

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591084

研究課題名（和文） PTD融合タンパクを用いた脊髄小脳変性症の画期的治療法の開発と新規原因遺伝子同定

研究課題名（英文） Identification of a novel gene responsible for spinocerebellar ataxia and therapy for ataxia

研究代表者

池田 佳生（IKEDA YOSHIO）

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：00282400

研究成果の概要（和文）：

遺伝性脊髄小脳変性症の新規原因遺伝子同定と小脳変性へ至る病態解明を目指し、未知の病型の脊髄小脳変性症家系を用いてポジショナルクローニングを行い、chr. 20p13 領域へ連鎖し nucleolar protein 56 (NOP56) 遺伝子イントロン1に存在する GGCCTG の6塩基繰り返し配列の異常延長を原因遺伝子変異とする新規の遺伝性疾患 Asidan (SCA36) を同定し、その分子病態として RNA gain-of-function の関与が示唆される結果を得た。また、両方向性に転写される SCA8 CTG・CAG リピート延長を病的変異とする SCA8 にも着目し、SCA8 患者剖検脳および SCA8 トランスジェニックマウスの解析から SCA8 病態において RNA gain-of-function の関与が示唆される結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the molecular pathomechanism and identify a novel gene responsible for spinocerebellar ataxia, positional cloning of SCA families with unknown etiology was performed. A novel genetic defect causing characteristic clinical features with ataxia complicated by motor neuron involvement had been discovered from this study as a hexanucleotide GGCCTG repeat expansion in intron 1 of the *NOP56* gene. The specific molecular effect of mutated transcripts might be related to RNA gain-of-function mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：神経変性疾患の臨床と研究（脊髄小脳変性症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病など）、生活習慣病と脳卒中・認知症
 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード: 脊髄小脳変性症、ポジショナルクローニング、spinocerebellar ataxia、SCD、Asidan、SCA36、NOP56、GGCCTG リピート

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は小脳失調症による運動障害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には30以上の遺伝子座の報告があり、遺伝学的に極めて多様性の高い疾患である。SCA の原因遺伝子も次々と明らかにされ分子病態解析も進展しているが、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おらず、さらなる病態解明の推進および早期に有効かつ根本的な新規治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 遺伝性脊髄小脳変性症の新規原因遺伝子同定

新規のSCA遺伝子を同定し、小脳変性の病態解明および発症に至る分子メカニズムを明らかにする。

(2) SCA8の分子病態解析

分子病態が未解明のSCA8における解析を通じて小脳変性に至る分子メカニズムを明らかにする。

(3) 脊髄小脳変性症の臨床的病態解析

脊髄小脳変性症の臨床像を詳細に検討し、診断、療養へ役立つ。

3. 研究の方法

未知の病型の遺伝性脊髄小脳変性症の新規原因遺伝子同定を目指し、岡山大学神経内科で集積した常染色体優性遺伝形式を示す脊髄小脳変性症家系のうち、既知の病型 (SCA1・SCA2・MJD/SCA3・SCA6・SCA7・SCA8・DRPLA) を除外した後、神経学的評価および脳画像解

析にて均一の臨床表現型を示し、地理的にも隣接した地域出身の10家系を対象として遺伝学的に解析した。また、SCA8患者剖検脳およびSCA8トランスジェニックマウスを用いて病態解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝性脊髄小脳変性症の新規原因遺伝子同定

