

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15706

研究課題名（和文）ポリグルタミン病における神経変性の超早期病態解明と核酸医薬開発

研究課題名（英文）The pathogenesis of neurodegeneration in the very early stage of polyglutamine disease and the development of nucleic acid therapy in polyglutamine diseases

研究代表者

蛭薙 智紀（Hirunagi, Tomoki）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00927527

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）：本研究により、球脊髄性筋萎縮症（SBMA）モデルマウスの運動ニューロンでは、新生仔期より変異アンドロゲン受容体（AR）の核内集積が生じ、また転写抑制因子Restにより調節されるシナプス関連遺伝子の発現上昇によるニューロンの過興奮がみられることが明らかとなった。またこれらの現象は変異ARがRestのアイソフォームを変化させることにより生じており、新生仔マウス脳室内に変異ARを減少させるアンチセンス核酸（ASO）や、Restのスプライシングを制御するASOを投与することで、これらの転写障害が改善し、ニューロンの興奮が緩和され、疾患表現型が改善することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、晩発性の疾患であるSBMAにおいても、新生仔期といった超早期に後の神経変性につながる運動ニューロンの過活動が生じていることを明らかとした点、および同時期のASOを用いた治療可能性を示した点で意義がある。また、発達段階における短期間の治療により、成人期以降の神経症状を緩和させるといった本研究で得られたproof of conceptは、SBMAなどのポリグルタミン病だけではなく、他の神経変性疾患にも応用可能であり、これまで根治的な治療法が開発されていない難治性神経疾患に対する、新たな治療戦略につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated nuclear accumulation of mutant androgen receptor (AR) in motor neurons during the neonatal period in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). We found that mutant AR induces hyperexcitability in neonatal motor neurons via elevation of synapse-related genes regulated by a transcription repressor, Rest. Further analyses revealed that mutant AR interferes with the repressor activity of Rest by altering its isoforms, resulting in the upregulation of synaptic genes. Furthermore, we showed that intracerebroventricular administration of antisense oligonucleotides that reduce mutant AR or regulate splicing of Rest ameliorates the transcriptional dysregulation, attenuating neuronal excitation and improved the disease phenotype.

研究分野：神経内科学

キーワード：ポリグルタミン病 球脊髄性筋萎縮症 超早期病態 シナプス関連遺伝子 核酸医薬

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中高年以降に発症する晩発性の神経変性疾患において、神経脱落症状が出現する数十年前より異常蛋白が中枢神経系に蓄積していることが明らかとなっており、発症前に長年にわたる早期病態が存在すると考えられている。ポリグルタミン病はシトシン-アデニン-グアニン (CAG) リピート配列の異常延長により生じる遺伝性神経変性疾患群の総称であり、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)、ハンチントン病、脊髄小脳変性症などの9疾患が含まれ、運動機能障害や認知機能障害などの神経脱落症状が成人期以降に生じる。疾患原因遺伝子を標的とした核酸医薬をはじめとした治療薬開発が精力的に行われているが、臨床応用には至っていない。近年の研究により、異常蛋白の蓄積が生じるさらに前の胎児や新生児期といった神経系の発達段階よりすでに、神経変性の超早期病態が始まっていることが示唆されているが、ポリグルタミン病の神経症状の出現時期は中高年以降と遅く、治療を開始すべき時期や早期治療の有効性は明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、SBMA のモデルマウスおよび iPS 細胞由来運動ニューロンを用いて、中枢神経系の発達段階において異常ポリグルタミン蛋白が神経毒性を生じる分子学的な機序を解明することを目的とする。また同時に、発達時期のマウスにアンチセンス核酸 (ASO) による治療的介入を行い、核酸医薬を用いた超早期治療の開発につながる、動物実験段階での proof of concept の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ポリグルタミン病における神経変性の超早期病態の解明

