

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Development of a new treatment for intractable neurodegenerative  
diseases by supplying microRNAs that are capable of promoting  
synaptic formation

研究開発担当者 (日本語) 神経研究所・室長・北條浩彦  
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Neuroscience/ Section Chief/ Hirohiko Hohjoh

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) miRNA 発現ウイルスの作製と新しい DDS 法に関する研究開発  
開発課題名： (英語) Development of miRNA expression vectors with a novel DDS

研究開発分担者 (日本語) 日本医科大学 大学院医学研究科 分子遺伝医学分野 大学院教授 岡田尚巳  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical  
School/Professor/Takashi Okada

分担研究 (日本語) 疾患モデルマウスの系統維持と In vivo イメージング解析  
開発課題名： (英語) In vivo imaging analysis and maintenance of disease-model mice

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科・教授・永井義隆  
所属 役職 氏名： (英語) Osaka University Graduate School of Medicine, Professor,  
Yoshitaka Nagai

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者：北條浩彦

我々は、ハンチントン病(HD)モデルマウスの脳内で顕著に減少する機能性 RNA(マイクロ RNA)、miR-132 を発見した。そして、その不足を補うために miR-132 発現 AAV を構築し、HD マウス脳内に投与した。その結果、明らかな運動機能の改善と有意な延命効果を観察した。さらに、その改善は、疾患の原因である異常型ハンチンチンの阻害・抑制を伴わないことも見出した。これらの発見は、HD に今までにない新しい治療アプローチを提供すると考えられる。我々はそれに基づき、本研究開発期間で新しい治療法の開発と確立を目指した基盤研究を推進した。そして、miR-132 補充による改善効果の作用機序の解明と新しい核酸医薬の送達方法の開発を行った。その結果、基盤となる作用機序(新しい病態)の解明が進み、予想もしていなかった RNA 結合タンパク質と当該 miRNA が関わる翻訳制御不全が病態に関わる可能性を示唆した。また、HD マウスと同様のポリグルタミン病モデルマウスである脊髄小脳変性症 1 型(Spinocerebellar Ataxia type 1: SCA1)モデルマウスの解析から、当該 miRNA の発現減少とシナプス成熟の遅延を見出し、晩発性神経変性疾患において発達期のシナプス成熟障害が神経機能障害の根底にあることを示唆した。これらの研究成果は、ポリグルタミン病の病態理解と治療戦略に有益なヒントを提供する成果であったと考える。AAV 中空粒子を用いた新しい核酸送達法の開発に関しては、人工核酸の取り込みに有効なパッケージング配列を決定することができた。最後に、本研究期間内に、達成目標の一つであった本研究に関する基盤特許を出願することができた。

We found a marked decrease in miR-132, which is a functional non-coding RNA (*i.e.*, microRNA or miRNA), in the brain of Huntington's disease (HD) model mice, and also demonstrated a significant amelioration in HD model mice that were subjected to miR-132 supplemental therapy by using an adeno-associated virus (AAV) miRNA expression system: miR-132 supplementation into HD mouse brain brought about a slow disease progression or symptomatic improvements of the motor functions and lifespan of HD mice. Based on these, our research project has been conducted to see the underlying mechanism by which such symptomatic improvements were produced, and to develop a new drug delivery system (DDS) of synthetic nucleotides for establishment of a better treatment for HD. Our findings suggested that certain RNA binding protein and miR-132 deficiency might be involved in HD pathogenesis through their affected translational dysregulation. From studies using model mice with Spinocerebellar Ataxia type 1 (SCA1) that is a poly-glutamine disease as with HD, similar miR-132 deficiency as well as a delay of synaptic maturation were detected, thereby suggesting that synaptic maturation defect during brain development might be involved in neuronal dysfunction. The findings obtained from our research project could provide us with useful clues for pathophysiological conditions of poly-glutamine diseases and for a better therapeutic approach for the diseases. Regarding a new DDS using AAV hollow particles, we have determined packaging sequences capable of incorporating chemically-synthesized oligonucleotides into the viral hollow particles effectively. Finally, we have completed a patent application on the data related to the research project.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 5件、国際誌 5件)

1. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Sci. Rep.* 2016, 6, 31172.
2. Ishiguro T, Sato N, Ueyama M, Fujikake N, Sellier C, Kanegami A, Tokuda E, Zamiri B, Gall-Duncan T, Mirceta M, Furukawa Y, Yokota T, Wada K, Taylor JP, Pearson CE, Charlet-Berguerand N, Mizusawa H, \*Nagai Y, Ishikawa K. Regulatory role of RNA chaperone TDP-43 for RNA misfolding and repeat-associated translation in SCA31. *Neuron.* 2017, 94(1), 108-124.
3. Tomioka I, Ishibashi H, Minakawa EN, Motohashi HH, Takayama O, Saito Y, Popiel HA, Puentes S, Owari K, Nakatani T, Nogami N, Yamamoto K, Noguchi S, Yonekawa T, Tanaka Y, Fujita N, Suzuki H, Kikuchi H, Aizawa S, Nagano S, Yamada D, Nishino I, Ichinohe N, Wada K, Kohsaka S, \*Nagai Y, Seki K. Transgenic monkey model of the polyglutamine diseases recapitulating progressive neurological symptoms. *eNeuro.* 2017, 4(2), ENEURO.0250-16.2017.
4. Ito N, Sakai A, Miyake N, Maruyama M, Iwasaki H, Miyake K, Okada T, Sakamoto A, Suzuki H. miR-15b mediates oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain through BACE1 down-regulation. *Br J Pharmacol.* 2017, 174(5), 386-395.
5. Takahashi M., Fukuoka M., Yoshioka K., Hohjoh H. Neighbors' death is required for surviving human adenocarcinoma PC-9 cells in an early stage of gefitinib treatment. *BBRC.* 2016, 479, 393-397.
6. 武内敏秀, 永井義隆. エクソソームによる生体内のタンパク質恒常性の維持. *細胞.* 2016, 48 (1), 5-8.
7. 武内敏秀, 永井義隆. エクソソームを介したプロテオスターシス維持機構と神経変性疾患. *Dementia Japan.* 2016, 30 (3), 368-376.
8. 永井義隆, 田港朝也. 神経変性機序と治療展望. *Mebio.* 2016, 33 (11), 62-70.
9. 鈴木マリ, 永井義隆. ショウジョウバエを用いた神経疾患研究. *生体の科学.* 2016, 67(6), 589-595.
10. 北條浩彦. デジタル PCR 革命. *実験医学.* 2016, 34, 1298-1306.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 神経障害性疼痛における miR-17-92 クラスターによるカリウムチャネルの調節 Modulation of potassium channel expressions by miR-17-92 cluster in the neuropathic pain, 口頭, 坂井敦、丸山基世、三宅紀子、齋藤文仁、三宅弘一、島田隆、岡田尚巳、鈴木秀典, 第 38 回日本疼痛学会, 北海道立道民活動センター, 2016 年 6 月 25 日, 国内
2. 一次感覚神経節 miR-15b のオキサリプラチン誘発性神経障害性疼痛における解析 Analysis of miR-15b in the dorsal root ganglion in oxaliplatin-induced neuropathic pain, 口頭, 黒木直美、

