

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07994

研究課題名(和文) 脊髄小脳変性症モデルマウスを用いたCRISPR/Cas13による新しい核酸医療

研究課題名(英文) A new oligonucleotide treatment with CRISPR/Cas13 using model mice of spinocerebellar ataxia

研究代表者

松田 由喜子 (MATSUDA, Yukiko)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・研究員

研究者番号：10735301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症(SCD)のうち点変異による病型に対して変異型遺伝子の発現を抑制する新規治療法の開発を目的として、SCA42ノックインマウスを用いてCRISPR/Cas13dによる変異型遺伝子の転写物を分解する方法を検討した。ターゲット遺伝子を特異的に認識するCas13dシステムを組み込んだアデノ随伴ウイルスを作製しマウス小脳培養細胞系にてターゲット遺伝子の発現を抑制出来る系を確立した。今後、変異型に対してより特異性の高い条件を探索し、ノックインマウス個体における治療効果を検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

点変異型常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症において、病因である変異型mRNAを選択的に分解することができれば病状の改善を期待できる。ターゲット遺伝子を特異的に認識するCas13dシステムを組み込んだアデノ随伴ウイルスによりマウス小脳培養細胞系にてターゲット遺伝子の発現を抑制出来る系を確立した。今後さらなる検討を必要とするが、新しい治療法の開発において有効な方法と期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel therapeutic method inhibiting the expression of the mutant gene for point mutation type in the autosomal dominant hereditary spinocerebellar degeneration (SCD), we investigated a method knocking-down the transcript of the mutant gene by CRISPR/Cas13d using SCA42 knock-in mice. We have made an adeno-associated virus incorporating Cas13d system, which specifically recognizes the target gene. We have established the method suppressing the expression of the target gene in mouse cerebellar culture. In the future, we will search conditions with higher specificity for the mutant gene and examine the therapeutic effect in knock-in mice.

研究分野：神経科学

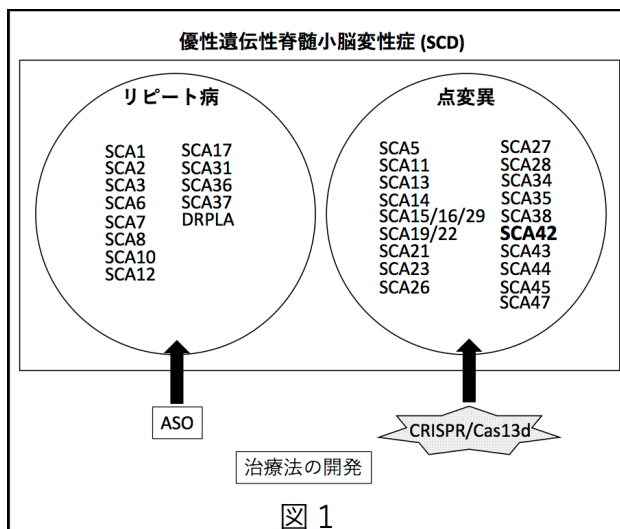
キーワード：脊髄小脳変性症

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 優性遺伝性脊髄小脳変性症 (SCD) は小脳性運動失調を主症状とする神経変性疾患であり、これまでに 42 病型が知られている。そのうち 30 個以上原因遺伝子が同定され、個々の病態も徐々に明らかにされてきた。しかし、同定された原因遺伝子産物が多岐に渡り、未だ根本的治療法はない。近年注目されているのが、原因遺伝子産物に対する低分子医薬品ではなく核酸医薬 (ASO、siRNA、HDO 等) による分子標的治療である。同定された原因遺伝子の変異特性に注目すると、SCD は大きく 2 つのカテゴリーに分けられる。異常伸長ポリグルタミンを生じる CAG リピート (SCA1、2、3、6、7、17、DRPLA) や非翻訳領域に繰り返し配列の異常伸長 (SCA8、10、12、31、36、37) を示すリピート病と点変異疾患群である。前者のリピート病においては、ASO を用いた治療薬が開発されている。しかし、後者の一塩基変異に対する治療法は開発されていない状況である (図 1)。

