論文の内容の要旨

論文題目：歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)トランスジェニックマウスを用いたポリグルタミン病の病態機序の解明 -遺伝子転写障害の関与の検討-

指導教員：辻省次先生

東京大学大学院医学系研究科平成 16 年 4 月入学

医学博士課程脳神経医学専攻

鈴木一詩

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)は DRPLA 遺伝子中の CAG 繰り返し配列の異常伸張を原因とする進行性の神経変性疾患である。同種の疾患はポリグルタミン病と総称され、①CAG リピート数が 35~40 を超えると発症、②リピート数と発症年齢の逆相関、③神経細胞中の変異蛋白を含む核内封入体の出現、等の共通点から発症には共通の機序が関与すると推測される。近年、変異蛋白と種々の転写関連蛋白との相互作用や、モデル動物における種々の遺伝子発現低下の報告などから、遺伝子の転写障害を主体とする神経細胞の機能障害が病態の核心である可能性が高まっている。一方、神経細胞には神経活動依存性に転写を活性化する機構が存在し、神経細胞の生存や分化、シナプス可塑性等様々の面で重要な役割を果たしている。特に、転写因子 CREB(cyclic-AMP-response-element-binding protein)は、種々の細胞内シグナル伝達系の集約点に位置して Fos などの最初期遺伝子群の転写を誘導し、転写活性化に重要な役割を担っている。近年、ポリグルタミン病の病態機序としてこの CREB 系を中心とした転写活性化機構の障害も注目されており、HDAC 阻害薬などの転写賦活を目的とした薬剤の治療効果も報告されている。1999 年 Sato らにより作成された DRPLA トランスジェニックマウス 4 系統（Q76, Q96, Q113, Q129）は、ヒト変異 DRPLA 遺伝子が全長かつ単一コピーで同一箇所に導入され、CAG リピート数以外の点において遺伝学的にほぼ同一であり、脳において週齢及びリピート長依存性に変異蛋白の核内集積が増加する等、ポリグルタミン病の病態をよく反映したモデルである。本研究では、これら 4 系統のマウスの①行動表現型、②遺伝子発現プロファイルを検討し、③更にトランスジェニックマウス脳の転写活性化障害とその回復を検討する。

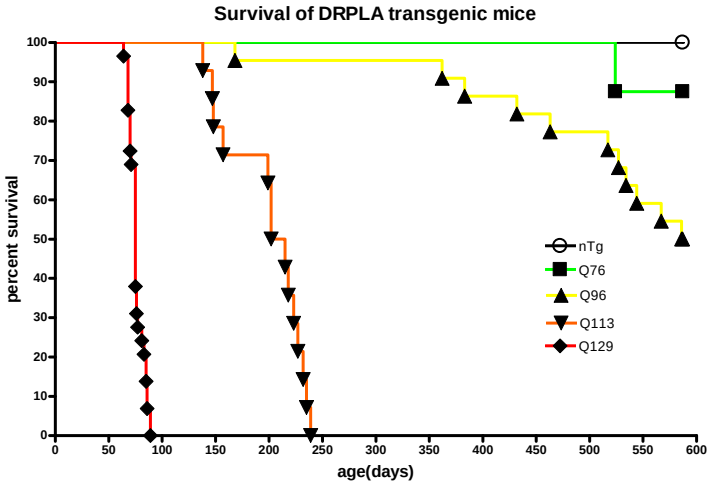
①最初に、各系統の生存期間及び体重は明確に導入遺伝子のリピート長に依存して短縮、減少が認められた **(Fig1,2)**。また加速ロタロッド試験 **(Fig3)**, Beamwalking 試験の運動協調性評価では Q129、Q113、Q96 の各系統がリピート長依存性、週齢依存性の成

