

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390231

研究課題名(和文) miRNA発現調節によるポリグルタミン病の治療法開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic approaches using the delivery of specific miRNAs for polyglutamine diseases

研究代表者

足立 弘明 (Adachi, Hiroaki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：40432257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はアンドロゲンレセプター(AR)遺伝子のCAGリピートの延長に起因する運動ニューロン病である。ヒト変異ARを発現する培養細胞とトランスジェニックマウスモデル(SBMA-Tg)を使用して、miRNA(micro-RNA)の関与を明らかにした。miR-196aを過剰発現させるAAVベクターをSBMA-Tgの筋肉に投与すると、血行性に神経系や他の筋に到達して、AR mRNAを安定化するRNA結合蛋白質であるCELF2の発現が低下して、変異ARのmRNA発現量が低下した。さらに、変異ARのモノマー及び凝集体の蓄積が脊髄や筋肉で低下してSBMA-Tgの表現型が有意に改善した。

研究成果の概要(英文)：Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is an inherited neurodegenerative disorder caused by the expansion of the polyglutamine (polyQ) tract of the androgen receptor. Recent functional studies have shown the potent activity of specific miRNAs as disease modifiers both in vitro and in vivo. Thus, potential therapeutic approaches that target the miRNA processing pathway have recently attracted attention. We demonstrated a novel therapeutic approach using the adeno-associated virus (AAV) vector-mediated delivery of a specific miRNA for SBMA. We found that miR-196a enhanced the decay of the AR mRNA by silencing CUGBP, Elav-like family member 2 (CELF2). CELF2 directly acted on AR mRNA and enhanced the stability of AR mRNA. Furthermore, we found that the early intervention of miR-196a delivered by an AAV vector ameliorated the SBMA phenotypes in a mouse model. Our results establish the proof of principle that disease-specific miRNA delivery could be useful in neurodegenerative diseases.

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：球脊髄性筋萎縮症 アンドロゲンレセプター CAGリピート miRNA CELF2 運動ニューロン病

## 1. 研究開始当初の背景

miRNA (micro-RNA) は、細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA で、他の遺伝子の発現を調節する機能を有すると考えられている ncRNA (ノンコーディング RNA: タンパク質への翻訳はされない) の一種である。その機能は遺伝子発現の抑制にあると考えられている。miRNA は一部の mRNA (大抵は 3' 側非翻訳領域) に相補的な配列を有する。この mRNA と miRNA との結合により、翻訳が阻害される場合、また RNA 干渉のように mRNA の分解を引き起こす。

miRNA は標的遺伝子発現調節に特異的に関与するだけでなく、その調節機構は多様性をもつことが示されていた。特に、発生や細胞死、細胞増殖、造血や神経経路形成といった様々な生物学的プロセスへの関与や、腫瘍形成やウイルス感染において重要な役割を担うことも示唆されていた。さらに、miRNA 発現パターンによる癌診断の可能性や miRNA によるフィードバック制御に関する報告もあり、わずか 1 つの miRNA の異常が細胞全体のプロファイルを変化させ疾病につながる可能性も報告され始めていた。

神経科学の分野においても、神経細胞の発生・維持に必須の miRNA が次々と同定され、シナプスの形成にも重要な役割を担っていることがわかっていった。また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関連する miRNA も報告されつつあった。Andrew H. Williams らは (Science 326:1549-1554, 2009)、特定の miRNA が ALS の疾患モデルマウスにおいて病態修飾因子として働くことを明らかにしていた。一方、ヒトを始めとする哺乳類の生体内に存在する miRNA の総数は約数百といわれ、その多くがデータベースに登録され、標的となる個々の mRNA も明らかとなりつつあった。

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、成人期に発症する緩徐進行性の下位運動ニューロン疾

患であり、ポリグルタミン病に含まれる。SBMA の原因はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の CAG リピートの異常延長である。ポリグルタミン病では、特異的な神経組織が変性するが、原因遺伝子の CAG リピートが蛋白質に翻訳され、異常伸長したポリグルタミン鎖になることで、変異蛋白質が新たな毒性を獲得することに困っている。ポリグルタミン病では変異蛋白質からなる核内封入体 (NI) とびまん性核内集積が特徴的な病理所見であり、異常伸長したポリグルタミン鎖を含有する異常蛋白質が生体の防御機構を凌駕して神経細胞内で不溶性の凝集体を形成したり、あるいは蓄積する過程で細胞毒性をもたらし、神経細胞が変性し細胞死に至ると考えられている。また、この病因蛋白質の蓄積による選択的な神経細胞変性死のメカニズムには、核内の転写因子が枯渇することやユビキチン・プロテアソームシステム (UPS) やライソソームなどの蛋白質分解系の破綻など多くの機序が関与していることが明らかになってきていた。

## 2. 研究の目的

今回我々は、神経変性疾患の一つであるポリグルタミン病のモデルマウスを用いて、miRNA の発現異常を探索し病態への関与を明らかにし、病態関連標的分子に対する miRNA を用いて、治療への応用も探索した。動物モデルとして、異常伸長した CAG リピート (AR97Q) をもつ、ヒト全長 AR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いて miRNA の発現解析を行い、病変の拡がりや病態の進行に影響を及ぼす miRNA を同定した。これをふまえ、さらに、特定の miRNA を高発現させることによるポリグルタミン病の治療法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

