

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640040

研究課題名(和文) CRAG機能と遺伝子治療開発

研究課題名(英文) Development of CRAG gene therapy for neurodegenerative diseases

研究代表者

柳 茂 (Yanagi, Shigeru)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：60252003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究グループにより同定されたCRAGは、脊髄小脳変性症の原因タンパク質である異常伸長したポリグルタミンタンパク質(PolyQ)の分解を促進すること、およびCRAGは転写因子SRFを活性化することで神経細胞保護することが明らかになっている。しかしながらその詳細な分子機構、およびCRAGの生体内における役割は不明である。私たちはCRAGノックアウトマウスを作製し解析した結果、CRAG欠損マウスは生後3週齢で致死を示した。CRAGは神経細胞の生存に必須の分子であることが明らかになりCRAGが脊髄小脳変性症だけでなく、様々な神経変性疾患に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：CRAG facilitated degradation of expanded polyglutamine protein (polyQ) via the nuclear ubiquitin-proteasome pathway. Taking advantage of this feature, lentivirus-mediated CRAG expression in the Purkinje cells of mice expressing polyQ resulted in clearance of the polyQ aggregates and rescue from ataxia, suggesting usefulness in targeted delivery of CRAG as a gene therapy for neurodegenerative diseases. However, a physiological relevant of CRAG in vivo are unknown. Here, we analyzed CRAG/Centaurin-3 KO mice. CRAG/Centaurin-3 KO mice spontaneously developed severe neurodegenerative phenotypes including hind-limb clasping, neuronal atrophy, cell death and lethality within 1 month of birth. Furthermore, we found that CRAG enhances neuronal cell survival against the accumulation of unfolded proteins through not only proteasome activation but also SRF-mediated c-fos activation in vivo. Our results may contribute to development of CRAG gene therapy for neurodegenerative diseases.

研究分野：生化学

キーワード：CRAG 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は治療法が確立されていない神経変性疾患である。本研究グループにより同定された CRAG は脊髄小脳変性症の原因タンパク質である異常伸長したポリグルタミンタンパク質(PolyQ)の分解を促進することが分かった。さらに CRAG は転写因子 SRF を活性化し、c-fos 依存的な AP-1 の活性化をすることで神経細胞保護することが判明した。これらの研究成果により CRAG を用いた遺伝子治療が脊髄小脳変性症の新たな治療法として期待できる。

本申請課題は、CRAG の生体内における役割をより詳細に解明し、脊髄小脳変性症の治療の確立への基盤をつくることを目的である。CRAG の小脳プルキンエ細胞特異的なノックアウトマウス(小脳 CRAG KO)を作製し、解析を行う。さらに CRAG を様々なウイルスベクターを用いて小脳に発現させる検討を行い、治療に向けた CRAG の導入方法を改善し、CRAG を用いた遺伝子治療の基盤をつくる。

2. 研究の目的

(1) 研究の学術的背景

CRAG による PolyQ の分解促進

CRAG が PolyQ をユビキチンプロテアソーム系で分解促進することが発見された (Qin et al. J Cell Biol. 2006)。

CRAG 遺伝子導入による PolyQ モデルマウスの症状の劇的な改善

CRAG の遺伝子導入によりモデルマウスの小脳において、劇的な PolyQ の減少が観察された。(Torashima et al. EMBO R. 2008)。この研究成果は世界で初めての神経変性疾患の遺伝子治療の成功例である。

CRAG による SRF を介した AP-1 の活性化

CRAG による SRF を介した AP-1 の活性化により、CRAG は PolyQ の分解と同時に神経細胞の保護に働くことが解明され、CRAG による遺伝子治療の可能性が高まった (Nagashima et al. J Biol Chem. 2011)。

(2) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

本申請課題では小脳特異的に CRAG をノックアウトし、小脳における生理的な機能を解明する。これまでの研究成果により、CRAG は変性タンパク質の分解や神経細胞の保護に働くことが判明したので、CRAG を欠損すれば、変性タンパク質の蓄積や細胞死の亢進が期待される。CRAG の発現量の低下が脊髄小脳変性症の一つの要因であることを解明したい。さらに、これまではレンチウイルスベクターを用いて CRAG を生体の脳に発現させたが、より高い発現を誘導できるウイルスベクターの探索を行い、より高い効率の CRAG の遺伝子導入の系を確立し、CRAG による遺伝子治療の基盤をつくる。

(3) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

CRAG は申請者の研究グループにより同定された分子であり、現在申請者のグループによる CRAG の研究は世界に先駆けて進んでいる。現在、脊髄小脳変性症などのポリグルタミン病は有効な治療法が無く、新しい治療法の開発が待ち望まれているので CRAG の研究は社会的価値が大きい。すでに CRAG 遺伝子による遺伝子治療はマウスでは大きな効果を挙げている。しかしながら、CRAG の生理的な機能は未知であり、CRAG を用いた遺伝子治療には生理的な機能解明が必要である。また、遺伝子治療を目的としたドラッグデリバリーシステムの研究の進展はめざましいものがあり、これらの成果を応用することにより、ヒトへの応用が大いに期待できる状況である。