績低下を示した一方、最短リピートの Q76 は障害を認めなかった。更に、情動行動の評価のオープンフィールド試験では、Q129、Q113、Q96 の 3 系統がリピート長依存性の活動低下を示した一方、Q76 は nTg よりも寧ろ有意に活動性が亢進していた。最後に、Home cage 内での活動を測定したところ、Q76 は nTg と総運動量の差を認めず活動の概日リズムも保たれていたが、Q96、Q113、Q129 マウスでは、暗時間における活動量が減少し、かつその程度はリピート長依存性に悪化した。更に、同一系統(Q113)で経時的に観察を行ったところ、週齢依存性に正常な睡眠覚醒リズムが失われた。以上のように、生存期間、体重減少、運動協調性障害に関しては明確なリピート長依存性、週齢依存性の悪化が認められ、変異蛋白のリピート長の伸長が直接にこれらの表現型を悪化させることが示された。これらの表現型は進行性の変異タンパクの蓄積、脳萎縮に伴って表出しており、ヒト DRPLA における症状の経過と神経変性の過程の特徴をよく再現していた。一方で Q76 の活動性亢進、Q113 マウスの睡眠覚醒リズムの障害など、過去のマウスモデルからは非典型的な表現型もみられたが、これらはヒト DRPLA 症例の精神症状や睡眠障害等との類似性を窺わせる。本マウスの病理学的検索からは、これらの表現型の背景に DRPL 系以外の広汎な部位に及ぶ変異タンパクの蓄積が存在することが判明している。特に、摂取エネルギー調節、睡眠覚醒リズムなどの中枢である視床下部に関しては、過去にもヒト症例やマウスモデルでの検討で機能障害が存在する可能性が指摘されており、DRPLA の多様な臨床像の背景には、これら視床下部を含む「早期からの脳内の広範な部位に及ぶ変異蛋白の蓄積」があると考えられる。

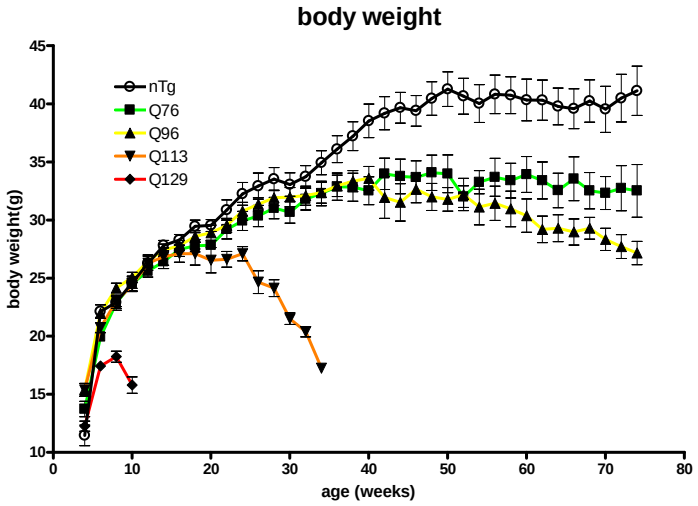
②次に、マイクロアレイによる Tg マウス大脳、小脳の網羅的な発現解析を行なった**(Fig4)**。同一検体を 2 種の異なるプラットフォームを用いて解析した結果、双方は互いに高い相関を示し、正の相関を示した遺伝子数は不の遺伝子数を大きく上回った**(Fig5)**。この結果から、cross-platform analysis はマイクロアレイ解析結果の網羅的かつハイスループットな確認の方法として信頼性が高いことが証明された。この方法を用いて、同週齢の nTg を対照とした DRPLA マウス大脳及び小脳の発現変動遺伝子数を算出した結果、その数はリピート長依存性に顕著に増加しており、マウスの表現型の重症度とよく相関することが示された。更に、変動遺伝子群を同定するため、Tg/nTg の発現比データを基に週齢および系統を変動因子とした 2way-ANOVA を行い、両方の platform で Interaction p-value<0.005 であった遺伝子（大脳: 204 遺伝子、小脳: 431 遺伝子）を発現変動パターンによりクラスタリングし **(Fig6, Fig7)**、各々のクラスターに付与された Gene ontology を集計して属する遺伝子の傾向を分析した。その結果大脳、小脳に共通して発現低下遺伝子の多数を占めたのはカルシウムイオン結合蛋白群であり、また calcium signaling pathway とその下流、phosphatidylinositol signaling system, MAPK signaling pathway の構成要素である遺伝子が多く含まれた。カルシウムシグナリングは種々のシグナル伝達経路の集約点に位置する非常に多様な役割を担っており、これらの遺伝子の発現低下は転写活性化の障害に大きな影響を与えていると考えられる。更に大脳では、Penk1, Npy, Cart,

