体を用いて、逆方向性に免疫沈降されるか否かの検定も行い、chorein 結合性の特異性の確証を得る。次に、細胞および組織レベルでの chorein と相互作用が確認された蛋白質および chorein の存在様式を免疫組織化学的に明らかにする。

ChAc 家系例の患者において血液サンプルを集積し、白血球から gDNA と RNA を抽出し、RNA は逆転写酵素を用いて cDNA を作成する。えられた gDNA と cDNA を用いてサンガー法により遺伝子配列解析を行うとともに、コピー数変異 (Copy Number Variation; CNV) 解析を含めた包括的遺伝子変異解析を行い変異を同定する。赤血球は低浸透圧溶液により破碎し、遠心することによって赤血球膜分画を作成する。赤血球膜分画を用いてウェスタンブロット法によって chorein 蛋白質を検出する。今回は、日本人 ChAc の臨床データベース構築の一環として、ChAc と臨床診断された日本人 ChAc 症例について赤血球膜分画を用いた chorein 蛋白質についてウェスタンブロットによる検出を行う。また、これまでに我々が ChAc の分子的診断を下した既報 22 症例を加えて日本人 ChAc 症例における臨床症状の解析を行った。

4 . 研究成果

Chorein を安定強制発現させた細胞、mock 細胞、RNA 干渉法により chorein 発現を低下させた細胞で細胞生存率を比べると、CCCP 添加 1 時間後に chorein の発現量と生存率が正の相関を示しており、chorein の発現が多いほど細胞生存率が高かった。また、CCCP 刺激により chorein は myosin-9 との相互作用を強めミトコンドリアに集積した。CCCP 刺激により、ミトコンドリアが障害されるとミトコンドリアの品質保持のために障害を受けたミトコンドリアに対して選択的なオートファジー (マイトファジー) が促進されることが知られており、chorein が マイトファジーを介したミトコンドリアの品質管理機構に関与しており、有棘赤血球舞踏病においては神経系細胞でその機構が破綻することによって神経変性をきたしている可能性が示唆された。有棘赤血球舞踏病は統合失調症様症状を含む多彩な精神症状を呈するが、CCCP 刺激の際に相互作用を示した myosin-9 は、統合失調症や自閉スペクトラム症における突然変異が報告されており、chorein 欠失による chorein と myosin-9 の相互作用の破綻が有棘赤血球舞踏病の多彩な精神症状と関連している可能性が示唆された。

chorein の免疫反応が欠損もしくは著しく減損していた 17 名日本人 ChAc 患者全例に VPS13A 病的変異を同定した。その中で、1 種類の新規 CNV を含め、11 種類の VPS13A 遺伝子の新規疾患変異を同定した。ChAc 患者において、ナンセンス変異依存 mRNA 分解と推定される機構によって通常 chorein 蛋白質の免疫反応は消失するが、ターミネーションコドンに伴わない変異を有した症例においては chorein 蛋白質の免疫反応がわずかに残存した。既報の 22 例を含めた 39 例の日本人 ChAc 患者の臨床症状の解析を行ったところ、遺伝子型—表現型の明らかな相関は認めなかったが、ChAc 患者の多くは認知機能の低下を含め多彩な精神症状を呈することが明らかとなった。日本人 ChAc 患者において exon 60-61 の欠失変異と exon 37 上の c.4411C>T (R1471X) の遺伝子変異が 55.1%を占め東京と西日本に多く存在し、一部の創始者効果が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshiaki Nishida, Masayuki Nakamura, Yuka Urata, Kei Kasamo, Hanae Hiwatashi, Izumi Yokoyama, 共著者26名省略, Akira Sano	4. 巻 5
2. 論文標題 Novel pathogenic VPS13A gene mutations in Japanese patients with chorea-acanthocytosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology: Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXG.0000000000000332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuka Urata, Masayuki Nakamura, Natsuki Sasaki, Nari Shiokawa, Yoshiaki Nishida, Kaoru Arai, Hanae Hiwatashi, Izumi Yokoyama, Shinsuke Narumi, Yasuo Terayama, Takenobu Murakami, Yoshikazu Ugawa, Hiroki Sakamoto, Satoshi Kaneko, Yusuke Nakazawa, Ryo Yamasaki, Shoko Sadashima, Toshiaki Sakai, Hiroaki Arai, Akira Sano	4. 巻 5
2. 論文標題 Novel pathogenic XK mutations in McLeod syndrome and interaction between XK protein and chorein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology: Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXG.0000000000000328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Urata Y, Nakamura M, Hiwatashi H, Yokoyama I, Meguro K, Sano A
2. 発表標題 Molecular diagnosis and symptoms of the six cases of McLeod syndrome.
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishida Y, Nakamura M, Sano A
2. 発表標題 Novel pathogenic mutations in the VPS13A gene in Japanese patients with Chorea-acanthocytosis and clinical diversities.
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村雅之、佐野 輝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 13
3. 書名 有棘赤血球舞蹈病、神経変性疾患ハンドブックー神経難病へのエキスパートアプローチ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中村 雅之 (Nakamura Masayuki) (90332832)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	