

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591252

研究課題名(和文) 脊髄小脳失調症31型における異常RNA分子標的同定

研究課題名(英文) A search for abnormal RNA metabolism in spinocerebellar ataxia type 31

研究代表者

石川 欽也 (Ishikawa, Kinya)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30313240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では日本人特有の疾患である脊髄小脳失調症31型(SCA31)患者脳と自作モデルマウス脳で病態を解析した。初年度に自作モデルマウスで患者脳と同様のRNA異常構造物を認め、第2年度では、患者脳で対照脳よりも上昇・低下する遺伝子を複数同定した。これらは、他の脊髄小脳変性症の原因遺伝子にもなることが知られているものも含まれており、SCA31の病態には他の脊髄小脳変性症とある程度共通する機序がある可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We studied on human brain samples affected with spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31). By expression analysis using microarray and RNA-seq, we found groups of genes which have meaningful alterations in their expression levels. Among those, we confirmed several genes that are down-regulated in SCA31 samples. Some of them were known to be involved in intracellular calcium homeostasis. We also found that SCA31 human Purkinje cells possess abnormal RNA structures called RNA foci which contain (UGGAA)_n repeat, the transcript of (TGGAA)_n repeat exclusively found in the SCA31 patients' mutation locus. Such RNA foci were also found in cultured cells expressing SCA31 mutation constructs. These results suggest that the UGGAA repeat is involved in SCA31 pathogenesis.

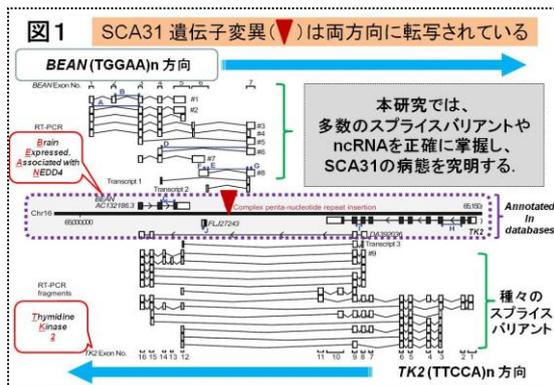
研究分野：神経内科学

キーワード：遺伝子 脳 神経疾患 RNA

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症は根本的な治療法が無い神経難病の一つである。これには様々な疾患が包含されており、常染色体優性遺伝型の遺伝をする脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) の多くは原因が同定された。研究代表者石川はこの分野の疾患の家系集積から原因の同定、病態の探索、モデル動物の開発を長年行ってきた。

脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) は、本邦の SCA 中、第 3 または 4 位の頻度を占める疾患で、高齢発症かつ小脳 Purkinje 細胞 (PC) にほぼ限定した異常を示す (Owada K. et al. Neurology, 2005)。石川らは全国多施設の神経内科専門医のご協力を得て、2009 年にこの疾患の原因を同定することが出来た。それは、第 16 番染色体長腕に位置する 2 つの遺伝子、BEAN および TK2 が共有するイントロン領域に 2.5~3.8kb の 5 塩基繰り返し配列が挿入されることである (Sato N. & Amino T. et al. Am J Hum Genet, 2009)。この 5 塩基繰り返しのうち、(TGGAA)_n が発病に必須と考えている。BEAN と TK2 は、脳ではお互いが反対方向に転写されるために (図 1)、sense および



anti-sense の転写産物が生じる。また、複雑な alternative splicing が働いているために 1 つの遺伝子から多種類の転写産物 (スプライスバリエント) が生じる。