Sst などの視床下部由来の神経ペプチドの発現低下も特徴的であり、行動解析の結果から視床下部の障害が示唆された点に合致した。他方小脳では、神経細胞の発生、分化、発達に関する遺伝子群が低下していた。本マウスでは病理学的にも神経細胞の萎縮やスパインの数の減少が報告されており、ヒトにおける小脳症状の発現にもこれらの遺伝子の発現異常による神経回路の形成不全が関与する可能性がある。先行研究では、上昇遺伝子の多くはストレス反応関連の遺伝子とされていたが、今回の検討では上昇遺伝子の大部分を nucleotide binding protein や、蛋白修飾に関与する核内蛋白など生理的に重要な機能性タンパクが占め、単に反応性の上昇にとどまらない可能性が示唆された。更に今回の検討では、4 週齢の Q129 マウスで発現が一過性に上昇する一群の遺伝子群が大脳と小脳の双方で確認され、その多くは Cdkn1a, Sgk, Trp53inp1, Tsc22d3, Agt 等の細胞死とその制御に関する遺伝子であった。これらの変化は病初期の変異 DRPLA 蛋白の細胞毒性の発現とそれに対する神経保護機構の表出と考えられる。更に小脳では、RNA スプライシング、クロマチン構造、転写などの転写プロセスに関与する遺伝子も多く含まれ、発症早期から転写制御機能の異常が存在する可能性が示唆された。

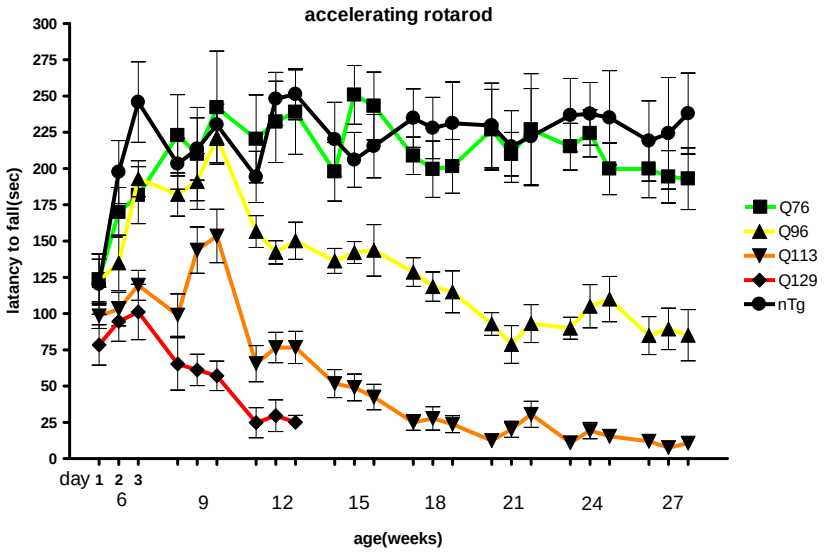
③更に、神経系における転写制御は種々の刺激に応じて変動する動的なシステムであるため、これを薬剤刺激に対する Fos mRNA 発現の活性化という形で定量的に検討した。マウス腹腔内に 15mg/kg、25mg/kg のカイニン酸を投与し、1,2h 後に海馬を摘出してリアルタイム定量的 RT-PCR で Fos mRNA の上昇度を定量した。結果、8 週齢の Q129 Tg と nTg 各群では、15mg/kg 、25mg/kg, 1h, 2h 後いずれの条件でも Tg は nTg に比し Fos の上昇度が有意に低かった。更に 12 週齢と 22 週齢の Q113 マウスで経時的変化を検討した **(Fig8,9)**。12 週齢群では 25mg/kg 投与群には有意な Fos 低下は観察されなかったが、22 週齢群では 15mg/kg、25mg/kg の両方で有意に Fos mRNA 誘導が低下し、転写活性化障害が進行性に悪化した可能性が考えられた。更に、カイニン酸に先行してヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)阻害薬である酪酸ナトリウム (SB)を前投与し、この Fos mRNA 転写活性化障害がどのように変動するかを検討した。予備実験で SB の単独投与は濃度依存性にマウス海馬のアセチル化ヒストン H3 を上昇させることを確認した。そこで 12 週齢 Q113Tg マウスに SB 1800mg/kg を投与し、20 分後にカイニン酸 15mg/kg を投与して 1,2h 後 Fos を定量したところ、SB 前投与群では非前投与群に比し Fos 上昇度が有意に改善した**(Fig10)**。カイニン酸は、細胞内へのカルシウム流入を介して CAMK や MAPK を介する経路を活性化、クロマチン再構成等を経て Fos を誘導すると推測される **(Fig11)**。この経路が発現プロファイリングの結果から病態への関与が最も強く疑われた calcium signaling pathway と一致する部分が多いことは非常に興味深く、転写活性化障害には細胞内の Ca 恒常性の障害が関与することが示唆された。更にその障害はヒストンのアセチル化というエピジェネティックな転写制御機構に介入することより回復する可能性が示された。この点において、今回の結果はポリグルタミン病の治療研究に新たな側面を提示するものである。



