

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 分担研究報告

『ポリグルタミン病の核機能病態に基づく治療開発』に関する研究

研究分担者 岡澤 均 （東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野）
共同研究者 田川一彦 （東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野）
田村拓也 （東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野）
伊藤日加瑠（東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野）

研究要旨

私たちはこれまで、神経変性疾患病態で神経細胞における DNA 損傷修復異常が共通生ずる可能性を提唱している。すでに脊髄小脳失調症 1 型モデル動物において DNA 二重鎖切断が亢進していることを示した。しかし、数ある DNA 修復メカニズムの内、どの修復経路異常が病態に寄与しているかは不明であった。私たちは寿命短縮などの表現型を示す脊髄小脳失調症 1 型モデルショウジョウバエを用いた解析を新規に開発している。そこで、この系を用い脊髄小脳失調症 1 型の症状を改善できる DNA 修復関連遺伝子を *in vivo* でスクリーニングした。その結果、RPA1 の過剰発現により寿命の短縮と DNA 二重鎖切断の両方が改善できることを明らかにした。一方、我々のモデルショウジョウバエに対し CHK1 は寿命をさらに短縮したが、CHK1 阻害剤には寿命延長効果があった。

A. 研究目的

ポリグルタミン病では核内封入体の形成が病理学的特徴である。また、SCA1, 2, 7, 17 などの原因タンパク質は正常な機能として転写、スプライシングなどの核機能に関与することが知られている。私たちは、疾患タンパクを発現する神経細胞のプロテオームあるいはインタラクトームの解析から、疾患タンパクの病態上のターゲット分子として HMGB および Ku70 を発見し、これら分子の機能障害を介した DNA 損傷修復不全がポリグルタミン病の主要病態である可能性を示してきた。

HMGB1 はクロマチンリモデリングに機

能を持ち、どのようなタイプの DNA 損傷修復においても重要な役割を果たすと考えられる。そのため、ハンチントン病モデルのショウジョウバエ及びマウスに対する治療効果を持っていた(Qi et al., Nature Cell Biol 2007)。一方、Ku70 は非相同末端結合 (non homologous end-joining, NHEJ) という DNA 二重鎖切断修復に特異的に必要な分子である。そのため、その治療効果は NHEJ 阻害を主病態とするハンチントン病に限定的であった(Enokido et al., JCB 2010, Tamura et al., PLoS ONE 2011, and unpublished data)。

今回、数ある DNA 損傷修復のメカニズ

ムのうちどの経路が SCA1 病態において重要であるかをショウジョウバエ *in vivo* スクリーニングとシステムズバイオロジーを用いて検討を行った。

B. 研究方法

OK6-Gal4 のコントロール下で運動ニューロン特異的に SCA1 原因遺伝子、変異型アタキシン 1 (AT1-82Q) を発現するショウジョウバエ、OK6>AT1-82Q を用いた。OK6>AT1-82Q は羽化率の低下や寿命の短縮などの表現形を示す。このモデルショウジョウバエに国立遺伝学研究所に存在する Gene Search (GS) 系統の中から DNA 損傷関連遺伝子を発現する 38 系統を掛けあわせ、羽化率及び寿命を回復させる遺伝子を *in vivo* でスクリーニングした。

スクリーニングの結果を IPA (Ingenuity inc.) ソフトウェアによりネットワーク解析し、特に重要な DNA 損傷修復経路を推定した。また、回復効果を確認するため免疫染色により、DNA 二重鎖切断マーカー、 γ H2Av のシグナル強度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験および組み替え DNA 実験は所轄官庁の指針に従って行い、また東京医科歯科大学の承認を得て行った。

C. 研究結果

スクリーニングの結果、寿命の短縮を回復できる 8 つの遺伝子を同定した。RPA1、XRCC3、XRCC4、CCNH、PER1、POLE、POLH そして PNKP である。モデルショウジョウバエの寿命は平均 22.8 日と野生型の 33.7 日に比べ顕著に短い。RPA1 の効果は

特に強く、共発現により平均 33.9 日と野生型レベルまで回復することが出来た。また、寿命をさらに短縮する 12 の遺伝子を同定した。LIG1、LIG3、XAB2、FEN1、ERCC2、ERCC5、CHEK1、BLM、SP011、XAB2、RecQL5、EME1 及び MUS81 である。羽化率を用いたスクリーニングでは、RPA1、CHK1、RecQL5 に回復効果があった。

次に寿命の結果を基に IPA ネットワーク解析を行った。寿命延長遺伝子から作られたネットワークにおいて、RPA1 が中心にありハブ的な役割を果たしていることが推定された。一方、寿命短縮遺伝子からなるネットワークのハブ的中心には CHK1 が存在した。そこで、これらの 2 つの遺伝子が実際に病態をコントロールするか、複眼変性モデルで確認した。予想通り、RPA1 は過剰発現で変性を回復し、ロックダウンで悪化させた。CHK1 は過剰発現で変性を悪化させ、ロックダウンで回復した。さらに、CHK1 阻害剤 (CHIR-124) をエサに混ぜたところ、0.02mg/ml の濃度で寿命を平均 29 日にまで回復することが出来た。

