

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03587

研究課題名（和文）BRCA1の機能回復に基づいたアルツハイマー病神経細胞DNA傷害の修復機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the repair mechanism of neuronal DNA damage in Alzheimer's disease based on the functional recovery of BRCA1

研究代表者

岩田 淳（Iwata, Atsushi）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：40401038

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、Alzheimer病(AD)でtauとBRCA1の共凝集によるDNA傷害の蓄積が神経細胞の機能低下の直接的な原因であることを明らかにした(Mano, et al., PNAS, 2017)。一方で、DNA傷害を生じるメカニズム、生じたDNA傷害がどのようにゲノムDNAを変化させるのか、神経細胞におけるBRCA1のDNA修復機構は不明であり、それらを明らかにするために以下の様な目標を立案した。

- 1) A β がDNA傷害を惹起するメカニズムを解明する
- 2) A β によるDNA傷害がゲノム構造変化と遺伝子発現に与える影響を明らかにする

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADの神経細胞機能の直接的な原因が、BRCA1の機能障害によるDNA傷害の蓄積であるとすれば、tauが蓄積した進行期ADに対して抗A β 薬は有効ではないことをよく説明する。一方でこの結果は、DNA傷害の蓄積という神経変性の直接的な原因を、BRCA1の機能回復もしくは代償によって治療可能な可能性も示している。このことを検証するため、神経細胞のゲノムDNAにおけるDNA傷害の蓄積の本態は何か、また、このようなゲノムDNA恒常性のリスクに対するBRCA1を中心とした修復機構は何かを問うこととした。

研究成果の概要（英文）：The applicant revealed that the accumulation of DNA damage caused by the co-aggregation of tau and BRCA1 in Alzheimer's disease (AD) is the direct cause of neuronal functional decline (Mano, et al., PNAS, 2017). On the other hand, the mechanisms by which DNA damage occurs, how the resulting DNA damage alters genomic DNA, and the DNA repair mechanism of BRCA1 in neurons are unknown, and the following goals were formulated to clarify them. 1) Elucidate the mechanisms by which A β induces DNA damage. 2) To elucidate the effects of A β -induced DNA damage on genomic structural changes and gene expression.

研究分野：臨床神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 BRCA1 tau

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は、認知機能の低下を主症状とする神経変性疾患であり、世界中で患者数が増加の一途をたどっている。ADの病態形成において、アミロイド(A β)の蓄積とリン酸化タウの凝集体形成が重要な役割を果たすことはこれまでの研究で明らかになってきたが、これらの因子がどのような順序で神経細胞の機能障害を引き起こすのかについては不明な点が多く残されていた。

このような背景の中、申請者らは、ADの神経細胞特異的なエピゲノム解析を行い、ADではDNA修復に関わるBRCA1遺伝子のプロモーター領域の低メチル化とそれに伴うBRCA1の発現上昇が生じていることを見出した。さらに、AD脳の免疫組織化学的解析により、BRCA1がリン酸化タウの凝集体と共凝集し、DNA修復修復機能を喪失していることを明らかにした(Mano, et al., PNAS, 2017)。この結果は、ADの初期段階ではA β の蓄積によって誘発されるDNA二重鎖切断に対して、BRCA1の発現上昇によってDNA修復が行われ、神経細胞の機能が維持されるが、病態が進行しリン酸化タウの凝集体が形成されるに伴って、BRCA1がタウと共凝集することでDNA修復機能が障害され、DNA損傷の蓄積と神経細胞死が引き起こされることを示唆するものであった。

申請者らの研究成果は、ADの病態形成におけるDNA損傷の役割とBRCA1-タウ共凝集によるDNA修復機能の障害という新たな知見を提供するものであり、タウ凝集体の蓄積が進行した段階のADにおいてA β を標的とした治療法が奏功しない理由を説明するものであった。同時に、DNA損傷の蓄積という神経細胞機能障害の直接的な原因に対して、BRCA1機能の回復や代償によって治療できる可能性をも示唆するものであった。

