

を行った症例の中に *PLA2G6* 遺伝子変異を伴う症例が含まれていたかどうかを検討した。(倫理面への配慮)

DNA サンプルを収集した研究協力者には山梨大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。また個人情報の取り扱いについては山梨大学個人情報保護規定に従って管理を行った。

C. 研究結果

双生児において、*PLA2G6* 遺伝子に新規の複合ヘテロ接合性変異 (c.517C>T/c.1634A>G, p.Q173X/p.K545R) を認めた。双生児はそれぞれ c.517C>T を父から、c.1634A>G 変異を母から受け継いでいた。この2つの変異は既報告のない変異ではあるものの、Mutation taster による in silico 解析では disease causing の判定であり、種を超えてアミノ酸配列が保存されている領域であることから本症例の原因遺伝子と考えた。

JASPAC に登録された常染色体劣性遺伝性と考えられる痙性対麻痺 88 症例中には *PLA2G6* 変異を伴う症例は認められなかった。

D. 考察

PLA2G6 遺伝子は infantile neuroaxonal dystrophy (INAD)、neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) や PARK14 の原因遺伝子として知られている⁵⁾。本邦においては juvenile-onset neuroaxonal dystrophy 1 例、early-onset parkinsonism 3 例の報告がある^{6, 7)}。*PLA2G6* 変異例は、parkinsonism, mental retardation, hyperreflexia をきたすことが知られているが、特に幼児発症例においては痙性失調症を呈することに注意が必要である。

E. 結論

痙性失調症を呈した一卵性双生児において、*PLA2G6* 遺伝子に新規の複合ヘテロ接合性変異を認めた。まれではあるが、遺伝性痙性対麻痺症例においても *PLA2G6* 遺伝子変異を検索する必要があると考えられた。

[参考文献]

1. 瀧山嘉久. 痙性対麻痺: JASPAC. BRAIN and NERVE. 2014; 66; 1210-1217.
2. Shimazaki H, et al. A homozygous mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). J Med Genet 2012; 49; 777-784.
3. Shimazaki H, et al. Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014; 85; 1024-1028.
4. Koh K, et al. Novel mutations in the PNPLA6 gene in Boucher-Neuhauser syndrome. J Hum genet 2015 Jan 29 [Epub ahead of print]
5. Morgan. N.M. et al. PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. Nat. Genet. 2006. 38. 752-754.
6. Riku Y. et al. Extensive aggregation of α -synuclein and tau in juvenile-onset individual with a novel mutation in the PLA2G6 gene-splicing site. Acta Neuropathol Commun. 2013; 1
7. Yoshino H. et al. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. Neurology 2010. 75. 1356-1361

F. 健康危険情報

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Koh K, et al. Novel mutations in the PNPLA6 gene in Boucher-Neuhauser syndrome J Hum Genet 2015 Jan 29 [Epub ahead of print].
- 2) Wang Y, et al. A Japanese SCA5 family with a novel tree-nucleotide in-frame deletion mutation in the SPTBN2 gene: a clinical and genetic study. J Hum Genet 2014; 59: 569-573.
- 3) Shimazaki H, et al. Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014; 85: 1024-1028.
- 4) 瀧山嘉久. 遺伝性痙性対麻痺の最新情報. 臨床神経 2014; 54: 1009-1011.
- 5) 瀧山嘉久. 痙性対麻痺: JASPAC. BRAIN and NERVE 2014; 66: 1210-1217.

- 6) Ichinose Y, et al. Characteristic MRI findings in beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN). Neurol Clin Pract 2014; 4: 175-177.

2. 学会発表

平成 26 年度「運動失調症の医療基盤に関する調査研究」班、「運動失調症の分子病態解明・治療法の開発に関する研究」班合同研究報告会. 痙性失調症を呈した *PLA2G6* 複合ヘテロ接合性変異の一卵性双生児例. 東京. 平成 27 年 1 月 15 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた運動失調症の治療開発研究

業務担当責任者： 岡澤 均 東京医科歯科大学難治疾患研究所

研究協力者 : 田川一彦 東京医科歯科大学

研究要旨

岡澤グループはこれまでの研究事業を通じて、極めて高いレベルの網羅的質量解析技術を保持している。本研究では、ヒト SCA1 患者 iPS 細胞由来の神経細胞を対象として質量解析を行う。これにより、SCA1 の重症度・進行度を反映するバイオマーカーの探索を目指し、現在、条件検討など予備的な検討を行っている。

A. 研究目的

神経変性疾患の一部、特にアルツハイマー病などではバイオマーカー探索型研究が進んでおり、臨床的に有用なものもすでに存在している。一方、脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1) は比較的希な疾患であり、研究は殆ど進んでいない。岡澤グループは、これまでポリグルタミン病あるいはアルツハイマー病を対象に、種々のモデル動物およびヒト脳サンプルを対象として、世界に先駆けて、プロテオーム、トランスクリプトーム、インタラクトームなど各種の網羅的解析 (オミックス) を行い、病態関連分子を同定してきた (文献 1-4)。さらに、岡澤グループは、他の研究事業を通じて世界最高水準の網羅的質量解析技術を現在保有している。

本研究では、これらの経験を踏まえつつ、ヒト SCA1 患者患者 iPS 細胞由来の神経細胞を対象として、同様のオミックス解析を行い、SCA1 の重症度・進行度に直結するバイオマーカー候補分子を捉えることを目的とする。

