

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591072

研究課題名（和文） RNA異常に着目した新しい脊髄小脳変性症SCA31の分子病態解明

研究課題名（英文） A research for dissecting molecular pathogenesis of SCA31.

研究代表者

石川 欽也（ISHIKAWA KINYA）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30313240

研究成果の概要（和文）：

本研究は、脊髄小脳失調症31型(SCA31)について、その治療薬開発を目指した基礎的研究を主にモデル動物を用いて研究する目的で、まずモデル動物を作製した。方法は、当該遺伝子変異を同定する課程で完成させたヒト16番染色体長腕領域を有するBAC(bacterial artificial chromosome)を用いて、マウス受精卵に導入した。遺伝子導入されたマウスを選定し、交配により9つのラインを樹立した。3年間の研究期間内に多くは安定してラインが確立し、行動解析まで果たせた。検索できた範囲では確かにヒトSCA31の責任遺伝子変異がマウス脳内で発現していた。本研究はSCA31の最初のモデルマウス作製を果たし、大きな成果が上がった。

研究成果の概要（英文）：

We performed basic research for three years (FY2009-2011) and achieved a success to generate SCA31 model mice. We introduced a BAC (bacterial artificial chromosome) clone, derived from a SCA31 affected individual, into mice fertilized eggs. We obtained 9 lines positive for the gene of interest. Four different lines were finally established. The SCA31 mutation was confirmed transcribed in the transgenic mice. These achievements are crucial for the future understanding of pathogenesis as well as establishment of treatments in SCA31.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ゲノム、拡散、脳神経疾患、マイクロアレー、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は、小脳とその関連する神経

系統が変性する神経変性疾患の総称である。臨床的には小脳障害による歩行障害で発症

し、進行して数年から 10 年程度で寝たきりになることが多く、未だ有効な治療法がない代表的な神経難病である。本邦の脊髄小脳変性症の有病率は人口 10 万中 20 人程度とされる。

SCA31 (脊髄小脳失調症 31 型) は、我が国に多い常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症である。その原因は 2 つの異なる方向に転写される遺伝子 *BEAN* (brain expressed associated with *NEDD4*) と *TK2* (thymidine kinase 2) が共有するイントロン領域に 2.5 ~ 3.8 キロ塩基対(kb)の長さによって続く 5 塩基繰り返し配列である。しかし、この遺伝子変異がどのようにして疾患を起こすかは全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RNA レベルでの異常が有力となった、新しい脊髄小脳変性症「SCA31」の病態を、トランスジェニックマウスを作製して究明することである。

3. 研究の方法

同定されたばかりの SCA31 遺伝子変異が、転写されて RNA になった後、どのように病態を引き起こすかを、高いコピー数で遺伝子変異を含むゲノム領域を導入したマウスを作製する。遺伝子転写産物の RNA 凝集体形成と、遺伝子変異がもつ cis/trans 調節効果などについて責任遺伝子の transcription などの影響を解析する。得られた知見を随時患者脳での検証を行い、SCA31 の分子病態を解明する。

4. 研究成果

脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31; spinocerebellar ataxia type 31) は、2 つの異なる方向に転写される遺伝子 *BEAN* (brain expressed associated with *NEDD4*) と *TK2* (thymidine kinase 2) が共有するイントロン領域に 2.5 ~ 3.8 キロ塩基対(kb)の長さによって続く 5 塩基繰り返し配列の存在で発症する常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症である。この病態は全く不明であり、本研究ではその分子病態の解明のためにモデル動物の作製を行った。

SCA31 患者ゲノムから単離した BAC clone をマウスに導入し、初年度にトランスジェニックマウスを作製した。この BAC clone には疾患を引き起こす 5 塩基繰り返し配列と、*BEAN* 遺伝子全長が含まれている。導入には精製度の高い DNA を調整し、通常のマウス受精卵前核注入 (pronuclear injection) 法を用いた。順調に発育し、尻尾からマウスのゲノム DNA を抽出した。その DNA をサザンブロット解析で導入されたヒト遺伝子のコピー数を解析したところ、8 つのラインに高いコピー

数でそのマウスゲノム (F0, ファウンダーマウス) にヒト由来の SCA31 責任領域が導入されているのが確認できた。

第 2 年度半ばから第 3 年度は作製した SCA31 トランスジェニックマウスの繁殖・継代を進めた。2 つのラインでは途中でファウンダーマウスが死亡してしまったため、残りの 6 系統でラインが樹立でき、生後 1 年目を過ぎる時期までのステージで、複数のマウスで行動解析を行った。

一方、すべてのラインで 6 か月齢のマウスより脳を摘出し、RT-PCR 法で遺伝子発現の検索を行った。逆転写酵素を加えない系や遺伝子を導入していない対照マウスでは、ヒト *BEAN* 遺伝子の転写・発現が見られなかったのに対して、逆転写酵素を加えた系では確かに導入遺伝子が全長に渡って増幅され、導入した遺伝子によってヒト由来の SCA31 遺伝子が高コピー発現していることが確認できた。次に詳細な形態的変化がないかを組織学的に検証した。小脳の神経細胞ではところどころ神経細胞が減少しているように観察される箇所があった。このため、複数のラインで神経細胞の変性・脱落や SCA31 の特徴である神経細胞の核内の RNA 凝集 (foci) について、期待を持って詳細に検索する方針を決め、研究 3 年目を終了した。

一方、生後 6 ヶ月および 12 ヶ月の時期で、複数のマウスで行動解析を行った。研究終了時点で、SCA31 トランスジェニックマウスでは行動機能の低下の兆しが認められ、発症している可能性も期待された。しかし、複数のマウスラインでの確認が必要で結論を出すには時期が早い。今後さらに複数ラインでの行動解析と、組織学的検索による神経細胞脱落などの異常の有無を確認する必要がある。