申請者らの発見とほぼ同時期に、米国の研究グループからADにおけるBRCA1機能障害に関する報告がなされた(Suberbielle, et al. Nat Neuroscience, 2017)。一見すると申請者らとは対照的な結果であるが、申請者らはBRCA1の不溶化が機能性BRCA1の減少をもたらすことを示したものであり、機能的なBRCA1の量を減少させることと、その帰結としてDNA損傷の蓄積を引き起こすことを示唆していると考えられる。これらの研究は、ADの神経細胞におけるBRCA1機能と、DNA損傷蓄積の重要性を示すものと考えられた。したがって、タウ凝集体によるBRCA1機能障害の分子機序の解明と、それに立脚した治療法の開発を目指す申請者らの研究は、ADの病態解明と治療法開発において意義を有するものと考え、以下の研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究は、アルツハイマー病(AD)の病態形成におけるDNA損傷の役割とBRCA1-タウ共凝集によるDNA修復機能の障害に着目し、以下の点を明らかにすることを目的とする。

(1) ADにおける神経細胞のエピゲノム変化の解明

ADの発症および進行に伴う神経細胞のエピゲノム変化を明らかにするために、AD脳由来の神経細胞を対象とした網羅的なエピゲノム解析を行う。具体的には、ATAC-seqによるクロマチンアクセシビリティの変化や、ChIP-seqによるヒストン修飾の変化を解析する。特に、A β の産生および分解に関連する遺伝子領域に着目し、それらの領域におけるエピゲノム変化とAD病態との関連性を明らかにする。これらの解析を通じて、ADにおける神経細胞のエピゲノム変化の全容を明らかにし、その病態形成における役割を解明する。また、DNA損傷蓄積の結果としてゲノム構造がどのように変化するかを、Hi-Cによって明らかにする。

(2) 神経活動に伴うDNA損傷の分子メカニズムの解明

神経活動に伴うDNA損傷の分子メカニズムを解明するために、ヒト神経前駆細胞の分化培養系を用いた解析を行う。まず、NMDA刺激によって誘導される神経活動とDNA損傷の関連性を検討し、DNA損傷マーカーである γ -H2axの発現変化と、FOS発現の変化との時間的な関係を明らかにする。次に、DNA損傷応答に関与するBRCA1や53BP1のゲノムワイドな結合部位の変化を、CUT&Tag法を用いて解析するための実験系を確立する。これらの解析を通じて、神経活動に伴うDNA損傷の分子メカニズムの解明に向けた基盤を構築する。

(3) BRCA1-タウ共凝集によるDNA修復機能障害の普遍性の検証

BRCA1-タウ共凝集によるDNA修復機能障害がAD特異的な現象なのか、それともタウオパチー全般に共通する病態なのかを明らかにするために、AD以外のタウオパチーであるピック病やPSPの剖検脳を用いた解析を行う。これらの疾患脳において、BRCA1とタウの共凝集の有無を免疫組織化学的手法や生化学的手法により検討する。さらに、タウ凝集体の構造的な違いがBRCA1との共凝集に影響を与えるかどうかについても明らかにする。これらの解析を通じて、BRCA1-タウ共凝集によるDNA修復機能障害の普遍性を検証し、タウオパチーの病態形成における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、アルツハイマー病(AD)および他のタウオパチーの病態形成におけるDNA損傷とBRCA1-

タウ共凝集の役割を明らかにするために、ヒト剖検脳および培養細胞モデルを用いた多角的な解析を行う。

(1) ヒト剖検脳を用いた解析

ADにおける神経細胞のエピゲノム変化を網羅的に理解するために、AD脳および非AD対照脳から、フローサイトメトリー(FACS)を用いて神経細胞核を単離する。単離した神経細胞核を用いて、クロマチンアクセシビリティの変化をATAC-seqにより、ヒストン修飾(H3K4me3, H3K27ac)の変化をChIP-seqにより、クロマチン立体構造の変化をHi-Cによりそれぞれ解析する。これらの解析を通じて、AD神経細胞において生じているエピゲノム変化を網羅的に捉え、その全容と病態への関与を明らかにする。