運動ニューロンにおける遺伝子発現変化、形態的变化の時系列的解析

これまでの検討で、新生仔 SBMA モデルマウスの脊髄において RNA-seq による網羅的遺伝子解析により、野生型マウスと比較し、シナプス関連遺伝子群の発現上昇を認めることが明らかとなっていた。本研究ではまず、リアルタイム PCR やウェスタンブロット法を用いて新生仔期におけるシナプス関連遺伝子の発現上昇を確認後、発症前・発症早期・発症後期といった各ステージにおける遺伝子発現変化を時系列的に検証した。さらに、蛍光免疫染色を用いて、運動ニューロン、シナプスの形態評価、c-Fos 抗体を用いたニューロン活動の評価を行った。具体的には、発現上昇がみられた後シナプス蛋白 GRIA1 と前シナプス蛋白の VGLUT1 を二重染色し、運動ニューロンとそれに接続するシナプス形態を可視化し、c-Fos と ChAT を二重染色し運動ニューロンにおける活動性の評価を行なった。

変異 AR と神経特異的転写抑制因子 Rest の相互作用の解明

RNA-seq の結果をもとに、遺伝子発現を制御する転写因子の解析を行ったところ、SBMA モデルマウス脊髄、iPS 細胞由来運動ニューロンでは、神経特異的転写抑制因子である Rest が結合する配列を持つ遺伝子群の発現が上昇していることが明らかとなっていた。また、SBMA モデルマウスでは Rest の神経特異的アイソフォームである Rest4 の発現が上昇していることが明らかとなった。本研究では SBMA の原因遺伝子である変異アンドロゲン受容体 (AR) と Rest のタンパク相互作用、および変異 AR が Rest の転写抑制機能に与える影響を検討した。具体的には、運動ニューロン様細胞である NSC34 に正常または変異 AR、および Rest を発現させ、免疫沈降法により両者の結合を検証した。また、正常または変異 AR を NSC34 細胞に発現させた際の Rest4 の発現を比較した。さらに、Rest 結合配列を含む *Grin1* 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼベクター (*Grin1-Luc*) にクローニングし、変異 AR、正常 AR、または Rest4 と共発現し、それぞれのプロモーター活性を検証した。

変異 AR が運動ニューロン活動に与える影響の検証

ヒトでの運動ニューロンの活動性の変化を検証するため、iPS 細胞由来運動ニューロンにレンチウイルスを用いて正常または変異 AR、および RCaMP を導入し、AR のリガンドであるジヒドロステロンの存在化で1週間培養し、Incucyte®ライブセル解析システムを用いたカルシウムイメージングによる神経活動の評価を行なった。また、リアルタイム PCR により変異 AR が運動ニューロンにおける *REST* のスプライシングに与える影響を検証した。

(2) ASO を用いたポリグルタミン病の超早期治療法開発

変異 AR を標的とする ASO を用いた治療法開発

予備的な検討として、新生仔 SBMA マウスの脳室内に、変異 AR を標的とする ASO (AR-ASO) を様々な濃度で投与し、忍容性が得られ、かつ投与1週間後の脊髄における変異 AR の発現抑制が可能な最大投与量 (5 µg) を決定していた。本研究では AR-ASO 2.5 または 5 µg を投与し、生存解析および体重・握力・運動機能といった表現型解析を行なった。また、新生仔期の AR-ASO の投与が成体期での異常ポリグルタミン蛋白の凝集や運動ニューロン変性、シナプス形態に与える影響を、免疫組織学的手法や網羅的遺伝子解析を用いて検証した。

Rest スプライシングを制御する ASO の効果検証

Rest のスプライシング制御により Rest4 の発現を低下させる ASO を新たに作成し、同様に SBMA モデルマウス新生仔の脳室内へ投与し、網羅的遺伝子解析やマウス表現型解析、および c-Fos 抗体を用いた運動ニューロンの活動性評価を行なった。

4. 研究成果

(1) SBMA マウス新生仔脊髄において、野生型マウスと比較し GRIA1 や GRIN1 といったグルタミン酸受容体の発現が mRNA (図 1a)、タンパクレベル (図 1b) で上昇していた。また、これらの遺伝子の発現は発症前の 7~9 週齢までは増加しているが、それ以降の週齢では低下し、シナプス関連遺伝子の上昇には時期特異性があることが明らかとなった。さらに、新生仔 SBMA マウスの脊髄では、運動ニューロンにおいて VGLUT1 と GRIA1 が共局在する領域が増加しており (図 1c)、c-Fos 陽性の運動ニューロンの割合も増加していた (図 1d)。これらの結果から、SBMA マウス新生仔脊髄ではグルタミン酸受容体をはじめとしたシナプス関連遺伝子の発現上昇により、運動ニューロンが過興奮の状態にあることが示唆された。