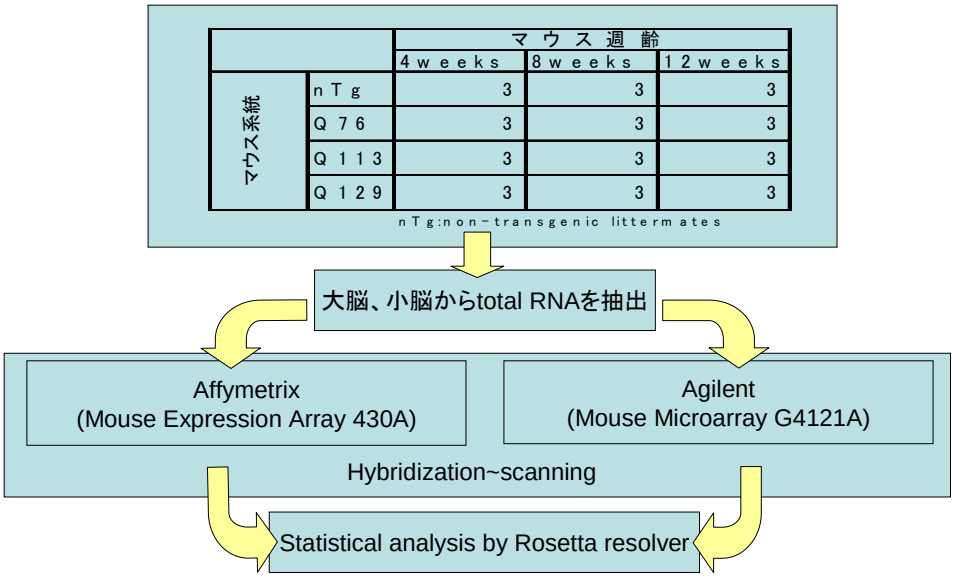
- Fig.1 DRPLAトランスジェニックマウス各系統の生存曲線　Q129、Q113、Q96のメジアン生存期間(median survival time) は 各々75、208.5、586.5日であった。観察期間中、Q76の死亡は一匹のみで、nTgとの間に生存期間の有意差はみられなかった。



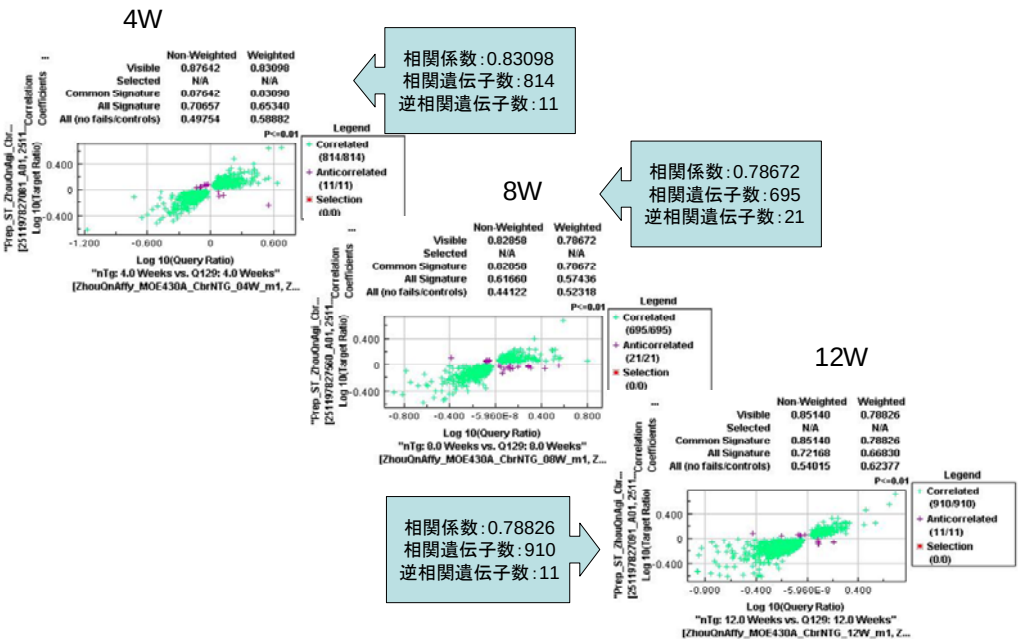
- Fig. 2 DRPLAトランスジェニックマウス各系統の体重の変遷　各シンボルは体重の平均値、Error barは±標準誤差(SEM)を示す。



