

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 30日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591095

研究課題名（和文）：一本鎖DNA修復異常症SCAN1の神経変性機構の解明

研究課題名（英文）： Pathomechanism of spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy (SCAN1)
-DNA single strand break repair and neurodegeneration

研究代表者：高嶋 博 (HIROSHI TAKASHIMA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80372803

研究成果の概要（和文）：

我々は、以前末梢神経障害と小脳失調を示す疾患（SCAN1）の原因TDP1を同定した。TDP1は一本鎖DNAの修復に関与している。我々はTdp1の欠失マウスを解析し、神経変性メカニズムを明らかにする。Tdp1ノックアウトマウスでは、脳神経系や主要臓器に異常がなく、網膜萎縮が見られ、外顆粒層の脱落所見があり、ヒトの網膜色素変性症の類似の所見が得られた。マイクロアレイによる発現解析でTdp1欠失による転写への影響も確認した。一本鎖DNA修復障害による神経変性のひとつの病態について解明した。

研究成果の概要（英文）：

Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy (SCAN1) is an autosomal recessive disorder characterized by ataxia, cerebellar atrophy, and peripheral neuropathy. We found SCAN1 is caused by a specific point mutation the tyrosyl-DNA phosphodiesterase (*TDP1*) gene. Functional and genetic studies suggest that this mutation, which disrupts the active site of the Tdp1 enzyme, causes disease by a combination of decreased catalytic activity and stabilization of the normally transient covalent Tdp1-DNA intermediate. The Tdp1 knockout mice showed the retinitis pigmentosa like phenotype. The RNA expressions were mostly normal in the microarray studies of Tdp1 knockout mice. These findings make spurred understanding of DNA repair in human biology and suggested a novel mechanism of human disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
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) SCAN1 (2) Tdp1 (3)SSBR (4) 末梢神経障害 (5) 一本鎖DNA修復
(6)ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病、パーキンソン病、脊髄小脳変性症、プリオン病、筋萎縮性側索硬化症、遺伝性ニューロパチーなどの神経変性疾患の神経変性機構は家系例の解析により原因が明らかとなり、そのメカニズムも解き明かされてきた。その中でもコンフォーメーション病という概念でくくられる異常タンパクの蓄積による神経変性機構は様々な疾患で研究が行われている。一方、我々は、常染色体遺伝性の疾患で軸索型ニューロパチーを伴う脊髄小脳失調症(spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy 1; SCAN1)の原因が TDP1(Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)の異常であることを同定し、Nat Genet 誌に報告した。その原因蛋白は、DNA の転写や修復と関連した蛋白であり、今までのコンフォーメーション病とは違う、新しい神経変性の機序が推定された。

本症の研究はその新しさから世界中で研究され、イギリスの El-Khaminski らが 2005 年 SCAN1 患者リンパ球において DNA の一本鎖修復 Single strand break repair(SSBR)が障害されていることを Nature 誌に報告した。また、米国からは 2005 年 Interthal らが SCAN1 患者のもつ His493Arg の異常が、TDP1-DNA 中間体を形成し、DNA 修復を遅らせることを EMBO J に報告している。さらに、2005 年 Interthal らは、TDP1 は主に DNA のひずみをとる Topoisomerase I にだけ働くと考えられてきた考えを広げ、より広い DNA 修復に関与していることを J Biol Chem に発表し、TDP1 の機能の広がりを示した。マウスのこのような機序による神経変性メカニズムは全く新しいことであるが、その先のメカニズムとして DNA の SSBR の異常が選択的に神経障害だけを引き起こすより詳しいメカニズムを多くの研究者がしの

ぎを削って研究しているところである。近年、DNA SSBR と神経変性の Review も多数記述され (Nat Rev Genet. 2008;9:619-31. Cell. 2007 21;130:991-1004. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2007;8:37-55., Neuroscience. 2007;145, 1260-6)、注目度は極めて高く、我々の論文も中心的に引用されている。

そこで我々は、平成 17 年度から 20 年度の科学研究補助 (基盤 C) を受けて、2007 年、Tdp1 のノックアウトマウスを作成、解析し、Tdp1 の機能と神経変性のメカニズムを EMBO J に報告した。本報告では、Tdp1 のノックアウトマウスでは、酵素学的にも Tdp1 活性がほぼゼロであったが、約 8 ヶ月間、ノックアウトマウスは、臨床的、電気生理学的、病理学的にも神経系の異常は明らかでなかった。そのため、なぜヒトとマウスで臨床型が異なるのか考えた。ヒトでは TDP1 His493Arg の異常が SCAN1 を引き起こすことが明らかとなっているため、酵素活性の低下だけでなく、TDP1 の His493Arg を持つ異常な TDP1 が DNA に強く結合することで、DNA の修復障害が起こることをコッメトアッセイ法で証明した。それ故、本症は His493Arg という特殊な変異によるものか、酵素活性低下によるものか、議論になっている。

