

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670418

研究課題名(和文) マイクロRNAによる神経変性疾患治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy of neurodegenerative disease using microRNA

研究代表者

祖父江 元 (Sobue, Gen)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20148315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞実験においてハンチントン病(HD)や脊髄小脳変性症(SCD)の病因遺伝子のmRNAの安定性に最も強く影響を与えるRNA結合蛋白質を同定した。培養細胞実験では、RNA結合蛋白質であるCUGBP、Elav-like family(CELF)がHDやSCDの病因遺伝子のmRNA発現を抑制することを見出した。また、この発現抑制効果が、HDやSCDの病因遺伝子特有の配列長の長さ(CAGリピート数)に依らなかった。現在、CELF蛋白がHDやSCDの病因遺伝子のmRNAの発現に影響を与える機序の解明と、CELF蛋白を発現するAAVを作製しHDやSCDのモデルマウスに投与し、治療効果の検討した。

研究成果の概要(英文)：We identified RNA-binding proteins that influence most strongly on the stability of the mRNA of Neuropathology spinocerebellar degeneration and (HD) Huntington's disease (SCD) in cultured cell experiments. In cell culture experiments, I found that CUGBP is an RNA-binding protein, Elav-like family (CELF) suppresses the mRNA expression of pathogenesis of SCD gene and HD. In addition, this expression suppression effect was not independent of the length of the array length of the gene-specific pathogenesis of SCD and HD in (CAG repeat number). Currently, it is administered to a mouse model of SCD and HD prepared and elucidation of the mechanism by which CELF proteins affect the expression of mRNA of pathogenesis gene of SCD and HD, the AAV expressing the CELF proteins, we examined the therapeutic effect.

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：脳神経疾患 トランスレショナルリサーチ 遺伝子 核酸

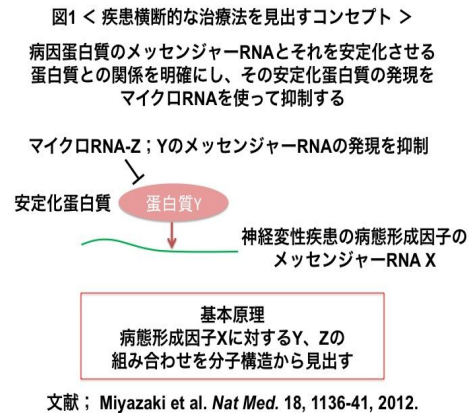
1. 研究開始当初の背景

我々は平成 24 年度までの研究において、球脊髄性筋萎縮症 (spinal-Bulbar Muscular Atrophy, SBMA) の原因遺伝子である異常 AR (androgen receptor) のメッセンジャーRNA (AR mRNA) に結合し、これを安定化させる蛋白質である CELF2 を同定した (Miyazaki Y, et al. *Nat Med.* 2012;18:1136-41)。さらに、miRNA-196a が CELF2 の発現を抑制することで間接的に AR mRNA の分解を促進し、その結果 AR 蛋白の発現を抑える機序を明らかにした。また、miRNA-196a を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を SBMA の疾患モデルマウスに投与し、その表現型を有意に改善させることを証明した (*Nat Med.* 2012)。今までの研究から、病因となる標的分子の遺伝子配列に注目し、これらの安定化蛋白質を介することで、その発現を miRNA によって抑制することができることを示した。この方法は病因蛋白質を内在性の miRNA によって抑制する点で、他の神経変性疾患にも汎用性が高いのではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

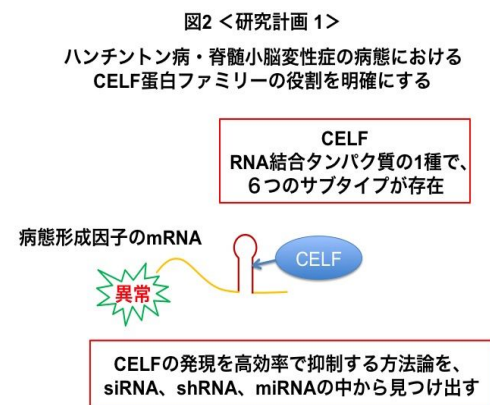
近年、microRNA (miRNA ; 約 20 塩基長の 1 本鎖 RNA で、他の遺伝子の発現を調節するノンコーディング RNA) の発現異常がヒトの疾患の発症や病態に関与することが示されている。具体的にはパーキンソン病やアルツハイマー病など神経変性疾患との関連がある miRNA も報告されつつある (Sébastien S, et al. *Science.* 2007:1179-80)。また、脊髄小脳変性症や筋萎縮性側索硬化症のモデルを用いた研究では、特定の miRNA が病態修飾因子として位置づけられている (*Nat Neurosci.* 2008、*Science* 2009)。本研究では球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) をはじめとするトリプレットリピート病の疾患モデルマウスにおいて、病態形成に寄与する miRNA 群を同定し治療法を開発するとともに、さらに神

