

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、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・SCA31・SCA8 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