一方、我々は、肺ガンの治療薬で Topoisomerase I の阻害薬であるイリノテカン(CPT-11)を Tdp1 ノックアウトマウスに投与したところ、Wild type は全く異常を認めないが、ノックアウトマウスは、著明な運動障害と電気生理学的および病理学的にニューロパチーの所見を呈したことは事実である。

今回の研究では、これまでの研究より発展させる形で、Tdp1 ノックアウトマウスの解析をマイクロアレイ法や長期的な観察を行

うなど詳細に行い、新しい神経変性のメカニズムを明らかにするものである。

2. 研究の目的

TDP1 遺伝子異常により発症するニューロパチーと小脳失調を示す疾患 (spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy 1; SCAN1) では、脊髓前角細胞、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 の転写や複製時の DNA の修復機構の酵素で、特に一本鎖 DNA 修復系 (Single strand break repair ; SSB) の一員として働く。他にも類似疾患において DNA 修復と神経変性を来す類似疾患および病態が報告されており、神経変性と DNA 修復の関連に注目が集まっている。

今回、TDP1 ノックアウトマウスモデルの解析を通じて新しい疾患メカニズムについて明らかにする。

特に、外界ストレス (光ストレス) などの影響がノックアウトマウスにおいて、神経変性と関わっているのかを明らかにし、また SSB 経路 (DNA 修復系) の異常と神経変性の本質的なメカニズムを探ることを目的とする。

3. 研究の方法

TDP1 ノックアウトマウスを用い、長期的な観察を行い、臨床的解析、電気生理学的解析、病理学的検索について解析を行う。さらに、分子メカニズムを明らかにするため、TDP1 の欠失と転写異常に着目し、マイクロアレイ解析を着実に進める。

我々の仮説は、SCAN1 の本態として、転写障害によりいくつかの mRNA の発現が落ちることが推定されるが、その変化を同定するため、Affymetrix 社のマイクロアレイシステム Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて、TDP1 ノックアウトマウスについて、小脳など

の神経組織においてどの遺伝子の発現がコントロールに比し、変化しているのかを観察する。その結果に基づき SSB と神経変性の関連を明らかにする。

また、Tdp1 ノックアウトマウスが9ヶ月を超えた頃より、急速に弱っていく現象が確認され、その原因を追及する。

4. 研究成果

Tdp1 ノックアウトマウスは、8ヶ月齢までは神経症状を呈さなかったが、それより若いマウスであっても抗ガン剤の投与により、臓器障害と運動障害、神経伝導検査異常、致死性を認めた。我々は、今回さらに長期間の観察による、神経系への影響を確認した。その結果、マウスは、生後 280-330 日あたりで、急激なやせを伴い死亡する現象が見られ、コントロール群より明らかに短命であった。その理由として、視力の消失により、おそらく飲水や食事がとれずに全身状態が悪化して死亡する状況が観察された。

病理学的には、脳神経系や主要臓器に異常なく、網膜萎縮が見られた。とくに外顆粒層と内顆粒層の比の異常がはっきりしており、これはヒトでいう網膜色素変性症に近い所見であった。具体的には外顆粒層の萎縮 (視細胞層) が認められ、最終的には、全盲の状態になることも確認した。これまでにまったく報告がないが、光ストレスの処理に Tdp1 が関わっているとすれば、新知見である。

我々は、より明るい (光量が多い) 環境において、ノックアウトマウスが眼障害を呈する可能性を考え、光ストレスを与えたが、明らかな悪化を確認できなかった。光量を多くするパターン条件により、新しい結果が得られる可能性があり、今後の検討が必要である。

しかし、いずれにしても TDP1 (Tdp1) 異常が眼科的な疾患の新しい原因として浮上すると同時に、この知見を含めて、外的ストレス処理機構としての Tdp1 と、神経変性、視細胞変性が関連する可能性は高い。一本鎖 DNA 修復過程 Single strand Break repair (SSBRs) と網膜神経細胞の障害について、さらに追求していく必要がある。