(2) 申請者らは 2005 年に T 型 Ca チャネル (*CACNA1G*) の点変異が SCD の原因遺伝子であることを見出し、CRISPR/Cas9 システムを用いてヒトと同じ点変異のみを相同遺伝子上に導入した SCA42 型ノックインマウスを作製した。このマウスはヒトと同様緩徐な進行性の運動失調症状を示した。さらに、小脳プルキンエ細胞変性像がヘテロ接合体、ホモ接合体の順に遺伝子量に応じて増加し、また加齢に伴い増えることを明らかにした。電気生理学的解析より T 型 Ca チャネルの点変異はチャネルの機能異常を引き起こしており、gain of toxicity であると推察される。病因である変異型 mRNA を選択的に分解することができれば病状の改善を期待できる。このように SCA42 型ノックインマウスはヒトと病状が類似し、かつ詳細な病態の時系列が把握されており、新しい核酸医療の開発にとって理想的なモデル動物である。

(3) CRISPR/Cas13d システム (Konermann S., *Cell*, April, 2018) は一塩基変異を認識し変異型 mRNA を特異的にノックダウンすることを可能とする画期的方法である。



### 2. 研究の目的

SCA42 において変異型のみ遺伝子発現を抑制する新規治療法の開発を目的として、SCA42 型ノックインマウスを用いて CRISPR/Cas13d による *Cacna1g* の変異型転写物を分解する方法を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) CAG プロモータの下流に GFP 配列を導入した AAV2 ベクターを構築する。AAV2 ベクターとヘルパープラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、GFP の発現を指標にトランスフェクションの条件検討を行う。

(2) プルキンエ細胞特異的プロモータの下流に GFP 配列を導入した AAV2 ベクターを構築する。AAV2 を産生し、細胞溶解後カラム精製を行う。AAV2 のタイターを qPCR により測定し、AAV2 精製法の検討をする。

(3) 野生型マウス生後 1 日目の小脳細胞を初代培養し、プルキンエ細胞特異的 GFP 導入 AAV2 を感染させ、細胞特異性、AAV2 の感染時期や感染量を検討する。

(4) U6 プロモータの下流にターゲット特異的ガイド RNA 配列、および、プルキンエ細胞特異的プロモータの下流に Cas13d 配列をタンデムにつなぎ合わせ、AAV2 ベクターを構築する。ターゲットとして、mRNA の発現をノックダウンするとプルキンエ細胞変性が起こる分子 A を用い、ノックダウン効果をプルキンエ細胞の形態変化で検出できる系を作製する。分子 A 特異的ガイド RNA を組み込んだ AAV2 ベクターを複数作製し、ヘルパープラスミドと共に HEK293T 細胞にトランスフェクションし、AAV2 の産生および精製を行う。野生型マウス生後 1 日目の小脳細胞を初代培養し、プルキンエ細胞特異的 GFP 導入 AAV2 を感染させる。プルキンエ細胞の突起伸長を確認後、分子 A 特異的ガイド RNA 導入 AAV2 を感染させ、プルキンエ細胞の形態変化を指標に、

Cas13d のノックダウン条件の検討を行う。

(5) *Cacna1g* 変異特異的ガイド RNA を複数パターン作製し、AAV2 ベクターを構築する。ヘルパープラスミドと共に HEK293T 細胞にトランスフェクションし、AAV2 の産生および精製を行う。

(6) 野生型またはホモ接合体ノックインマウス生後 1 日目の小脳細胞を初代培養し、*Cacna1g* mRNA の発現を RT-qPCR により確認する。コントロールとして野生型マウスにおいては野生型 mRNA 量に影響を与えないことを確認する(図 2)。

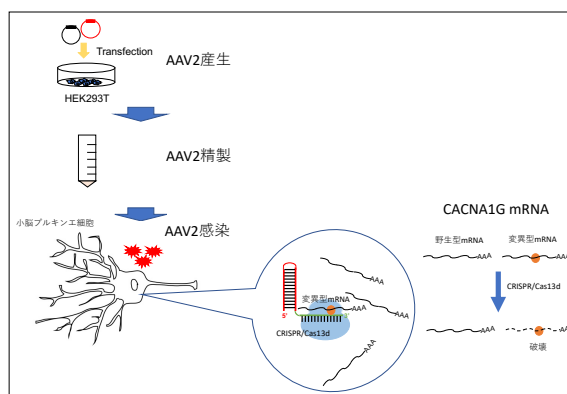


図 2

#### 4. 研究成果

(1) 野生型マウス生後 1 日目の小脳を採取し、ポリ-D-リジンおよびラミニンコートしたプレートに単離した小脳細胞を蒔種した。1 週間に 1 回培地交換を行い、培養 50 日まで安定してプルキンエ細胞を培養できることを確認し、小脳初代培養系を確立した。