また、BRCA1-タウ共凝集によるDNA修復機能障害の普遍性を検証するために、AD脳に加えて、ピック病やPSP等の他のタウオパチー脳についても同様の解析を行い、疾患間での比較解析を行う。これにより、BRCA1-タウ共凝集がADに特異的な現象なのか、あるいはタウオパチー全般に共通する病態なのかを明らかにする。

(2) 培養細胞モデルを用いた解析

神経活動に伴うDNA損傷の分子メカニズムを解明するために、ヒト神経前駆細胞(ReNcell)の分化培養系を用いて解析を行う。まず、NMDA刺激による神経活動の誘導とDNA損傷の関連性を評価するために、DNA損傷マーカー(-H2ax)の発現変化とFOS発現変化の時間的関係を明らかにする。これにより、神経活動がDNA損傷を引き起こすタイミングと、その後の遺伝子発現変化への影響を明らかにする。

次に、神経活動誘導前後でのBRCA1、53BP1、RNA polymerase IIのゲノムワイドな結合部位の変化を、CUT&Tag法およびCUT&Tag/CUTAC法を用いて解析する。これにより、神経活動に伴うDNA損傷の分子メカニズムにおける、これらの因子の動態変化を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、アルツハイマー病(AD)の病態形成におけるDNA損傷の役割とBRCA1-タウ共凝集によるDNA修復機能の障害について、ヒト剖検脳および培養細胞モデルを用いた多角的なアプローチから検討を行い、いくつかの重要な知見が得られた。

(1) ADにおける神経細胞のエピゲノム変化

剖検脳を用いた解析では、まずAD脳由来の神経細胞を対象としてATAC-seqを行い、エピゲノム変化の探索を行った。Footprint解析による転写因子スクリーニングでは、AD神経細胞ではFOS関連の転写因子の結合が増加していることが明らかになった。このことは、AD神経細胞では正常脳と比較してより多くの神経活動が誘導されていることを示唆しており、過去に報告されていたA β による異常な興奮性神経活動の亢進を裏付ける結果であると考えられる。また、AD脳の神経細胞において、ヒストン修飾の変化を調べるために、神経細胞特異的なChIP-seqを行った。その結果、A β の産生および分解に関連する遺伝子領域において、活性型のヒストン修飾であるH3K4me3およびH3K27acの変化が認められた。この知見は、ADにおける神経細胞でのA β 代謝の異常とエピゲノム変化の関連性を示唆するものである。一方、HiC解析ではAD特異的なグローバルなクロマチン構造の変化は認められなかったが、局所的なエピゲノム変化の有無については今後のさらなる検討が必要である。これらの剖検脳を用いた一連の解析は、ADにおける実際の神経細胞で生じているエピゲノム変化を捉えることを可能にし、disease relevanceの高い知見を提供するものと期待される。

(2) 神経活動に伴うDNA損傷の分子メカニズムの解明

培養細胞モデルを用いた解析では、まず神経活動によるDNA損傷について、ヒト神経前駆細胞の分化培養系を用いてNMDA刺激を行った。その結果、FOS発現誘導に先行してDNA傷害・修復マーカーである-H2axの上昇が確認された。このことから、神経活動に伴うDNA損傷がFOS発現の制御に関与している可能性が示唆された。さらに、この過程におけるRNAポリメラーゼの挙動を評価するため、CUT&TagおよびCUTACによるRNA polymerase II解析の実験系を確立した。また、BRCA1および53BP1のゲノムワイドな結合領域を解析するための実験系もCUT&Tagを用いて構築した。これらの培養細胞モデルを用いた解析は、神経活動とDNA損傷の関連性を分子レベルで解明する上で重要なツールを提供するものであり、ヒト脳では検討が難しい詳細なメカニズムの解析を可能にすると期待される。

