

令和元年5月30日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09665

研究課題名(和文) 非翻訳リピート伸長による脊髄小脳失調症の病態解明と治療開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis and development of treatment for spinocerebellar ataxia due to a non-coding microsatellite repeat expansion

研究代表者

池田 佳生 (Ikeda, Yoshio)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00282400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非翻訳領域に存在するGGCCTGリピート伸長変異を原因遺伝子変異とする疾患である脊髄小脳失調症36型(SCA36)を対象として培養細胞モデルを作成した。同モデルは伸長した(GGCCUG)exp転写物由来のRNA fociやrepeat-associated non-ATG translation(RANT)由来蛋白を形成し、細胞死を誘導することを確認した。転写伸長因子であるyeast Spt4/Spt5 orthologuesに対するsiRNAをSCA36培養細胞モデルに作用させたところ、(GGCCUG)exp転写物の発現抑制を介して細胞毒性も減少させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄小脳失調症36型(SCA36)の病態を再現する培養細胞モデルを確立し、これを用いてSpt4/Spt5に対するsiRNAによる細胞毒性減少効果を明らかにした。本研究による成果はSCA36に対する治療法を今後開発する上での重要な基礎データになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We developed a cell culture model for spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36), which is caused by a GGCCTG repeat expansion mutation located in the untranslated region of the causative gene. This model reproduced the RNA foci or the repeat-associated non-ATG translation (RANT)-associated proteins, which are associated to cell death. When siRNAs against the transcriptional elongation factor yeast Spt4/Spt5 orthologues were introduced to the SCA36 cell culture model, it was revealed that the cytotoxicity is reduced through the suppression of expression of (GGCCUG)exp transcripts through Spt4/Spt5 silencing.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：脊髄小脳変性症 脊髄小脳失調症 マイクロサテライトリピート リピート伸長変異 siRNA SCA36

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝性脊髄小脳変性症の一型である脊髄小脳失調症 36 型 (spinocerebellar ataxia type 36: SCA36) は、本来タンパクには翻訳されないイントロン領域に存在する GGCCTG リピートの異常伸長が原因であることが明らかにされた。この変異が SCA36 の病態にどのように関与しているのかについては、伸長リピートが存在する遺伝子の機能喪失 (loss-of-function) よりも伸長リピートが新たに病原性を発現する病的機能の獲得 (gain-of-toxic function) についてのエビデンスが多く報告されている。さらに興味深いことに、異常伸長したリピートを含んだ転写産物は RNA レベルでは凝集体 (RNA foci) を形成し、それぞれのリピート配列特異的な RNA 結合タンパクと複合体を形成することが引き金となり、核内 RNA 結合タンパクの機能不全をもたらすメカニズム (RNA gain-of-function) と、本来ならば翻訳されない領域にある異常伸長リピートを鋳型として、AUG スタートコドンが必要としない新たな翻訳の形式 (repeat-associated non-AUG translation: RANT) を介した homopolymeric protein の形成を伴う神経細胞障害 (protein gain-of-function) といった、RNA レベルとタンパクレベルで形成される複数の病的分子によるメカニズムが提唱されている。