本研究で SCA31 のモデルとなる有望なマウスの作製が出来た。今後の研究継続が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima Y, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama M, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H. Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. 2012. *Neuropathology* (in press).
2. Obayashi M, Ishikawa K, Izumi Y,

- Takahashi M, Niimi Y, Sato N, Onodera O, Kaji R, Nishizawa M, Mizusawa H. Prevalence of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor type 1 gene (*ITPR1*) deletion, the mutation for spinocerebellar ataxia type 15 (SCA15), in Japan screened by gene dosage. 2012. *J Hum Genet*, 57(3): 202-206.
3. Ishikawa K, Dürr A, Klopstock T, Müller S, De Toffol B, Vighetto A, Marelli C, Wichmann HE, Illig T, Niimi Y, Sato N, Amino T, Stevanin G, Brice A, Mizusawa H. Pentanucleotide repeats at the spinocerebellar ataxia type 32 (SCA31) locus in Caucasians. 2011. *Neurology*, 77(20): 1853-1855.
 4. Ishikawa K, Mizusawa H. The chromosome 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA*): A newly identified degenerative ataxia in Japan showing peculiar morphological changes of the Purkinje cell. 2010. *Neuropathology*, 30(5): 490-494.
 5. Ishiguro T, Ishikawa K, Takahashi M, Obayashi M, Amino T, Sato N, Sakamoto M, Fujigasaki H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Arai T, Sasaki H, Nagashima K, Kato T, Yamada M, Takahashi H, Hashizume Y, Mizusawa H. The carboxy-terminal fragment of alpha1A calcium channel preferentially aggregates in the cytoplasm of human spinocerebellar ataxia type 6 Purkinje cells. 2010. *Acta Neuropathol* 119(4): 447-464.
 6. Sato N, Amino T, Kobayashi K, Asakawa S, Ishiguro T, Tsunemi T, Takahashi M, Matsuura T, Flanigan KM, Iwasaki S, Ishino F, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Hashizume Y, Takahashi Y, Tsuji S, Shimizu N, Toda T, Ishikawa K, Mizusawa H. Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGAA)n. 2009. *Am J Hum Genet* 85(5):544-557.
- [学会発表] (計 7 件)
1. 石川欽也、水澤英洋. 「脊髄小脳変性症の分子病態」. シンポジウム 4-S-5-3 (シンポジウム 4. こころと神経: 「神経変性疾患の病態と治療 (脊髄小脳変性症を含む)」) 第 28 回日本医学会総会 (震災のため抄録発表のみ).
 2. 新美祐介, 佐藤 望, 網野猛志, 高橋 真, 大林正人, 石黒太郎, 石川欽也, 水澤英洋. 細胞モデルを用いた脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の病態探索. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 18.
 3. 渡瀬 啓, 石川欽也, 水澤英洋. SCA6-原因の同定から治療法の開発へ-. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 2010. 5. 22. (シンポジウム: 神経難病の克服 - 単一遺伝子病からのアプローチ-).
 4. 石川欽也、網野猛志、佐藤 望, 新美祐介, 融 衆太, 水澤英洋. シンポジウム 16. 「Neurodegenerative diseases and RNA.」 SCA31. 第 51 回日本神経学会総会. 東京. 2010. 5. 22.
 5. 石川欽也, 石黒太郎, 高橋 真, 佐藤 望, 網野猛志, 新美祐介, 水澤英洋. シンポジウム 9-1 ポリグルタミン病への分子生物学的アプローチ. 「脊髄小脳変性症への分子生物学的アプローチ」第 50 回日本神経学会総会. 仙台. 2009. 5. 22.
 6. 渡瀬 啓, Barrett CF, 宮崎太輔、海野敏紀、石川欽也、笠井沙由美、渡辺雅彦、水澤英洋、Tsien RW, Zoghbi HY. SCA6 ノックインマウス表現型の経時的検討. 第 50 回日本神経学会総会. 仙台. 2009. 5. 20.
 7. 石川欽也, 水澤英洋. 50 周年記念標本提示「日本が世界に発信したあの疾患」 本邦で同定された新しい脊髄小脳変性症 16q-ADCA - その特異的 Purkinje 細胞変性 - 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会. 高松. 2009. 6. 5-6.
- [図書] (計 6 件)
- 1). 石川欽也, 佐藤 望, 網野猛志, 新美祐介, 融 衆太, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31). *Annual Review 神経* 2011 巻 241-250.
 - 2). 石川欽也、水澤英洋. 遺伝性脊髄小脳変性症. 雑誌「内科」特集「内科疾患の診断基準病型分類・重症度」vol.105 増大号 No6. 2010. 1342-7. 南江堂、東京.
 - 3). 石川欽也、水澤英洋. 不随意運動. 雑誌「内科」特集「内科疾患の診断基準病型分類・重症度」vol.105 増大号 No6. 2010. 1398. 南江堂、東京.
 - 4). 石川欽也、水澤英洋. 脊髄小脳変性症の分類と治療. 鈴木則宏・編「からだの科学」神経内科の病気のすべて. 日本評論社, 東京, 2010 : 98-102.
 - 5). 石川欽也. 脊髄小脳変性症. In: 落合滋之監修 森田明夫、吉澤利弘編集, 「脳神経疾患ビジュアルブック」. 学研, 東京, 2009 : 256-259.
 - 6). 石川欽也. 多系統萎縮症. In: 落合滋之

監修 森田明夫、吉澤利弘編集、「脳神経疾患ビジュアルブック」. 学研, 東京, 2009 : 260-263.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 欽也 (ISHIKAWA KINYA)

研究者番号 : 30313240