

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871169

研究課題名(和文)ハンチントン病核内凝集体形成における非コードRNA・MENbの関与についての研究

研究課題名(英文)An analysis of relation between MENb and nuclear foci in Huntington's disease

研究代表者

高橋 理貴(Takahashi, Masaki)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：00549529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ハンチントン病の原因となる変異型ハンチンチンタンパク質の核内凝集体形成と、核内タンパク質係留因子として近年同定された長鎖非コードRNA・MENbとの関連性の有無を明らかにすることである。変異型ハンチンチンタンパク質を発現する株化細胞および疾患モデルマウスを用いた定量的発現解析および局在解析の結果、MENbが変異型ハンチンチン核内凝集体形成に積極的に関与している可能性は乏しいと推察された。

研究成果の概要(英文)：MEN beta (MENb) long non-coding RNA have been identified as an essential factor for structural integrity of nuclear body paraspeckle involved in stress responses. The ability of MENb to retain several nuclear proteins in paraspeckle seems likely to contribute to formation of abnormal nuclear foci observed in neurodegenerative disorders such as Huntington's disease; however, it remains to be elucidated. In this study, we evaluated whether MENb influences organization of nuclear foci in Huntington's disease using model mice and stable cell lines expressing the mutant Huntingtin (mHTT) gene. The expression analysis of MENb and the localization analysis of nuclear foci derived from mHTT in vitro and in vivo suggested a poor relation between MENb and mHTT aggregations.

研究分野：RNA医科学

キーワード：non-coding RNA 神経変性疾患 ハンチントン病 凝集体形成

1. 研究開始当初の背景

近年、長鎖非コード RNA (long non-coding RNA; lncRNA) が種々の生命現象において重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。その lncRNA の一つ “MEN-beta(以下 MENb と略)” は神経細胞で発現が高く、そして核内タンパク質を繋ぎ止める因子であることが分かっている。その機能から “核内凝集体形成” を分子病態とする疾患群への関与が推察されるが、その真偽は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ハンチントン病を対象に、その病因である変異型ハンチンチンタンパク質と MENb との関連を精査し、変異型ハンチンチンタンパク質の核内凝集体形成に対する MENb の積極的な関与の有無について明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究は、MENb と変異型ハンチンチンとの関連性の解明を目指し、1)細胞レベルの詳細な解析と、2)疾患モデルマウスを用いた個体レベルの解析を行った。

1) 培養細胞を用いた変異型ハンチンチン遺伝子の凝集体形成と MENb との分子間相互作用

神経系株化細胞に変異型ハンチンチン遺伝子発現ベクターを導入することで、“外因性変異型遺伝子”と“内在性 MENb”との相互作用を「局在」「発現」の観点から解析した。2)ハンチントン病モデルマウス脳神経系における MENb の時空間的発現変化

疾患モデルマウスの脳組織における内在性の“変異型ハンチンチンタンパク質凝集体”と“MENb”との関連を「発現」「局在」の観点から脳領域別に時経列を追って解析を行った。

4. 研究成果

本研究は「変異型ハンチンチンタンパク質の病的な核内凝集体形成」と「核内構造物(パラスペックル)形成必須因子である非コード RNA・MENb」との関連性を明らかにすること目的としている。

(1)変異型ハンチンチン遺伝子発現株化細胞を用いた in vitro 評価:

始めに、in vitro 評価系に重要となる、変異型ハンチンチン (HTT) の安定発現細胞株の樹立を行った。細胞は神経系の株化細胞 (Neuro2A 細胞、SH-SY5Y 細胞) を用い、変異型 HTT 遺伝子は GFP タグ結合型のフュージョンタンパク質として発現させた。蛍光顕微鏡観察とウエスタンブロットによって視覚的および定量的に導入遺伝子の発現を確認した。安定発現株の樹立後、まず変異型 HTT 遺伝子の発現の有無によって細胞生存率に影響が出るのか否かを評価した結果、影響が

ないことが分かった。さらに、分化誘導時の細胞生存率についても確認したが変化は見られなかった。これらのことから、株化細胞では変異型 HTT の発現によって核内外に封入体は観察できるが、生存率には影響がないことが明らかとなった。

次いで、上記条件下における MENb の発現解析を実施した。未分化な細胞では、変異型 HTT の有無により MENb の発現に変化は見られなかった。しかし分化誘導後では、正常 HTT 発現細胞において MENb の発現が 2 倍近く上昇すること、変異型 HTT 発現細胞では MENb の発現上昇が若干抑制されることが分かった。このことから、分化誘導というストレス条件下において MENb が発現上昇する事、その際に変異型 HTT が発現していた場合、直接的あるいは間接的に MENb の発現に影響するが、その程度は極めて小さいことが示唆された。

