

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02715

研究課題名(和文) RNA-結合蛋白のバランス仮説に基づく神経疾患の病態・治療法探索

研究課題名(英文) Exploring a balancing mechanism between RNA and its binding protein partners

研究代表者

石川 欽也 (Ishikawa, Kinya)

東京医科歯科大学・附属病院・教授

研究者番号：30313240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症31型(SCA31)は、BEAN遺伝子のイントロン内にTGGAAの5塩基が1.25～2Kbに及ぶ長いリピートとして存在することを原因とする、我が国において最も頻度が高い脊髄小脳変性症の一つである。本研究では、研究者が作製したモデルマウスSCA31-BACトランスジェニック(Tg)マウスの歩行解析と遺伝子発現解析を行ったものである。詳細な定速式および加速式rotarod解析で、このマウスは生後67-68週で異常を表すことを明らかにした。同時期の遺伝子発現をRNA-seqで検証したところ、対照マウスに比べていくつもの異常を見出した。このうち、病態の範囲を示唆する遺伝子群を抽出する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性神経疾患、脊髄小脳変性症「SCA31」の病態を探索する研究である。代表研究者らは2009年にSCA31の原因を発見し、その原因遺伝子部分をマウスに導入して作製したものがSCA31 BAC-Tgである。これまでSCA31のモデルマウスは存在しないため、SCA31 BAC-Tgが、モデルマウスとして妥当かどうかを明らかにすることにもつながらる。本研究の結果、このマウスでは患者と同じ遺伝子異常を発現し、67週齢頃に異常な運動症状を表していることが解った。さらに、その病態を明らかにする異常な遺伝子発現状態を確認することができ、SCA31の病態を解明する大きな進歩を果たした。

研究成果の概要(英文)：This is a study on a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA31). We established several lines of SCA31 mouse model in which patient-derived bacterial artificial chromosome (BAC) clone was inserted into mouse genome by a conventional transgenesis. We observed a consistent motor phenotype in these mice at around 67 weeks of age. RNA-seq analysis was performed in these mice, which led us to find abnormal gene expressions.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：RNA 小脳 Purkinje タンパク TDP-43

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)は、BEAN 遺伝子のイントロン内に 5 塩基 TGGAA が 1.25 ~ 2Kb に及ぶ長いリピートとして存在することを原因とする、我が国において最も頻度が高い脊髄小脳変性症の一つである。これまでの、SCA31 の病態には、5 塩基 TGGAA リピートが BEAN1 遺伝子の転写によって 5 塩基 RNA 配列「UGGAA リピート」になることが深くかかわっていることがほぼ間違いないと考えられている。それは、UGGAA リピートが確かに患者脳でも発現し、RNA の異常な構造物を小脳のプルキンエ細胞で形成していることや、同様の RNA の異常構造物は、培養細胞でも形成され、細胞死に関わっていることから想定される。

われわれは SCA31 の病態をさらに明らかにするために、患者の異常リピートを含むゲノム領域をマウスゲノムに導入した、BAC トランスジェニックマウス(SCA31 BAC-Tg マウス)を開発してきた。このマウスの行動解析をとおして SCA31 の病態理解を深める必要性や妥当性があり、本研究を着想した。

また、重要な背景として、我々は RNA 配列「UGGAA リピート」そのものが毒性を示すことを発見していた。そしてこの UGGAA リピートは、それに結合する RNA 結合蛋白があり、その中には ALS の原因蛋白である TDP-43, FUS, hnRNPA2B1 があり、UGGAA リピートの毒性は、これらの結合蛋白で抑制されることを発見していた。一方、ALS を起こす TDP-43 などの毒性は、短い RNA である UGGAA リピートによって緩和されることも明らかにしていた。このようなことから、RNA(UGGAA)と RNA 結合蛋白(TDP-43 など)が正常ではバランスをとるが、一旦破綻すると疾患が起きることがショウジョウバエの実験からも明らかになっていた。このようなバランスの破綻が、患者脳でも起きているかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

このようなことを背景にして、2 つの戦略を立ててバランスの破綻が SCA31 でも起こっているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

戦略 1 : SCA31 の病態を反映する可能性があるモデルマウス SCA31 BAC-Tg を作製していたので、そのマウスの行動解析を、分担研究者である柳原 大博士らと共に進めた。

戦略 2 : 歩行などの行動異常が出る時期のモデルマウスから脳を取り出し、RNA の異常発現変動を RNA-seq で解析した。得られた結果の内、TDP-43 などの RNA 結合蛋白が、スプライシングなどでかわる遺伝子を中心に探索した。

4. 研究成果

戦略 1 : 当初、SCA31 BAC-Tg マウスに、週齢ごとに繰り返し歩行解析を行ってきた。しかし、学習効果があるためか、対照マウスとの間で歩行異常などの差が認められなかった。

このようなことから、高齢のマウスに初めての条件で歩行を解析することで異常を検出できるかどうかを検証することにした。

SCA31-BAC Tg モデルマウスの個体を 67-68 週に固定し、同一ラインの雄マウス個体を 15 匹用意し、順次共同研究者柳原博士に個体を移送し、同一個体数の野生型対照マウスと歩行を比較する解析を実施した。歩行解析は、検査者は遺伝子型を知らないブラインドの状態で行い、10 往復のラダー歩行、定速式 rotarod および加速式 rotarod の 3 系統の解析を実施した。その結果、野生型 13 匹、SCA31-BAC Tg モデルマウス 9 匹について解析を完遂し、定速式 rotarod での平均滞在時間と最大滞在時間、加速式 rotarod での平均滞在時間と最大滞在時間などに有意な差を見いだした。