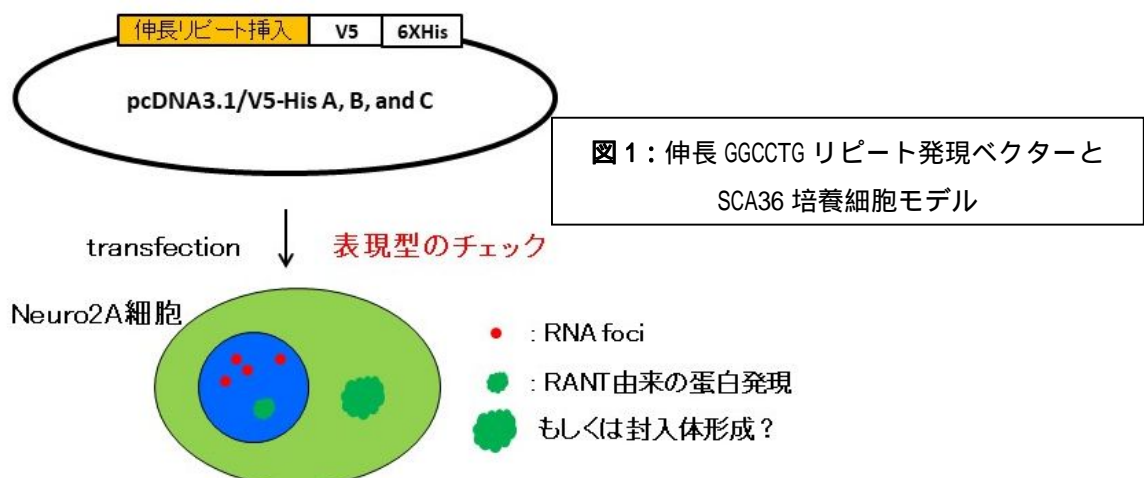
2. 研究の目的

SCA36 を主たる対象疾患として、伸長 GGCCTG リピートを単離し、それを導入した培養細胞モデルの確立を行い、この SCA36 培養細胞モデルを用いて病態解析および病態を修飾する治療候補薬スクリーニングや標的タンパクに対する siRNA による病態改善効果を検討した。これにより、臨床的に有用性の高い新たな脊髄小脳変性症の治療法開発研究を推進することを目的とする。

3. 研究の方法

SCA36 における伸長 GGCCTG リピート領域を self-templating PCR の手法を用いて単離し、75 回まで伸長した GGCCTG リピート領域を発現ベクターへ導入し、RANT を生じた場合には V5 や 6xHis といったエピトプタグ付きの蛋白として発現するコンストラクトを作成した (図 1)。

この伸長 GGCCTG リピート発現ベクターを Neuro2A 細胞へトランスフェクションし、その表現型に関して、RNA foci 形成や RANT 蛋白形成といった病態マーカーを定量的に解析した。さらにこの SCA36 培養細胞モデルを用いて治療候補化合物や転写伸長因子である Spt4/Spt5 (哺乳類では Supt4a/Supt5) に対する siRNA を作用させた場合の病態抑制効果について検討を行った。



4. 研究成果

SCA36 の病態を再現する培養細胞モデルを確立し、これを用いてエリスロマイシンおよび Supt4a/Supt5 に対する siRNA による細胞毒性減少効果を明らかにした(図 2-4)。本研究による成果は SCA36 に対する治療法を今後開発する上での重要な基礎データになると考えられた。