(3) BRCA1-タウ共凝集によるDNA修復機能障害の普遍性の検証

また、AD以外のタウ蓄積を伴う神経変性疾患であるピック病とPSPの剖検脳サンプルを用いて、タウとBRCA1の共凝集の有無を検討した。その結果、3Rタウオパチーであるピック病、4RタウオパチーであるPSPのいずれにおいても、タウ依存的なBRCA1の共凝集が生じている可能性が示された。このことから、BRCA1の機能喪失はAD特異的な現象ではなく、タウオパチー全般に共通して生じうる可能性が浮上した。また、タウ凝集体の疾患特異的な構造の違いはBRCA1の共凝集には影響しないことも示唆された。剖検脳を用いたこれらの解析は、ヒトの神経変性疾患の脳内で実際に起こっている病態を反映したデータを提供するものであり、タウ蓄積とBRCA1機能障害の関連性を示す重要な知見であると考えられる。

以上の研究成果は、ヒト剖検脳を用いた解析により、AD および他のタウオパチーにおける神経細胞のエピゲノム変化や BRCA1-タウ共凝集の実態を明らかにするとともに、培養細胞モデルを用いた解析により、神経活動と DNA 損傷の関連性を分子レベルで解明するための実験系の確立に成功した。特に、AD 脳の神経細胞において、A 代謝関連遺伝子のヒストン修飾変化を見出したことは、AD の病態形成におけるエピゲノム変化の重要性を示す新たな知見として注目される。剖検脳と培養細胞モデルのそれぞれの長所を活かしたこれらのアプローチを組み合わせることで、AD における DNA 損傷と BRCA1-タウ共凝集の役割について多角的な理解が深まることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kurihara Masanori, Mano Tatsuo, Eto Fumihiro, Yao Ikuko, Sato Kenichiro, Ohtomo Gaku, Bannai Taro, Shibata Shota, Ishiura Hiroyuki, Ikemura Masako, Matsubara Tomoyasu, Morishima Maho, Saito Yuko, Murayama Shigeo, Toda Tatsushi, Setou Mitsutoshi, Iwata Atsushi	4. 巻 177
2. 論文標題 Proteomic profile of nuclei containing p62-positive inclusions in a patient with neuronal intranuclear inclusion disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105989 ~ 105989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2023.105989	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurihara Masanori, Komatsu Hiroki, Sengoku Renpei, Shibukawa Mari, Morimoto Satoru, Matsubara Tomoyasu, Arakawa Akira, Orita Makoto, Ishibashi Kenji, Mitsutake Akihiko, Shibata Shota, Ishiura Hiroyuki, Adachi Kaori, Ohse Kensuke, Hatano Keiko, Ihara Ryoko, Higashihara Mana, Nishina Yasushi, Iwata Atsushi	4. 巻 100
2. 論文標題 CSF P-Tau181 and Other Biomarkers in Patients With Neuronal Intranuclear Inclusion Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e1009 ~ e1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.000000000201647	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita Kazuto, Miura Masahiro, Watanabe Shunsuke, Ishiki Kengo, Arimatsu Yuji, Kawahira Junko, Kubo Toshiko, Sasaki Katsutaka, Arai Takayuki, Hagino Kei, Irino Yasuhiro, Nagai Kota, Verbel David, Koyama Akihiko, Dhadda Shobha, Niuro Hayato, Iwanaga Shigeki, Sato Toshiyuki, Yoshida Tomokazu, Iwata Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Fully automated and highly specific plasma β -amyloid immunoassays predict β -amyloid status defined by amyloid positron emission tomography with high accuracy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Alzheimer's Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 86-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13195-022-01029-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto Ryoji, Kurihara Masanori, Kameyama Masashi, Komatsu Hiroki, Higashino Masashi, Hatano Keiko, Ihara Ryoko, Higashihara Mana, Nishina Yasushi, Matsubara Tomoyasu, Kanemaru Kazutomi, Saito Yuko, Murayama Shigeo, Iwata Atsushi	4. 巻 130
2. 論文標題 Correlations between cerebrospinal fluid homovanillic acid and dopamine transporter SPECT in degenerative parkinsonian syndromes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 513 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00702-023-02611-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsubara Tomoyasu, Kameyama Masashi, Tanaka Noriko, Sengoku Renpei, Orita Makoto, Furuta Ko, Iwata Atsushi, Arai Tomio, Maruyama Hirofumi, Saito Yuko, Murayama Shigeo	4. 巻 98