B. 研究方法

北海道大学・佐々木教授グループより SCA1 患者の血液・皮膚の提供を受ける。慶応大学・岡野栄之教授グループとの共同研究を基に、これらの細胞から iPS 細胞を樹立する。これらのサンプルを LC-MS で解析し、健常者とリン酸化状態が異なる分子を探索する。また、得られた候補分子は臨床サンプルを用いて確認する。

(倫理面への配慮)

北大・慶応大および医科歯科において、血液・皮膚サンプルの採取と使用・iPS 細胞作成に関する申請がすでに受理されている。これらの倫理申請は、人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意の項目について、国の基準を完全に満たしている。また、実験動物は使用せず、動物愛護上の配慮には該当しない。これらのことから、本研究は倫理面において問題がないと判断した。

C. 研究結果

SCA1 特異的な iPS 細胞を二人の患者さんよりそれぞれ 3 系統ずつ、合計 6 系統作出した。樹立した iPS 細胞で見られる CAG リ

ピート数と患者で見られるリピート数の関係を、佐々木教授グループとの協働のもとに調べた。DNAは常法に従って抽出し、ダイレクトシーケンスおよびフラグメント解析法を用いて CAG リピート数を検討した。その結果、樹立した iPS 細胞の CAG リピート数が患者とほぼ同一であることが確認された。

D. 考察

これらの疾患特異的 iPS 細胞を用いて、神経細胞へ分化誘導することで、解析が開始できる。

E. 結論

サンプルの準備と条件設定が進行しており、解析が進めばバイオマーカーを捉えることができると考えられる。

[参考文献]

1. Qi M-L, Tagawa K, Enokido Y, Yoshimura N, Wada Y, Watase K, Ishiura S, Kanazawa I, Botas J, Saito M, Wanker EE, Okazawa H. Proteome analysis of soluble nuclear proteins reveals that HMGB1/2 suppress genotoxic stress in polyglutamine diseases. *Nature Cell Biol.* 2007;9:402-414
2. Tagawa K1, Marubuchi S, Qi ML, Enokido Y, Tamura T, Inagaki R, Murata M, Kanazawa I, Wanker EE, Okazawa H. The induction levels of heat shock protein 70 differentiate the vulnerabilities to mutant huntingtin among neuronal subtypes. *J Neurosci.* 2007; 27(4):868-80.
3. Enokido Y, Tamura T, Ito H, Arumughan A, Komuro A, Shiwaku H, Sone M, Foulle R, Sawada H, Ishiguro H, Ono T, Murata M, Kanazawa I, Tomilin N, Tagawa K, Wanker EE, Okazawa H. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol.* 2010;189(3):425-43.
4. Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., Okazawa, H. Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet.* 2015 : 24(2);540-58.

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1.論文発表

1. Mizuguchi, M., Obita, T., Serita, T., Kojima, R., Nabeshima, Y., Okazawa, H. Mutations in the *PQBP1* gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15kD. *Nature Commun.* 2014;5:3822
2. Ito, H., Shiwaku, H., Yoshida, C., Homma, H., Luo, H., Chen, X., Fujita, K., Musante, L., Fischer, U., Frint, S. G., Romano, C., Ikeuchi, Y., Shimamura, T., Imoto, S., Miyano, S., Muramatsu, S. I., Kawauchi, T., Hoshino, M., Sudol, M., Arumughan, A., Wanker, E. E., Rich, T., Schwartz, C., Matsuzaki, F., Bonni, A., Kalscheuer, V. M., Okazawa, H. In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Mol Psychiatry.* 2014:doi: 10.1038/mp.2014.69.

3. Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H., Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta, H., Murayama, S., Iwatsubo, T., Miyano, S., Okazawa, H. Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet.* 2015 : 24(2);540-58.
4. Ito, H., Fujita, K., Tagawa, K., Chen, X., Homma, H., Sasabe, T., Shimizu, J., Shimizu, S., Tamura, T., Muramatsu, SI., Okazawa, H. HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. *EMBO Mol Med.* 2014;7(1);78-101.
5. Shiraishi, R., Tamura, T., Sone, M., Okazawa, H. Systematic Analysis of Fly Models with Multiple Drivers Reveals Different Effects of Ataxin-1 and Huntingtin in Neuron Subtype-Specific Expression. *PLoS One.* 2014; 9(12);e116567.

2. 学会発表

1. Okazawa, H. "Comprehensive Phosphoproteome Analysis Unravels the Core Signaling Network that Initiates the Earliest Synapse Pathology in Preclinical Alzheimer's Disease Brain", ISP Symposium 2014 - Ageing and Metabolis, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 2014.8.28 (Oral)
2. Tamura, T., Barclay, S, S., Fujita, K., Ito, H., Motoki, K., Shimamura, T., Tagawa, K., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Tagawa, K., Imoto, S., Miyano, S., Okazawa, H. "Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1" Neuroscience2014, Pacifico Yokohama, Yokohama, 2014.9. 13 (Poster and short talk)
3. Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Yoshida, C., Sone, M., Okazawa, H. "A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases. Neuroscience2014, Pacifico Yokohama, Yokohama, 2014.9.12 (Poster)
4. 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 第55回日本神経学会学術大会「脊髄小脳失調症 1 型における DNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析」(口演)、福岡国際会議場、2014.5.23
5. 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、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第55回日本神経学会学術大会「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)、福岡国際会議場、2014.5.23
6. 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 第55回日本神経病理学会総会学術研究会「脊髄小脳失調症 1 型における DNA 損傷修復異常のコアネットワーク解析」(口演)、学術総合センター(東京)、2014.6.6
7. 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、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会「複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(口演)、学術総合センター(東京)、2014.6.6

