

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15373

研究課題名(和文)非翻訳領域リピート病-SCA36-の多系統に渡る神経障害の病態解明

研究課題名(英文)Clearing the pathology of the SCA36 multiple system disturbance

研究代表者

松園 構佑(Matsuzono, Kosuke)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80809070

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): SCA36のiPS細胞系では、障害されている運動神経細胞、大脳皮質神経細胞、ドパミン細胞全てでNOP56の発現低下が起こっており、NOP56の発現低下がSCA36の病態には密接に関連している。NOP56ノックアウトマウスは新規遺伝子改変マウスだが、致命的となる。その原因は小脳形成であることが示唆された。NOP56ヘテロノックダウンマウスでは、小脳の障害が起こるが、運動神経細胞や大脳皮質細胞には異常を認めない。SCA36では、NOP56の約50%の発現低下が小脳失調を引き起こしている一方、運動神経細胞系や大脳皮質細胞系の異常はNOP56の発現低下以外の機序が関連していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本で確認されたSCA36患者は年々増加しているが、SCA36では原因遺伝子がNOP56内のGGCCTGリピートの延長であること、脊髄小脳変性症の病型に加え、筋萎縮性側索硬化症に類似した病態を呈すること等が分かっている。しかし、SCA36の多系統の神経障害は分かっていなかった。本研究でSCA36の主病態である小脳障害が原因遺伝子のNOP56の発現低下であることが分かったことで、今後NOP56の発現を増加させる薬物をSCA36患者に投与することで病態を改善させる、創薬につながることを期待される。

研究成果の概要(英文): We studied with the induced pluripotent stem cell (iPSC) derived from spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36). We differentiated SCA36-iPSCs to motor neuron cells, cortex neuron cells, and dopaminergic cells, which revealed NOP56 expression decrease. From these SCA36-iPSCs study, we cleared that the NOP56 gene expression decrease universally concerns with the SCA36 multiple system disturbance. Next we produced the novel gene transgenic mice, NOP56 knockout mice. Surprisingly, NOP56 completely knockout mice died within 7 days from born. Thus, we studied the NOP56 hetero-knockdown mice behavior test. In results, NOP56 hetero-knockdown mice showed the cerebellar disturbance, which suggests that SCA36 patient cerebellar ataxia concerns with the NOP56 50% expression decrease.

研究分野：神経内科学

キーワード：iPS細胞 神経難病 脊髄小脳変性症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症 36 型 (SCA36) は脊髄小脳変性症の病型に加え、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に類似した病態を呈する。これまで SCA36 の原因遺伝子や RNA foci と呼ばれる異常な RNA 凝集体が神経細胞の核内に存在することが分かっていた。しかし、何故 SCA36 では多系統の神経障害を来すのか、小脳変性の原因と ALS 様の病態の原因が同じなのか、その病態生理は分かっていた。

2. 研究の目的

SCA36 において原因遺伝子が NOP56 遺伝子のイントロン 1 に存在する GGCCTG 6 塩基リピートの異常伸長であることは判明しているが、原因遺伝子である NOP56 の機能低下 (“loss of function”) が多系統の障害にどのように関与しているのか、その病原性も含めて不明だった。

本研究では、SCA36 の多系統障害の原因に関与する病態生理について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、SCA36 患者由来の iPS 細胞を用いた *in vitro* での実験に加え、NOP56 ノックアウトマウスを作製した *in vivo* の実験も追加することで、多面的に SCA36 の多系統障害の機序について解析した。

SCA36 患者由来の iPS 細胞を用いた実験では、既に前実験の段階で、SCA36 患者由来の iPS 細胞から分化した運動神経細胞で NOP56 の発現が、健常者の 50%程度にまで低下していることが判明していたため、

(1) SCA36 患者由来の iPS 細胞から大脳皮質神経細胞に分化させ、皮質神経細胞への分化能及び NOP56 発現量について解析する。

(2) SCA36 患者由来の iPS 細胞からドパミン神経細胞に分化させ、ドパミン神経細胞への分化能及び NOP56 発現量について解析する。

と新たに 2 系統の神経分化に関する実験を行った。

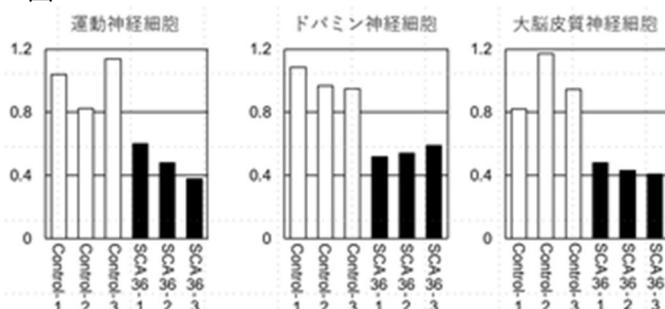
NOP56 ノックアウトマウスはこれまで作製歴の無い新規の遺伝子改変マウスであることから、新たに CRISPER-CAS9 システムを使用して作製を行い、その表現型について解析を行った。

