

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 難治性神経変性疾患に対する神経シナプス形成を促進させるマイクロRNAの補充による新規治療法の開発と確立

2. 研究開発代表者： 北條 浩彦

3. 研究開発の成果

本研究の目的は、マイクロRNA (miRNA) の補充治療がハンチントン病 (HD) に代表されるポリグルタミン病などの神経変性疾患の治療に有効であることを証明し、新しい治療戦略として実現化するための基盤を築くことにある。これは、機能性RNA分子であるmiRNAの投与によってHDモデルマウス (R6/2 マウス) の症状が改善し、延命することを見出した最近の研究成果に基づくものである。本研究は、上記の目標達成のために大きく分けて3つの柱を中心に研究を推進する。まず、研究代表者 (北條) を中心に「①miRNA 補充による治療効果の検討と作用機序の解明」。研究分担者の岡田を中心に「②miRNA 発現ウイルスの作製と新しいDDS法に関する研究開発」、そして研究分担者の永井を中心に「③疾患モデルマウスの系統維持と治療マウスのin vivoイメージング解析」を推進する。当該年度の研究成果は下記の通りである：

①miRNA補充による治療効果の検討とその作用機序の解明：miRNA投与マウスの線条体からRNAとタンパク質を調整し、それらを用いてmiRNAと全遺伝子の網羅的遺伝子発現解析そしてタンパク質の比較定量解析を実施し、それらのデータを基に3層オミックス解析を実施した。具体的には、miRNA-AAV投与R6/2とWtマウス、そしてコントロールAAV投与R6/2とWt マウスの計4匹を1セットとして、3セットの比較検体を作成し、其々から試料を調整した。その内、2セット分については当該年度にオミックス解析を実施し、データを取得した。残りの1セットについては次年度にデータ取得を予定している。また、HD以外のモデル動物として脊髄小脳変性症 (SCA1) モデルマウスを解析し、発症前のSCA1マウスにおいても当該miRNAの発現低下を観察した。

②miRNA 発現ウイルスの作製と新しいDDS法に関する研究開発：遺伝子治療薬の規格決定に向け、miRNA 補充療法のためのmiRNA 発現 AAV ベクターの開発を実施した。精製したAAV8ベクターを用いて、培養細胞の系でmiRNAの発現と機能を確認した。また、AAVのゲノムを含まない中空粒子を用いた新しいDDS法の開発検討を行った。中空粒子へのmiRNAの取り込み条件を最適化するために、AAV中空粒子ないしAAVベクターのゼータ電位の測定を行った。その結果、中空粒子そしてAAVベクターともに精製度が十分高くないと散乱強度別粒度分布が単一にならず、そのためゼータ電位値が安定しない可能性が判明した。精製方法の違いにより測定値が異なることが示唆されたため、野生型ならびにTyr変異体中空粒子について、精製条件と最終的な溶媒の選択に関し現在検討を行っている。

③疾患モデルマウスの系統維持と治療マウスのin vivoイメージング解析：神経変性疾患モデルマウス (HD、SCA1、SBMAモデル) の系統を維持し、miRNA補充治療の実施スケジュールに合わせて治療適応年齢マウスの調整・供給を行った。また、SCA1マウスにおけるシナプス障害について、2光子レーザー顕微鏡を用いたライブイメージング解析を行い、発症前の4週齢からシナプスのターンオーバー率が有意に亢進し、シナプス成熟期に入っても異常亢進が持続することが明らかになった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いてシナプス微細形態の解析を行った結果、8-12週齢と週齢を重ねるに連れてシナプス密度が徐々に減少することが明らかになった。以上の結果から、SCA1マウスでは神経ネットワーク発達のシナプス成熟が遅延し、症状の進行と共にシナプス変性が出現・進行すると考えられた。

最後に、当該年度において本研究の基盤となる特許の出願を完了することができた。