8. 田村拓也、岡澤均 第 7 回分子高次機能研究会「昆虫モデルから見る神経疾患の特異性と普遍性」(口演)、KKR 沼津はまゆう(静岡)、2014.8.25

9. 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 第 37 回日本神経科学大会「情報科学を用いた神経変性疾患の病態解明」(ポスター)、パシフィコ横浜(横浜)、2014.9.13

10. 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、吉田 千里、曾根 雅紀、岡澤 均 第 37 回日本神経科学大会「複数のポリグルタミン病に共通する TERA/VCP/p97 の DNA 損傷修復機能不全」(ポスター)、パシフィコ横浜(横浜)、2014.9.12

11. 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 第 37 回日本分子生物学会年会「脊髄小脳失調症 1 型の分子病態コアネットワークの解明」(ポスター)、パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.26

12. 伊藤日加瑠、塩飽裕紀、吉田千里、本間秀典、陳西貴、藤田慶大、岡澤 均 第 37 回日本分子生物学会年会「神経幹細胞の Pqbp1 機能不全による小頭症は in utero 遺伝子治療によって改善できる」(ポスター)、

パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.27

13. 矢島 隆明、田村 拓也、岡澤 均、曾根 雅紀 第 37 回日本分子生物学会年会「ショウジョウバエアルツハイマー病モデルにおける yata 遺伝子による APP 輸送制御」(ポスター)、パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.25

14. 岡澤 均、大谷 彰子 運動失調症の分子病態解明・治療法開発に関する研究班平成 26 年度 研究報告会「iPS 細胞由来ヒト神経細胞を用いた SCA1 のバイオマーカー探索」(口演)、JA 共済ビル カンファレンスホール(東京)2015.1.15

15. 岡澤 均「神経変性疾患と知的障害・小頭症をつなぐ RNA 関連分子 P Q B P 1」(招待講演)第 1 回 TMDU「知の創造」若手コアセミナー、2014.8.20、東京医科歯科大学

16. 岡澤 均「ゲノム安定性と脳機能」(招待講演)第 37 回日本分子生物学会年会シンポジウム・ゲノム再生、パシフィコ横浜(横浜)、2014.11.25-27(発表日 11/25)

17. 岡澤 均「シナプス病態から脳疾患治療へ、網羅的質量分析の示唆するアルツハイマー病のシナプス超早期病態の分子機構」(岡澤班)(招待講演)『包括脳ネットワーク』冬のシンポジウム「精神神経疾患研究の現状と展望：新学術 5 領域の相互理解・連携を目指して」2014.12.11、東京医科歯科大学

18. 岡澤 均「「シナプス病態」領域の紹介」(招待講演)『包括脳ネットワーク』冬のシンポジウム「「大脳新皮質構築」「シナプス病態」「メゾ神経回路」3 領域合同公開シンポジウム」2014.12.13、ホテル東京ガーデンパレス

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：脊髄小脳変性症を予防又は治療するための薬剤

出願人：国立大学法人 東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

出願番号：PCT/JP2014/077258（基礎出

願：特願 2013-214155)

2. 実用新案登録

3. その他

核酸・蛋白質の代謝恒常性破綻モデルの解析を通じた神経変性病態の解明と創薬

業務担当責任者：和田圭司

研究協力者：長谷勝徳、藤原悠紀、株田智弘

(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部

研究要旨

脊髄小脳変性症および筋萎縮性側索硬化症 (ALS)の一部において、遺伝子中の非翻訳領域におけるリピート配列の異常伸長が原因であることが報告されている。病態機序として、原因遺伝子から産生される異常伸長 RNA が神経細胞毒性を仲介していると考えられている。したがって、異常伸長 RNA を細胞内で分解することができれば新たな治療法となり得ると考えられる。我々は最近、RNA が ATP 依存的にリソソームに直接取り込まれ、分解されるという新たなオートファジーシステムを発見し、このシステムを RNautophagy と名付けた (Autophagy. 2013)。本研究では、異常伸長 RNA の分解に RNautophagy を活用することを目的に研究を行っている。そのため、RNA RNautophagy が基質選択性を有しているかどうか、また神経変性に関与するリピート RNA が RNautophagy の基質となるかを検討した。その結果、RNautophagy は基質選択性を有していること、また少なくとも特定のリピート RNA は *in vitro* において RNautophagy の基質となることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年脊髄小脳変性症および筋萎縮性側索硬化症 (ALS)の一部において、遺伝子中の非翻訳領域におけるリピート配列の異常伸長が発症の原因となることが報告されている。原因遺伝子から作られる異常伸長 RNA が神経細胞毒性を仲介していると考えられており、異常伸長 RNA を細胞内で分解することができれば新たな治療法となり得る。ところが、神経細胞内における RNA 分解機構についてはほとんどわかっていない。細胞内分解システムのうち、リソソームを分解の場とするものは総称してオートファジーと呼ばれている。リソソームは多種類の加水分解酵素を内部に有しており、蛋白質だけでなく核酸や脂質、糖質も分解することができる。