SCA31 患者 PC 細胞には変異 DNA から転写された RNA が核内で凝集しているため、非翻訳型 RNA (ncRNA) が病態に関与していることに

ほぼ間違いない。一般的に、ncRNA はターゲットとする翻訳型 RNA の発現調節、転写後修飾 (post-transcriptional modification)、染色体構造安定化など、多岐にわたる機能を有していることが判明しており (Nat Rev Genet, 10:155-159, 2009)、知見は急速に増えている。SCA31 でも、BEAN, TK2 両責任遺伝子の発現調節を担う ncRNA が BEAN/TK2 ゲノム領域から転写されていることが充分考えられ、さらに変異 ncRNA が未知のターゲット遺伝子の発現を変化させて病態を起こしている可能性もある。これらの未知の内容を解明することが SCA31 の治療戦略を立てる上で非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、本邦で頻度が高く、原因が ncRNA である SCA31 について、患者脳で RNA 発現解析を行い、患者でまず異常発現する ncRNA を同定し、次に、自作モデルマウスなどを用いてその意義を究明することである。その成果をもって重要な関与をする ncRNA の発現制御による治療法開発へ挑戦する足掛かりとする。

3. 研究の方法

患者脳の検索については、生前の同意が在り、規定の倫理審査の承諾を得てご説明した結果、病理解剖にご同意があった患者の脳凍結組織を用いた。対照と比較して小脳より抽出した RNA を用いて RT-PCR 法および microarray 法、RNA-seq 法を用いて検索した。RNA-seq 法は本研究のみでは資金的に困難であったため、別研究で行った成果をこの研究で検証した。モデルマウスの研究では、別研究で作製した自作モデルマウスを用いた。

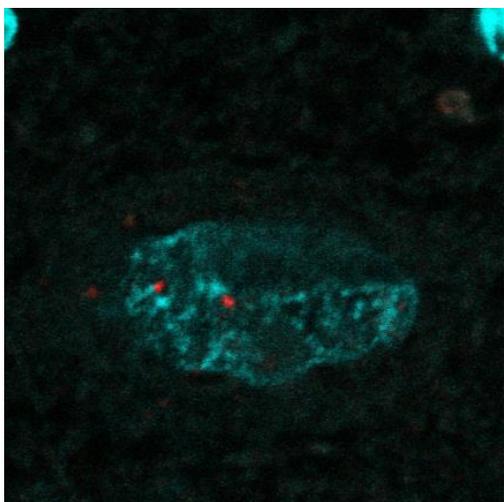
異常変動を起こしていると想定された遺伝子の検証には、定量的 RT-PCR で確認した。また、プルキンエ細胞から RNA を濃縮して抽出する目的で、Leica 社製レーザーマイクロ

ダイセクション機器を用いて、凍結脳組織からプルキンエ細胞の細胞体を濃縮して切除し、RNAを抽出した。

脳組織標本を用いた研究では、パラフィン包埋切片を用いて、SCA31の遺伝子変異部分に対するプローブを作成し、それを用いて患者脳組織における fluorescence in situ hybridization (FISH)法を行った。同様にモデルマウスでも FISH法を行った。

4. 研究成果

まず初年度に、患者脳内では SCA31 の遺伝子変異部分の UGGAA リピートが確かに異常な RNA 構造を形成していることを見出した



(上の図；赤い点が RNA 異常構造物)。

一方、同様の所見は対照症例には見られず、SCA31の小脳プルキンエ細胞に特異的な所見であることを見出した。培養細胞に SCA31 遺伝子の BEAN 方向の変異リピートや、TK2 方向の変異リピートを導入する実験を行ったところ、BEAN 方向での遺伝子配列 UGGAA リピートを発現させた場合に、RNA 異常構造が形成され、さらにもっとも際立った細胞死が見られた。以上より、SCA31 の病態には BEAN 方向の転写産物である UGGAA リピートが関与している可能性が見出された。以上の内容を、日本神経病理学会機関誌 *Neuropathology* より発表をした(文献#7)。

また初年度は、自作モデルマウスでの RNA 発現異常の解析を進めた。これまで SCA31 の

モデルマウスとしては世界初の本マウスにおいて、先の図に示した患者脳と同様の RNA 異常構造物を認めた(誌上発表準備中)。さらにこの時期の小脳における遺伝子発現解析を進めた。

