

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07440

研究課題名（和文）新規イントロンリピート病CANVASの病態解析モデルの構築

研究課題名（英文）Establishment of a pathophysiological analysis model for novel intronic repeat disease CANVAS

研究代表者

田中 章景（Tanaka, Fumiaki）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30378012

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）：CANVASのRFC1イントロンACAGGリピート伸長例（患者1）とAAGGGリピート伸長例（患者2）で、遺伝学的に診断した症例としては初めて後根神経節神経細胞（DRG）喪失とNageotte結節を確認した。両例の病理所見とRNA fociを評価したところ、患者1でより重度の神経変性を認めたプルキンエ細胞、DRG、下オリーブ核、脊髄前角の神経細胞では、患者1の方がfociのサイズが大きく、患者2の方でより重度の神経変性を認めた前庭神経核では患者2のfociが大きかった。本研究では、CANVAS剖検組織においてRNA foci形成を初めて証明し、病態にRNA毒性が関与する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子の非翻訳領域のリピート伸長に基づく疾患が近年次々と発見され、脊髄小脳変性症のCANVASもその一つである。これらの病態として、RNAやその機能タンパクの減少による機能喪失仮説、RNA foci（RNA凝集体）がRNA結合タンパクを隔離してその機能を阻害するRNA毒性仮説、リピート部が翻訳され毒性ポリペプチドが産生されるRAN翻訳毒性仮説が提唱されている。しかし、CANVASでは、いずれを支持するデータも存在しなかった。本研究により、患者組織でRNA fociが形成され、RNA毒性が病態に関与する可能性がはじめて明らかになったことは、今後の疾患修飾療法の開発に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：In cases of CANVAS with RFC1 intronic ACAGG repeat expansion (Patient 1) and AAGGG repeat expansion (Patient 2), we identified for the first time dorsal root ganglia (DRG) neuron loss and Nageotte nodules as genetically diagnosed manifestations. Histopathological evaluation and RNA foci assessment revealed more severe neurodegeneration in Patient 1, with larger foci observed in Purkinje cells, DRG, inferior olivary nucleus, and spinal anterior horn neurons. Conversely, Patient 2 exhibited more pronounced neurodegeneration in the vestibular nuclei, with larger foci observed. This study provides the initial evidence of RNA foci formation in CANVAS autopsy tissues, suggesting involvement of RNA toxicity in its pathophysiology.

研究分野：脊髄小脳変性症

キーワード：CANVAS RNA foci 病理学的解析 FISH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1990年代以降、遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に存在する繰り返しリピート配列の異常伸長が様々な神経筋疾患の原因であることが明らかとなってきた。本研究で対象とする CANVAS は非翻訳領域リピート病で、小脳性運動失調、末梢神経障害、両側前庭神経障害を3徴とする常染色体潜性遺伝性の脊髄小脳変性症の一型である。CANVAS のリピート配列には、ホモ接合性の AAGGG 配列や ACAGG 配列の他、これら両配列の複合ヘテロ接合体が存在する。CANVAS を含む非翻訳領域リピート病は進行性の神経症状、重大な QOL 障害をきたし、病態解明に基づく効果的な疾患修飾療法の開発が強く求められている。非翻訳領域リピート病の病態仮説としては、RNA およびその機能タンパクの減少による機能喪失仮説のほか、RNA foci と呼ばれる RNA の凝集体が RNA 結合タンパクを隔離してその機能を阻害する RNA 毒性仮説や、開始コドンに依存せずリピート部が翻訳されることで毒性を持つポリペプチドが産生される RAN 翻訳毒性仮説が提唱されている。しかし、研究開始時点において、CANVAS では、いずれの仮説を示唆する決定的なデータは存在しなかった。

2. 研究の目的

CANVAS では、これまで患者組織において AAGGG リピートによる RNA foci は同定されていない。しかし、ペンタヌクレオチドリピートの延長を伴う mRNA は構造変化を来し、RNA 結合タンパク質との結合に影響を及ぼしている可能性は十分考えられる。そこで、本研究では、主として CANVAS の RNA 毒性仮説を検証すべく、培養細胞、剖検例を用いてこの仮説の傍証を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

CANVAS の原因となる病的リピート(AAGGG)_n、(ACAGG)_n、非病的リピート(AAAAG)_nを含むベクターを作成し、これらを発現させた Neuro2A 細胞において RNA 蛍光 in situ hybridization (FISH) 法を行い、RNA foci 形成の有無を検証した。これによりプローブの条件を決定した。次に、遺伝学的に確定診断された CANVAS の病理学的特徴を評価した。両アレル性 ACAGG リピートの異常伸長を有し、三主徴に加え臨床的に運動神経障害を認めた 83 歳女性(患者 1)および、両アレル性 AAGGG リピートの異常伸長を有し、典型的な三主徴を呈した 86 歳女性(患者 2)の 2 剖検例を対象とし、脳、脊髄、後根神経節、末梢神経を含めた病理学的検討を行った。また、Neuro2A 細胞における FISH で検証した蛍光標識された(ACAGG)₅ および(AAGGG)₅ プローブを用いて RNA 蛍光 in situ hybridization 法により RNA foci の存在を評価し、次に病理学的変化と RNA foci の比較検討を行った。

4. 研究成果

異常伸長リピートは通常の PCR 法では検出困難であるが、申請者らは条件検討を重ねた結果、160 リピートの AAGGG (CCCTT)₁₆₀、260 リピートの ACAGG (CCTGT)₂₆₀、9 リピートの AAAAG (CTTTT)₉を含むベクターの構築に成功した。そして、これらを Neuro2A 細胞に発現させ、(AAGGG)₅-locked nucleic acid LNA)プローブ、(ACAGG)₅-LNA プローブを用いて、FISH)法を施行した。その結果、(ACAGG)₅-LNA プローブにより(CCTGT)₂₆₀ 発現細胞において核周囲の RNA foci 形成を確認した。同様に(AAGGG)₅-LNA プローブは特異的に(CCCTT)₁₆₀ 発現細胞の RNA foci を同定した。また、各々のプローブが cross reactivity を示さないことも確認した。両プローブとも、非病的リピートである(CTTTT)₉ 発現細胞においては RNA foci は見られなかった。

病理学的解析では、両症例に共通する所見として、プルキンエ細胞の消失、後索の変性、腓腹神経の大小有髄線維の消失、大腿神経の小線維を主体とする有髄線維の消失を認めた。また遺伝学的診断された CANVAS 症例としては初めて後根神経節の神経細胞の喪失と Nageotte 結節が確認された。前庭神経核の変性は AAGGG リピートを持つ症例でより顕著である一方、クラーク柱と下オリーブ核の変性は ACAGG リピートを持つ症例でより重度であるなど、一部の神経細胞においては、両症例間で障害部位の差が認められた。もっとも顕著な相違点として、ACAGG リピートを持つ症例でのみ前根の萎縮と前角運動神経細胞の消失が観察された。

次に、培養細胞の RNA foci 同定で検証済みのプローブを用い、患者組織での RNA foci の有無を検討し、病理学的変化との関係を解析した。神経細胞喪失を認める組織の残存神経細胞の核内に、それぞれ内因性の CCTGT および CCCTT を含む RNA foci を認めた。患者 1, 2 を比較すると、患者 1 の方がより重度の神経変性を認めたプルキンエ細胞、後根神経節神経細胞、下オリーブ核、脊髓前角の神経細胞では患者 1 の方が RNA foci のサイズが有意に大きく、また患者 2 の方でより重度の神経変性を認めた前庭神経核では患者 2 の RNA foci が有意に大きかった。

本研究では、CANVAS 剖検組織において RNA foci 形成を初めて証明した。この結果は CANVAS の病態に RNA 毒性が関与する可能性を示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Doi H, Okubo M, Wada T, Hamanaka K, Ueda N, Kishida H, Minase G, Matsuno A, Kodaira M, Ogata K, Kato R, Sugiyama A, Sasaki A, Miyama T, Satoh M, Uchiyama Y, Tsuchida N, Hamanoue H, Misawa K, Hayasaka K, Sekijima Y, Adachi H, Yoshida K, Tanaka F, Mizuguchi T, Matsumoto N.	4. 巻 7
2. 論文標題 Rapid and comprehensive diagnostic method for repeat expansion diseases using nanopore sequencing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ Genom Med.	6. 最初と最後の頁 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41525-022-00331-y.	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 Koyano S, Yagishita S, Tada M, Doi H, Uchihara T, Tanaka F.	4. 巻 81
2. 論文標題 Parallel Appearance of Polyglutamine and Transactivation-Responsive DNA-Binding Protein 43 and Their Complementary Subcellular Localization in Brains of Patients With Spinocerebellar Ataxia Type 2.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neuropathol Exp Neurol.	6. 最初と最後の頁 535-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnen/nlac032.	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 Miyatake S, Yoshida K, Koshimizu E, Doi H, Yamada M, Miyaji Y, Ueda N, Tsuyuzaki J, Kodaira M, Onoue H, Taguri M, Imamura S, Fukuda H, Hamanaka K, Fujita A, Satoh M, Miyama T, Watanabe N, Kurita Y, Okubo M, Tanaka K, Kishida H, Koyano S,----- Tanaka F, Mizuguchi T, Matsumoto N.	4. 巻 145
2. 論文標題 Repeat conformation heterogeneity in cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1139-1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awab363.	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 Kytovuorii L, Sipila J, Doi H, Hurme-Niiranen A, Siitonen A, Koshimizu E, Miyatake S, Matsumoto N, Tanaka F, Majamaa K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Biallelic expansion in RFC1 as a rare cause of Parkinson's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ Parkinsons Dis.	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41531-021-00275-7.	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 該当する

1. 著者名 Ylikotila P, Sipila J, Alapirtti T, Ahmasalo R, Koshimizu E, Miyatake S, Hurme-Niiranen A, Siitonen A, Doi H, Tanaka F, Matsumoto N, Majamaa K, Kytovuori L.	4. 巻 30
2. 論文標題 Association of biallelic RFC1 expansion with early-onset Parkinson's disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eur J Neurol.	6. 最初と最後の頁 1256-1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ene.15717.	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 Wada T, Doi H, Okubo M, Tada M, Ueda N, Suzuki H, Tominaga W, Koike H, Komiya H, Kubota S, Hashiguchi S, Nakamura H, Takahashi K, Kunii M, Tanaka K, Miyaji Y, Higashiyama Y, Koshimizu E, Miyatake S, Katsuno M, Fujii S, Takahashi H, Matsumoto N, Takeuchi H, Tanaka F.	4. 巻 95
2. 論文標題 RNA foci in two bi-allelic RFC1 expansion carriers.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Ann Neurol	6. 最初と最後の頁 607-613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.26848.	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 土井 宏, 田中 章景	4. 巻 99
2. 論文標題 【運動失調症の病態と治療】Cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome(CANVAS)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 518-526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Wada T, Doi H, Okubo M, Tada M, Ueda N, Tominaga W, Koike H, Hosoda K, Nakamura H, Takahashi K, Kunii M, Miyaji Y, Higashiyama Y, Miyatake S, Katsuno M, Fujii S, Matsumoto N, Takeuchi H, Tanaka F.
2. 発表標題 Pathological evaluations of patients of CANVAS with biallelic expansion of AAGGG and ACAGG repeats
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tanaka F
2. 発表標題 Pathophysiology and therapeutic strategies for spinocerebellar ataxia type 42
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮地 洋輔, 土井 宏, 宮武 聡子, 伊東 毅, 林 紀子, 東山 雄一, 木村 活生, 岸田 日帯, 竹内 英之, 松本 直通, 上田 直久, 田中 章景
2. 発表標題 Cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndromeにおける線維束性収縮と運動ニューロン障害
3. 学会等名 第59回日本臨床神経生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮地 洋輔, 土井 宏, 宮武 聡子, 林 紀子, 東山 雄一, 木村 活生, 上木 英人, 岸田 日帯, 竹内 英之, 松本 直通, 上田 直久, 田中 章景
2. 発表標題 CANVASにおける線維束性収縮と運動ニューロン障害
3. 学会等名 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔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	土井 宏 (Doi Hiroshi) (10326035)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	竹内 英之 (Takeuchi Hideyuki) (30362213)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	2021年度と2022年度は、横浜市立大学医学部准教授

	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 協力者	和田 大司 (Wada Taishi)		
研究 協力者	大久保 正紀 (Okubo Masaki)		
研究 協力者	多田 美紀子 (Tada Mikiko)		

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