RPA1 は一本鎖 DNA を保護する役割を持ち、二重鎖切断部位に集積することで相同組換え修復 (HR 修復) に役割を果たす。変異型アタキシン 1 が RPA1 に結合しその働きを阻害することが DNA 損傷亢進の原因ではないかと考えその検証も行った。免疫沈降法により、神経細胞においてアタキシン 1 と RPA1 が結合することが示された。この結合は変異型アタキシン 1 により強かった。また、SCA1 モデルマウス (Atxn1-154Q KI マウス) で両者の核内の共局在を免疫染色により確認している。

さらに、マイクロレーザー照射法により、DNA 損傷部位への RPA1 集積を観察した。変異型アタキシン 1 を発現した U2OS 細胞では RPA1 のダメージ部位への集積が阻害されていた。これらの結果から変異型アタキシン 1 による RPA1 の機能阻害が明らかとなった。

D. 考察

私たちの行ったスクリーニングにより、複数の DNA 損傷修復関連遺伝子が SCA1 の病態を回復できる可能性が示された。また、システムバイオロジー解析により SCA1 病態における DNA 損傷修復において最も重要な役割を果たしていると考えられる分子、RPA1 を特定することが出来た。驚くべきことに RPA1 は HR 修復に重要な役割を担う BRCA2 とも結合した。また、BRCA1, 2 は変異型アタキシン 1 とも結合した。この事は変異型アタキシン 1 が HR 修復複合体の機能を阻害する事を示唆している。HR 修復は細胞周期の動いている細胞でのみ働く機構である。しかし神経細胞は G0 期にあり、疑問点であった。しかしながら、近年では変性疾患における細胞周期リエントリーがしばしば報告されている。実際に私たちが検証したところ、SCA1 モデルマウスにおいて BrdU を取り込むプルキンエ細胞を発見している。このことから、RPA1 は SCA1 病態において細胞周期が再開した神経細胞の DNA 損傷を修復する機能があるのではないかと考えられる。

E. 結論

私たちの研究により、従来考えられて

いなかった、HR 修復の SCA1 病態への関与が明らかとなった。今回の結果から RPA1 による治療の可能性が見出された。また、CHK1 阻害剤が治療薬となる可能性も見出された。

これまで、私たちが明らかにしてきた SCA1 病態を回復する分子は、それぞれ DNA 損傷修復の異なるステップに関与している。そのため、これらの分子を同時に発現することで、相加的・相乗的に治療効果が得られることを期待している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Barclay SS, Tamura T, Ito H, Fujita K, Tagawa K, Shimamura T, Katsuta A, Shiwaku H, Sone M, Imoto S, Miyano S, Okazawa H: Systems biology analysis of *Drosophila in vivo* screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1. Hum Mol Genet 2014; 23(5): 1345-1364
- 2) Ikeuchi Y, de la Torre L, Matsuda T, Steen H, Okazawa H, Bonni A: The XLID protein PQBP1 and the GTPase dynamin 2 define a signaling link that orchestrates ciliary morphogenesis in postmitotic neurons. Cell Reports 2013; 4(5): 879-89
- 3) Shiwaku H, Yagishita S, Eishi Y, Okazawa H: Bergmann glia are reduced

- in spinocerebellar ataxia type 1. Neuroreport 2013; 24: 620-625
- 4) Li C, Ito H, Fujita K, Shiwaku H, Qi Y, Tagawa K, Tamura T, Okazawa H: Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, an Intellectual Disability-Microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells. PLOS ONE 2013; 8: e68627
- 5) Fujita K, Nakamura Y, Oka T, Ito H, Tamura T, Tagawa K, Sasabe T, Katsuta A, Motoki K, Shiwaku H, Sone M, Yoshida C, Katsuno M, Eishi Y, Murata M, Taylor JP, Wanker EE, Kono K, Tashiro S, Sobue G, La Spada AR, and Okazawa H: A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA damage repair in multiple polyglutamine diseases. Nature Commun 2013; 4: 1816