我々は最近、RNA が ATP 依存的にリソソームに直接取り込まれ、分解されるという新

たなオートファジーシステムを発見し、この選択的分解システムを RNautophagy と名付けた (Autophagy. 2013)。同時に、このシステムにおいてリソソーム膜蛋白質である LAMP2C が核酸受容体として機能することを見いだした。興味深いことに、LAMP2C は脳内、とりわけ神経細胞に高発現しており、RNautophagy は神経細胞において機能し神経の恒常性維持に働いていると考えられる。また、LAMP2 遺伝子欠損マウス脳のトータル RNA 量を解析したところ、野生型と比較して RNA の蓄積が観察された。

本研究では、脊髄小脳変性症の治療のため、異常伸長 RNA の分解に RNautophagy を活用することを目的に研究を行っている。本年度は、RNautophagy が基質選択性を有しているかどうか、また異常伸長 RNA が RNautophagy の基質となるかを検討した。

B. 研究方法

LAMP2Cの細胞質側配列(約12アミノ酸)を用いたプルダウンアッセイにより、LAMP2Cに結合するRNA配列を検討した。またマウス脳から単離したリソソームを用いて、どのような配列のRNAがRNautophagyの基質となるかについて解析した。RNAの配列としては、polyA, polyU, polyG, polyCおよび神経変性疾患の原因と関与するリピートRNAを用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立精神・神経医療研究センター 神経研究所において該当する委員会の承認を受けて行った。実際の実施に当たっては3Rの原則に、研究者のresponsibilityを加えた4Rに配慮して行った。

C. 研究結果

PolyA, polyU, polyG, polyCのうち、特定の配列のみがLAMP2Cの細胞質側配列と結合した。また、LAMP2Cの細胞質側配列と結合したRNAはRNautophagyによって単離リソソームに取り込まれたが、結合しないRNAは取り込まれなかった。さらに、神経変性疾患の原因と関与するリピートRNAについてもLAMP2Cの細胞質側配列と結合し、RNautophagyによって単離リソソームに取り込まれた。

以上の結果から、RNautophagyは基質選択性を有すること、少なくともある種の神経変性関連リピートRNAはin vitroにおいてRNautophagyの基質となることが明らかとなった。

D. 考察

RNautophagyは神経細胞内において、不必要なRNAや異常RNAをある程度選択的に分解している可能性がある。

E. 結論

RNautophagyは基質RNAに対して選択性を有し、少なくとも特定の神経変性関連リピートRNAはin vitroにおいてRNautophagyの基質となる。今後、細胞内において神経変性関連リピートRNAがRNautophagyの基質となるか検討し、脊髄小脳変性症の治療のためのRNautophagy活用法を構築する。

[参考文献]

1. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Yoshimura A, Tamai Y, Wada K, Kabuta T. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy*. 2013; 9(3): 403-409.
2. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, Uchida K, Wada K, Kabuta T. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy*. 2013; 9(8): 1167-1171.

F. 健康危険情報

該当するものは無し。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Furuta, A., kikuchi, H., Fujita, H., Yamada, D., kabuta, T., Blanz, J., Saftig, P., Nishino, I., Wada, k., Uchiyama, Y. Property of lysosomal storage disease associated with midbrain pathology in the CNS of LAMP-2-deficient mice. *Am. J., Pathol.*, in press

2. 学会発表

- 1) 鈴木マリ, 藤掛伸宏, 和田圭司, 永井義隆. ポリグルタミン病モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 2) 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 岡本佑馬, 和田圭司, 永井義隆. ポリグルタミン病モデルにおいて p62 はオートファジー分解系を介して保護的に作用する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 3) 藤掛伸宏, 木村展之, 長野清一, 齊藤勇二, 横関明男, 小野寺理, 和田圭司, 永井義隆. DCTN1 依存的輸送の障害は TDP-43 のオリゴマー形成を促進する. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 4) 石黒太郎, 石川欽也, 藤掛伸宏, 上山盛夫, 永井義隆, 和田圭司, 水澤英洋. SCA31 (UGGAA)_n リピートはショウジョウバエで進行性神経障害を引き起こす. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.21-24.
- 5) 石黒太郎, 藤掛伸宏, 佐藤望, 和田圭司, 水澤英洋, 永井義隆, 石川欽也. 異常伸長 UGGAA リピート RNA はショウジョウバエにおいて神経毒性を引き起こす. 第 37 回日本神経科学会, 横浜, 2014.9.11-13.
- 6) 鈴木マリ, Anne-Marie Neumann, 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 和田圭司, 永井義隆. 神経変性疾患モデルショウジョウバエの神経変性は過栄養摂取により増悪する. 第 37 回日本神経科学会, 横浜, 2014.9.11-13.
- 7) 齊藤勇二, 藤掛伸宏, 岡本佑馬, 和田圭司, 永井義. p62/SQSTM1 はポリグルタミン病モデルショウジョウバエにおいて、ポリグルタミン蛋白質凝集体をオートファジー分解系で除去することで保護的役割を果たす. 第 37 回日本神経科学会, 横浜, 2014.9.11-13.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2014-209340 「異常核酸分解誘導剤」、
出願人：国立精神・神経医療研究センター、
発明人：株田智弘、藤原悠紀、和田圭司、相澤修、長谷勝徳、出願日：2014 年 10 月 10 日