(2)ハンチントン病モデルマウスを用いた個体レベルでの評価:

個体レベルでの検証のため、ハンチントン病モデルマウス (R6/2) とこれに対応する野生型マウスより脳組織 (大脳皮質、中脳、線条体、海馬、小脳) をサンプリングし、MENb の遺伝子発現解析を行った。その結果、モデルマウスでは、発症後 (8 週齢) 病変部位 (大脳皮質および線条体) において MENb の発現が上昇していることが分かった。しかし、症状が進行し、10 週齢程度になると MENb の発現は小脳以外では 2 割程度低下していた。この発現変化は神経変性の進行の程度等と関係している可能性があるが、その因果関係を調べるためには詳細な解析が必要である。

さらにモデルマウスを用いた個体レベルの実験では、上記脳組織を用いて、ウエスタンブロット法によりパラスペックルマーカータンパク質 (PSPC1、PSF) の発現解析を実施したが野生型マウスとモデルマウス (R6/2) の脳組織では、それらの発現に違いが見られなかった。また局在解析のため、パラスペックルマーカータンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行ったが、野生型マウスの正常脳組織とは違い、モデルマウスでの脳組織では全体的に染色性が悪く、明確な局在解析が困難であった。ウエスタンブロットではマーカータンパク質の発現が両マウスで確認できていたため、再度検証が必要となる。

上記の細胞および個体レベルでの発現解析の結果より、MENb は病的な状態において発現変化を示すが、その程度が軽微 (1.5 倍 ~ 0.8 倍) であること、パラスペックルマーカータンパク質の発現量に変化がないことから、変異型 HTT タンパク質の核内凝集と MENb との直接的な関与は乏しいものと推察された。

(3) MENb との相互作用が疑われた

microRNAに関する解析：
モデルマウスにおいて、ハンチントン病の発症とともに発現上昇する MENb に対し、配列相補性を示す microRNA が病的症状を示す以前からモデルマウスの脳内で発現低下していることが分かったため、これについても解析を進めた。その結果、MENb と該 microRNA との直接的関連性は不明確であったが、大変興味深い事に発現低下している該 microRNA を、モデルマウスの脳内で補充 (AAV ベクター脳内投与による過剰発現) することで病的な症状 (行動テスト) の緩和だけでなく、寿命も若干延命することが分かった。次いで、その治療効果の分子機構を明らかにするため幾つか解析を行ったところ、該 microRNA は神経細胞の機能に必須な構造体シナプスに関連するタンパク質の発現促進に関与することが明らかとなった。本研究成果は、有効な治療法が存在しないハンチントン病に対する新たな治療戦略を提案することに加え、シナプスの数的 (あるいは質的) な低下が疾患症状の増悪に関わる難治性神経疾患にも有望な、新たな治療戦略となりうる可能性があると考えられる。

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 7件)

Takahashi M, Suzuki M, Fukuoka M, Fujikake N, Watanabe S, Murata M, Wada K, Nagai Y, Hohjoh H: "Normalization of overexpressed alpha-synuclein causing Parkinson's disease by a moderate gene silencing with RNA interference" *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 May 12;4:e241. 査読有.
DOI: 10.1038/mtna.2015.14.

Kashima I, Takahashi M, Hashimoto Y, Sakota E, Nakamura Y, Inada T: "A functional involvement of ABCE1, eukaryotic ribosome recycling factor, in nonstop mRNA decay in *Drosophila melanogaster* cells" *Biochimie*, 2014 Nov;106:10-6. 査読有.
DOI: 10.1016/j.biochi.2014.08.001.

Takahashi M, Hohjoh H: "A novel measurement of allele discrimination for assessment of allele-specific silencing by RNA interference" *Mol Biol Rep*. 2014 Nov;41(11):7115-20. 査読有.
DOI: 10.1007/s11033-014-3586-7.

Fukuoka M, Yoshida M, Eda A, Takahashi

M, Hohjoh H: "Gene silencing mediated by endogenous microRNAs under heat stress conditions in mammalian cells" *PLoS One*. 2014 July 28; 9(7): e103130. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0103130.

Sawano E, Takahashi M, Negishi T, Tashiro T: "Thyroid hormone-dependent development of the GABAergic pre- and post-synaptic components in the rat hippocampus" *Int J Dev Neurosci*. 2013 Sep 26. 査読有.
DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2013.09.007.

Takahashi M, Chiyo T, Okada T, Hohjoh H: "Specific inhibition of tumor cells by oncogenic EGFR specific silencing by RNA interference" *PLoS One*. 2013 Aug 8;8(8):e73214. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0073214.