2. 学会発表

〔国際学会〕

- 1) Ito H, Tagawa K, Okazawa H: “ HMGB1 as a therapeutic molecule candidate for spinocerebellar ataxia type1 (SCA1). ” Neuro2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Tokyo, 2013.6.20-23 (6/21) (Oral)
- 2) Tamura T, Barclay SS, Fujita K, Ito H, Motoki K, Shimamura T, Tagawa K, Katsuta A, Shiwaku H, Sone M, Tagawa K, Imoto S, Miyano S, Okazawa H: “ Replication - dependent DNA repair in SCA1 pathology. ” Neuro2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Tokyo, 2013.6.20-23 (6/20)(Poster)
- 3) Okazawa H: “ Brain disease researches and brain bank. ” Neuro 2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Tokyo, 2013.6.20-23(6/22) (Symposia)
- 4) Okazawa H: “ Morphological and molecular changes of synaptic spines in mouse models of PQBP1-linked intellectual disability. “ The 16th International Workshop on Fragile X, Novotel Barossa Valley Resort, Australia, 2013.9.17-20
- 〔国内学会〕
- 1) 伊藤 日加瑠, 田川 一彦, 岡澤均:「HMGB1を用いた脊髄小脳失調症1型モデルマウス治療の試み」(口演), 第54回日本神経病理学会総会学術研究会タワーホール船堀、2013.4.24-26 (発表日 4/26)
- 2) 伊藤 日加瑠, 田川 一彦, 岡澤均:「HMGB1を用いた脊髄小脳変性症1型モデルマウス治療への試み」(口演), 第54回日本神経学会学術大会東京国際フォーラム, 2013.5.29-6.1 (発表日 5/30)
- 3) 田村 拓也, Barclay S Sam, 藤田 慶大, 伊藤 日加瑠, 本木 和美, 島村 徹平, 田川 一彦, 勝田 明寿香, 曾根 雅紀, 井元 清哉, 宮野 悟, 岡澤均:「脊髄小脳変性症1型におけるDNA損傷修復遺伝子の効果; in vivo screening

- による解析」(ポスター), 第 54 回日本神経学会学術大会東京国際フォーラム、2013.5.29-6.1 (発表日 5/30)
- 4) Ito H, Tagawa K, Okazawa H: “HMGB1 as a therapeutic molecule candidate for spinocerebellar ataxia type1 (SCA1).” (口演) Neuro2013, 国立京都国際会館, 2013.6.20-23 (発表日 6/21)
- 5) Tamura T, Barclay SS, Fujita K, Ito H, Motoki K, Shimamura T, Tagawa K, Katsuta A, Sone M, Imoto S, Miyano S, Okazawa H: “causative pathway underlying in spinocerebellar ataxia type 1” (ポスター), Neuro2013, 国立京都国際会館, 2013.6.20-23 (発表日 6/20)
- 6) 藤田慶大, 中村蓉子, 岡 努, 伊藤日加瑠, 田村拓也, 田川一彦, 岡澤 均: 「TERA/VCP/p97 の DNA 修復機能不全は複数の神経変性疾患に関与する」(ポスター), 第 32 回日本認知症学会学術集会, キッセイ文化ホール・松本市総合体育館, 2013.11.8-10 (発表日 11/9)
- 7) 田村拓也: 「神経変性疾患モデルショウジョウバエを用いたバイオインフォマティクス解析」(口演), 第六回高次分子機能研究会, 軽井沢ホテル, 2013.9.17-19 (発表日 9/17)
- 8) 藤田慶大, 中村蓉子, 岡 努, 伊藤日加瑠, 田村拓也, 田川一彦, 笹邊俊和, 勝田明寿香, 本木和美, 塩飽裕紀, 曾根雅紀, 吉田千里, 岡澤 均: 「複数のポリグルタミン病における TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(ポスター), 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 2013.12.3-6 (発表日 12/4)
- [招待講演・セミナー]
- 1) 岡澤 均: 「神経疾患タンパク質研究とブレインバンク」, 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 シンポジウム・ブレインバンク, タワーホール船堀, 2013.4.24-26 (発表日 4/26)
- 2) 岡澤 均: 「神経変性疾患の分子標的治療を目指して」, 横浜市立大学大学院生命医科学研究科 大学院講義横浜市大鶴見キャンパス, 2013.5.20
- 3) 岡澤 均: 「脳疾患研究とブレインバンク Brain disease researches and brain bank」, Neuro2013 シンポジウム, 国立京都国際会館, 2013.6.20-23 (発表日 6/22)
- 4) 岡澤 均: 「網羅的リン酸化タンパク質質量解析を用いた神経変性病態の解明の試み」, AB SCIEX 質量分析計によるタンパク質発現量解析セミナー, UDX GALLERY NEXT-1, 2013.7.17
- 5) 岡澤 均: 「網羅的リン酸化タンパク質質量解析を用いた神経変性病態の解明の試み」, AB SCIEX 質量分析計によるタンパク質発現量解析セミナー, 新大阪ブリックビル, 2013.7.19
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**
- 1. 特許取得**
- 発明: 脊髄小脳変性症 1 型を予防又は治療するための薬剤
- 出願者: 国立大学法人 東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

特願 2013-214155

2. 実用新案登録

3. その他

岡澤 均 夢のクスリ –医療研究最
前線– 『DNA 修復阻害メカニズムの解
明』、代ゼミナルジャーナル vol 619,
No 2, 2013 (代々木ゼミナル)

HDとSCA1のDNA損傷修復病態の共通性・特異性