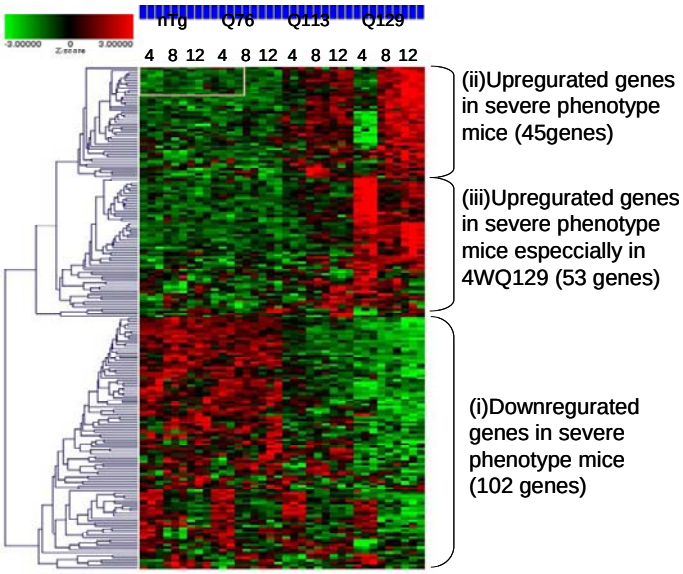
- Fig. 3 DRPLAトランスジェニックマウス各系統における加速ロタロッド試験の経時的変化。 各シンボルはロッド上滞在時間(latency to fall、単位；秒)の平均値、Error barは±標準誤差(SEM)を示す。



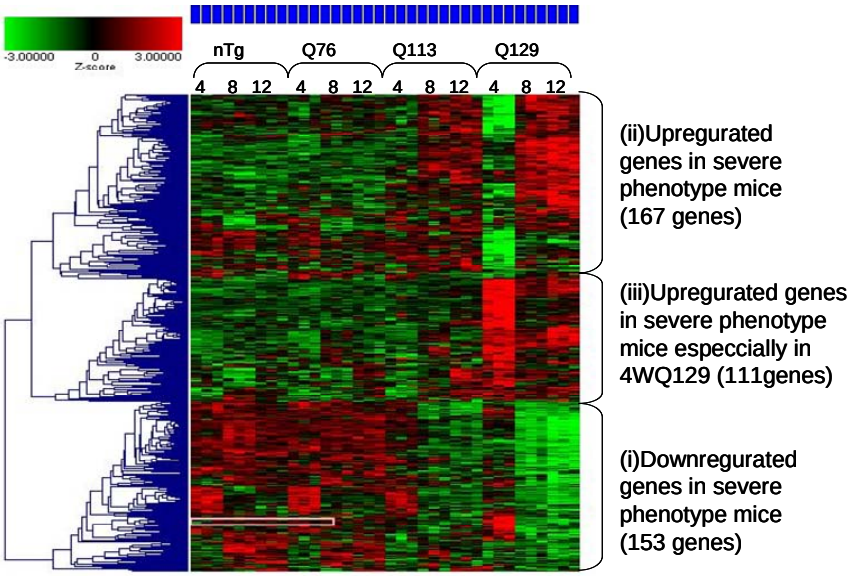
- Fig. 4 DRPLAトランスジェニックマウス大脳、小脳を用いたCross-platform expression profiling



