

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07432

研究課題名（和文）プルキンエ細胞特異的遺伝子発現に着目したSCA31モデルマウスの病態解析

研究課題名（英文）A study on Purkinje cell-specific gene expression in SCA31 model mice

研究代表者

石川 欽也（Ishikawa, Kinya）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30313240

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）： SCA31 BAC Tgマウス（ラインD）でのRNA-seqによっていくつかの異常RNAが検出された。しかしタンパクレベルでの確認には未だ至っていない。

患者脳でのRNA解析の結果、非常に多数のスプライシング変化や発現量の変動を来した遺伝子を見い出した。その中には、病態への関与や2次的であるにせよ病態の進行を反映する可能性が確からしい分子も見出された。これらを取りまとめて論文として公表する準備を進めた。SCA31 BAC Tgマウス（ラインD）とL7/pcp2 TRAPマウスとの交配による作製は、引き続き続けることにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりSCA31の病態について開始前よりも大幅に治験を増すことができた。学術的意義としては、脊髄小脳変性症の根本的な病態解明に関する研究が近年減少しているなかで、我が国において最も患者数が多いとも言われる本疾患の基礎的な病態解明についての課題を、解明できたことは意義が大きいと考えている。技術的な側面でも、最先端の次世代シーケンサーによるRNA-seq法を用いたことで初めて得られた成果であることも強調したい。社会的にも、我が国だけでさえ脊髄小脳変性症の患者は2万人の罹患者がいるため、大きな意義があると考えている。今回の成果は、SCA31のみならず類縁疾患に広く応用可能である。

研究成果の概要（英文）： This study was conducted to elucidate how the penta-nucleotide TGGAA/TTCCA repeat leads to relatively selective Purkinje cell degeneration in human affected with spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31). We found numerous abnormal RNA sequences when examined with RNA-seq, some of which appeared consistent with our prior knowledge regarding neuropathologic changes in SCA31. For example, splicing changes or cellular makers supported by Purkinje cell loss and gliosis in histologic specimens were documented in RNA-seq. As these differential expression profiles have not been described in SCA31, we are planning to publish these data in the near future.