2. 論文標題 Autopsy Validation of the Diagnostic Accuracy of ¹²³ I-Metaiodobenzylguanidine Myocardial Scintigraphy for Lewy Body Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e1648 ~ e1659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.000000000200110	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 Watanabe Naoki, Nakano Masaki, Mitsuishi Yachiyo, Hara Norikazu, Mano Tatsuo, Iwata Atsushi, Murayama Shigeo, Suzuki Toshiharu, Ikeuchi Takeshi, Nishimura Masaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Transcriptional downregulation of FAM3C/ILEI in the Alzheimer 's brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 122 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab226	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 Sato Kenichiro, Niimi Yoshiki, Ihara Ryoko, Suzuki Kazushi, Toda Tatsushi, Iwata Atsushi, Iwatsubo Takeshi	4. 巻 23(7)
2. 論文標題 Efficacy and cost-effectiveness of multiple promotion methods to recruit participants to an online screening registry to facilitate Alzheimer 's disease prevention trials: observational study of website access and registration (Preprint)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Internet Research	6. 最初と最後の頁 e26284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2196/26284	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 Sato Kenichiro, Mano Tatsuo, Iwata Atsushi, Toda Tatsushi	4. 巻 21
2. 論文標題 Need of care in interpreting Google Trends-based COVID-19 infodemiological study results: potential risk of false-positivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Medical Research Methodology	6. 最初と最後の頁 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12874-021-01338-2	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 Sato K., Mano T., Ihara R., Suzuki K., Niimi Y., Toda T., Iwatsubo T., Iwata A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Cohort-Specific Optimization of Models Predicting Preclinical Alzheimer 's Disease, to Enhance Screening Performance in the Middle of Preclinical Alzheimer 's Disease Clinical Studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal Of Prevention of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14283/jpad.2021.39	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurihara Masanori, Mano Tatsuo, Saito Yuko, Murayama Shigeo, Toda Tatsushi, Iwata Atsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Colocalization of BRCA1 with Tau Aggregates in Human Tauopathies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 7~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci10010007	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 Tanaka Hikari, Homma Hidenori, Fujita Kyota, Kondo Kanoh, Yamada Shingo, Jin Xiaocen, Waragai Masaaki, Ohtomo Gaku, Iwata Atsushi, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 YAP-dependent necrosis occurs in early stages of Alzheimer 's disease and regulates mouse model pathology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14353-6	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masanori Kurihara, Tatsuo Mano, Yuko Saito, higeo Murayama, Atsushi Iwata, Tatsushi Toda
2. 発表標題 Tau-induced Aggregation of BRCA1
3. 学会等名 2021 Asian Oceanian Congress of Neurology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenichiro Sato, Yoshiki Niimi, Ryoko Ihara, Kazushi Suzuki, Atsushi Iwata and Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Evaluation of efficacy and cost-effectiveness of promotions for recruiting online participants to Japanese Trial-Ready Cohort (J-TRC) study
3. 学会等名 CTAD 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 正典, 間野 達雄, 齊藤 祐子, 村山 繁雄, 岩田 淳, 戸田 達史
2. 発表標題 タウオパチーにおけるBRCA1とtauの共凝集の検討
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanori Kurihara, Tatsuo Mano, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Atsushi Iwata, Tatsushi Toda
2. 発表標題 Tau-induced Aggregation of BRCA1 in Tauopathies
3. 学会等名 2021 Asian Oceanian Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------