(2) Addgene より CRISPR/Cas13d システムを用いるプラスミドを購入し、U6 プロモータの下流にターゲット特異的ガイド RNA 配列、および、プルキンエ細胞特異的プロモータの下流に Cas13d 配列をタンデムにつなぎ合わせ、AAV2 ベクターを構築した。

(3) GFP 配列を導入した AAV2 ベクターとヘルパープラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、GFP の発現効率の高いトランスフェクション条件を決定した。

(4) 作製したウイルスの精製法を検討し、最終的に  $10^{12} \sim 10^{13}$  vg/mL のタイターを持つ AAV2 を安定して産生出来る系を確立した。

(5) プルキンエ細胞の培養には小脳のプルキンエ細胞以外の顆粒細胞などとの Co-Culture を必要とし、プルキンエ細胞の微量な *Cacna1g* mRNA を検出しながら Cas13d の特異性や至適な AAV2 量・感染時期を検討するのは困難であった。そこで、mRNA の発現をノックダウンするとプルキンエ細胞変性が起こる分子 A をターゲットとし、ノックダウン効果をプルキンエ細胞の形態変化で検出できる系を作製することにした。プルキンエ細胞特異的に GFP を発現させる AAV2 を作製し、野生型マウス小脳初代培養系に感染させ、GFP で光るプルキンエ細胞が安定して培養できる条件を検討した。次に、ターゲット分子 A に対するガイド RNA を選定し、AAV2 ベクターの構築、AAV2 産生および精製を行った。野生型マウス生後 1 日目の小脳細胞を初代培養し、プルキンエ細胞特異的 GFP 導入 AAV2 を感染させ突起伸長したプルキンエ細胞の形態を確認した。突起伸長が安定した段階で、ターゲット分子 A に対する AAV2 を感染させ、プルキンエ細胞の形態変化を観察した。培養 14 日目にターゲット特異的ガイド RNA と CRISPR/Cas13d を発現する AAV2 を感染させたところ 20 日後に細胞変性死を確認し、ターゲット特異的に転写物をノックダウンする系を確立出来たことを確認した(図 3)。



図 3

(6) *Cacna1g* 変異特異的ガイド RNA の配列に関しては、ガイド RNA の全長およびガイド RNA 内の点変異の位置の設定を複数パターン準備した。各々のガイド RNA を組み込んだ AAV2 ベクターを構築し、ヘルパープラスミドと共に HEK293T 細胞にトランスフェクションし、AAV2 の産生および精製を行った。野生型およびホモ接合体ノックインマウス生後 1 日目の小脳細胞を初代培養し、培養 14 日目に AAV2 を感染させ、1 週間後に細胞を回収した。回収した細胞から mRNA を抽出し RT-qPCR により変異型転写物の特異的な分解を効率的に起こすガイド RNA を現在スクリーニング中である。