上記の10家系においては小脳失調症と運動ニューロン疾患を合併し、本疾患をAsidanと命名した。サンプルサイズの大きい3家系における連鎖解析の結果、chr. 20p13領域に4.60のロッド値を認め、さらにfine mappingと最小候補領域に存在する遺伝子のDNAシーケンシングを行い、nucleolar protein 56 (NOP56) 遺伝子イントロン1に存在するGGCCTGの6塩基繰り返し配列の異常延長を原因遺伝子変異として同定した (SCA36)。Asidan/SCA36の臨床像は小脳失調症で発症し、罹病期間が進むと共に舌や四肢の筋萎縮・線維束性収縮などの運動ニューロン障害が明らかとなる点に従来のSCAでは認められない特徴であることを明らかにした。また、Asidan/SCA36患者リンパ芽球核内に延長したGGCCUGリピート転写産物の凝集体であるRNA-fociを認め、さらにRNA-FISHと免疫蛍光法を組み合わせた解析においては、RNA-fociと転写因子SRSF2との共局在を認めた。このことから、本疾患の分子メカニズムとしてRNAレベルの病態 (RNA gain-of-function) が示唆された。ALSと脊髄小脳変性症の病態解明と治療法開発へ向けて大きな発見となった。

(2) SCA8の分子病態解析

両方向性に転写される SCA8 CTG・CAG リピート延長を病的変異とする SCA8 (脊髄小脳失

調症 8 型) に着目し、CTG 方向の転写産物、つまり延長 CUG transcripts の分子病態への関与を検討した。SCA8 患者剖検脳および SCA8 トランスジェニックマウスの小脳神経細胞核内に延長 CUG transcripts の凝集体を同定し、それが転写調節因子 MBNL1 と共局在することを明らかにするとともに、MBNL1 の機能不全をもたらすことが、GABA-A transporter4 のスプライシングパターンおよび発現量を変化させることを明らかにした。さらに SCA8 トランスジェニックマウスを用いた検討からは、GABA-A transporter4 の転写調節異常に起因することが想定される小脳の GABA 介在性抑制系の機能障害も明らかにした。以上より、SCA8 の病態における CUG transcripts を介した RNA gain-of-function のメカニズムを本研究により明らかにした。

(3) 脊髄小脳変性症の臨床的病態解析

SCA31 (脊髄小脳失調症31型) および他の病型の小脳失調症における聴覚障害について詳細な検討を行った。既報の論文結果とは異なり、聴覚障害はSCA31に特徴的とは言えず、病型の鑑別診断に役立つような小脳外臨床症候とは言えないことを明らかにした。また、本州最北の青森県地域の遺伝性脊髄小脳変性症の臨床遺伝学的特徴を明らかにした。

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 15 件)

1. Clinicoepidemiological analysis of genetic testing in 1,000 cases of hereditary neurological disorders. Kametaka S, Ikeda Y, Abe K. *Rinsho Shinkeigaku*. 51: 471-7 (2011), 査読有.

2. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Liu W, Okuda H, Koizumi A. *Am J Hum Genet*. 89: 121-30 (2011), 査読有.
3. Differential clinical features in a pair of monozygotic twins with dentatorubropallidoluysian atrophy. Sato K, Yunoki T, Morimoto N, Nagotani S, Deguchi K, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K, Yamamoto Y. *Eur J Neurol*. 18: e100-1 (2011), 査読有.
4. Correlation of cerebral spinal fluid pH and HC03(-) with disease progression in ALS. Morimoto N, Deguchi K, Sato K, Yunoki T, Deguchi S, Ohta Y, Kurata T, Takao Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. *J Neurol Sci*. 307: 74-8 (2011), 査読有.
5. Comparisons of acoustic function in SCA31 and other forms of ataxias. Ikeda Y, Nagai M, Kurata T, Yamashita T, Ohta Y, Nagotani S, Deguchi K, Takehisa Y, Shiro Y, Matsuura T, Abe K. *Neurol Res*. 33: 427-32 (2011), 査読有.
6. Atorvastatin and pitavastatin protect cerebellar Purkinje cells in AD model mice and preserve the cytokines MCP-1 and TNF- α . Kozuki M, Kurata T, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Ikeda