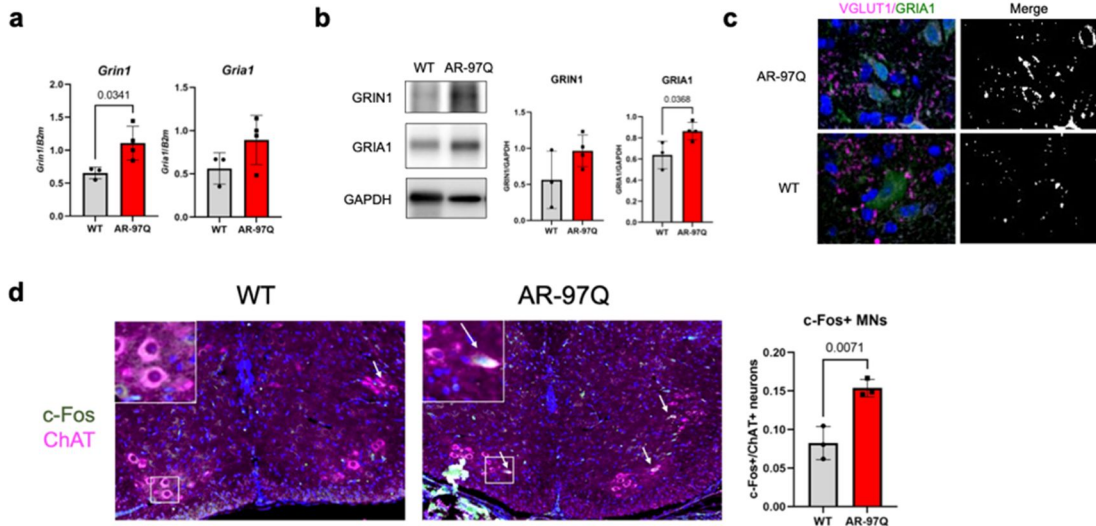


図 1. 新生仔 SBMA マウスにおけるグルタミン酸受容体発現上昇および c-Fos 陽性運動ニューロン割合の増加

NSC34 細胞に正常または変異 AR、および FLAG タグを結合した Rest 遺伝子を共発現し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法に両者の相互作用を検証した。その結果、これらのタンパクの相互作用が明らかとなったが、正常または変異 AR と、Rest との相互作用は同程度であった。続いて正常 (AR-24Q) または変異 AR (AR-97Q) の NSC34 細胞における Rest4 の発現に与える影響を検証したところ、変異 AR を発現させた場合のみ、Rest4 アイソフォームの発現比率が増加した (図 2a)。また Grin1-Luc を用いたレポーターアッセイでは、変異 AR のみ Rest 結合領域のプロモーター活性を上昇させた (図 2b)。また、Rest4 自体は Grin1-Luc の活性に影響を与えないものの、Rest と共発現させた場合、容量依存的に Rest の転写抑制効果を打ち消すことが明らかとなった (図 2c)。これらの結果より、変異 AR は Rest4 の発現比率を増加させることで Rest の転写抑制作用を阻害しているものと考えられた。

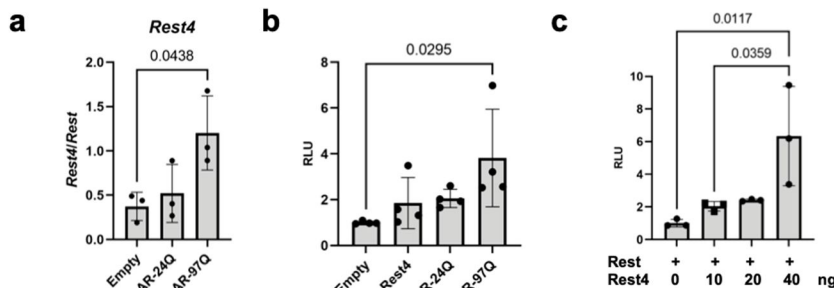


図 2. 変異 AR による Rest4 発現比率の上昇と Rest 結合領域のプロモーター活性の上昇

iPS 細胞由来運動ニューロンに正常 (AR-17Q) または変異 AR (AR-97Q) を発現させ、カルシウムイメージングにより神経活動の評価を行ったところ、活動を認めるニューロン数は同程度であったが、変異 AR を発現させた場合に、RCaMP の蛍光強度、発火頻度が上昇した (図 3a,b)。また iPS 細胞由来運動ニューロンにおいても、変異 AR が REST4 アイソフォームの発現比率を上昇させた。これらの現象は、変異 AR が運動ニューロンの過興奮を引き起こすという仮説をさらに支持する結果であった。

