

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07813

研究課題名（和文）転写伸長機構に着目したマイクロサテライトリピート伸長病の治療開発

研究課題名（英文）Therapeutic development of microsatellite repeat expansion disorder focusing on the transcriptional mechanism

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脊髄小脳失調症36型（SCA36）におけるGGCCTGリピート伸長変異に由来する転写物の凝集体（RNA foci）を形成し、細胞死を誘導する培養細胞モデルを用いて、伸長GGCCUGリピート転写物が形成するグアニン四重鎖（G-quadruplex：GQ）の病態への関与と候補治療化合物について検討した。GQ構造を安定化する目的で各種のポルフィリン誘導体を作用させたところ、SCA36 RNA foci形成抑制作用、細胞毒性低下作用および生存率上昇作用を確認した。

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用いて、RNAレベルの病態に關与するGGCCTGリピート伸長変異に由来する転写物の凝集体（RNA foci）やグアニン四重鎖（G-quadruplex：GQ）の病態への關与を明らかにした。また、複数のポルフィリン誘導体の病態改善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）：To clarify molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36), the role of aggregates (RNA foci) or G-quadruplex (GQ) formed by the expanded GGCCUG repeat transcripts were investigated by using SCA36 cell culture model. Various porphyrin derivatives were examined as a candidate chemical compound to treat SCA36 by stabilizing the SCA36 GQ structure, and inhibiting downstream events. As a result, some of porphyrin derivatives could suppress SCA36 RNA foci formation and its cytotoxicity, and improve cell viability. These data were considered to be important for developing treatments for SCA36.

研究分野：脳神経内科学、神経遺伝学

キーワード：脊髄小脳変性症 脊髄小脳失調症 グアニン四重鎖 ポルフィリン マイクロサテライトリピート

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症 36 型 (spinocerebellar ataxia type 36: SCA36) は、*NOP56* 遺伝子のイントロン 1 に存在する GGCCTG リピートの異常伸長を原因とする遺伝性脊髄小脳変性症である。本来蛋白には翻訳されない非翻訳領域における本リピート伸長変異が、SCA36 の病態にどのように関与しているのかについては、*NOP56* 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。異常伸長した GGCCUG 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、種々の RNA 結合蛋白と複合体を形成することが引き金となり、核内 RNA 結合蛋白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) を介した病的蛋白形成を伴う神経細胞障害 (protein gain-of-function) といった、RNA レベルと蛋白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 の原因である伸長 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候補治療薬を探索して、非翻訳リピート伸長変異を原因とする疾患の新たな治療法開発に寄与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

合成 RNA オリゴヌクレオチドを用いて、GGCCUG リピート RNA が G-quadruplex (GQ) を形成するか、CD スペクトロスコピーによって解析した。SCA36 培養細胞モデルにおける、GQ と RNA foci の局在を抗 GQ 抗体による蛍光免疫染色、RNA-FISH 法を用いて解析した。既知の GQ リガンドであるポルフィリン TMPyP4 を用いて、SCA36 培養細胞モデルにおける RNA foci 形成抑制の定量解析を行った。また、ポルフィリン誘導体にクラスエフェクトがあると仮定し、他のポルフィリン、cyanocobalamin、sodium copper chlorophyllin (SCC)、hemin chloride (HC) を用いて、SCA36 培養細胞モデルにおける RNA foci 形成抑制、cytotoxicity の低減効果、cell viability の改善効果の定量解析を行った。

### 4. 研究成果

GGCCUG リピート RNA は GQ を形成するが不安定であり、*in vitro* 条件での二次構造としてはヘアピン構造が優位であると考えられた。SCA36 培養細胞モデルでは、核内に GQ 構造と RNA foci の共局在を認めた (図 1)。TMPyP4 は (GGCCTG)<sub>75</sub> を発現する SCA36 培養細胞モデルにおいて、RNA foci の形成を抑制した (図 2A)。また SCC、HC も SCA36 培養細胞モデルにおいて、