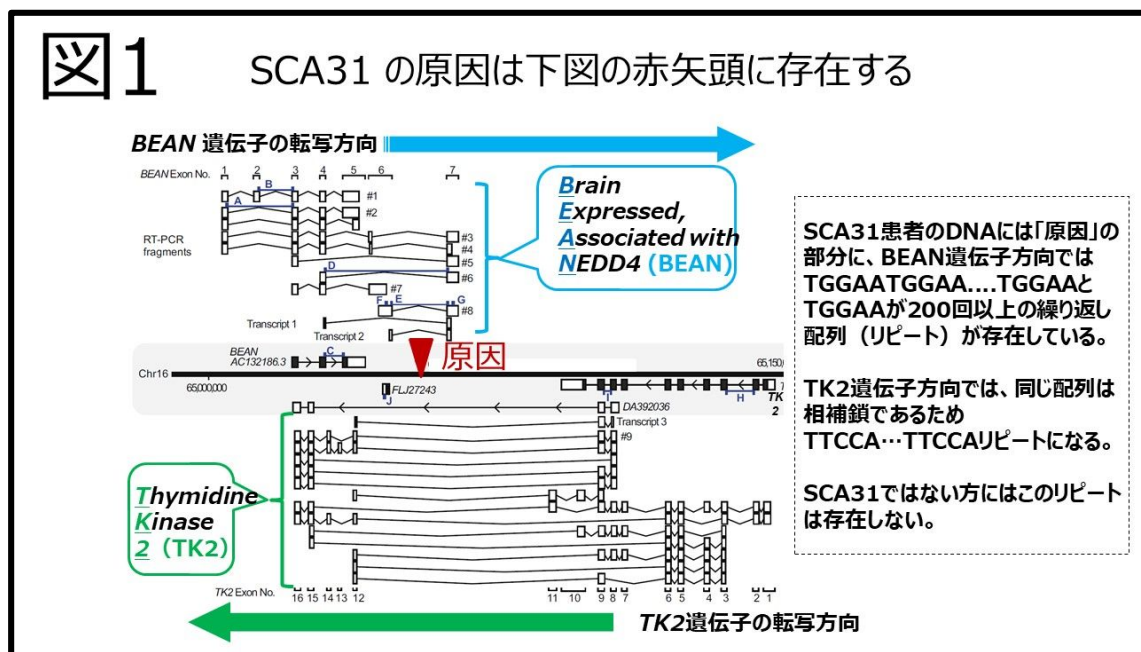
研究分野：脳神経内科学

キーワード：脊髄小脳変性症 小脳 遺伝子 RNA 蛋白

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SCA31 は、我が国に多い常染色体優性遺伝性の神経変性疾患（脊髄小脳変性症）で、病理学的には小脳皮質プルキンエ細胞が変性・脱落する。その原因は、ヒト第 16 番染色体長腕に存在する 2 つの遺伝子 brain expressed associated with NEDD4 (BEAN) と thymidine kinase 2 (TK2) がイントロンとして共有する領域に、5 塩基(TGGAA/TTCCA; 以下 TGGAA と略す)を含む 5 塩基繰り返し配列が 2.5 ~ 3.8kb(キロベース)に亘り存在することである(Sato N. and Amino T. et al. AJHG, 2009)。健常者にはこのリピートはなく、2.5 ~ 3.8kb の配列が長いほど患者は若く発症することから、5 塩基繰り返し、特に TGGAA リピートが疾患の原因と考えられる。TGGAA リピートは、BEAN 遺伝子が転写される時に UGGAA リピートとして発現する。



我々はこれまで、患者プルキンエ細胞においてのみ、UGGAA リピートが RNA の異常構造体 (RNA foci) をプルキンエ細胞の核内に形成すること (Niimi Y. et al. Neuropathology, 2003) さらに UGGAA リピートは蛋白に翻訳され、5 つのペプチド (Trp-Asn-Gly-Met-Glu) が繰り返すペプチドリピートとして発現し、患者プルキンエ細胞で凝集していることを報告している (Ishiguro T. et al., Neuron, 2017)。一方 SCA31 病態のカギを握る RNA、UGGAA リピートは、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因・病態関連蛋白である TDP-43 や FUS、hnRNPA2/B1 などの RNA 結合蛋白と結合することを発見した。さらにショウジョウバエにおいては UGGAA リピートが示す毒性を TDP-43 などが緩和し、RNA foci の形成を抑制した。これを RNA-RNA 結合蛋白バランスと称し、2018 年に特許登録に至った。

SCA31 の病態解明のため申請者は、患者由来の SCA31 ゲノム領域を約 100kb に渡って有する BAC clone を導入した BAC Transgenic マウス(以下、SCA31 BAC Tg)を開発した (誌上未公開)。この SCA31 BAC Tg では、ヒトの BEAN 遺伝子と同じ発現分布を表し、UGGAA リピートは RNA foci を形成して内因性(マウス)TDP-43 と共局在してプルキンエ細胞に存在していた。さらに、分担研究者の柳原 大博士と長年にわたり行動解析を続けた結果、高齢でいくつかの歩行異常を示すことを見いだした。この歩行異常は、プルキンエ細胞に入力する平行線維のシナプスに発現するタンパクが欠損マウスでも共通して見られた歩行異常に類似していた。

以上の背景を経て、RNA UGGAA リピートがどのような分子を介して病態を起し、そこに UGGAA 結合蛋白 TDP-43 がどのように病態を緩和させるのか、という問いであり、本研究ではこれを解明する。この機序がマウス上で解明されれば、患者での治療法を探索する有力なヒントを得られる可能性がある。

2. 研究の目的

BEAN 方向の異常配列 TGGAA リピートを有する SCA31 モデル BAC Tg マウスにおいて、異常な発現をする RNA を明らかにし、患者脳での RNA 発現解析結果と一致するものを探索することで、SCA31 における RNA 病態の理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、モデルマウスで脳機能異常がいつ現れるかについて、小脳の重要な機能である運動学習と運動制御を検証しやすい split belt トレッドミル法を用いて脳機能異常の早期発見を目指す。これは左右のベルトが独立して速度制御ができるトレッドミル機器である。マウスをトレッドミル機器の上を歩かせる間、3次元の歩行動態を解析できるように画像を収録する。トレッドミルは最初左右を同じスピードで動かす (tied-baseline condition)、次に左右の速度を異なるものとし (split condition)、最後にもう一度左右を同速にする (after-effect and washout)。これを経て運動学習を評価する。各個体について精密な解析が必要であり、これを共同研究者の柳原 大博士が行う。

その時期において SCA31 の病態に関わると考えられる UGGAA リピートが、どのようにその病態を起こすかを明らかにするために、同マウスでの RNA 発現解析を再解析する。また TRAP 法を用いて UGGAA リピートが、どのような分子を介してプルキンエ細胞で病態を起こすかを明らかにする。

4. 研究成果

モデルマウスを用いた運動学習能の評価では、高齢のモデルマウスである歩行障害が見られた時期において解析を進めた。本研究期間終了時点で、誌上報告を済められなかったことから詳細は本報告書では控えることにしたい。