経変性疾患に普遍的な治療法開発を目指すことを目的とする。



3. 研究の方法

今回の研究では、トリプレットリピート病の中からハンチントン病と脊髄小脳変性症を選択し研究対象とする。これら 2 疾患を選択する理由として、日本をはじめ世界において、トリプレットリピート病の中でもとくに疾患発症率が比較的高いという点、さらに、すでに疾患モデルマウスが作成され (海外の学術施設からの動物入手が容易) ており、病態メカニズムの解明や治療法開発が積極的に行われるとともに、世界的に科学誌にて報告されているものの、未だ画期的な治療創出には至っていないという点が共通する。



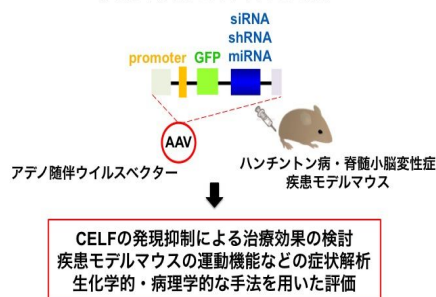
実際には CELF 蛋白ファミリーが、ハンチントン病と脊髄小脳変性症においてもみられる上記の繰り返し配列と反応しうるか、ま

た、これらの反応が病態形成因子の mRNA の安定性に影響を与えるかを培養細胞モデルにおいて個別に検討する。培養細胞モデルでは、病態形成因子を発現するプラスミド DNA を投与する一過性強制発現系を用いて病態を再現する。プラスミド DNA は国内外の研究機関から入手する予定であり、それらの一部は入手済である。この系において、CELf 蛋白ファミリーを共発現させ、病態形成因子の mRNA との反応を評価する。この実験系において、病態形成因子の mRNA の安定性に最も強く影響を与える CELf 蛋白ファミリーを同定する。さらに、この同定された CELf 蛋白ファミリーが病態形成因子の mRNA 直接結合し反応することを証明する(図2)。次に、同定された CELf 蛋白を RNAi によってその発現を抑制させた場合に、病態形成因子の mRNA の安定性低下とその分解に寄与することを確認する(図2)。RNAi の方法は、通常の siRNA や shRNA に加え、前述の研究結果同様に miRNA も選択肢に入れて、最も発現抑制効果の強いものを見つけ出す。また、RNAi によっておこる off target 効果についても慎重に検討を行う。

上記の培養細胞モデルにおいて得られた結果をふまえ、CELf 蛋白ファミリーの発現抑制を介した病態形成因子の mRNA の分解が、疾患モデルマウスにおいても再現可能で、病態進行阻止効果があるかを検討する(図3)。

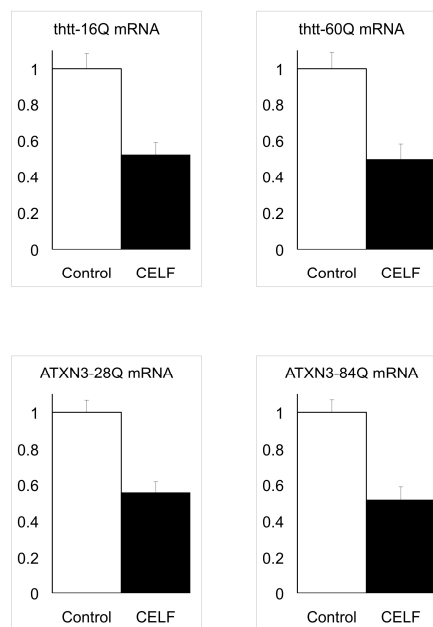
ハンチントン病と脊髄小脳変性症の疾患モデルマウスは海外の学術機関から購入し、当教室の有する動物実験施設において管理する。さらに、CELf 蛋白ファミリーの発現抑制を siRNA、shRNA、miRNA のいずれかでを行い、遺伝子導入には AAV を用いる。