RNA foci の形成を抑制した。さらに SCC、HC は SCA36 培養細胞モデルにおいて、伸長 GGCCUG リピート RNA を介した cytotoxicity を低減し、cell viability を改善した ( 図 2B )。

SCC と HC は既に臨床適用されている化合物であり、それらの安全性、副作用に関するデータは十分に蓄積されている。ドラッグリポジショニングの観点から、これらの化合物は SCA36 に対する候補治療化合物として有望と考えられた。

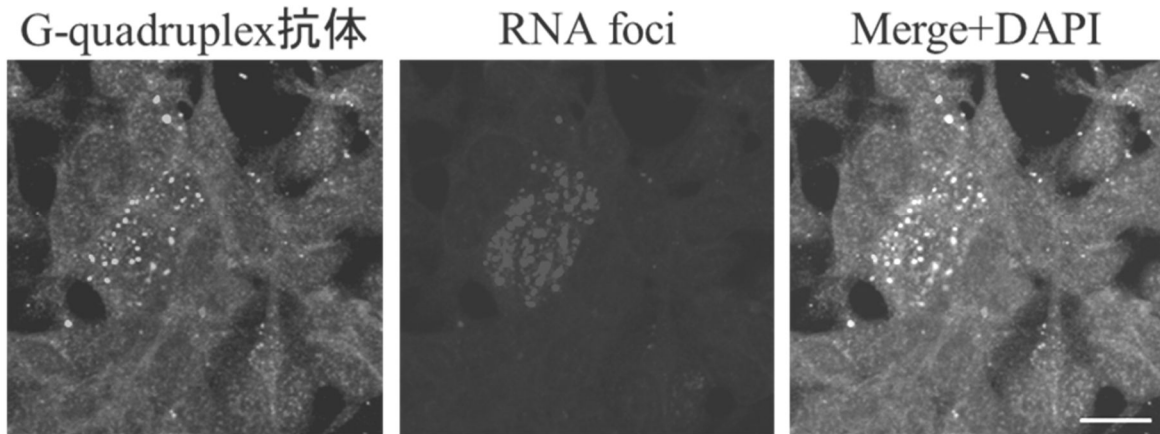
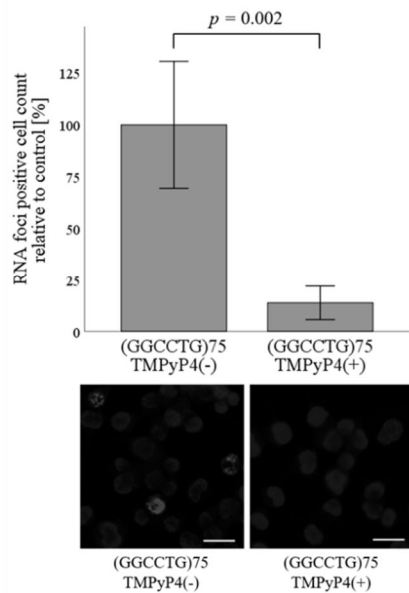