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

脊髄小脳失調症の霊長類モデルの作製と検証

業務担当責任者 : 平井宏和 群馬大学大学院医学系研究科

研究協力者 : 松崎泰教、今野歩、中村和裕 群馬大学大学院医学系研究科

研究要旨

過去 20 年に渡って様々な脊髄小脳失調症 (SCA) モデルマウスが作成され、病態解明と治療法開発が大きく進んだ。しかし、これまでのところマウスで明らかになった治療法は一つも臨床応用されていない。原因の一つとして非ヒト霊長類モデルがないことが上げられる。本研究では、異常伸長した CAG 繰返し配列をもつ SCA3 型原因遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを、マーモセット小脳に注射することで SCA3 モデルマーモセット作成を目指した。ウイルスベクター注入 8 ヶ月後に評価したところ、変異遺伝子を発現するマーモセットは顕著な小脳失調を示し、組織学的には小脳顆粒細胞、小脳核の神経細胞に変異タンパク質凝集体が観察された。

A. 研究目的

非ヒト霊長類の疾患モデルが出来ると、疾患の治療法開発と臨床応用が飛躍的に早まる。近年、レンチウイルスベクターを用いて受精卵に疾患遺伝子を導入することで疾患モデルマーモセットが作成されている。これは有用な技術ではあるが、マウスのように短期間で繁殖するわけではないので、実験に必要な数の疾患モデルマーモセットを確保するにはかなり長い年月と大きな飼育設備が必要となる。また、レンチウイルスベクターを用いた場合、多コピーの疾患遺伝子がマーモセットのゲノムに組み込まれることが一般的で、子孫には少ないコピー数の遺伝子が遺伝することが多く、その場合、親と同じフェノタイプを示さない。本研究ではアデノ随伴ウイルス 9 型 (AAV9) ベクターを用いて、変異した脊髄小脳失調症 (SCA) 遺伝子を直接、成熟後のマーモセット小脳に発現させることで、SCA マーモセットモデルを作成することを

目的とした。

B. 研究方法

シナプシン I プロモーター制御下で 89 回のグルタミン繰返し配列をもつ ATXN1 タンパク質 (ATXN3[Q89]) を発現する AAV9 ベクターを生後 1 年 6 ヶ月のマーモセットの小脳に注射した。コントロールとして、15 回のグルタミン繰返し配列をもつ ATXN1 タンパク質 (ATXN3[Q15]) を発現する AAV9 ベクターを別の同年齢のマーモセット小脳に注射した。8 ヶ月後に小脳失調の有無について、独自に開発した 2 つの行動テストを用いて評価した。その後、小脳皮質、小脳核の遺伝子発現の様子を免疫組織学的に調べた。

(倫理面への配慮)

実験計画は遺伝子組換え安全委員会、動物実験委員会により承認されており、動物愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

ATXN3[Q89]を発現させたマーモセットは、ベクター注入 1~2 ヶ月後から、ケージの隙間に足を滑らせたり、高いところにあるバーに捕まり損ねたりするなど、小脳失調と思われる動きの失敗が見られるようになった。このような動きは ATXN3[Q15]を発現させたコントロールマーモセットでは見られなかった。注射 8 ヶ月に、餌をとる手の動き及び、高いところからステップを下らせる行動を評価したところ、ATXN3[Q89]発現マーモセットは何も処置をしていないマーモセットや ATXN3[Q15]を発現するコントロールマーモセットと比べて有意に低い成績を示した。その後、小脳の組織を観察したところ、顆粒細胞と小脳核のニューロンを中心に広範囲に ATXN3[Q89]が発現しており、凝集体は核内に局在していた。また多くの小脳核のニューロンは脱落していた。

D. 考察

この方法で同程度のフェノタイプを、同様の時間経過で示す SCA モデルマーモセットが安定して得られるのか今後検討が必要である。これらのモデルマーモセットにマウスで効果が示されている SCA の治療法を施し、症状の進行が抑えられ、あるいは改善が見られるのかを検討することで、マウスで明らかになった治療法の患者への臨床応用が促進することが期待される。

E. 結論

AAV9 ベクターを用いて、変異した脊髄小脳失調症 (SCA) 遺伝子を直接、成熟後のマーモセット小脳に発現させることで、行動学的及び、組織学的に SCA 患者と類似のフェノタイプを示すマーモセットモデルを作成することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cerebellar Pathology in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Cerebellum* 2014 Jun;13(3):323-30.
- 2) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T and Hirai H. Distinct transduction profiles in the CNS via three injection routes of AAV9 and the application to generation of a neurodegenerative mouse model. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* 1, Article number: 14032 (2014) doi:10.1038/mtm.2014.32
- 3) Saida H, Matsuzaki Y, Takayama K, Iizuka A, Konno A, Yanagi S, Hirai H. One-year follow-up of transgene expression by integrase-defective lentiviral vectors and their therapeutic potential in spinocerebellar ataxia model mice. *Gene Therapy* 2014 Sep;21(9):820-7.
- 4) Nakamura K, Mieda T, Suto N, Matsuura S, Hirai H. Mesenchymal Stem Cells as a Potential Therapeutic Tool for Spinocerebellar Ataxia. *Cerebellum* 2014 Oct 4. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 平井宏和. Molecular mechanisms and potential therapies of the

spinocerebellar ataxia and the future perspective of the clinical application. International congress on Neuroscience. クラスノヤルスク (ロシア) . June 20, 2014.