4. 研究成果

SCA36 患者由来の iPS 細胞を用いた研究成果

SCA36 患者由来の iPS 細胞では、運動神経細胞、ドパミン産生細胞、大脳皮質細胞、いずれの分化でも NOP56 の mRNA 転写が健常者よりも約 50%程度に低下していることが判明した (図 1)

図 1

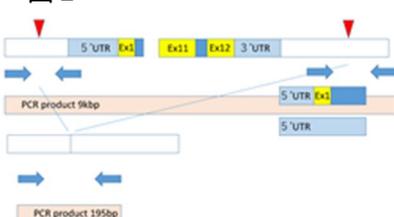


iPS 細胞の研究成果より、SCA36 の神経系には共通して NOP56 の発現が低下していることが判明した。そのため、次に、NOP56 ノックアウトマウスの作製にとりかかった。

NOP56 ノックアウトマウスの作製

下記の図 2 のように遺伝子改変を設計した。

図 2



その結果、下記の図 3 のように、NOP56 の発現が半分低下した NOP56 ヘテロノックダウンマウスの作製に成功した。

図 3 NOP56 ヘテロノックダウンマウスの作製成功 (1~5 が遺伝子改変試み。6 は野生型) 4 のみ、バンドが 2 種類検出され、ヘテロで NOP56 の改変に成功

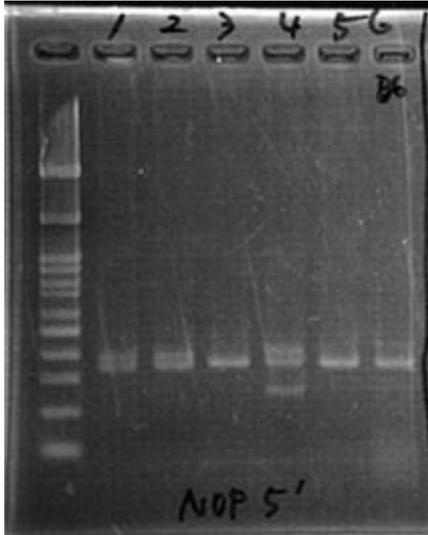


図 3 で成功した NOP56 ヘテロノックダウンマウスの雌雄を交配させ、NOP56 ホモノックアウトマウスを行動解析することが当初の実験の予定だった。しかし、交配の結果産まれた NOP56 ホモノックアウトマウスは生後 1 週間以内に死亡することが明らかになった = NOP56 ホモノックアウトマウスは致死的。

NOP56 ホモノックアウトマウスを解剖すると、小脳が低形成であることが判明した。NOP56 ホモノックアウトマウスは行動解析可能になるまで発育することが不可能なことから、NOP56 ヘテロノックダウンマウスの行動解析を行ったところ、生後 1 年経過した時点で、ロータロッド試験での持続時間が野生型のマウスよりも有意に短い一方、小動物用握力メーターで測定した握力は前肢・後肢ともに野生型と有意差は認めなかった。

NOP56 ヘテロノックダウンマウスと野生型マウスを解剖した結果では、前頭葉、脊髄運動神経細胞数に有意差は認めなかった一方、NOP56 ヘテロノックアウトマウスでは小脳の体積が少なく、ブルキンエ細胞数が少なかった。本結果は、SCA36 患者の NOP56 の発現量が約 50%に低下 (=NOP56 ヘテロノックアウト状態)しているが、何故 50 歳から 60 歳代で小脳失調が起こるのか、その病態機序と一致するものであった。

以上、本研究より、

1. SCA36 の iPS 細胞系では、障害されている運動神経細胞、大脳皮質神経細胞、ドパミン細胞全てで NOP56 の発現低下が起こっており、NOP56 の発現低下が SCA36 の病態には密接に関与している。
2. NOP56 ノックアウトマウスは新規遺伝子改変マウスだが、致死的となるが、その原因は小脳形成であることが示唆された。
3. NOP56 ヘテロノックダウンマウスでは、小脳の障害が起こる一方、運動神経細胞系や大脳皮質細胞系には異常が起こらなかった。そのため、SCA36 では、NOP56 の約 50%の発現低下が小脳失調を引き起こしている一方、運動神経細胞系や大脳皮質細胞系の異常は NOP56 の発現低下以外の機序が関与していると考えられる。

といった SCA36 の多系統障害の機序が明らかとなった。本研究成果は、研究実施期間内には学会や論文で発表することが出来なかったが、近未来に各種学会と国際誌にて発表を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------