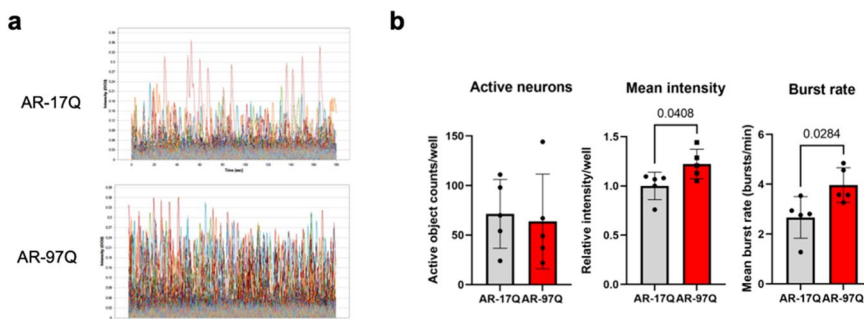


図 3. iPS 細胞由来運動ニューロンにおける、変異 AR によるニューロン興奮性の増大

(2) 新生仔 SBMA マウス脳室内に AR-ASO 2.5 または 5 μg を投与し、同僚のコントロール ASO を投与した場合と比較した。その結果、2.5 μg を投与した場合はマウスの表現型は変化しなかったが、5 μg を投与した場合、マウスの生存期間が延長し (図 4a)、ロタロッドテスト (図 4b) における運動機能や握力 (図 4c) が有意に改善し、また生存期間も延長した。また AR-ASO 5 μg を投与した場合、新生仔期におけるシナプス関連遺伝子の発現上昇が抑制された。後期ステージ (13 週齢) においては、骨格筋や運動ニューロンにおける AR 凝集体には変化がなかったが、筋細胞や運動ニューロンの変性が抑制された (図 4d, e)。また、後期ステージでみられる Calca などの神経ペプチドの上昇も AR-ASO の投与により抑制された。以上の結果から、新生仔期での変異 AR の減少はシナプス関連遺伝子の上昇を抑制し、凝集体形成とは関連せず、後の運動ニューロン変性を抑制することが明らかとなった。

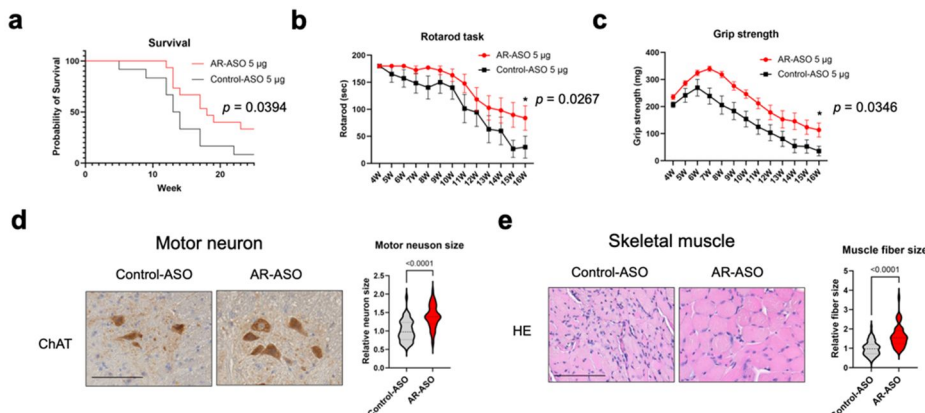


図 4. SBMA マウス新生仔期における変異 AR を標的とした ASO の治療効果

NSC34 細胞を用いたスクリーニングにより、Rest4 アイソフォームの発現比率を減少させる ASO の配列を同定した。その後、同定した ASO を新生仔 SBMA マウス脳室内に投与し、脊髄における RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行なったところ、同 ASO によりグルタミン酸受容体を含むシナプス関連遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった (図 5a)。また同 ASO により新生仔脊髄における c-Fos 陽性の運動ニューロンの割合が低下し (図 5b)、後期ステージにおける運動機能の改善、マウス生存期間の延長を認め、神経ペプチドの上昇が緩和した。これらの結果により、SBMA マウス新生仔において ASO を用いてシナプス関連遺伝子の発現を抑制することにより、運動ニューロンの過興奮が抑えられ、後の疾患表現型や運動ニューロン変性が抑制されることが示唆された。