モデルマウスにおける RNA 発現については、pair-end 法での RNA-seq 解析で、多数の遺伝子発現異常が見られた。対照マウスと比較して、2倍発現亢進の遺伝子が50以上見られ、逆に0.5倍以下に発現低下している遺伝子群も多数みられた。これらの遺伝子の発現が亢進・低下することと病態がどのように関わるのかを検証する必要があり、本研究期間後にも続けて行く。

一方、これらの遺伝子発現変化が、患者脳での発現とどのように一致するかについても検証を進めた。患者においてはすでにプルキンエ細胞が減少していることや、慢性炎症などの変化が形態的な解析からも確認できるため、それを裏付ける遺伝子発現の変化がヒトでは確認できた。一方、モデルマウスではこのような形態変化は患者ほど強くはないため、一致性の検証にはさらなる検証が必要であることが判明した。

また、これまでの研究成果から SCA31 には TDP-43 などの RNA 結合蛋白が関与することが想定されるため、TDP-43 の機能の一つであるスプライシングにも影響し、SCA31 患者小脳ではスプライシング異常が起きている可能性が想定された。このため、Long-read RNA-seq を行った結果を本研究課題において解析を加えた。解析のためには、これまで脊髄小脳変性症および小脳失調症をキーワードに、ヒトに限らず、マウスでも小脳障害を起こす疾患とその遺伝子をデータベースから検索し構築することにした。その際に、SCA31 は常染色体顕性 (優性) 遺伝であるが、潜性 (劣性) 遺伝の疾患についてもリスト化した。次にポリグルタミン病の20個をそのリストからは除外した。その結果、45 の遺伝子を抽出した。さらに同時に当該遺伝子が小脳失調症を来す病態を、「機能獲得型」、「機能喪失型」、「優性抑制効果」の3つに分けて、それぞれの遺伝子名と共にリストに載せた。

次に順次 RNA-seq の結果を IGV (<https://igv.org/>) において検証し、一つずつの遺伝子について全エクソンのスプライス変化がないかを検証していった。そのうちの一例を示す。

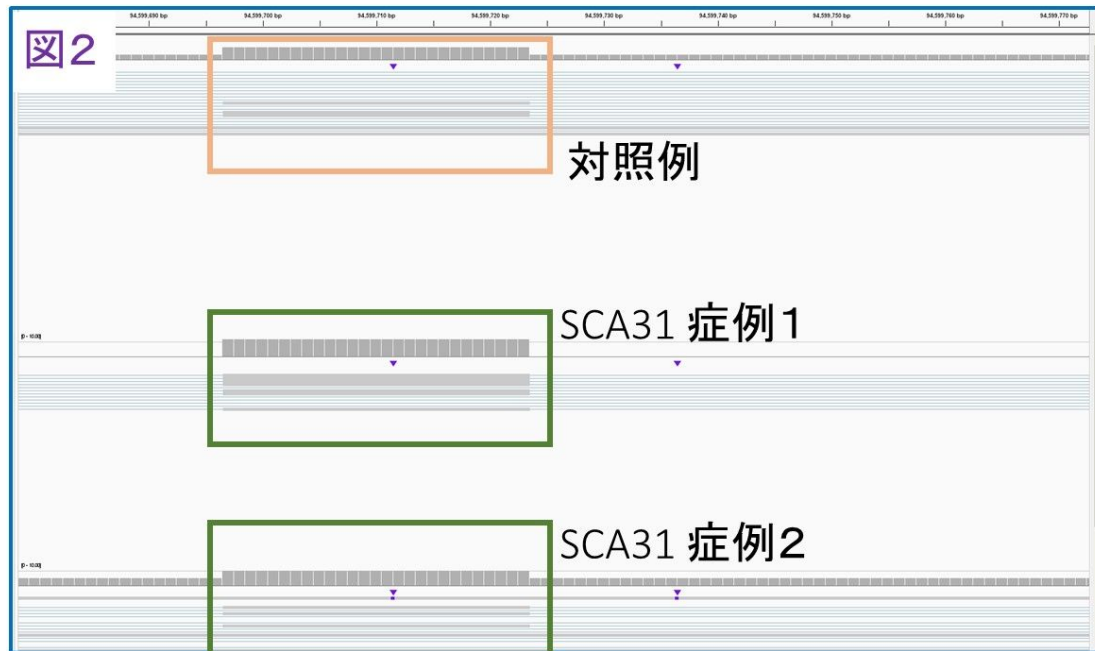


図2 Long read RNA-seq法を用いて解析した際の所見

この図2のように、上に対照例（1例）下に SCA31 患者 2 例、合計 3 例での long-read RNA-seq 結果をある遺伝子にマッピングし、IGV で解析した結果を示す。（なお、科学雑誌などに公表前のデータであることから遺伝子名や位置情報はこの報告書では割愛させていただきます。）