3. 研究の方法

平成 25 年度

小脳プルキンエ細胞特異的な CRAG ノックアウトマウス(小脳 CRAG KO)の作製

現在、私達は CRAG のコンディショナルノックアウトマウスの作製に必要な CRAG 遺伝子が loxP に挟まれた CRAG flox/flox マウスを保持している。CRAG flox/flox マウスと Pcp2 プロモーターに制御された小脳プルキンエ細胞特異的に CRE を発現するマウス (Cg-Tg(Pcp2-cre)3555Jdhu/J) を用いて小脳プルキンエ細胞特異的な CRAG ノックアウトマウス(小脳 CRAG KO)を作製する。小脳プルキンエ細胞で特異的に CRAG が消失できたかを免疫組織染色法、in situ hybridization 法を用いて確認する。

小脳 CRAG KO の組織学的な解析

小脳の構造は生後約 1 ヶ月で成体とほぼ変わらない構造となる。小脳の形成に CRAG が関与するか検討するために、生後 7 日、生後 14 日、生後 1 ヶ月で形態学的解析を行い、CRAG が小脳プルキンエ細胞の分化に関与するか検討する。まずは HE 染色や Nissl 染色を用いて形態学的に野生型と差があるか検討する。次にプルキンエ細胞の樹上突起のマーカーとなる calbindin の抗体で免疫組織染色を行い、樹上突起形成に野生型と差があるか検討する。

小脳プルキンエ細胞の初代培養細胞を用いた解析

小脳プルキンエ細胞をマウスから取り出し、初代培養を行う。レンチウイルスを用いて CRAG をノックダウンすることで神経突起形成に変化が見られるか検討する。また、CRAG をノックダウンした際、細胞死がおきやすいか様々なストレスを与え検討する。

平成 26 年度

ウイルスベクターを用いた CRAG の遺伝子導入

これまではレンチウイルスを用いて CRAG を生体の小脳に遺伝子導入してきた (Torashima et al. EMBO R. 2008)。しかしながら、臨床試験の実施件数、ウイルス自体の病

原性の有無などから判断して、レンチウイルスベクターと比較してアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の方が安全性が高い。まずはAAV2にGFPを挿入したベクターを使用して、小脳への発現効率を確認する。次にAAV2にCRAGを挿入したベクターを用いてCRAGの発現量を確認する。

小脳 CRAG KO の組織学的な解析

加齢したマウスの CRAG が欠損した細胞では変性タンパク質が蓄積し、細胞死が亢進する可能性が考えられる。したがって、生後6ヶ月、生後1年の形態学的解析、変性タンパク質の蓄積や細胞死を免疫組織染色で観察する。

小脳 CRAG KO の運動機能の解析

小脳 CRAG KO では小脳失調症状が観察できると予想される。したがって、マウスの運動機能の rotarod test を行い、小脳 CRAG KO の運動機能を測定する。

小脳 CRAG KO の電気生理学的な解析

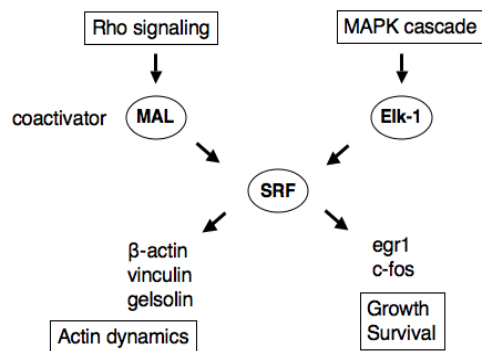
小脳 CRAG KO ではプルキンエ細胞が正常な機能を有しているかどうか電気生理学に解析する。

ウイルスベクターを用いた小脳 CRAG KO に CRAG のレスキュー実験

in vivo において小脳に AAV2 を用いて CRAG を発現させ、小脳プルキンエ細胞に CRAG を発現させ、機能解析のレスキュー実験を行う。

小脳プルキンエ細胞の初代培養細胞を用いた解析

小脳 CRAG KO のプルキンエ細胞をマウスから取り出し、初代培養を行う。レンチウイルスを用いて CRAG を発現させ、神経突起形成や細胞死をレスキューできるか検討する。



SRF の活性化機構

4 . 研究成果

脊髄小脳変性症は治療法が確立されていない神経変性疾患である。本研究グループにより同定された CRAG は、脊髄小脳変性症の原因タンパク質である異常伸長したポリグルタミンタンパク質(PolyQ)の分解を促進すること、および CRAG は転写因子 SRF を活性化することで神経細胞保護することが明らかになっている。しかしながらその詳細な