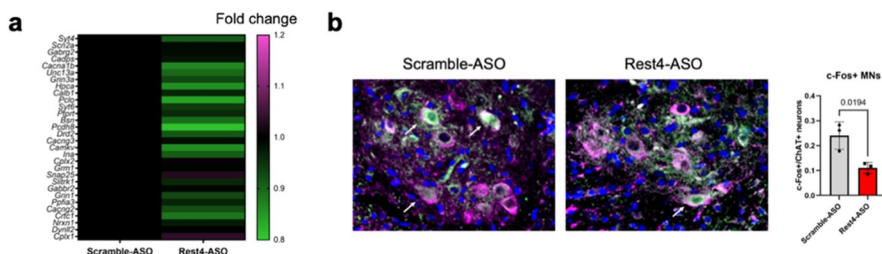


図 5. Rest スプライシン制御 ASO による新生仔 SBMA マウスのシナプス関連遺伝子の発現抑制および c-Fos 陽性運動ニューロン割合の低下

結論として、上記研究成果より、生後早期の神経系の発達段階において、異常ポリグルタミン蛋白により運動ニューロンの過興奮を原因とした神経毒性が生じ、後の運動ニューロン変性につながっている可能性が示された。さらに、同時期での ASO を用いた短期間の治療介入により、後の疾患表現型の改善が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ogura Yosuke, Sahashi Kentaro, Hirunagi Tomoki, Iida Madoka, Miyata Takaki, Katsuno Masahisa	4. 巻 13
2. 論文標題 Mid1 is associated with androgen-dependent axonal vulnerability of motor neurons in spinal and bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death and Disease	6. 最初と最後の頁 601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-022-05001-6	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 Daida Kensuke, Shimonaka Shotaro, Shiba Fukushima Kahori, Ogata Jun, Yoshino Hiroyo, Okuzumi Ayami, Hatano Taku, Motoi Yumiko, Hirunagi Tomoki, Katsuno Masahisa, Shindou Hideo, Funayama Manabu, Nishioka Kenya, Hattori Nobutaka, Imai Yuzuru	4. 巻 37
2. 論文標題 Synuclein V15A Variant in Familial Parkinson's Disease Exhibits a Weaker Lipid Binding Property	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 2075 ~ 2085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.29162	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 Hirunagi Tomoki, Nakatsuji Hideaki, Sahashi Kentaro, Yamamoto Mikiyasu, Iida Madoka, Tohnai Genki, Kondo Naohide, Yamada Shinichiro, Murakami Ayuka, Noda Seiya, Adachi Hiroaki, Sobue Gen, Katsuno Masahisa	4. 巻 15
2. 論文標題 Exercise attenuates polyglutamine mediated neuromuscular degeneration in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 159 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.13344	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 Kataoka Mayumi, Sahashi Kentaro, Tsujikawa Koyo, Takeda Jun-ichi, Hirunagi Tomoki, Iida Madoka, Katsuno Masahisa	4. 巻 194
2. 論文標題 Dysregulation of Aldh1a2 underlies motor neuron degeneration in spinal muscular atrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 58 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2023.04.007	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蛭薙智紀, 中辻秀朗, 佐橋健太郎, 藤内玄規, 飯田円, 山田晋一郎, 村上あゆ香, 野田成哉, 勝野雅央
2. 発表標題 Exercise-induced Ampk activation ameliorates polyQ-mediated neuromuscular degeneration in SBMA mice
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蛭薙智紀, 中辻 秀朗, 佐橋 健太郎, 山本幹泰, 飯田円, 藤内玄規, 近藤直英, 山田晋一郎, 村上あゆ香, 野田成哉, 足立弘明, 祖父江元, 勝野雅央
2. 発表標題 運動による骨格筋AMPKシグナルの活性化は、ポリグルタミン蛋白の凝集体形成による神経筋変性を抑制する
3. 学会等名 第16回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蛭薙智紀
2. 発表標題 Polyglutamine-mediated neurotoxicity in developmental stages of spinal and bulbar muscular atrophy
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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