初年度から第2年度にかけて患者脳を用い、対照脳よりも上昇・低下する遺伝子を多数(200以上)見出した。このうち、小脳変性に意義を見出すことが予測できる遺伝子に注目し、定量的 RT-PCR で異常変動を確認した。その結果、細胞内カルシウム代謝に関わる複数の遺伝子に異常変動を見出した。これらの遺伝子は、ヒトの小脳失調の原因遺伝子でもあり、プルキンエ細胞に豊富に発現する遺伝子であった。このため、これらの遺伝子の発現異常が SCA31 の病態に関係している可能性が考えられた。ただし、SCA31 脳でのプルキンエ細胞脱落の影響によって、これらの遺伝子発現が低下している可能性も否定できない。また、他の遺伝子での発現変動が、プルキンエ細胞以外の細胞から発現している遺伝子を検出している可能性も考えられた。このような判断の困難さは、小脳組織が多数の細胞の混在した組織であり、患者脳では既に病変の影響を受けて、目的のプルキンエ細胞が減少してしまっており、逆に他の細胞の相対的な密度が増加してしまっていることに立脚している。このため、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、プルキンエ細胞層のみから RNA を採取する条件検討を行った。

最終年度では、プルキンエ細胞を単離して、RNA を抽出しそれを発現解析に供する試みを行った。6か月以上をかけて回収を試み、ある程度満足できる質(quality)の RNA を抽出できたが、量的には非常に少なく、長くこの試みを続ける必要が生じた。

患者脳における異常発現蛋白の解析の一つとして、免疫組織化学的な検索を第2年度と最終年度で行った。変異遺伝子の産物に対

する抗体を用いて、患者脳での染色を進めたところ、変異 RNA は ncRNA として発現して異常な構造をとるだけでなく（前頁の図）、異常な蛋白に翻訳されて局在していることを発見した（誌上発表準備中）。モデルマウスでも同様な変化を認める可能性を見出したところで研究を終了し、今後の研究課題として追及を続けることにした。

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 18 件）以下に主要論文を列記します。

1. Ozaki K, Doi H, Mitsui J, Sato N, Iikuni Y, Majima T, Yamane K, Irioka T, Ishiura H, Doi K, Morishita S, Higashi M, Sekiguchi T, Koyama K, Ueda N, Miura Y, Miyatake S, Matsumoto N, Yokota T, Tanaka F, Tsuji S, Mizusawa H, Ishikawa K. (Corresponding Author). A novel mutation in ELOVL4 leading to spinocerebellar ataxia with the hot cross bun sign but lacking erythrodermia: a broadened spectrum of SCA34. *JAMA Neurol.* 2015 May 26. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0610. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Dürr A, Brice A, Takashima H, Kikuchi A, Aoki M, Ishiura H, Yasuda T, Date H, Ahsan B, Iwata A, Goto J, Ichikawa Y, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Ishikawa K. Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Tanner CM, Kukull WA, Stern MB, Lee VM, Trojanowski JQ, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Ozelius LJ, Foroud T, Tsuji S. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015 Apr;2(4):417-26. doi: 10.1002/acn3.185. Epub 2015 Feb 28. 査読あり
3. Quantitative evaluation of human cerebellum-dependent motor learning through prism adaptation of hand-reaching movement. Hashimoto Y, Honda T, Matsumura K, Nakao M, Soga K, Katano K, Yokota T, Mizusawa H, Nagao S, Ishikawa K. (Corresponding Author) *PLoS One.* 2015 Mar 18;10(3):e0119376. doi: 10.1371/journal.pone.0119376. eCollection 2015. 査読あり
4. Spinocerebellar ataxia type 36 exists in diverse populations and can be caused by a short hexanucleotide GGCCTG repeat expansion. Obayashi M, Stevanin G, Synofzik M, Monin ML, Duyckaerts C, Sato N, Streichenberger N, Vighetto A, Desestret V, Tesson C, Wichmann HE, Illig T, Huttenlocher J, Kita Y, Izumi Y, Mizusawa H, Schöls L, Klopstock T, Brice A, Ishikawa K. Dürr A. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014 Dec 4. pii: jnnp-2014-309153. doi: 10.1136/jnnp-2014-309153. [Epub ahead of print] 査読あり
5. Relocation of p25 α /tubulin polymerization promoting protein from