分子機構、および CRAG の生体内における役割は不明である。私たちは CRAG ノックアウトマウスを作製し解析した結果、CRAG 欠損マウスは生後3週齢で致死を示した。さらに大脳皮質神経細胞、海馬神経細胞、小脳プルキンエ細胞において広範な細胞死が認められた。CRAG は神経細胞の生存に必須の分子であることが明らかになり CRAG が脊髄小脳変性症だけでなく、様々な神経変性疾患に応用できる可能性が示された。CRAG による SRF の活性化機構において CRAG は ELK1 と結合して SRF を活性化することが明らかとなった。これまで CRAG の活性化機構は不明であったが、CRAG 自身がスモ化修飾を受けて核移行することがわかった。さらにスモ化されない CRAG の変異体に核移行シグナルを付加して強制的に核移行させても SRF の活性化は認められなかった。この結果は CRAG のスモ化修飾は核移行のみならず核内でも SRF の活性化に必須であることがわかった。また CRAG は ELK1 を細胞質から核に移行させることにより細胞の生存を高めていることが示唆された。CRAG は神経細胞の細胞死を強力に抑制できることが証明され、脊髄小脳変性症をはじめ神経変性疾患の遺伝子治療に有用であることが示された。現在 CRAG のスモ化酵素の同定を試みている。これまでの知見を論文にまとめ現在投稿中である。

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 6 件)

- (1) Saida, H., Matsuzaki, Y., Takayama, K., Iizuka, A., Konno, A., Yanagi, S., and Hirai, H.
One-year follow-up of transgene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice.
Gene Ther. 21(9), 820-827 (2014)
doi: 10.1038/gt.2014.60.
- (2) Homma, M., Nagashima, S., Fukuda, T., Yanagi, S., Miyakawa, H., Suzuki, E., and Morimoto, T.
Downregulation of Centaurin gamma1A increases synaptic transmission at Drosophila larval neuromuscular junctions.
Eur. J. Neurosci. 40(8), 3158-3170 (2014)
doi: 10.1111/ejn.12681.
- (3) Nagashima, S., Tokuyama, T., Yonashiro, R., Inatome, R., and Yanagi, S.
Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases.
J. Biochem. 155(5), 273-279 (2014)
doi: 10.1093/jb/mvu016
- (4) Konno, A., Shuvaev A.N., Miyake, N., Miyake, K., Iizuka, A., Matsuura, S., Huda,

F., Nakamura, K., **Yanagi, S.**, Shimada, T., and Hirai, H.

Mutant Ataxin-3 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar purkinje cells.

Cerebellum 13(1), 29-41 (2014)

doi: 10.1007/s12311-013-0516-5.

- (5) Nishiyama, T., Hasegawa, E., **Yanagi, S.**, Kudo, Y., Hamada, R., Matsumura, N., Tomino, M., Muromachi, Y., Hatakeyama, K., and Uchino, H.

Simultaneous measurement of cytosolic and mitochondrial Ca(2+) during ischemia in mice whole-brain slice preparation and its application to drug evaluation.

Acta Neurochir. Suppl. 118, 65-70 (2013)

doi: 10.1007/978-3-7091-1434-6_11

- (6) Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H.M., Fukuda, T., Matsushita, T., Inatome, R., and **Yanagi, S.**

MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2.

Mol. Cell 51, 20-34 (2013)

doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.023

[学会発表](計 23 件)

- (1) Tokuyama, T., Nagashima, S., Matsushita, N., Takeda, K., Inatome, R., and **Yanagi, S.**: Generation and Analysis of MITOL Conditional Knockout Mice. The International Symposium on Mitochondria 2013. 2013, 11/7, Tokyo
- (2) Nagashima, S., **Yanagi, S.**: Role of MITOL in Mitochondrial Dynamics. DynaMito2013, the 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondri. 2013, 10/30, Okinawa
- (3) 武田啓祐, **柳 茂**: MITOL 欠損によるオートファジー障害と心不全. 第7回オートファジー研究会 2013 12/20, 掛川
- (4) Shun Nagashima, Ayumu Sugiura, **Shigeru Yanagi**: Role of MITOL in mitochondrial dynamics. 第37回日本分子生物学会年会 ワークショップ「ミトコンドリアを内外から理解する Internal and external mitochondrial biology」2013, 12/3, 神戸
- (5) 松下暢子, 鈴木みどり, **柳 茂**: TAX1BP1 plays a role in immunoglobulin gene diversification through regulation of somatic hyper mutation. 第37回日本分子生物学会年会 2013/12, 神戸
- (6) 武田 啓祐, 長島 駿, **柳 茂**: ミトコンドリア新機能と疾患. 東京医科大学第172回医学会総会 2013, 11/2, 東京
- (7) 松下暢子, 鈴木みどり, 伊波英克, **柳**