図 1 : (GGCCTG)75 を導入した SCA36 培養細胞モデルにおける解析

(A) ポルフィリン誘導体による RNA foci 抑制



(B) Cell viability assay

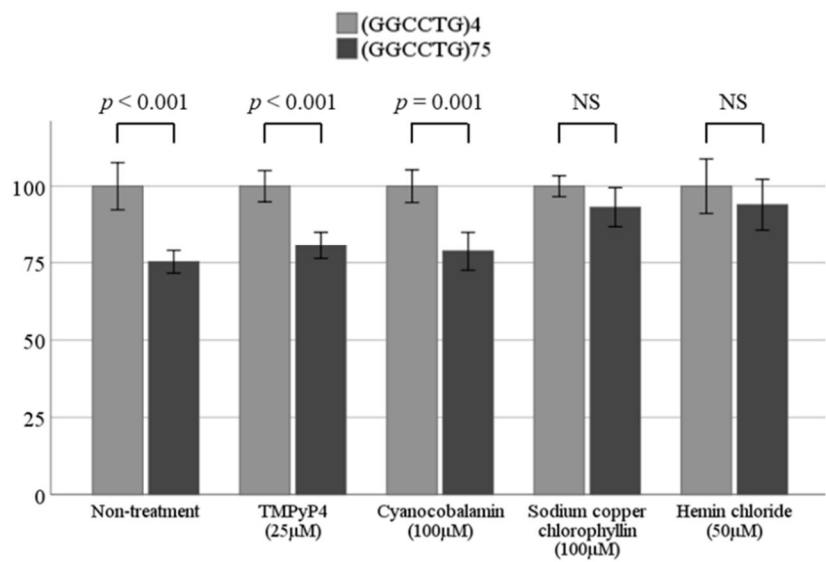


図 2 : SCA36 培養細胞モデルにおけるポルフィリン誘導体による病態改善効果の検討

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Perez Barbara A, Shorrock Hannah K, Banez Coronel Monica, Zu Tao, Romano Lisa EL, Laboissonniere Lauren A, Reid Tammy, Ikeda Yoshio, Reddy Kaalak, Gomez Christopher M, Bird Thomas, Ashizawa Tetsuo, Schut Lawrence J, Brusco Alfredo, Berglund J Andrew, Hasholt Lis F, Nielsen Jorgen E, Subramony SH, Ranum Laura PW	4. 巻 13
2. 論文標題 CCG・CGG interruptions in high penetrance SCA8 families increase RAN translation and protein toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 e14095
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/emmm.202114095	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 該当する
1. 著者名 Aoki Sho, Nagashima Kazuaki, Shibata Makoto, Kasahara Hiroo, Fujita Yukio, Hashiguchi Akihiro, Takashima Hiroshi, Ikeda Yoshio	4. 巻 60
2. 論文標題 Sibling Cases of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 4H with a Homozygous <i>FGD4</i> Mutation and Cauda Equina Thickening	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3975 ~ 3981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.7247-21	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 Hirayanagi Kimitoshi, Ozaki Hiroaki, Tsukagoshi Setsuki, Furuta Natsumi, Ikeda Yoshio	4. 巻 171
2. 論文標題 Porphyrins ameliorate spinocerebellar ataxia type 36 GGCCGTG repeat expansion-mediated cytotoxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 92 ~ 102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.03.001	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 Furuta Natsumi, Tsukagoshi Setsuki, Hirayanagi Kimitoshi, Ikeda Yoshio	4. 巻 1711
2. 論文標題 Suppression of the yeast elongation factor Spt4 ortholog reduces expanded SCA36 GGCCUG repeat aggregation and cytotoxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 29 ~ 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.12.045	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 Tsukagoshi Setsuki, Furuta Minori, Hirayanagi Kimitoshi, Furuta Natsumi, Nakazato Shogo, Fujii Motoaki, Yuminaka Yasushi, Ikeda Yoshio	4. 巻 71
2. 論文標題 Noninvasive and quantitative evaluation of movement disorder disability using an infrared depth sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 135 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2019.08.101	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平柳公利、尾崎広明、塚越設貴、古田夏海、池田佳生
2. 発表標題 ポルフィリンは脊髄小脳失調症36型GGCCTGリピート伸長による細胞毒性を改善する
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古田夏海、塚越設貴、平柳公利、池田佳生
2. 発表標題 Suppression of the yeast elongation factor Spt4 ortholog reduces expanded SCA36 GGCCUG repeat aggregation and cytotoxicity
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚越設貴、古田みのり、平柳公利、古田夏海、弓仲康史、池田佳生
2. 発表標題 神経変性疾患における歩行障害定量化の検討
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚越設貴, 古田みのり, 平柳公利, 古田夏海, 弓仲康史, 池田佳生
2. 発表標題 神経変性疾患における歩行障害定量化の検討
3. 学会等名 第37回日本神経治療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脊髄小脳変性症の分子病態解明と治療開発研究 <a href="https://neurology.dept.med.gunma-u.ac.jp/class/kenkyu%20shokai%20yoshio%20ikedai.html">https://neurology.dept.med.gunma-u.ac.jp/class/kenkyu%20shokai%20yoshio%20ikedai.html</a>
--

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

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
---------	---------