- Y, Abe K. *Brain Res.* 1388: 32–8 (2011), 査読有.
7. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. Miyazaki K, Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. *J Neurosci Res.* 89: 718–28 (2011), 査読有.
 8. Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Violeta-Lukic-Panin, Morimoto N, Ohta Y, Nagai M, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. *Brain Res.* 1371: 161–70 (2011), 査読有.
 9. Prevalence of autosomal dominant cerebellar ataxia in Aomori, the northernmost prefecture of Honshu, Japan. Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Hikichi M, Ikeda Y, Jackson M, Wakasaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kannari K, Shoji M. *Intern Med.* 49: 2409–2414 (2010), 査読有.
 10. A Japanese ALS6 family with mutation R521C in the FUS/TLS gene: a clinical, pathological and genetic report. Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Okamoto K, Fujita Y, Jackson M, Ikeda M, Nakazato Y, Ikeda Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M. *J Neurol Sci.* 296: 59–63 (2010), 査読有.
 11. Induction of parkinsonism-related proteins in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Ohta Y, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asanuma M, Abe K. *J Neurosci Res.* 88: 1804–1811 (2010), 査読有.
 12. Familial amyloid polyneuropathy (Finnish type) presenting multiple cranial nerve deficits with carpal tunnel syndrome and orthostatic hypotension. Makioka K, Ikeda M, Ikeda Y, Nakasone A, Osawa T, Sasaki A, Otani T, Arai M, Okamoto K. *Neurol Res.* 32: 472–475 (2010), 査読有.
 13. Spinal anterior horn has the capacity to self-regenerate in amyotrophic lateral sclerosis model mice. Miyazaki K, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Abe K. *J Neurosci Res.* 87: 3639–3648 (2009), 査読有.
 14. RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. Daughters RS, Tuttle DL, Gao W, Ikeda Y, Moseley ML, Ebner TJ, Swanson MS, Ranum LP. *PLoS Genet.* 5: e1000600 (2009), 査読有.
 15. Changes of Nogo-A and receptor NgR in the lumbar spinal cord of ALS model

mice. Miyazaki K, Nagai M, Ohta Y, Morimoto N, Kurata T, Murakami T, Takehisa Y, **Ikeda Y**, Kamiya T, **Abe K**. *Neurol Res*, 31: 316-321 (2009), 査読有.

[学会発表] (計5件)

1. **池田佳生**、倉田智子、山下 徹、太田康之、出口章子、出口健太郎、武久 康、城洋志彦、松浦 徹、**阿部康二**. SCA31 および他の小脳失調症における聴覚障害の検討. 第 52 回日本神経学会学術大会. 2011. 5. 18-20, 名古屋
2. 亀高さつき、**池田佳生**、**阿部康二**. 岡山大学神経内科における遺伝子検査 1,000 件の臨床疫学的解析. 第 52 回日本神経学会学術大会. 2011. 5. 18-20, 名古屋
3. **池田佳生**、辻 徳生、折戸謙介、松浦 徹、石井 抱、**阿部康二**. 運動失調症の治療開発研究への応用をめざした上肢協調運動障害の数量化測定装置の開発. 第 28 回日本神経治療学会総会. 2010. 7. 15-16, 横浜
4. 佐藤恒太、柚木太淳、森本展年、名古屋章子、出口健太郎、永井真貴子、武久 康、**池田佳生**、松浦 徹、**阿部康二**. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) の一卵性双生児例についての検討. 第 87 回日本神経学会中国・四国地方会. 2009. 12. 5, 高松
5. **池田佳生**、宮崎一徳、森本展年、倉田智子、永井真貴子、武久 康、辻 徳生、折戸謙介、石井 抱、**阿部康二**. SCD における上肢協調運動障害の数量化測定装置の開発. 第 50 回日本神経学会総会. 2009. 5. 20-22, 仙台

[その他]

岡山大学神経内科ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/shinkeinaika>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 佳生 (IKEDA YOSHIO)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：00282400

(2) 研究分担者

阿部 康二 (ABE KOJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20212540

(3) 連携研究者