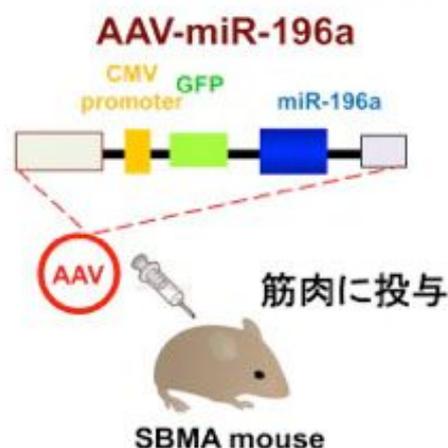
miRNA アレイ解析によって、特定し得た疾患関連性の高い miRNA が 2 種類存在し、この

2種類のmiRNA(以下、固有のmiRNA)に関して、特にその標的メッセンジャーRNAにより翻訳されるペプチドおよび蛋白質の解析に焦点を当てて研究を進めた。うちmiR-196aは、SBMA神経培養細胞モデルにおいて高発現させることで変異AR蛋白質の発現低下を起こしうることを見出ししていた。そこで、SBMAマウスモデルに対してAR蛋白質の発現を制御するmiR-196aを高発現するAAVベクターを作製した。AAVは病原性を持たないことからウイルス学的には大きな研究対象とはならなかったが、遺伝子治療用ベクターとしては、非病原性で安全であることが大きな利点となっている。また、AAVベクターは、非分裂細胞に効率よく遺伝子導入することができ、そのような細胞では遺伝子発現が長期間持続する。神経変性疾患の治療法開発には、このようなAAVベクターの特徴が活きる。既にパーキンソン病については、平成16年12月に臨床研究が米国でスタートし、平成19年5月には日本の自治医大でも第1例目を実施された。

次に、SBMAモデルマウスにおいてどの病期から固有のmiRNAが発現しているかを解析した。各週齢毎のSBMAモデルマウスを解剖し、病変脊髄よりTotal RNAを抽出し、miScript PCR System(QIAGEN)によりmiR-196aの発現を定量化した。次に、miR-196aの標的メッセンジャーRNAをデータベース(miRBase <http://www.mirbase.org/> など)から同定し、病変脊髄より抽出されたRNAから発現量を病期毎に定量化した。この定量化には、標的メッセンジャーRNAのプライマーを設計した上でRT-PCRによって行った。さらにその標的メッセンジャーRNAから翻訳される蛋白質の発現とそれに関わる他の転写因子活性の解析を既存の装置を用いて行った。

次に、miR-196aおよびその標的となりうる蛋白を利用した治療法の開発に引き続き取り組んだ。まず、miR-196aの機能促進による病

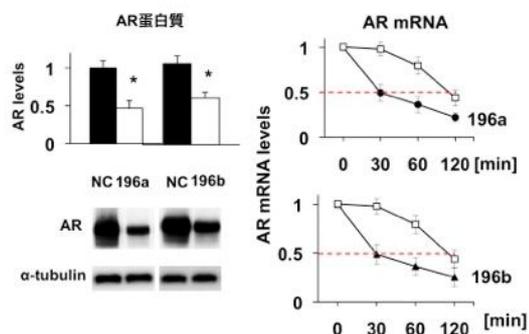
態修飾を評価した。病態抑止療法の開発として、SBMAモデルマウスに対して、miR-196aを高発現するAAVベクターを発症前に筋肉内へ注射して全身に投与した。ベクター導入の効果は、マウスの体重変化、生存率、Rotarod法(回転する棒の上につかまっていられる時間)、Cage activity測定法(24時間の動作の回数の測定)の4つのパラメーターを用いて解析した。



さらに、マウス解剖組織標本において免疫組織化学などの病理学的検索や蛋白発現解析により病態修飾効果の判定を分子生物学的にも行った。

#### 4. 研究成果

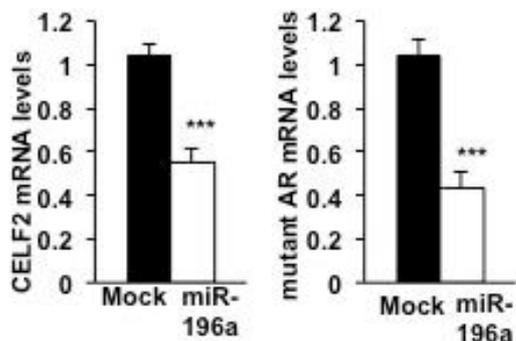
(1) miR-196aは、SBMA神経培養細胞モデルにおいて高発現させることで変異AR蛋白質の発現低下を起こした。



(2) miR-196aを過剰発現させるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターをSBMA-Tgに投与すると、ARもターゲットとするRNA結合蛋白質であるCELF2の発現が低下して、変異AR