今後、変異型転写物の特異的な分解を誘導する AAV2 をマウス個体に感染させ、運動失調に対する改善効果を検討したいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hara Naoyuki, Morino Hiroyuki, Matsuda Yukiko, Satoh Kenichi, Hashimoto Kouichi, Maruyama Hirofumi, Kawakami Hideshi	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Zonisamide can ameliorate the voltage-dependence alteration of the T-type calcium channel Cav3.1 caused by a mutation responsible for spinocerebellar ataxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 163-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00700-7	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 Matsuoka Toshinori, Yamasaki Miwako, Abe Manabu, Matsuda Yukiko, Morino Hiroyuki, Kawakami Hideshi, Sakimura Kenji, Watanabe Masahiko, Hashimoto Kouichi	4. 巻 599(2)
2. 論文標題 Kv11 (ether-a-go-go-related gene) voltage-dependent K <sup>+</sup> channels promote resonance and oscillation of subthreshold membrane potentials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 547-569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP280342	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 Kume Kodai, Takata Tadayuki, Morino Hiroyuki, Matsuda Yukiko, Ohsawa Ryosuke, Tada Yui, Kurashige Takashi, Kawakami Hideshi	4. 巻 65(10)
2. 論文標題 The first Japanese case of primary familial brain calcification caused by an MYORG variant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 917-920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0779-x	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 Mizuno Noriyoshi, Kume Kodai, Nagatani Yukiko, Matsuda Shinji, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Kajiya Mikihiro, Takeda Katsuhiro, Matsuda Yukiko, Tada Yui, Ohsawa Ryosuke, Morino Hiroyuki, Mihara Keichiro, Fujita Tsuyoshi, Kawaguchi Hiroyuki, Shiba Hideki, Kawakami Hideshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 65(10)
2. 論文標題 Aggressive periodontitis and NOD2 variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 841-846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-0777-z	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 Matsuda Yukiko, Morino Hiroyuki, Miyamoto Ryosuke, Kurashige Takashi, Kume Kodai, Mizuno Noriyoshi, Kanaya Yuhei, Tada Yui, Ohsawa Ryosuke, Yokota Kazunori, Shimozawa Nobuyuki, Maruyama Hirofumi, Kawakami Hideshi	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Biallelic mutation of HSD17B4 induces middle age-onset spinocerebellar ataxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology Genetics	6. 最初と最後の頁 e396 ~ e396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXG.0000000000000396	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 Kume Kodai, Morino Hiroyuki, Miyamoto Ryosuke, Matsuda Yukiko, Ohsawa Ryosuke, Kanaya Yuhei, Tada Yui, Kurashige Takashi, Kawakami Hideshi	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 Middle-age-onset cerebellar ataxia caused by a homozygous TWNK variant: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12881-020-01002-4	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 Mizuno Noriyoshi, Iwata Tomoyuki, Ohsawa Ryosuke, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Kajiya Mikihiro, Matsuda Yukiko, Kume Kodai, Tada Yui, Morino Hiroyuki, Yoshimoto Tetsuya, Ueki Yasuyoshi, Mihara Keichiro, Sotomaru Yusuke	4. 巻 525(4)
2. 論文標題 Optineurin regulates osteoblastogenesis through STAT1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 889-894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.028	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 Tada Yui, Kume Kodai, Matsuda Yukiko, Kurashige Takashi, Kanaya Yuhei, Ohsawa Ryosuke, Morino Hiroyuki, Tabu Hayato, Kaneko Satoshi, Suenaga Toshihiko, Kakizuka Akira, Kawakami Hideshi	4. 巻 65(4)
2. 論文標題 Genetic screening for potassium channel mutations in Japanese autosomal dominant spinocerebellar ataxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 363 ~ 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0717-y	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 Kurashige Takashi, Morino Hiroyuki, Matsuda Yukiko, Mukai Tomoya, Murao Tomomi, Toko Megumi, Kume Kodai, Ohsawa Ryosuke, Torii Tsuyoshi, Tokinobu Hiroshi, Maruyama Hirofumi, Kawakami Hideshi	4. 巻 91(2)
2. 論文標題 Retinitis pigmentosa prior to familial ALS caused by a homozygous cilia and flagella-associated protein 410 mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 220 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2019-321279	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 Kume Kodai, Morino Hiroyuki, Komure Osamu, Matsuda Yukiko, Ohsawa Ryosuke, Kurashige Takashi, Kanaya Yuhei, Tada Yui, Kawakami Hideshi	4. 巻 402
2. 論文標題 C-terminal mutations in SYNE1 are associated with motor neuron disease in patients with SCAR8	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 118 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.05.001	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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Matsuda Y, Morino H, Sotomaru Y, Kurashige T, Maruyama H, Kawakami H
2. 発表標題 Transcriptomic analysis using model mice of spinocerebellar ataxia 42
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 Matsuda Y, Morino H, Kurashige T, Miyamoto R, Maruyama H, Kawakami H
2. 発表標題 Biochemical analysis of middle-age-onset SCAR caused by a biallelic mutation of HSD17B4
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsuda Y, Morino H, Kurashige T, Nakayama H, Matsuoka T, Sotomaru Y, Hashimoto K, Kawakami H
2. 発表標題 Degeneration of cerebellar Purkinje cells in the knock-in mice harboring SCA42 mutation
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuda Y, Morino H, Miyamoto R, Kawakami H
2. 発表標題 Homozygous mutation in dehydrogenase domain of DBP cause slowly progressive spinocerebellar ataxia
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	森野 豊之  (MORINO Hiroyuki)  (10397953)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授    (16101)	

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