- the nucleus to the perinuclear cytoplasm in the oligodendroglia of sporadic and COQ2 mutant multiple system atrophy. Ota K, Obayashi M, Ozaki K, Ichinose S, Kakita A, Tada M, Takahashi H, Ando N, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. (Corresponding Author). *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Sep 11;2:136. doi: 10.1186/s40478-014-0136-4. 査読あり
6. Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *New England Journal of Medicine* 2013 Jul 18;369(3):233-44. doi: 10.1056/NEJMoa1212115. Epub 2013 Jun 12. 査読あり
 7. Niimi Y, Takahashi M, Sugawara E, Umeda S, Obayashi M, Sato N, Ishiguro T, Higashi M, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K. (Corresponding author). Abnormal RNA structures (RNA foci) containing a penta-nucleotide repeat (UGGAA)_n in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis. *Neuropathology* 2013 Apr 22. doi: 10.1111/neup.12032. [Epub ahead of print] (日本神経病理学会賞受賞) 査読あり
 8. Takahashi M, Obayashi M, Ishiguro T, Sato N, Niimi Y, Ozaki K, Mogushi K, Mahmut Y, Tanaka H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Yamada M, Takahashi H, Kato T, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K (corresponding author). Cytoplasmic location of $\alpha 1A$ voltage-gated calcium channel C-terminal fragment (Ca_v2.1-CTF) aggregate is sufficient to cause cell death. *PLoS ONE* 8(3): e50121, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0050121. Epub 2013 Mar 7. 査読あり
 9. Unno T, Wakamori M, Koike M, Uchiyama Y, Ishikawa K, Kubota H, Yoshida T, Sasakawa H, Peters C, Mizusawa H, Watase K. Development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement in the pathogenesis of SCA6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(43): 17693-17698, 2012. doi: 10.1073/pnas.1212786109. Epub 2012 Oct 10. 査読あり
 10. Takahashi M, Ishikawa K (Corresponding Author), Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima Y, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama M, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H. Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology*, Dec;32(6):595-603, 2012. doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01302.x. Epub 2012 Mar 7. 査読あり
- [学会発表] (計 1 件)
- Spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36): expanding the genotype and phenotype**
 Authors: Masato Obayashi, Giovanni Stevanin, Matthias Synofzik, Marie-Lorraine Monin, Charles Duyckaerts, Nozomu Sato, Nathalie Streichenberger, Alain Vighetto, Virginie Desestret, Christelle Tesson, H-Erich Wichmann, Sylvie Forlani, Thomas Illig, Ludger Schöls, Johanna Huttenlocher, Yasushi Kita, Yuishin Izumi, Nobuo Sanjo, Hidehiro Mizusawa, Peter Bauer, Thomas Klopstock, Alexis Brice, Kinya Ishikawa and Alexandra Dürr. The

SPATAX Meeting. 2013年6月11日から
14日開催、サルベトリエ病院、パリ（フランス）。

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

1. 名称：「脳機能評価システム及び脳機能
評価方法」

発明者：石川欽也、水澤英洋、永雄総一

権利者：国立大学法人 東京医科歯科大学、
独立行政法人 理化学研究所

種類：

番号：【特願 2012-193894】

出願年月日：平成 24 年 9 月 1 日

国内外の別： 国外（発明拡大）

平成 26 年 2 月 海外出願公開

2. 名称：ALS の原因タンパク毒性を軽減する
核酸

発明者：石川欽也、水澤英洋、永井義隆、横
田隆徳、石黒太郎、佐藤 望、和田圭司

権利者：国立大学法人 東京医科歯科大学、
国立研究開発法人 国立精神神経医療研究
センター

種類：

番号：特願 2014-244034

出願年月日：平成 26 年 12 月 2 日

国内外の別： 国内

3. 名称：脊髄小脳失調症 3 1 型（SCA31）
治療剤

発明者：石川欽也、水澤英洋、永井義隆、石
黒太郎、佐藤 望、和田圭司

権利者：国立大学法人 東京医科歯科大学、
国立研究開発法人 国立精神神経医療研究
センター

種類：

番号：特願 2014-244350

出願年月日：平成 26 年 12 月 2 日

国内外の別： 国内

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 欽也 (Ishikawa, Kinya)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30313240

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：