Kabuta T, Mitsui T, Takahashi M, Fujiwara Y, Kabuta C, Konya C, Tsuchiya Y, Hatanaka Y, Uchida K, Hohjoh H, Wada K: "Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) Acts as a Novel Potentiator of Cyclin-dependent Kinases to Enhance Cell Proliferation, Independent of its Hydrolase Activity" *J Biol Chem*. 2013 May 3;288(18):12615-26. 査読有.
DOI: 10.1074/jbc.M112.435701.

[学会発表](計 10件)

Takahashi M, Hashimoto Y, Sakota E, Nakamura Y: "Development of an efficient Cell-SELEX to generate RNA aptamers against a cell surface protein of interest" *The Oligonucleotide Therapeutics Society 11th Annual Meeting, Stadspodia, Leiden, Netherlands, 11-14, Oct, 2015*

橋本芳史、高橋理貴、迫田絵理、中村義一: The fate of naturally truncated nonstop mRNA in *Drosophila* cells、第17回日本RNA学会年会、2015年6月15-17日、北海道札幌市中央区、ホテルライフォート札幌

Takahashi M, Nakamura Y, Hohjoh H: "Application of atypical RNAi for human diseases" *Joint Australia and Japan RNA (jajRNA) meeting, University of Technology Sydney, Sydney, Australia, 3 Nov 2014.*

Takahashi M, Fukuoka M, Hohjoh H: "Early drug responses that are

followed by an acquired drug resistance in non-small cell lung cancer cells exposed to gefitinib" The American Society of Human Genetics (ASHG) 64th annual meeting, San Diego, USA, 19 Oct 2014

Fukuoka M, Yoshida M, Eda A, Takahashi M, Hohjoh H: "Gene silencing mediated by endogenous miRNAs under heat stress conditions in mammalian cells" The American Society of Human Genetics (ASHG) 64th annual meeting, San Diego, USA, 20 Oct 2014,

福岡聖之、吉田満史子、枝垂希子、高橋理貴、北條浩彦: 熱ストレス下におけるマイクロ RNA の遺伝子発現制御に関する解析、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 26 日、神奈川県横浜市パシフィコ横浜

北條浩彦、高橋理貴、枝垂希子、福島達伸: 老化モデルマウスおよび正常加齢マウスにおける miR-29 の発現上昇とそれに伴うコラーゲンタイプ IV の発現低下、第 59 回日本人類遺伝学会大会、2014 年 11 月 21 日、東京都江戸川区タワーホール船堀

Furuya H, Takahashi M, Hohjoh H, Era T: " Construction of Drug Screening System and Allele-Specific Silencing Against Pathogenic ALK2 Mutants in Pluripotent Stem Cell (iPSC) of Fibrodysplasia Ossificans Progressive (FOP)" 42nd Annual Meeting of the Child-Neurology-Society, Texas, USA, Oct 30 - Nov 2, 2013

Takahashi M, Suzuki M, Fujikake N, Murata M, Wada K, Nagai Y, Hohjoh H: " A corrective gene silencing by RNA interference to control over-expressed SNCA " The American Society of Human Genetics (ASHG) 63rd annual meeting, Boston, USA, 22 Oct 2013

高橋理貴、鈴木マリ、藤掛伸宏、村田美穂、和田圭司、永井義隆、北條浩彦: 野生型 シヌクレイン過剰発現に対する遺伝子発現補正型 RNAi 誘導法の確立と有効性評価、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、兵庫県神戸市神戸国際展示場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: シナプス形成増強剤及び神経変性疾患治療剤

発明者: 北條浩彦、高橋理貴

権利者: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

種類: 特許

番号: 特願 2015-248219

出願年月日: 2015 年 12 月 21 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 3 件)

名称: 優性アレル発現抑制剤

発明者: 北條浩彦、高橋理貴

権利者: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

種類: 特許

番号: US 8,946,185 B2

取得年月日: 2015 年 3 月 3 日

国内外の別: 国外 (USA)

名称: 優性アレル発現抑制剤

発明者: 北條浩彦、高橋理貴

権利者: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

種類: 特許

番号: ZL201180030038.8

取得年月日: 2015 年 4 月 22 日

国内外の別: 国外 (中国)

名称: 長鎖繰返し配列を含有する遺伝子又は遺伝子産物の選択又は優先的回収方法

発明者: 北條浩彦、高橋理貴

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許

番号: 5716217

取得年月日: 2015 年 3 月 27 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 理貴 (TAKAHASHI, Masaki)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号: 00549529

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし