

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15908

研究課題名(和文) Schaaf-Yang症候群に対するアンチセンス核酸治療法の確立

研究課題名(英文) Development of antisense oligonucleic therapy for Schaaf-Yang Syndrome

研究代表者

家田 大輔 (Ieda, Daisuke)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・臨床研究医

研究者番号：70745950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：モデルマウスの行動解析を詳細に行うことで野生型との表現型の違いを詳細に解析する予定であったが、研究の手続き、準備に時間がかかり、予定していた行動解析を行うことはできなかった。行動解析の代わりに、モデルマウスを高温環境に暴露して高体温にすることで急性脳症を発症するかどうかを検討した。同条件下で、野生型には異常を認めなかったが、モデルマウスでは痙攣を起こすことが確認され、急性脳症を再現できたと考える。脳組織の評価を行い、病理学的に急性脳症であることを確認する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Schaaf-Yang症候群(SYS)は2013年に疾患概念が確立した疾患である。本邦での診断確定例は100名以上にのぼるが、現時点で治療法は開発されていない。SYS患者は感染症罹患時にしばしば急性脳症を発症することが知られている。我々のモデルマウスを高温環境に暴露されると痙攣することが判明し、急性脳症を再現できたと考えられる。現在作成中のアンチセンス核酸をモデルマウスの髄腔内に投与することで脳症を予防することが確認できれば、有効な治療薬となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Although we planned to conduct a detailed behavioral analysis of the model mice to analyze in detail the phenotypic differences from the wild type, we were unable to conduct the planned behavioral analysis due to the time required for study procedures and preparation. Instead of the behavioral analysis, we examined whether the model mice could develop acute encephalopathy by exposing them to a high temperature environment and hyperthermia. Under the same conditions, no abnormalities were observed in the wild-type mice, but the model mice were observed to develop seizures, which we believe reproduced the acute encephalopathy. We plan to evaluate brain tissue to pathologically confirm that this is an acute encephalopathy.

研究分野：小児神経

キーワード：Schaaf-Yang症候群 Mage12 行動解析 急性脳症 熱性けいれん アンチセンス核酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Schaaf-Yang 症候群(SYS)は筋緊張低下、哺乳障害、過食、発達遅滞、性腺機能低下などの Prader-Willi 症候群(PWS)様症状や自閉症、関節拘縮をきたす疾患である。SYS は刷り込み遺伝子 MAGEL2 の父由来アレルの短縮型変異が原因である(Schaaf et al. Nat Genet 2013)。一方、父由来アレルの MAGEL2 遺伝子欠失は軽度の知的障害にとどまり SYS とは明らかに表現型が異なっている(Buiting et al. Orphanet J Rare Dis 2014)。また、MAGEL2 遺伝子の変異部分によって表現型が異なることが報告されており、c.1996delC (p.Gln666Serfs:36)変異を有する患者は周産期あるいは新生児期に死亡する。一方、最も頻度の高い変異である c.1996dupC(p.Gln666Profs*47)を有する患者は他の変異を有する SYS 患者と比べ、関節拘縮や経口摂取困難を合併することが多く、知的障害の程度も強いことが知られている(McCarthy et al. Am J Med Genet A 2018)。これらの事実から我々は、MAGEL2 短縮型変異が SYS を発症させるメカニズムは機能獲得型変異によるものと仮説を立てた。

我々は、PWS 症状を示すが遺伝学的に PWS が否定された 105 名を解析し、同胞例 1 組を含む 6 名に MAGEL2 短縮型変異を同定し、臨床症状をまとめて報告した。全例とも症状は PWS よりも重症であり、MAGEL2 変異の機能獲得型変異仮説を支持する(Negishi et al. Orphanet J Rare Dis 2019)。Magel2 ノックアウトマウスは、新生仔死亡率が上がること、離乳前の体重増加不良と離乳後の肥満、サーカディアンリズムの変化することなどが報告されている(Kozlov et al. Nat Genet 2007, Bischof et al. Hum Mol Genet 2007)。さらに、Magel2 ノックアウトマウスにオキシトシンを投与することで認知機能が改善することも報告されている(Meziane et al. Biol Psychiatry 2015)。しかし、Magel2 はイントロンレス遺伝子のため、ナンセンス変異依存性 mRNA 分解が起こらず、変異蛋白が産生される。この変異蛋白が神経細胞機能を障害すると考えられ、Magel2 ノックアウトマウスは SYS のモデルマウスに相当しないと考えられる。我々は SYS のモデルマウスとして、内因性 Magel2 に CRISPR/Cas9 システムで短縮型変異を引き起こすノックインマウス (Magel2 編集モデル) を世界に先駆けて作成した。Magel2 編集モデルは新生仔期の体重増加不良を示し、Magel2 の刷り込み現象と大脳基底核での mRNA 発現は維持していた(Ieda et al. PLOS ONE 2020)。このように、私たちは SYS の治療法を開発するための唯一のモデルマウスを独自に作成した。

2. 研究の目的

本研究の目的は私たちが独自に作成したモデルマウスを用いて、SYS の治療法開発を行うことである。SYS は PWS よりも重症の疾患であるが、治療法は全く存在しない。そのため、有効な治療法開発は緊喫の課題である。

我々は、SYS の発症メカニズムとして、MAGEL2 機能獲得型変異仮説を立てた。そうであれば、変異蛋白を mRNA レベルで抑制することが治療となる可能性がある。実際、MAGEL2 遺伝子の欠失は SYS よりも軽症の表現型を示す。従って、MAGEL2 蛋白は存在しなくてもそれほど重症とはならない。この考え方は、最近示された Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) のモデルマウスを用いたアンチセンス核酸療法 (Elitt et al. Nature 2020)と同じ考えに基づく。PMD では PLP 遺伝子の変異もしくは重複は重症な表現型をとるが、欠失は軽症となる。そして、モデルマウスを用いた実験によりアンチセンス核酸で PLP 遺伝子の発現を抑制することが有効な治療法となることが示された。

髄液内にアンチセンス核酸を投与することの有効性は既に、脊髄性筋萎縮症でのヌシネルセン療法で明確に示されており、実現可能な治療法である。我々は、独自に Magel2 編集モデルマウスを作成し、世界で唯一アンチセンス核酸療法の効果を検証できる高い独自性がある。この治療法は世界中でいくつか作成されている Magel2 KO マウスでは検証することが不可能である。

さらに、アンチセンス核酸を用いた神経疾患の治療は実用性が高く、Dravet 症候群や Angelman 症候群などの小児神経疾患で研究が進んでいる。我々の研究は SYS にとどまらず、広く神経疾患の治療へ展開する大いなる発展性がある。また、自らの仮説に基づき、モデル動物を作成し、治療法を検証する創造的な研究計画である。

3. 研究の方法

マウスの *Magel2* 遺伝子に対して複数のアンチセンス核酸を設計し、細胞株に導入することで変異および野生型 *Magel2* の抑制効率を検討し、効率よく抑制するアンチセンス核酸を選択する。次に、候補として選ばれたアンチセンス核酸を *Magel2* 編集モデルおよび正常対照マウスから樹立したニューロスフェアに導入し、それらの効率を評価する。

上記で設計および検証したアンチセンス核酸を *Magel2* 編集モデルマウスおよび対照マウスの脳室内に投与し、有効性と安全性を評価する。

4 . 研究成果

アンチセンス核酸投与の前段階として、モデルマウスの行動解析を行う予定であったが、研究の手続き、準備に時間がかかり、予定していた行動解析を行うことができなかった。予定していた行動解析の代わりに、モデルマウスを高温環境に暴露して高体温にすることで急性脳症を発症するかどうかを検討した。同条件下で、野生型には異常を認めなかったが、モデルマウスでは痙攣を起こすことが確認され、急性脳症を再現できたと考える。脳組織の評価を行い、病理学的に急性脳症であることを確認する予定である。

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