

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ファクター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

チド (antisense oligonucleotide; ASO)に着目した。本研究でモデルとしたポリグルタミン病の一種である DRPLA (歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症)は、進行性ミオクローヌステんかん、小脳失調、舞踏アテトーシス、性格変化、痴呆など多彩な神経症状を示し、歯状核赤核路と淡蒼球ルイ体路の変性を特徴とする常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症である。本症は原因遺伝子;atrophin-1 内の CAG リピートの異常伸長によって発症する (Koide R et al., Nat Genet. 1994.)。本研究の目的は、我々が保有するモデルマウスが呈する DRPLA 病態を ASO 投与によって制御可能であるかどうかを検討することである。

B. 研究方法

本研究では、発現抑制の手法として、mRNA からの翻訳を抑制する ASO と RNaseH を介した mRNA の分解を誘導する Gapmer 型 ASO の効果を検討した。

本研究では、翻訳抑制型 ASO として、Gene Tool, LLC 社の Morpholino を用いて、atrophin-1 の発現サイレンシングを行うこととした。第 3 世代と呼ばれる ASO である Morpholino ASO は従来の ASO よりも特異性が高く、off-target による非特異的な遺伝子への作用が少ない。

Gapmer 型 ASO には、Exiqon 社の LNA 修飾 ASO を使用した。ヒト atrophin-1 特異的な LNA ASO を 5 種、設計・合成した。

ヒト atrophin-1 サイレンシング効果の最も高い ASO を選抜するため、atrophin-1 の発現を認める、ヒト神経芽細胞腫である SHSY5Y 細胞を用いて *in vitro* にて判定を行った。

in vivo の解析は、DRPLA モデルマウスである DRPLA Q129 マウスを用いた。この DRPLA モデルマウスは 129 リピートの CAG トリプレットリピートを exon5 内に保持した

全長型のヒト変異型 atrophin-1 遺伝子をシングルコピーで導入されたラインである。このマウスは生後 3 週程度から運動失調を認め、脳内に週齢依存的に核内ポリグルタミン鎖の凝集物を認める。その後 11 週程度からてんかん様発作の発生をおこし、16 週までに死亡する (Sato T et al., Hum Mol Genet. 1999)。ASO の投与は、生後 1 日齢の DRPLA Q129 マウスに対して、ガラスキャピラリーを用いて両側脳室内投与 (i.c.v.)によって行った。

(倫理面への配慮)

動物の愛護及び管理に関する法律に基づいて行うとともに、新潟大学の動物実験規則および組換え DNA 実験安全管理規則に従い、学長許可を受けて実施した

C. 研究結果

<Morpholino>

in vitro における検討の結果、翻訳抑制型の morpholino を処理することによって、内在性 atrophin-1 のタンパク質レベルでの減少が確認された。そこで、次に *in vivo* での効果を検討するために、新生仔 DRPLA Q129 マウス脳室内に morpholino の投与を行った。しかしながら、morpholino によって DRPLA Q129 マウスのヒト変異型 atrophin-1 のタンパク質の発現量に減少効果は見られず、本マウスの DRPLA 病態の表現型にも効果は見られなかった。

<LNA Gapmer>

in vitro におけるスクリーニングの結果、ASO のサイレンシングの効果は、ターゲット配列によって差が認められた。いずれの LNA ASO においても、内在性 atrophin-1 の mRNA レベル、タンパク質レベルの減少が認められた。このうち最も効果の高かった 1 種を *in vivo* での効果検証に用いることとした。

新生仔 DRPLA Q129 マウス脳室内に ASO

を投与し、一週間後におけるサイレンシング効果の検討を行った結果、コントロールと比較して ASO 投与マウス脳内ではヒト atrophin-1 の mRNA レベル、タンパク質レベルでの減少が認められた。一方で、内在性マウス atrophin-1 タンパク質レベルに変化はなく、ASO がヒト atrophin-1 特異的にサイレンシング効果を発揮していることが確認された。

D. 考察

これまでの研究によって、ASO 投与によって中枢神経系 atrophin-1 が抑制可能であることが示された。ASO は変異遺伝子由来だけではなく、正常型由来の発現も抑制することから、副作用が一部で懸念されているが、atrophin-1 ノックアウトマウスは、正常に出生し、重篤な表現型もなく寿命も野生型とほぼ同様であることが確認されている。従って、ASO を用いた原因遺伝子発現のサイレンシングは、DRPLA の有効な治療戦略になりうることを示唆される。

E. 結論

ポリグルタミン病の一種である DRPLA の原因遺伝子;atrophin-1 は ASO によって発現制御可能である。

[参考文献]

1. Koide R1, Ikeuchi T, Onodera O, et al.:Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-

pallidoluysian atrophy (DRPLA). Nat Genet. 1994 Jan;6(1):9-13.

2. Sato T1, Oyake M, Nakamura K, Nakao K, Fukusima Y, Onodera O, et al.: Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients.Hum Mol Genet. 1999 Jan;8(1):99-106.

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

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当