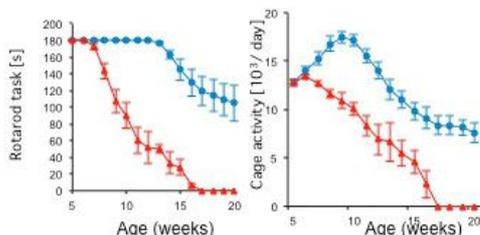
の mRNA 発現量が低下した。

### CEL2 & AR mRNA



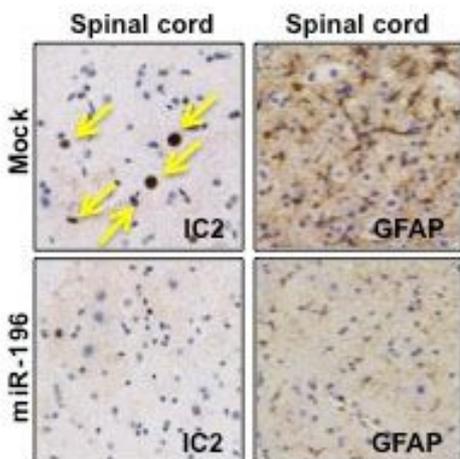
(3) 表現型を対照群と比較検討したところ、miR-196a 投与群では、運動能、生存率、体重減少が改善した。

### miR-196a ameliorated phenotypes of SBMA mouse

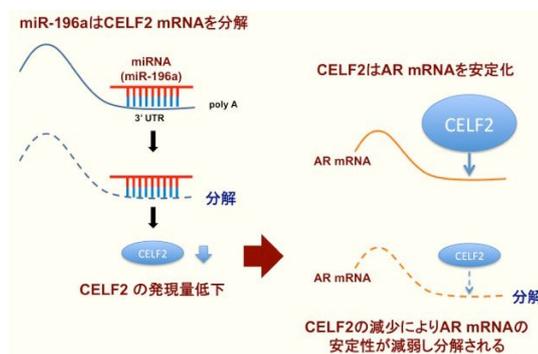


(4) また、miR-196a 投与群では、変異 AR の核内蓄積が脊髄および骨格筋で減少した。また、miR-196a は、変異 AR を正常 AR に比してより減少させた。投与群では肝機能、腎機能などに異常はみられなかった。

### Pathology



(5) miRNA は、細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA で、他の遺伝子の発現を調節する機能を有すると考えられている ncRNA の一種である。その機能は遺伝子発現の抑制にあると考えられている。miRNA は一部の mRNA (大抵は 3'側非翻訳領域) に相補的な配列を有する。この mRNA と miRNA との結合により、翻訳が阻害される場合、また RNA 干渉のように mRNA の分解を引き起こす。



AR mRNA 発現量の減少によって、SBMA-Tg の表現型および病理所見も改善した。

### 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3件)すべて査読あり

1. Qiang Q, Adachi H, Huang Z, Jiang YM, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Sobue G. Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *J Neurochem* 126:122-130, 2013. doi: 10.1111/jnc.12172.
2. Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G. p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy mouse model. *J Neurosci* 33: 7710-7727, 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3021-12.2013.
3. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi

H, Matsumoto S, Kondo N, Iida N, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via the silencing of CUGBP, Elav-like family member 2. Nat Med 18: 1136-1141, 2012. doi: 10.1038/nm.2791.

〔学会発表〕(計3件)

1. 宮崎 雄, 足立弘明, 勝野雅央, 村松慎一, 祖父江 元: miR-196a は CELF2 の発現抑制を介し SBMA の表現型を有意に改善する. 第 54 回日本神経学会総会, 東京都千代田区 (東京国際フォーラム), 2013 年 5 月 31 日.
2. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. Neuroscience 2012, New Orleans 16 October 2012.
3. 宮崎 雄, 足立弘明, 勝野雅央, 南山 誠, 蔣 月梅, 土井英樹, 松本慎二郎, 近藤直英, 飯田 円, 藤内玄規, 田中章景, 村松慎一, 祖父江 元: miR-196a は SBMA において異常 AR mRNA の不安定化を促進し表現型を有意に改善させる. 第 53 回日本神経学会総会, 東京千代田区 (東京国際フォーラム), 2012 年 5 月 24 日.

〔図書〕(計1件)

勝野雅央, 足立弘明, 祖父江 元: 球脊髄性筋萎縮症に対する分子標的治療法の開発. すべてがわかる ALS・運動ニューロン疾患 辻省次, 祖父江 元編, 2013. 6.10, 288-294, 中山書店

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurology/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

足立 弘明 (Hiroaki Adachi)  
名古屋大学・医学系研究科・  
寄附講座准教授  
研究者番号: 40432257

(2)研究分担者

祖父江 元 (Gen Sobue)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 20148315

小池 春樹 (Haruki Koike)  
名古屋大学・医学部附属病院・  
病院講師  
研究者番号: 80378174

田中 章景 (Fumiaki Tanaka)  
横浜市立大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 30378012  
(H23 H24)

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

宮崎 雄 (Yu Miyazaki)  
名古屋大学・医学系研究科・客員研究者