- Fig. 5 4,8,12週齢 Q129マウス大脳のAffymetrix-Agilentのcompare plot



- Fig. 6 大脳において有意な変動のみられた204遺伝子のAgglomerative clusteringの結果。結果はAffymetrixでのnTgマウスに対する発現量比(z-scoreに変換)で示し、赤が上昇、緑が減少を示す。各カラムはマウス由来のRNAサンプルに相当し(系統、週齢は上部に記載)、行は各遺伝子を示す。



- Fig. 7 小脳において有意な変動のみられた431遺伝子のAgglomerative clusteringの結果。結果はAffymetrixでのnTgマウスに対する発現量比(z-scoreに変換)で示し、赤が上昇、緑が減少を示す。各カラムはマウス由来のRNAサンプルに相当し(系統、週齢は上部に記載)、行は各遺伝子を示す。

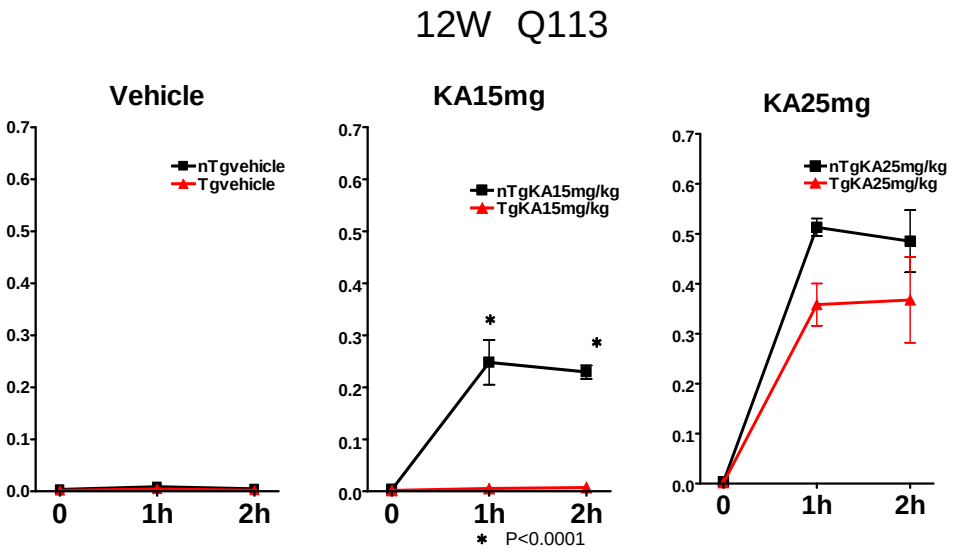


