

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591263

研究課題名(和文) 新たな遺伝性脊髄小脳変性症 SCA36 の分子病態解明と治療法開発研究

研究課題名(英文) Molecular analysis and therapeutic investigation of SCA36

研究代表者

池田 佳生 (Ikeda, Yoshio)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00282400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性神経変性疾患SCA36/Asidanの臨床的特徴として、小脳失調症に加えて高率に運動ニューロン障害や感音性難聴を伴うことを明らかにした。SCA36/Asidan剖検組織を用いたRNA-FISH解析では、広範な中枢神経系の神経細胞および骨格筋細胞において核内に伸長GGCCUG転写物からなる凝集体(RNA foci)を確認した。RNA fociの形態、大きさや存在様式については多様性を認めた。以上よりSCA36/Asidanの分子病態として、他の非翻訳マイクロサテライトリピート伸長病と同様にRNA gain-of-functionメカニズムが想定された。

研究成果の概要(英文)：Cerebellar ataxia, motor neuron involvement, and sensorineural hearing loss are found to be the characteristic clinical findings of genetic disease SCA36/Asidan. The RNA-FISH analysis using an SCA36/Asidan autopsy specimen, RNA foci were found in the nuclei of neurons from various parts of CNS as well as skeletal muscles. There is a large variety of appearance in size, shape, and distribution among RNA foci. Based on these findings, the molecular effect of SCA36 mutation might be involved in the RNA gain-of-function mechanism.

研究分野：神経内科学

キーワード：脊髄小脳変性症 SCA36 NOP56 RNA gain-of-function GGCCUGリピート マイクロサテライトリピート spinocerebellar ataxia SCD

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は小脳失調症を主症状とする原因不明の神経変性疾患で、その約30%は常染色体優性遺伝形式を示し脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxia: SCA) と呼ばれる。SCAは遺伝学的に多様性が高く、これまでに40以上の遺伝子座の報告がある。SCAの原因遺伝子は次々と明らかにされているが、脊髄小脳変性症に対する画期的な治療法は未だ確立されていない。我々は2011年、小脳失調症に加えて運動ニューロン疾患の臨床的特徴を併せ持つ新たな病型であるSCA36/Asidanの原因遺伝子としてNOP56遺伝子イントロン1に存在するGGCCTGリピート伸長を同定した。

2. 研究の目的

(1) SCA36/Asidanの臨床遺伝学的解析

SCA36/Asidanの臨床遺伝学的特徴を明らかにして、鑑別診断に有用な情報を抽出する。

(2) ALSモデルマウスにおけるNOP56発現解析

SCA36/Asidanと共通した臨床的・病理学的所見を示すALSのモデルマウスにおけるNOP56発現様式を解析し、病態との関連を検討する。

(3) SCA36/Asidan剖検組織を用いたGGCCUG fociの検索

SCA36/Asidan剖検脳を用いて、伸長GGCCTGリピート転写物由来の凝集体 (RNA foci) の有無および中枢神経系内における存在様式を明らかにする。

(4) SCA36の伸長GGCCTGリピート領域を導入したコンストラクトおよび培養細胞モデルの作成

伸長GGCCTGリピート領域を単離後、発現ベクターに導入してコンストラクトおよび培養細胞モデルを作成し、病態解析および治療法開発に応用する。

3. 研究の方法

岡山大学神経内科で収集し、遺伝学的に診

断したSCA36/Asidan家系を対象として臨床的に解析した。またSCA36患者剖検脳より中枢神経系の各部位の凍結切片を作成し、RNA-FISH解析によりRNA fociの有無および存在様式について検討を行った。また、PCRを応用した方法により可能な限り長く伸長したGGCCTGリピート領域を単離し、リポーター遺伝子のイントロン領域に導入した発現ベクターを作成する。これを神経系由来のSH-SY5Y細胞に導入してRNA foci形成など病態に係る表現型の解析を行い、治療研究に応用できる培養細胞モデルを作成する。