- 2) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H. Distinct transduction profiles resulting from direct cortical, intrathecal or intravenous injection of AAV9 in the CNS. 9th Federation of European Neuroscience Societies. ミラノ (イタリア) . July 5-9, 2014.
- 3) Hosoi N, Hirai H. Abnormalities of metabotropic glutamate receptor (mGluR)-mediated signaling at cerebellar parallel fiber-purkinje cell synapses in spinocerebellar ataxia type 1(SCA1) model mice. ミラノ (イタリア) . July 5-9, 2014.
- 4) Huda F, Konno A, Matsuzaki Y, Goenawan H, Miyake K, Shimada T, Hirai H. Cerebellar transduction profiles after ssAAV9 injection via cortical, intrathecal or intravenous routes. 第 37 回日本神経科学学会大会

横浜. Sep. 11-13. 2014.

- 5) 今野歩、平井宏和. AAV による遺伝子導入を介した脊髄小脳変性症 3 型モデルマウスの作出. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.
- 6) 松崎泰教、齊田英恵、高山清彦、飯塚朗、今野歩、柳茂、平井宏和. インテグレーションを欠損させたレンチウイルスベクターによる一年間の遺伝子発現の経過観察と遺伝性神経変性疾患モデルマウスを用いた遺伝子治療での有効性の検討. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.
- 7) 平井宏和. シンポジウム [Synaptic regulation in the cerebellum and motor control] Impairment of synaptic transmission that induces cerebellar ataxia and the underlying molecular mechanisms. 第 37 回日本神経科学学会大会 横浜. Sep. 11-13. 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

多系統萎縮症のモデル動物作製と分子病態解明

業務担当責任者 : 若林孝一 弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座

研究協力者 : 三木康生、丹治邦和、森文秋

弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座

研究要旨

Sigma-1 receptor (SIGMAR1) は小胞体シャペロンの 1 つであり、小胞体関連分解を介した異常タンパク質分解に関わることが知られている。最近、我々は SIGMAR1 が種々の神経変性疾患の核内封入体に蓄積すること、核内と細胞質を行き来することを示し、SIGMAR1 が核内異常タンパク質の分解に関わることが示唆された。そこで今回、HeLa 細胞に CAG リピートが異常に伸長したハンチンチン遺伝子を導入したハンチントン病モデル細胞を作製し、siRNA による SIGMAR1 の機能抑制あるいは SIGMAR1 遺伝子の過剰発現が核内の異常タンパク質分解に及ぼす影響を検討した。さらに、核輸送阻害剤、選択的プロテアソーム阻害剤を用いた際の核内異常タンパク質の蓄積、そしてこれらの処理を行った際のユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) およびオートファジー・ライソソーム系の変化について評価した。

SIGMAR1 siRNA、選択的プロテアソーム阻害剤、核輸送阻害剤の投与で核内凝集物が有意に増加した。SIGMAR1 siRNA 投与群の LC3-II および p62 量には変化がなかったが、SIGMAR1 siRNA 投与群では有意にプロテアソーム活性が低下していた。さらに、SIGMAR1 の過剰発現で細胞内凝集物の形成は有意に抑制された。

SIGMAR1 は小胞体関連分解を介した核内の異常タンパク質の分解に関わり、その分解には UPS が重要であることが示唆された。既に臨床で使用されている Fluvoxamine をはじめとする抗うつ薬のいくつかは、SIGMAR1 に強い親和性を持つことが知られている。Fluvoxamine が UPS を活性化することが判明すれば、ハンチントン病を含むポリグルタミン病の薬物治療へ通ずる可能性がある。

A. 研究目的

核内封入体の形成を病理学的特徴とするポリグルタミン病などの神経変性疾患では、細胞内分解機能の異常が認められ、タンパク質分解酵素に不溶性のタンパク質が神経細胞死に関与している。Sigma-1 receptor

(SIGMAR1) は小胞体 (ER) に存在する分子シャペロンであり、異常タンパク質を ER からユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) に逆輸送し、分解する (ER 関連分解) ことにも関わっている。我々は昨年度、SIGMAR1 が核内封入体を形成する神経変性疾患に特異

的に関与していることを報告した¹⁾。そこで今回、SIGMAR1 が核内封入体として不溶化したタンパク質の分解に関与しているか否かについてハンチントン病の細胞モデルを用い検討した。

B. 研究方法

HeLa 細胞に、ハンチンチン遺伝子の第 1 エクソン内にある CAG リピートが異常に伸長した遺伝子 (Q74) およびリピート数が正常な遺伝子 (Q23) を導入し、核内に異常タンパク質が蓄積する細胞モデルと正常対照を

作成した。それらを用い、①SIGMAR1 siRNA による SIGMAR1 の機能抑制あるいはSIGMAR1 遺伝子の過剰発現が核内の異常タンパク質分解に及ぼす影響、②SIGMAR1 遺伝子を過剰発現させる時期が核内異常タンパク質の分解に及ぼす影響、③SIGMAR1 の agonist、antagonist、核輸送阻害剤 (leptomycin B)、選択的プロテアソーム阻害剤 (epoxomicin) 投与が核内異常タンパク質の蓄積に及ぼす影響、④これらの処理を行った培養細胞の UPS およびオートファジー・ライソソーム系の変化について、免疫染色、ウェスタンブロット法、プロテアソームアクティビティアッセイにて評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は倫理審査が必要な研究に該当しない。