Fig. 8 12週齢Q113マウス、nTgマウス海馬におけるカイニン酸投与後のFos mRNA発現。

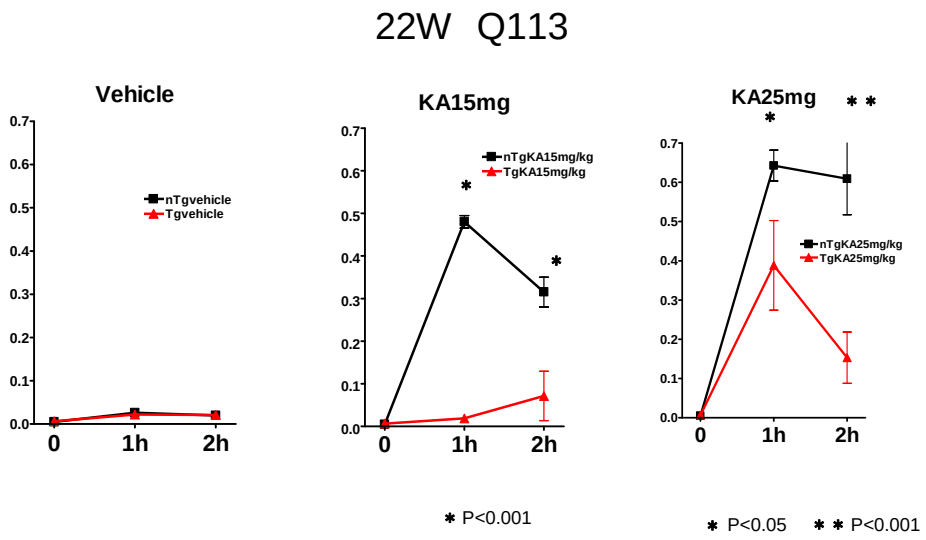


Fig. 9 22週齢Q113マウス、nTgマウス海馬におけるカイニン酸投与後のFos mRNA発現。

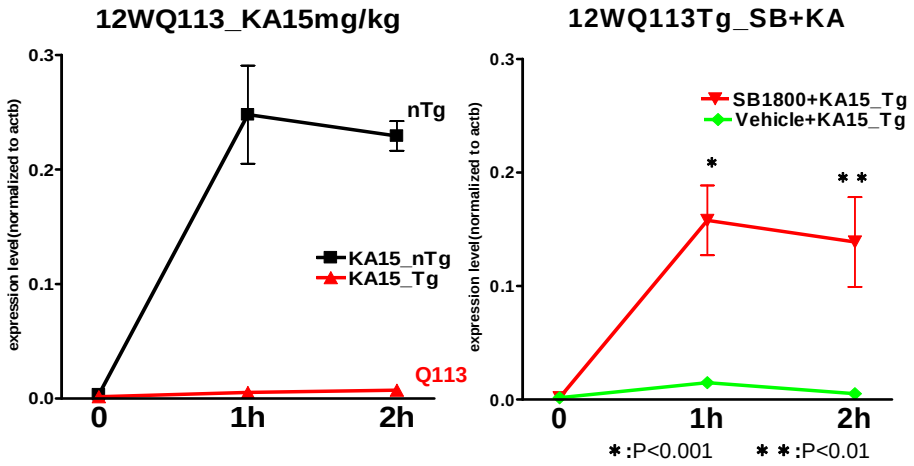
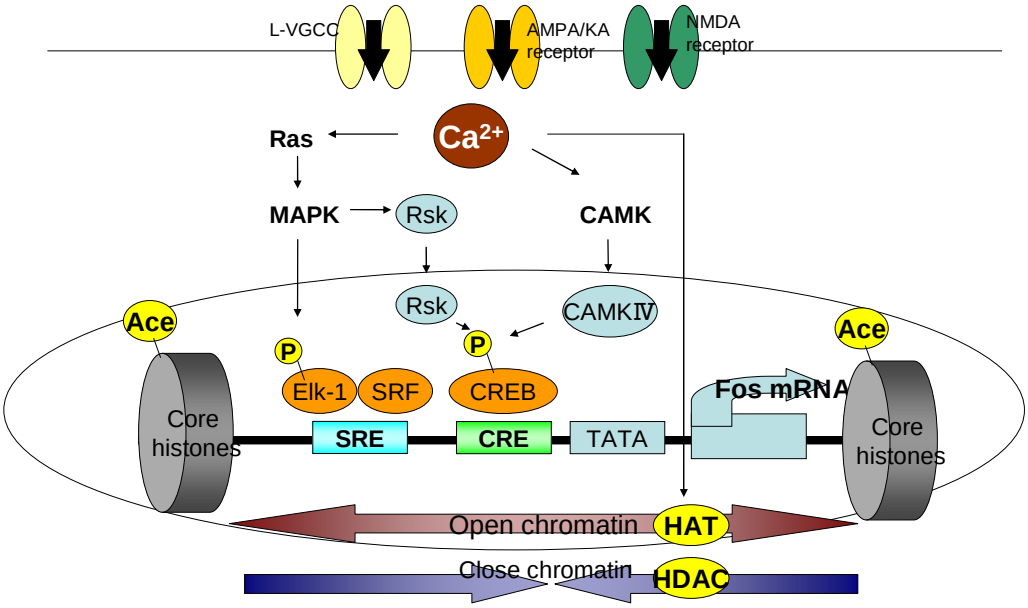


Fig. 10 12週齢Q113マウス海馬における酪酸ナトリウム及びカイニン酸投与後のFos mRNAの発現レベル



・ Fig. 11 Fos mRNA転写活性化を誘導する細胞内シグナル伝達系(仮説)。(Nestlar et al. Molecular Neurophamacology 2001、nature reviews neuroscience 2002より改変)