図2に示すように、橙色の枠で示すように、対照例ではこの図に示すエクソンをスキップする RNA 分子が圧倒的に優位（21 リード中 17 リードでスキップ）である。なお、スキップした RNA は細い青の線で示され、同エクソンを含む RNA は太めの灰色の線で示されている。対照者では多くの RNA 分子でこのエクソンがスキップされている。

一方、症例1では 12 リード中 5 リードのみがスキップし、残る 7 リードはこのエクソンを mRNA に含むスプライシングを起こしている。症例2では 12 リード中 8 リードがスキップしていた。以上よりスキップ率は、対照例 80.9%、SCA31 の症例1は 41.7%、症例2は、66.7%であった。

この遺伝子はプルキンエ細胞にとって非常に重要な遺伝子である。このエクソンの塩基数は 33 であるため、エクソンがスキップされる mRNA と、スキップしない mRNA では、フレームにずれが生じないことが推定された。しかし、このエクソンは機能的にも重要な領域であることから、この遺伝子に軽微な機能変化が生じた場合に、長い年月を経てプルキンエ細胞に機能変化が起きることや、脆弱性をきたす可能性は否定できないと考えた。このような軽微なスプライシング変化をきたしている遺伝子は 10 以上認められた。

Long-read RNA-seq での検索を、症例数を増やして行うことには限界があるため、このような結果が示唆された遺伝子について RT-PCR 法でスプライシング異常が確認されるかをより多数の症例で実施した。これまでの成果では、RNA-seq で得られた結果を確かに検証できた遺伝子を確認した。今後も多数のスプライシング異常を検証してゆき、ヒトでの RNA 発現異常を確認してゆく予定である。そして研究計画当初とは逆の順番にはなるが、軽微なモデルマウスにおける一貫性も検証する予定である。

さらに、この作業を進めながら、海外の研究者との共同研究で、このようなスプライス異常を起こす可能性のある RNA 結合蛋白を追跡した。具体的にはこのエクソンと周辺のイントロン配列内に、スプライス因子の認識部位を *in silico* で検証した。その結果、TDP-43 などの RNA 結合蛋白であり、スプライス因子としての機能を有するある蛋白が実際に、RNA-seq で認められた複数のスプライス異常に関わっている可能性が示唆された。今後は *in vitro* の実験でこの関心領域が本当に標的 RNA 結合蛋白で認識されてスプライシングに影響するかを証明する実験を行う予定である。

これが証明されれば、SCA31 において当初計画した SCA31 における RNA 病態の理解を深めたことになると言える。さらに、その異常を修復する方法を探索して、本疾患の治療法を開発することが可能になりうると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishikawa K.	4. 巻 68(3)
2. 論文標題 Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31).	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 153-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-022-01091-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saucier J, Al-Qadi M, Amor MB, Ishikawa K, Chamard-Witkowski L.	4. 巻 444
2. 論文標題 Spinocerebellar ataxia type 31: A clinical and radiological literature review.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Neurol Sci.	6. 最初と最後の頁 120527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2022.120527.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishiguro T, Nagai Y, Ishikawa K.	4. 巻 May 25;15
2. 論文標題 Insight Into Spinocerebellar Ataxia Type 31 (SCA31) From Drosophila Model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Neurosci.	6. 最初と最後の頁 648133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.648133.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ozaki K, Irioka T, Uchihara T, Yamada A, Nakamura A, Majima T, Igarashi S, Shintaku H, Yakeishi M, Tsuura Y, Okazaki Y, Ishikawa K, Yokota T.	4. 巻 172 (Oct 24)
2. 論文標題 Neuropathology of SCA34 showing widespread oligodendroglial pathology with vacuolar white matter degeneration: a case study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-021-01272-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aoki H, Higashi M, Okita M, Ando N, Murayama S, Ishikawa K, Yokota T.	4. 巻 Jan 17
2. 論文標題 Thymidine Kinase 2 and Mitochondrial Protein COX I in the Cerebellum of Patients with Spinocerebellar Ataxia Type 31 Caused by Penta-nucleotide Repeats (TTCCA) n	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Cerebellum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12311-021-01364-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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
研究分担者	柳原 大 (Yanagihara Dai) (90252725)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授 (12601)	

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
---------	---------