

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： RNA 異常配列による神経難病（SCA 3 1）に対するヘテロ核酸医薬開発
2. 研究開発代表者： 石川欽也（東京医科歯科大学 医学部附属病院 長寿・健康人生推進センター）
3. 研究開発の成果

当初の予定通り本研究開発では①標的配列のデザインと配列特許取得と②TK2 方向の過剰発現マウスの樹立を進めた。

①標的配列のデザインと配列特許取得(横田分担研究者)では、候補配列を網羅的に検証し、SCA31 の病態を起こす原因遺伝子または変異配列の発現を抑制する配列特異的な核酸配列を発見することを目標とし、マイルストーン(MS)1 として位置付けた。具体的には SCA31 の原因である 2 つの責任遺伝子 *BEAN*(brain expressed associated with NEDD4)と *TK2*(thymidine kinase 2)由来にそれぞれ反対方向に転写される変異 RNA リピート、あるいはこれら責任遺伝子の転写産物の発現を抑制するヘテロ核酸を探索することとした。標的配列を別々に発現するように、培養 HeLa 細胞において一過性発現の実験系を作製し、別途設計した ASO を共発現させ、定量的 RT-PCR 法などで効果の探索を進めた。その結果、いずれの方向の転写産物についても遺伝子発現を抑制できる ASO を発見できた。年度末時点で特異性を検証したところ、良好な結果を得たため配列特許の申請のための準備を進めた。

②TK2 方向の過剰発現マウスの樹立(石川研究代表者、柳原分担研究者)：石川研究代表者は本研究開発前に TK2 方向の過剰発現マウスは複数のラインを取得していたが、本研究開始後最も発現量が高いライン(#35)を維持した。平成 27 年 7 月に初めて 2 匹の F1 マウスを同週齢の同腹野生マウスとともに解析したところ、脳内で導入遺伝子が確かに発現していることを確認できた。SCA31 患者脳で最も明瞭に変性する神経細胞である小脳プルキンエ細胞においては、RNA の異常構造体(RNA foci)が形成され、またプルキンエ細胞の細胞体から異常に突起が出現する特徴的な形態異常を認める。本年度 95 週齢に至るまで高齢に達した当該マウスを年度末に検索したところ、患者脳でのプルキンエ細胞に類似する形態的变化を軽度ながら認めた。また、既に有する *BEAN-Tg* マウスと *TK2-Tg* マウス(ライン 35)とを掛け合わせ、両方向の変異遺伝子が同一個体内で発現するマウスを計画通り作製するため、初年度末に *BEAN-Tg* マウスの受精卵を起こし、*TK2-Tg* マウスとの交配のための準備を開始した。また、マウス由来の脳から RNA を抽出し、対照マウスとの比較で異常なスプライシングなどが生じていないかの検索を開始した。

一方、柳原分担研究者はライン 35 マウスの歩行解析を行った。最初に 95 週齢の *TK2-Tg* 雄マウス 3 匹と同齢同腹の野生型雄マウス 3 匹において歩行解析や rotarod 解析を行った。その結果、*TK2-Tg* マウスにおいて行動異常が認められた。運動能の低下は特に高コピーで遺伝子異常を発現するヘテロ接合性マウスにおいて認められ、コピー数が通常レベルのヘテロ接合性マウスでは、より軽微であった。このため、年度末に既に 95 週に達したマウスをさらに 5 匹解析する準備を行い、平成 28 年度 4 月に追加解析することになった。これらの結果を受けて、代表研究者によってライン 35 由来の凍結受精卵から、新しくマウスを出生させ、高コピーマウスをホモ接合性に有するマウスを維持することにし、年度末に受精卵からの個体発生に着手した。

4. その他

特記事項なし