4. 研究成果

(1) SCA36/Asidanの臨床遺伝学的解析

遺伝学的に確定したSCA36/Asidanの11家系16名の患者の臨床所見、電気生理学的検査、筋生検所見、聴覚機能検査、嚥下機能検査、脳画像検査、認知機能検査、剖検脳の病理所見につき解析した。SCA36/Asidan患者の延長GGCCTGリピート数はサザンブロット解析にて1700-2300リピートであった。平均発症年齢は53.1歳で、殆どの患者は小脳失調で発症し、四肢の腱反射亢進は79%に認められた。舌萎縮・線維束性収縮は71%に、四肢の筋萎縮・線維束性収縮は57%に認め、これらの下位運動ニューロン徴候は罹病期間10年以上の患者で特に目立っていた。筋電図では脱神経所見を認め、筋生検では群集萎縮や小角化線維などの神経原性所見を認めた。また聴力低下も高頻度に認め(69%)、オージオグラム解析での平均聴力レベル(PTA)は42.9dBであり、他の小脳失調症と比べて有意な聴力低下を認めた。嚥下造影検査(VF)と舌圧測定器を用いた嚥下機能検査では、SCA36/Asidan患者の嚥下障害度はALS患者よりも軽度であった。脳画像検査では発症早期には比較的小脳に限局した萎縮を呈し、罹病期間の長い患者においては脳幹萎縮や前

頭葉を主とした大脳萎縮を認めた。認知機能検査では前頭葉機能低下を認めた。神経病理学的には、プルキンエ細胞や小脳歯状核ニューロンの顕著な脱落を認めたが、橋底部および下オリブ核の神経細胞は保たれていた。また、舌下神経核や脊髄前角の運動ニューロンの顕著な脱落も認めた。

NOP56/TDP-43/ataxin-2免疫染色では残存神経細胞に細胞質内もしくは核内の封入体形成を認めなかった。

(2) ALSモデルマウスにおけるNOP56発現解析

ALSモデルマウスである、G93A変異型SOD1トランスジェニックマウスの脊髄におけるNOP56タンパク発現様式を野生型マウスと比較して継時的に解析した。運動障害の発症早期(14週齢)から下位運動ニューロンにおけるNOP56蛋白発現量減少を認め、大脳皮質と小脳皮質においては減少を認めなかった。以上からNOP56を原因遺伝子として運動ニューロン障害を伴うSCA36/Asidanにおける運動ニューロン変性への関与も示唆された。

(3) SCA36/Asidan剖検組織を用いたGGCCUG fociの検索

SCA36/Asidanの分子病態解明のため、患者剖検組織を用いてRNA-FISH解析を行った。その結果、大脳、小脳、脳幹の広範な領域の神経細胞をはじめ、中枢神経系以外では骨格筋細胞においても核内に伸長GGCCUG転写物からなる凝集体(RNA foci)を確認した。RNA fociの形態、大きさや存在様式については多様性を認め、特に下オリブ核の神経細胞においては巨大なRNA fociを豊富に認めた。以上よりSCA36/Asidanの分子病態においても、他の非翻訳マイクロサテライトリピート伸長病と同様にRNA gain-of-functionメカニズムが想定された。しかしながら、SCA36/Asidanと同様の6塩基繰り返し配列の伸長変異を認めるC9orf72-linked FTD/ALS

とは異なり、P62陽性の神経細胞内封入体形成は認めなかった。

(4) SCA36の伸長GGCCTGリピート領域を導入したコンストラクトおよび培養細胞モデルの作成

RNA foci形成を指標にした治療候補薬探索を行うことを目的として、伸長GGCCTGリピートを人工的に合成し、(GGCCTG)75リピートまで伸長したコンストラクトを作成することができた。この伸長リピート領域を神経系および非神経系の培養細胞に導入し、SCA36の培養細胞モデル作成を試みた。RNA-FISH解析では本モデル細胞中にRNA fociと思われる構造物を認め、さらに解析を進めている。

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7件)

1. Liu W, Ikeda Y, Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Abe K. Characteristic RNA foci of the abnormal hexanucleotide GGCCUG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 36 (Asidan). *Eur J Neurol*, 査読有り, 21: 1377-1386, 2014.
2. Ikeda Y, Ohta Y, Kurata T, Shiro Y, Takao Y, Abe K. Acoustic impairment is a distinguishable clinical feature of Asidan/SCA36. *J Neurol Sci*, 査読有り, 324:109-112, 2013.
3. Morimoto N, Yamashita T, Sato K, Kurata T, Ikeda Y, Kusuhara T, Murata N, Abe K. Assessment of swallowing in motor neuron disease and Asidan/SCA36 patients with new methods. *J Neurol Sci*,