C. 研究結果

Q74 を遺伝子導入した培養細胞においてのみ細胞質内および核内に変異型ハンチンチンの凝集物が認められた。SIGMAR1 siRNA と epoxomicin の投与で細胞質内および核内凝集物が有意に増加した。Leptomycin B の投与でも核内凝集物が増加した。さらに、変異型ハンチンチンは SIGMAR1 siRNA と epoxomicin 投与群で不溶化した。Control siRNA 投与群と比較して、SIGMAR1 siRNA 投与群の LC3-II および p62 量には変化がなかったが、SIGMAR1 siRNA 投与群では有意にプロテアソーム活性が低下していた。SIGMAR1 の過剰発現で細胞内凝集物の形成は有意に抑制された。

D. 考察

SIGMAR1 は核内の異常タンパク質の分解に関わり、その分解には UPS が重要であることが示唆された。

Fluvoxamine をはじめとする抗うつ薬の

いくつかは臨床的に既に使用されており、SIGMAR1 に強い親和性を持つことが知られている。Fluvoxamine が UPS を活性化することが確認できれば、核内異常タンパク質の蓄積を抑制できる可能性があり、ハンチントン病を含むポリグルタミン病の薬物治療へ通ずるものと思われる。

E. 結論

SIGMAR1 は核内の異常タンパク質の分解に ER 関連分解を介し、関わっている可能性がある。

[参考文献]

1. Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 2014; 34: 148-158.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Miki Y, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K. Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2014; 74C: 25-31.
- 2) Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H. Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral

sclerosis. Acta Neuropathol Comm 2014; 2: 173.

- 3) Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Maruyama A, Nikaido Y, Mimura J, Mori F, Warabi E, Yanagawa T, Ueno S, Itoh K, Wakabayashi K. p62 deficiency enhances α -synuclein pathology in mice. Brain Pathol (in press)

2. 学会発表

- 1) 若林孝一. MSA とオートファジー. 第 55 回日本神経学会総会 (福岡、2014 年 5 月 21~24 日)
- 2) 森文秋、豊島靖子、丹治邦和、柿田明美、高橋均、若林孝一. 脊髄小脳失調症 2 型脳に認められた 2 種類の核内封入体. 第 55 回日本神経病理学会総会 (東京、2014

年 6 月 5~7 日)

- 3) 若林孝一、森文秋、柿田明美、高橋均、内海潤、佐々木秀直. ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた神経変性疾患の microRNA 解析. 第 55 回日本神経病理学会総会 (東京、2014 年 6 月 5~7 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

非翻訳マイクロサテライト・リピート伸長による脊髄小脳失調症の ribonuclear foci 形成を指標にした治療薬の探索

業務担当責任者 : 池田佳生 群馬大学大学院医学系研究科 脳神経内科学

研究協力者 : 古田夏海、平柳公利 群馬大学大学院医学系研究科 脳神経内科学

研究要旨

非翻訳領域におけるマイクロサテライト・リピート伸長を原因とする脊髄小脳失調症のうち、SCA36/Asidan、SCA31、SCA8 について、各病型の伸長リピートをリポーター遺伝子内の非翻訳領域に発現するように導入した培養細胞モデルを作成して、各 SCA の分子病態解析および ribonuclear foci 形成を指標にした治療候補薬の探索を行う。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症の分子病態解明および新規治療法開発を推進するため、非翻訳領域におけるマイクロサテライト・リピート伸長を原因とする脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxia: SCA) のうち、SCA36/Asidan、SCA31、SCA8 について、各病型の培養細胞モデルを作成し、ribonuclear foci (RNA foci) 形成を指標にした治療候補薬探索を行うことを目的とする。

B. 研究方法

SCA36/Asidan については (GGCCTG)₈ および逆相補的な (CAGGCC)₅ のペアオリゴヌクレオチドプライマーを用いて self-templating PCR (STP-PCR) 法により伸長 GGCCTG リピートを合成した。SCA31 および SCA8 においては患者由来の伸長リピート領域を PCR 法により単離した。これらの伸長リピートを、2 エクソン (エクソン 1 とエクソン 2) およびその間のイントロンから構成される eGFP (enhanced Green

Fluorescent Protein) 遺伝子構造を持つ発現ベクターのイントロン領域に挿入した。各々のコンストラクトを哺乳動物細胞 (HEK293 細胞) に導入し、培養細胞モデルを作成した。RNA fluorescent in situ hybridization (RNA-FISH) の手法により、分子病態と関連の深いマーカーで伸長リピート転写物の凝集からなる RNA foci 形成について解析した。また本培養細胞モデルに各種の低分子化合物を作用させて、RNA foci 形成が抑制されるような候補治療薬を探索する。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して行われている。

C. 研究結果

SCA36 に関して、STP-PCR により得た (GGCCTG)₄₀ リピートをイントロン領域に挿入した eGFP ベクターを導入した HEK293 細胞において、GGCCTG リピートを挿入していないコントロールベクターと同様に

eGFP を発現したが、RNA-FISH 解析では明らかな RNA foci 形成を認めなかった。STP-PCR により GGCCTG リピートは現在 75 リピートまで単離されており、更に長いリピートを得るべく検討を行っている。

SCA31 では 1.5kb サイズの normal fragment をイントロン領域に挿入したベクターを導入した HEK293 細胞においても正しくスプライシングをされて、イントロン領域に挿入のないコントロールベクターと同様に eGFP を発現した。現在は伸長 TGGAA リピートが挿入されたコンストラクトを得るべく検討中である。