図3 <研究計画 2>
CELf の発現抑制効果をもつアデノ随伴ウイルスベクターを
作製し、疾患モデルマウスに投与



4. 研究成果

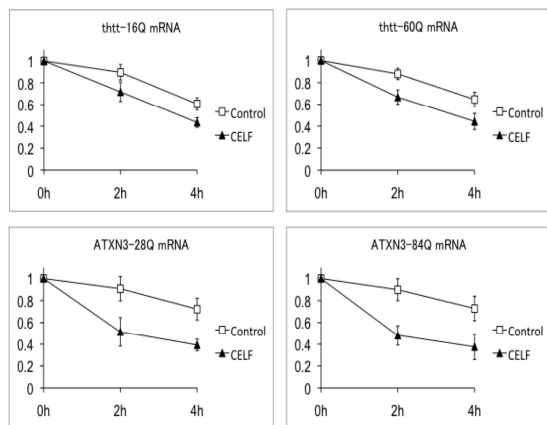
培養細胞モデルの実験において、RNA 結合蛋白質である CUGBP, Elav-like family (CELf) がハンチントン病や脊髄小脳変性症の病因遺伝子の mRNA の発現を抑制する効果をもつことを新たに見出した。また、この発現抑制効果が、ハンチントン病や脊髄小脳変性症の病因遺伝子特有の配列長の長さ (CAG リピート数) に依らないことも確認した【図1】。



【図1. thtt: ハンチントン病の病因遺伝子を改変したもの、ATXN3: 脊髄小脳変性症 3 型の病因遺伝子、Q: ポリグルタミンをコードする CAG 配列】

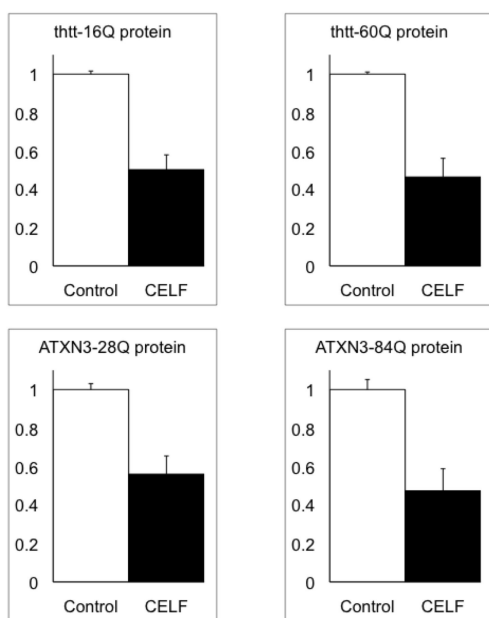
また、培養細胞モデルの実験において、RNA

stability assay を行った。これは、抗生物質でもあるアクチノマイシン D を投与し新規の mRNA 合成を阻害することで、残存する mRNA を定量し目的の mRNA の半減期を求める方法である。これによって、ハンチントン病や脊髄小脳変性症の病因遺伝子の mRNA の発現を抑制効果が、mRNA の分解によることを同定した【図 2】。



【図 2. CELF 蛋白がハンチントン病や脊髄小脳変性症の病因遺伝子の mRNA の分解を亢進している】

さらに、培養細胞モデルの実験において、ハンチントン病や脊髄小脳変性症の病因遺伝子の最終産物である蛋白質の発現も抑えられることも確認した【図 3】。



【図 3. CELF 蛋白がハンチントン病や脊髄小

脳変性症の病因遺伝子の蛋白質の発現を抑えている】

今後、CELF 蛋白によるハンチントン病や脊髄小脳変性症の病因遺伝子 mRNA の分解亢進が、直接的な作用によるものか、共役因子を介する間接的なものかを分子レベルで解明することに取り組んでいる。当初、CELF 蛋白は mRNA を安定化させる因子として仮説を立てていたが、今回の培養細胞実験においてハンチントン病や脊髄小脳変性症の病因遺伝子の mRNA に対しては分解を亢進する役割をもつことが明らかとなった。そこで、CELF 蛋白そのものを発現する AAV を作製しハンチントン病や脊髄小脳変性症の疾患モデルマウスに投与することで、治療効果、安全性の評価の検討が必要であると考えられる。

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 1 件)

宮崎雄、祖父江元。mRNA 搭載ウイルスベクターによる球脊髄性筋萎縮症の治療展望 神経内科、科学評論社、79:390-399, 2013.

査読無

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

祖父江 元 (Sobue, Gen)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20148315

(2) 研究分担者

足立 弘明 (Adachi, Hiroaki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・

寄附講座准教授

研究者番号：40432257

勝野 雅央 (Katsuno, Masahisa)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50402566