

アルツハイマー病における活動依存性 DNA 2 重鎖切断とその代償機構の解明

間野達雄

東京大学医学部附属病院 脳神経内科

【研究の背景】

アルツハイマー病(AD)はアミロイド β ($A\beta$)とリン酸化タウが蓄積する進行性の神経変性疾患である。発表者は、神経細胞特異的 DNA メチル化解析から、AD において DNA 修復タンパクである BRCA1 の機能障害が起きており、AD 神経細胞において DNA 傷害の蓄積が生じていることを報告した(Mano T, PNAS, 2017)。その後の報告などから、神経細胞において DNA の恒常性を維持が重要であること、一方で活動依存性に DNA 2 重鎖切断が生じること、が明らかとなった。特に AD では $A\beta$ による異常な神経細胞活動が報告されており、ゲノム DNA の恒常性は神経細胞機能の維持にとって死活問題である。

【目 的】

本研究では、神経細胞における DNA 修復機構を明らかにすることを第一の目的とする。また、AD における神経細胞の異常興奮に着目し、AD における DNA 傷害と活動依存性 DNA 傷害の共通する点の探索を行うこととする。最終的に、DNA 傷害はゲノム構造の変化をもたらすものと考えられ、そのようなゲノム構造を明らかにするために神経細胞特異的なヒストン修飾、ATAC-seq、HiC を実施する技術基盤を確立し、ゲノム構造と神経細胞の機能とを明らかにする。

【方 法】

活動依存性の DNA 傷害を解析するにあたっては、神経前駆細胞を分化させて、成熟した神経細胞を培養し、NMDA による刺激を行った。また、神経細胞における DNA 傷害の程度を FACS を用いて定量するため、 γ -H2ax の免疫染色を行った。アルツハイマー病およびコントロール各 30 症例を解析対象とする。FACS を用いて神経細胞の核を分取し、ヒストン修飾(H3K4me3, H3K27ac)、クロマチンアクセシビリティ(ATAC-seq)、3 次元構造(HiC)の解析を行った。

【結 果】

Etoposide による DNA 傷害の誘導を行った神経細胞では、 γ -H2ax の染色性によって DNA 傷害を定量することができることが分かった。同様の方法を用い、NMDA による神経細胞の活動が DNA 傷害を誘導することを利用して、CRISPR KO Library によるスクリーニングを行った。また、ATAC-seq により、このようなゲノム DNA の 2 重鎖切断と同時に迅速なゲノム DNA の構造変化が生じることが分かった。

神経細胞特異的なゲノム DNA の構造を明かにするため、神経細胞の核だけを用いた ChIP-seq および HiC を行う技術基盤を確立した。特に ChIP-seq については、剖検脳を用いることによって避けられないノイズの混入を、ATAC-seq によって得られたゲノム構造を考慮して解析することで、真の ChIP-seq ピークを見出すことができた。このような結果から、AD において既知の遺伝子におけるヒストン修飾の変化が確認されるとともに、新規の病態関連遺伝子を見出すことができた。それらの ontology 解析からは、DNA/RNA といった核酸の恒常性に関わる遺伝子群、オートファジーにかかわる遺伝子群が明らかとなった。

【考 察】

培養神経細胞において、神経細胞の活動依存性 2 重鎖切断から初期応答遺伝子の発現が誘導され、その後に DNA 修復が誘導される様子が観察された。また、AD 剖検脳の検討から、ゲノム構造の変化を合わせて解析することによって、細胞機能の生物学的な解析につながる可能性を示すことができた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

アルツハイマー病は孤発性疾患であり、遺伝子改変動物からのアプローチだけでなく、実際の患者から得た剖検脳を用いたアプローチが重要である。その中でも、脳は多彩な細胞からなる複雑な臓器であり、我々が行った神経細胞特異的なゲノム構造解析アプローチは、アルツハイマー病の病態理解に貢献できるのではないかと考えている。また、神経細胞における DNA 傷害は、加齢と密接な関係があることも分かっており、アルツハイマー病の根源的な病態理解に有用であることが期待されると同時に、その先の予防・治療戦略へと発展することを期待している。

【参考・引用文献】

Koshi-Mano, Kagari, Tatsuo Mano, Maho Morishima, Shigeo Murayama, Akira Tamaoka, Shoji Tsuji, Tatsushi Toda, and Atsushi Iwata. 2020. "Neuron-Specific Analysis of Histone Modifications with Post-Mortem Brains." *Scientific Reports* 10 (1): 3767.