SCA8 では現在、CTG リピート数が 73 リピートのコンストラクトを作成しており、(CTG)₇₃ リピートをイントロン領域に挿入した eGFP ベクターを導入した HEK293 細胞においても、コントロールと同様に eGFP を発現したが、RNA-FISH 解析では明らかな RNA foci 形成を認めなかった。更に長いリピートを得るべく検討中である。

D. 考察

今年度の検討で SCA36・SCA8 培養細胞モデルで RNA foci が形成されなかった理由として、各リピート長が病的な表現型を呈するリピート数を下回っていた可能性が考えられた。そのため SCA36・SCA 31・SCA 8 のより長い伸長リピートを挿入したコンストラクトを作成することを目指し、RNA foci が形成されるかについて継続して検討をしている。また HEK293 細胞以外の哺乳動物培養細胞を用いた検討も行う予定である。

今後の検討課題として、蛋白レベルでの分子病態解明が挙げられる。非翻訳領域マイクロサテライト・リピート伸長病の新たな発症メカニズムとして提唱されている伸長リピート由来の homopolymeric protein の翻訳である repeat-associated non-ATG translation

(RANT)に関連して、各 SCA 培養細胞モデルにおいて RANT を介した細胞内封入体形成を伴う神経細胞障害を認めるか、神経細胞内封入体に対する抗体を用いた免疫染色により確認を行う。更なる検討課題として、候補治療薬スクリーニングが挙げられる。作成した各 SCA 培養細胞モデルを用いて、FDA 承認薬物スクリーニング用 library plate 上で培養を行い、病的表現型として形成される RNA-foci や RANT タンパク由来封入体が抑制されるか否かを定量的に評価する。RNA-foci 形成や RANT 由来封入体形成が抑制された場合には、当該の化合物は各 SCA に対する候補治療薬になり得ると考えられる。

E. 結論

現時点で有効な治療法の存在しない難治性神経疾患の代表である脊髄小脳変性症について、培養細胞モデルを作成することにより分子病態に基づいた候補治療薬を効率的に、より早期に見出し、脊髄小脳変性症の克服へ寄与することを目指して検討している。

[参考文献]

1. Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi H, Okamoto M, Takamatsu K, Ota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K. Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology*. 2012 ; 79 ; 333-341.
2. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Liu W, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum*

Genet. 2011 : 89 ; 121-130.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

Liu W, Ikeda Y, Hishikawa N, Yamashita T,
Deguchi K, Abe K. Characteristic RNA foci

of the abnormal hexanucleotide GGCCUG
repeat expansion in spinocerebellar ataxia
type 36 (Asidan). *Eur J Neurol.* 2014 : 21 ;
1377-1386.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

In vitro 疾患モデル系を用いたポリグルタミン病治療薬候補の探索

業務担当責任者：小野寺 理 新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
研究協力者：加藤泰介 新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
藤田菜摘 新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
佐藤俊哉 北里大学医学部実験動物学
辻 省次 東京大学大学院医学系研究科神経内科学
西澤正豊 新潟大学脳研究所神経内科学分野

研究要旨

ハンチントン病や脊髄小脳変性症を含むポリグルタミン病は、原因遺伝子内のグルタミン酸をコードする CAG 繰り返し配列の異常伸長によって引き起こされる重篤な神経変性疾患であるが、有効な治療法は開発されていない。我々は、ポリグルタミン病の一つである DRPLA をモデルとして、原因物質であるポリグルタミンタンパク質の産生そのものをアンチセンスオリゴヌクレオチド (antisense oligonucleotide; ASO) によって抑制し治療するという研究を開始した。本年度は、数種の ASO の遺伝子サイレンシング効率の検討と選定を行った。その結果、生体の中枢神経系で、原因遺伝子の発現抑制効果を示す ASO が見出された。現在、この ASO を用いてモデル動物の病態発症を抑制可能であるか、検討を進めている。

A. 研究目的

ハンチントン病をはじめとするポリグルタミン病は、原因遺伝子の CAG 反復配列の異常伸長によって引き起こされ、この伸長したグルタミン鎖を含む原因遺伝子産物がミスフォールディングによって不溶性の線維構造を形成し、神経細胞に蓄積することにより細胞が傷害される。

ポリグルタミン病で指摘されている細胞毒性には、上記のタンパク毒性に加えて、伸長 CAG トリプレットリピートを持った mRNA による RNA 毒性が存在する。RNA 毒性では、CAG 異常伸長型 mRNA が RNA foci と呼ばれる RNA 凝集物として核内に蓄積し、ここに細胞の恒常性に必須なスプライシング因子などのタンパク質がトラップされるこ

とによって、機能を失うことが毒性の原因であると考えられている。つまり、ポリグルタミン病では、タンパク毒性のみならず、mRNA に由来する細胞障害性も治療の標的とする必要があると考えられる。

これまでにタンパク毒性に対しては、シャペロン介在性オートファジーや凝集阻害剤などの手法が検討されており、RNA 毒性に対しては siRNA や shRNA の効果が検討されてきている。siRNA や shRNA による発現の抑制は、mRNA の分解を介するため、mRNA 毒性も制御可能であるが、効果が短期間である点や、作用部位が投与部位近辺に限られるなどの欠点があった。そこで本研究では、mRNA 毒性とタンパク毒性を共に制御できる可能性のあるアンチセンスオリゴヌクレオ