茂: TAX1BP1 は体細胞高頻度突然変異を制御することによって抗体遺伝子多様化機構に機能する. 第72回日本癌学会学術総会 2013/10, 横浜

- (8) 鈴木みどり, 松下暢子, 伊波英克, **柳 茂**: TAX1BP1 regulates IgM expression at the cell surface through NF- B pathway, 第72回日本癌学会学術総会 2013/10, 横浜
- (9) 長島 駿, 杉浦 歩, 徳山剛士, 武田啓祐, 稲留涼子, **柳 茂**: Role of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial dynamics and diseases. 86回日本生化学会大会 2013 9/11. 横浜
- (10) Nagashima, S., Takeda, K., Konishim, T., Inatome, R., and **Yanag, S.**: Role of MITOL in neuron. 11th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine ASMRM 2014, 2014, 11/14-15, Taipei
- (11) **柳 茂**: ミトコンドリアダイナミクスの破綻と疾患 第87回日本内分秘学会学術集会「ミトコンドリア生物学からミトコンドリア疾患学へ」. 2014, 4/24, 福岡(招待講演)
- (12) **柳 茂**, 福田 敏史, 稲留 涼子, 長島 駿: CRAG による SRF 活性化を介した神経細胞の生存シグナル機構 第37回日本神経科学会大会. 2014, 9/11, 横浜
- (13) **柳 茂**, 徳山剛士, 武田啓祐, 稲留涼子, 長島 駿: ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL による MAM 制御機構と破綻による疾患 第87回日本生化学会大会 シンポジウム「膜局所場研究と医療イノベーションとの接点」. 2014, 10/15, 京都
- (14) 長島 駿, 稲留涼子, **柳 茂**: 神経回路形成関連分子 CRAG による生存シグナルと神経変性疾患への応用 第87回日本生化学会大会 シンポジウム「病態メカニズムへのオートファジーの多様な関与」. 2014, 10/18, 京都
- (15) **柳 茂**: ミトコンドリア活性化による皮膚老化の抑制機序解明と応用 第161回 FJ セミナー「老化研究とエイジングケア」. 2014, 10, 東京(招待講演)
- (16) **柳 茂**, 徳山剛志, 武田啓祐, 稲留涼子, 長島駿: ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL による老化制御機構 第36回基礎老化学会シンポジウム 日本基礎老化学会-日本ミトコンドリア学会 Joint Meeting 「ミトコンドリアと老化の接点を考える」. 2014, 10/25, 東京(招待講演)
- (17) 武田啓祐, 長島 駿, 徳山剛士, 稲留涼子, **柳 茂**: MITOL による小胞体-ミトコンドリア接着の制御と細胞死 第14回日本ミトコンドリア学会年会 セクション2「ミトコンドリアと酸化ストレス」. 2014, 12/3, 福岡

- (18) 柳 茂 : MITOL によるミトコンドリアダイナミクス制御と破綻による疾患第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会合同大会 シンポジウム 3「ミトコンドリアダイナミクスと病態生理の最先端」2015, 3/21, 神戸
- (19) 鈴木みどり、池辺詠美、伊波英克、柳 茂、松下暢子 : TAX1BP1 は NF-kB 経路を利用することによって抗原特異的抗体産生に機能する . TAX1BP1 Modulates antigen-specific antibody response thorough NF-kB pathway. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014, 10/25, 横浜
- (20) 鈴木みどり、伊波英克、柳 茂、松下暢子 : TAX1BP1 は NF-kB 経路を抑制化することによって特異抗体産生を制御する . 第 87 回日本生化学会大会 . 2014, 10/18, 京都
- (21) 坪井健吾、福田敏史、佐藤愛梨花、谷本悠祐、稲留涼子、柳 茂 : CAMD1 遺伝子ノックアウトマウスにおける学習・記憶の行動学的解析 . 第 37 回日本分子生物学会年会 . 2014, 11/27, 横浜
- (22) 高橋智彦、福田敏史、上原茉莉、佐藤真李子、稲留涼子、柳 茂 : CAMD1 ノックアウトマウスにおける脳内モノアミンレベルおよび抗うつ・不安様行動の解析 . 第 37 回日本分子生物学会年会 . 2014, 11/27, 横浜
- (23) 鈴木みどり、伊波英克、柳 茂、松下暢子 : TAX1BP1 は NF-kB 経路を抑制することによって B 細胞分化を制御する . 第 37 回日本分子生物学会年会 . 2014, 11/27, 横浜

〔書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況(計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕
 ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者
 柳 茂 (YANAGI SHIGERU)
 東京薬科大学・生命科学部・教授
 研究者番号 : 60252003

(2)研究分担者
 ()

研究者番号 :

(3)連携研究者
 ()

研究者番号 :