次に、Rotarod 以外の方法として、より過激な環境下で歩行のテストを行えるスプリットベルト・トレッドミル法を採用することにした。そのために機器は特注で作製した。この機器は歩行を強制的に行わせる環境であると共に、小脳を中枢とする運動学習能を検証することができ、それが SCA31 の研究では重要であると考えた。その結果、SCA31-BAC Tg マウスではある程度の運動学習が表れていることを確認した。このことは、研究当初、同一個体で時期を換えて重ねて Rotarod 解析を行ったところ、対照マウスと差が見られにくかったことと呼応する結果であると考えられた。ただし、対照マウスでの運動学習能を調査できなかったため、SCA31 BAC-Tg マウスでの運動学習能が低下している可能性は残った。いずれにせよ、当該モデルマウスでは 67-68 週齢という高齢では、運動障害を呈するものと結論した。

戦略2 : SCA31-BAC Tg マウスでの遺伝子の発現異常を明らかにするため、67-68 週齢のマウスで、対照の正常マウスと複数回、実験方法を換えて RNA-seq を行った。その結果、多数の遺伝子で発現変動を認めた。さらに、TDP-43 が関わる遺伝子に絞って病態の範囲を示唆する遺伝子群を抽出しつつある。

また、患者脳での遺伝子発現の異常変動についても検証し、モデルマウスでの異常と一致するものがあるかどうかを探索した。その結果、プルキンエ細胞に変性を来す遺伝子で TDP-43 が関わる遺伝子に、確かに変動を見い出した。TDP-43 がスプライス異常を起こしているかどうかを今後も検証する必要があるが、RNA と RNA 結合蛋白のバランス破綻が、SCA31 のモデル小脳および患者小脳でも起きている可能性が示唆された。今後、バランス破綻が修復されたときに、プルキンエ細胞の変性が制御されるかどうかを検証してゆく必要があると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Aoki H, Higashi M, Okita M, Ando N, Murayama S, Ishikawa K, Yokota T.	4. 巻 Jan 27
2. 論文標題 Thymidine kinase 2 and mitochondrial protein COX I in the cerebellum of patients with spinocerebellar ataxia type 31 caused by penta-nucleotide repeats (TTCCA)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cerebellum	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12311-021-01364-2.	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 Ozaki K, Irioka T, Uchihara T, Yamada A, Nakamura A, Majima T, Igarashi S, Shintaku H, Yakeishi M, Tsuura Y, Okazaki Y, Ishikawa K, Yokota T.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Neuropathology of SCA34 showing widespread oligodendroglial pathology with vacuolar white matter degeneration: a case study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-021-01272-w.	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 Shibata T, Nagano K, Ueyama M, Ninomiya K, Hirose T, Nagai Y, Ishikawa K, Kawai G, Nakatani K.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Small molecule targeting r(UGGAA)n disrupts RNA foci and alleviates disease phenotype in Drosophila model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20487-4.	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 Ishiguro T, Nagai Y, Ishikawa K.	4. 巻 May 25;15
2. 論文標題 Insight into spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) from Drosophila model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Neurosci.	6. 最初と最後の頁 648133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.648133. eCollection 2021.	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 Toru Shuta, Ishida Shoko, Uchihara Toshiki, Hirokawa Katsuiku, Kitagawa Masanobu, Ishikawa Kinya	4. 巻 20
2. 論文標題 Comorbid argyrophilic grain disease in an 87-year-old male with spinocerebellar ataxia type 31 with dementia: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 136-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-020-01723-2	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 Ishikawa Kinya, Nagai Yoshitaka	4. 巻 16
2. 論文標題 Molecular Mechanisms and Future Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 31 (SCA31)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13311-019-00804-6	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 石川 欽也、石黒太郎、佐藤望、永井義隆 .	4. 巻 91
2. 論文標題 RNA結合タンパクと病態機序 .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 458-464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Honda T, Nagao S, Hashimoto Y, Ishikawa K, Yokota T, Mizusawa H, Ito M.	4. 巻 115
2. 論文標題 Tandem internal models execute motor learning in the cerebellum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 7428-7433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1716489115.	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 Higashi M, Ozaki K, Hattori T, Ishii T, Soga K, Sato N, Tomita M, Mizusawa H, Ishikawa K*, Yokota T.	4. 巻 387
2. 論文標題 A diagnostic decision tree for adult cerebellar ataxia based on pontine magnetic resonance imaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurol Sci.	6. 最初と最後の頁 187-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2018.02.022.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Itaya S, Kobayashi Z, Ozaki K, Sato N, Numasawa Y, Ishikawa K, Yokota T, Matsuda H, Shintani S.	4. 巻 57
2. 論文標題 Spinocerebellar ataxia type 31 with blepharospasm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 1651-1654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.0068-17.	査読の有無 有
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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石川 欽也 .
2. 発表標題 Pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31)
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会, 2019/ 5/ 23, 国内, 口頭 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kinya Ishikawa
2. 発表標題 Role of RNA chaperone TDP-43 in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31)
3. 学会等名 The 9th International Conference on Unstable Microsatellite and Human Disease. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 石川欽也	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 545
3. 書名 日本臨床 増刊号 医薬品副作用学(第3版)下	

1. 著者名 日本神経学会・厚生労働省「運動失調症の医薬基盤に関する調査研究班」, 「脊髄小脳変性症・多系統萎縮症診療ガイドライン」作成委員会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 280
3. 書名 脊髄小脳変性症・多系統萎縮症診療ガイドライン2018	

〔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
研究分担者	柳原 大 (Yanagihara Dai) (90252725)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授 (12601)	

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			
カナダ	トロント小児病院			
ドイツ	ミュンヘン大学			
フランス	IGBMC			