図 2 : SCA36 培養細胞モデルにおける RNA foci 形成

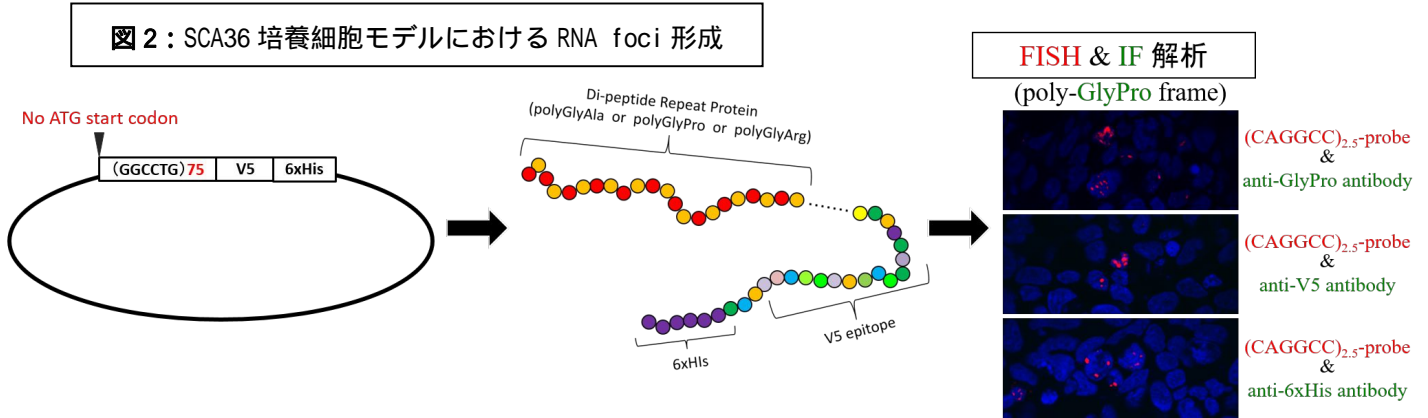


図 3 : Supt4a/Supt5 に対する siRNA は、SCA36 培養細胞モデルにおける RNA foci 形成を抑制する

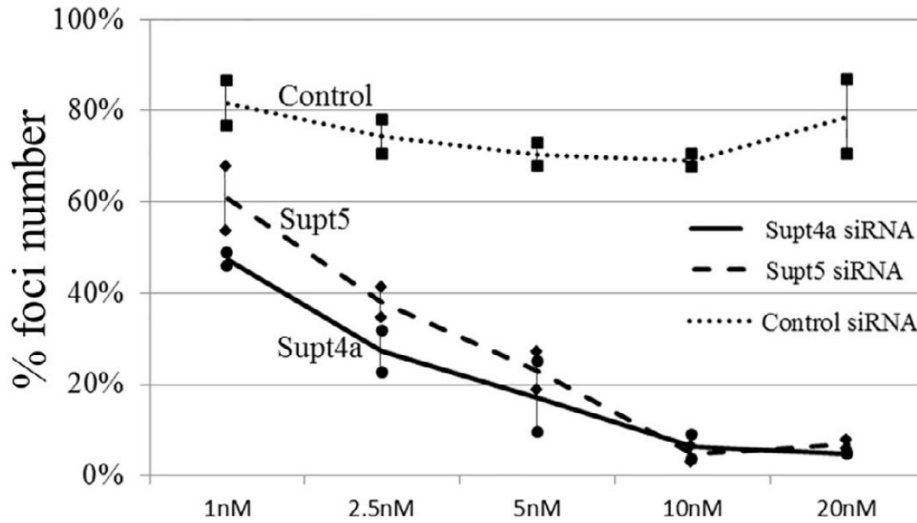
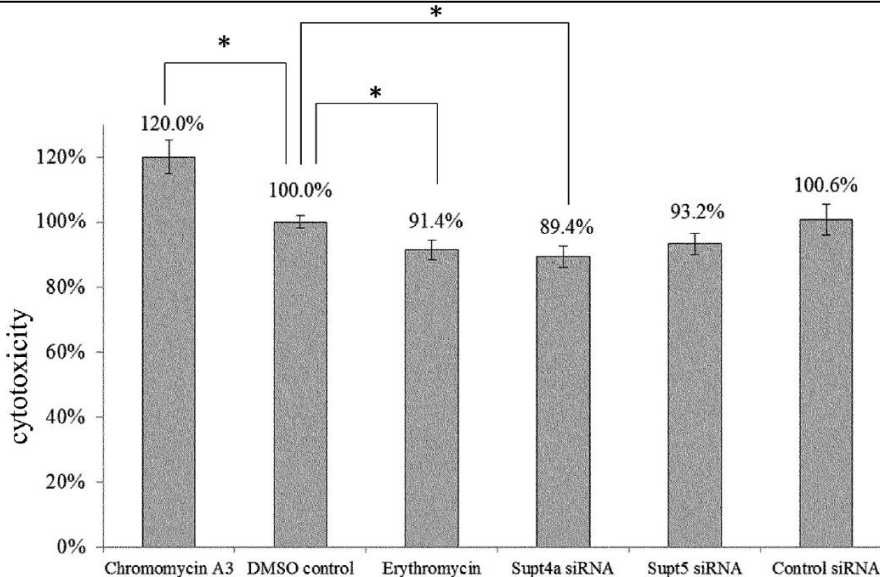


図 4 : エリスロマイシンおよび Supt4a/Supt5 に対する siRNA は細胞毒性を減少させる



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Furuta N, Tsukagoshi S, Hirayanagi K, Ikeda Y. Suppression of the yeast elongation factor Spt4 ortholog reduces expanded SCA36 GGCCUG repeat aggregation and cytotoxicity. *Brain Res.*, 査読有, 2019 May 15;1711:29-40. doi: 10.1016/j.brainres.2018.12.045. Epub 2019 Jan 2. PubMed PMID: 30610877.

Kikuchi Y, Shibata M, Hirayanagi K, Nagashima K, Mihara B, Ikeda Y. Putaminal iron deposition precedes MSA-P onset by 2 years. *Neurology.*, 査読有, 2018 Jun 5;90(23):1071-1072. doi: 10.1212/WNL.0000000000005637. Epub 2018 May 4. PubMed PMID: 29728526.

Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Tanikawa S, Shirai S, Takahashi I, Kimura M, Hama Y, Matsushima M, Fujioka S, Kano T, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Ohtsuka T, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H. Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome. *Sci Rep.*, 査読有, 2018 Jan 16;8(1):819. doi: 10.1038/s41598-018-19198-0. PubMed PMID: 29339765; PubMed Central PMCID: PMC5770378.

Hirayanagi K, Okamoto Y, Takai E, Ishizawa K, Makioka K, Fujita Y, Kaneko Y, Tanaka M, Takashima H, Ikeda Y. Bilateral striatal necrosis caused by a founder mitochondrial 14459G>A mutation in two independent Japanese families. *J Neurol Sci.*, 査読有, 2017 Jul 15;378:177-181. doi: 10.1016/j.jns.2017.05.015. Epub 2017 May 10. PubMed PMID: 28566160.

〔図書〕(計2件)

池田佳生. 「DNA 反復配列の異常伸長が神経障害を引き起こすことがある」。人体の細胞生物学。日本医事新報社。256-257, 2018.

池田佳生. 「遺伝性脊髄小脳変性症分子病態の最新トピックス」。Annual Review 神経 2018. 中外医学社。34-43, 2018.

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。