加えて、網膜萎縮の機序として、光ストレスや活性酸素による DNA の障害との関連も考えられ、TDP1 (Tdp1) はミトコンドリアで強く発現し、ミトコンドリアとの関連も含め、多方面からその機序を検討している。これまでの知見も考えると、SCAN1 患者における神経細胞の脱落の機序は、単なる loss-of-function の機序ではなく、一本鎖 DNA 修復過程 Single strand Break repair (SSBRs) と網膜神経細胞の障害について、さらに追求していく必要がある。

他方、我々は、SCAN1 やの本態として、転写障害が起こっていると推定しているが、Affymetrix 社のマイクロアレイシステムを導入し、様々な条件でマイクロアレイの解析を行った。その結果、驚くべきことに、小脳組織において、99%以上の遺伝子発現が、Tdp1 ノックアウトマウスで保たれており、転写障害がほとんどないことが明らかとなった。一部に発現低下する遺伝子があったが、一定の傾向はなく、最も発現が低下していた遺伝子は Tdp1 であった。SCAN1 患者細胞を用いた解析では、転写の異常が報告されており、我々は Tdp1 ノックアウトマウスにおいては、RNA の転写障害は軽微であることから、H493R 変異を持つ SCAN1 とは機序的に別であることを想定している。

Tdp1 ノックアウトマウスは、表現形が網膜色素変性症であり、SCAN1 とは異なる神経変性メカニズムが存在している。

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 14 件)

1) Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto YI, Arimura K, Takashima H. A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. *Acta Neuropathol*. 査読(有) 2011, 121(6):775-783, DOI: 21424749

2) Okamoto Y, Higuchi I, Sakiyama Y, Tokunaga S, Watanabe O, Arimura K, Nakagawa M, Takashima H. A new mitochondria-related disease showing myopathy with episodic hyper-CKemia. *Ann Neurol*. 査読(有) 2011, 70(3) 486-492 DOI: 21905081

3) Walton C, Interthal H, Hirano R, Salih MA, Takashima H, Boerkoel CF. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Adv Exp Med Biol*. 査読(有) 2010, 685:75-83 DOI:20687496

4) Hirano R, Takashima H, Okubo R, Hokezu Y, Arimura K, et al. Clinical and genetic characterization of 16q-linked autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Kyushu, Japan. *J Hum Genet*. 査読(有) 54(7), 2009, 377-81 DOI: 15455264

5) 高嶋 博. 特集2 劣性遺伝性脊髄小脳変性症の治療と具体的事例 難病と在宅ケア 査読(無) 15(3), 2009, 25-28

〔学会発表〕（計 6 件）

- 1) 橋口昭大、中村友紀、徳永章子、岡本裕嗣、高嶋 博、有村公良. MFN2 点変異を有する軸策型 Charcot-Marie-Tooth 病 17 例の検討. 第 22 回日本末梢神経学会学術集会 2011 年 9 月 3 日 宜野湾
- 2) 橋口昭大、中村友紀、徳永章子、岡本裕嗣、高嶋 博、有村公良. MFN2 点変異を有する軸策型 Charcot-Marie-Tooth 病 13 例の検討. 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 20 日 名古屋
- 3) 中村友紀、樋口雄二郎、橋口昭大、徳永章子、岡本裕嗣、高嶋 博. MPZ 変異を伴う CMT11 例の検討. 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 20 日 名古屋
- 4) 高嶋 博. Charcot-Marie-Tooth 病の分子遺伝学—治療への展望 第 52 回日本小児神経学会シンポジウム 3 2010 年 5 月 21 日 福岡
- 5) 徳永章子、橋口昭大、岡本裕嗣、中村友紀、有村公良、高嶋 博. マイクロアレイ DNA チップによる Charcot-Marie-Tooth 病の遺伝子診断 第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 20 日 東京
- 6) 高嶋 博. CMT の臨床症状と診断法 (1) 成人発症の CMT シャルコー・マリー・トゥース病 市民公開講座 2010 年 2 月 21 日 東京

〔図書〕（計 4 件）

- 1) 高嶋 博. 遺伝疾患としての側面. シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会編 金芳堂 pp. 29-40, 2010
- 2) Hirano R, Takashima H, Boerkoel CF. National Organization of Rare Disorder (NORD), Disease Database (On line textbook for patients), Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy (SCAN1). http://www.rarediseases.org/nord/news/policy/gene_pat, 2009, 1

6. 研究組織

- (1) 高嶋 博 (TAKASHIMA HIROSHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：80372803
- (2) 研究協力者
平野隆城 (HIRANO RYUKI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
中村友紀 (NAKAMURA TOMONORI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生
橋口昭大 (HASHIGUCHI AKIHIRO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員