- 査読有り, 324:149-155, 2013.
- Miyazaki K, Yamashita T, Morimoto N, Sato K, Mimoto T, Kurata T, Ikeda Y, Abe K. Early and selective reduction of NOP56 (Asidan) and RNA processing proteins in the motor neuron of ALS model mice. *Neurol Res*, 査読有り, 35: 744-754, 2013.
 - Matsuzono K, Ikeda Y, Liu W, Kurata T, Deguchi S, Deguchi K, Abe K. A novel familial prion disease causing pan-autonomic-sensory neuropathy and cognitive impairment. *Eur J Neurol*, 査読有り, 20: e67-e69, 2013.
 - Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi H, Okamoto M, Takamatsu K, Ota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K. Clinical features of SCA36: A novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology*, 査読有り, 79: 333-341, 2012.
 - Abe K, Ikeda Y, Kurata T, Ohta Y, Manabe Y, Okamoto M, Takamatsu K, Ohta T, Takao Y, Shiro Y, Shoji M, Kamiya T, Kobayashi H, Koizumi A. Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation Asidan. *Eur J Neurol*, 査読有り, 19: 1070-1078, 2012.

〔学会発表〕(計7件)

- Ikeda Y, Clinical characterization and molecular pathogenesis of SCA36. 8th International Meeting on Unstable

- Microsatellites and Human Disease (UMHD8). (Guanacaste, Costa Rica), 2015.1.19
- 池田佳生, 「新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan の臨床的特徴」, 第23回日本神経学会中国四国地区生涯教育講演会(岡山), 2014.6.28
 - 池田佳生, 「成人発症する脊髄小脳変性症の鑑別診断と治療」, 第55回日本神経学会学術大会教育講演(福岡), 2014.5.23
 - 池田佳生, 山下 徹, 倉田智子, 出口健太郎, 松浦 徹, 阿部康二(2013). 多系統萎縮症および脊髄小脳変性症における認知機能の検討. 第31回日本神経治療学会総会(東京), 2013.11.21-23
 - 池田佳生, 大野凌, 森本展年, 倉田智子, 出口健太郎, 松浦徹, 阿部康二. 岡山大学神経内科における SCD/MSA 症例 313 例の検討. 第92回日本神経学会中国四国地方会(徳島). 2012.7.7
 - 池田佳生, 太田康之, 小林果, 岡本美由紀, 高松和弘, 大田泰正, 真邊泰宏, 岡本幸市, 小泉昭夫, 阿部康二. 小脳失調症と運動ニューロン疾患の特徴を併せ持つ新たな遺伝性疾患 Asidan の臨床病理学的特徴. 第106回日本内科学会中国地方会(島根). 2012.6.2
 - 池田佳生, 太田康之, 小林果, 岡本美由紀, 高松和弘, 大田泰正, 真邊泰宏, 岡本幸市, 小泉昭夫, 阿部康二. 新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan の臨床病理学的特徴. 第53回日本神経学会学術大会(東京). 2012.5.23

〔図書〕(計2件)

- Ikeda Y, Ranum LP, Day JW. Clinical and genetic features of spinocerebellar

ataxia type 8. Edited by Subramony SH
and Dürr A, Handbook of Clinical
Neurology vol.103, 1st edition,
ELSEVIER, Edinburgh, 493-505, 2012.

2. Dick KA, Ikeda Y, Day JW, Ranum LP.
Spinocerebellar ataxia type 5. Edited
by Subramony SH and Dürr A, Handbook of
Clinical Neurology vol.103, 1st edition,
ELSEVIER, Edinburgh, 451-459, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）
該当なし

取得状況（計0件）
該当なし

〔その他〕

ホームページ等

群馬大学神経内科ホームページ

<http://neurology.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 佳生 (IKEDA YOSHIO)
群馬大学・医学（系）研究科・教授
研究者番号：00282400

(2)研究分担者

倉田 智子 (KURATA TOMOKO)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：40598562
(削除：平成26年3月18日)

森本 展年 (MORIMOTO NOBUTOSHI)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：60598556
(削除：平成25年2月5日)

(3)連携研究者

なし