- 坂井敦、三宅紀子、三宅弘一、岡田尚巳、鈴木秀典、坂本篤裕、第 63 回日本麻酔科学会、福岡国際会議、2016/5/28、国内
3. miR-15b role in the oxaliplatin-induced neuropathic pain. 口頭, Atsushi Sakai, Naomi Ito-Kuroki, Motoyo Maruyama, Noriko Miyake, Hiroto Iwasaki, Koichi Miyake, Takashi Okada, Atsuhiko Sakamoto, Hidenori Suzuki. 16th World Congress on Pain, Pacifico Convention Center, September 26-30, 2016, 国外
  4. Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子細胞治療, 口頭, 岡田尚巳, 第 2 回日本筋学会シンポジウム, 2016/08/06, 国内
  5. 筋ジストロフィーの遺伝子・細胞治療, 口頭, 岡田尚巳, 第 15 回日本再生医療学会総会シンポジウム, 2016/03/18, 国内
  6. Intercellular transmission of molecular chaperones via exosomes contributes to maintenance of organismal protein homeostasis. ポスター, Takeuchi T, Suzuki M, Fujikake N, Popiel HA, Kikuchi H, Sakai S, Futaki S, Wada K, Nagai Y. 2016 CSH Asia meeting: Biology & Function of Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles & Beyond. 2016/12/12-16, 国外.
  7. ショウジョウバエモデルを用いた神経変性疾患研究. 口演, 永井義隆. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21, 国内.
  8. SCA3 マーモセットモデルの作出. 口演, 富岡郁夫, 石橋英俊, 本橋秀之, 高山修, 皆川栄子, 齊藤祐子, 皆川栄子, ポピエル明子, プエンテスサンドラ, 山本和弘, 野口悟, 藤田尚子, 尾張健介, 中谷輝美, 西野一三, 和田圭司, 高坂新一, 永井義隆, 関和彦. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21, 国内.
  9. Non-cell autonomous therapeutic effects on polyQ disease models by exosomal chaperone transmission. 口演, 武内敏秀, 鈴木マリ, 藤掛伸宏, ポピエル明子, 菊地寿枝, 二木史朗, 和田圭司, 永井義隆. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21, 国内.
  10. QAI1, a polyglutamine protein oligomerization inhibitor, exerts disease-modifying therapeutic effect. 口演, 皆川栄子, ポピエルヘレナ明子, 他田正義, 高橋俊昭, 山根宏志, 齊藤勇二, 鈴木マリ, 岡本佑馬, 渡瀬啓, 足立弘明, 勝野雅央, 祖父江元, 戸田達史, 和田圭司, 小野寺理, 永井義隆. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21, 国内.
  11. Screening for polyglutamine aggregation inhibitors that suppress neurodegeneration in fly models. 口演, 齊藤勇二, 岡本佑馬, ポピエル明子, 藤掛伸宏, 戸田達史, 和田圭司, 永井義隆. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21, 国内.
  12. エクソソームを介した分子シャペロンの細胞間伝播によりポリグルタミン病モデルショウジョウバエに対して細胞非自律的な治療効果を発揮する. 口演, 永井義隆. 第 68 回日本細胞生物学会. 2016/6/15-17, 国内.
  13. Hsp70 の機能欠損体が示す細胞非自律的な変性抑制効果. 口演, 武内敏秀, 鈴木マリ, 坂井聖子, 二木史朗, 和田圭司, 永井義隆. 第 8 回日本 RNAi 研究会/第 3 回日本細胞外小胞学会. 2016/8/31-9/2, 国内.
  14. 神経変性疾患における血中エクソソームを利用したバイオマーカーの探索. ポスター, 金井雅裕, 武内敏秀, 鈴木マリ, 藤田寛美, 植田幸嗣, 永井義隆. 第 8 回日本 RNAi 研究会/第 3 回日本細胞外小胞学会. 2016/8/31-9/2, 国内.

15. シャペロンのエクソソーム分泌による細胞非自律的プロテオスタシス調節機構. 口演, 武内敏秀, 永井義隆. 第 89 回日本生化学会. 2016/9/25-27, 国内.
16. 異常タンパク質の凝集・蓄積と神経変性疾患. 口演, 永井義隆. 第 25 回日本神経学会近畿地区生涯教育講演会. 2017/3/5, 国内.
17. Difference in plasma circulating cell-free microRNAs between young and aged mice: Effects of miRNAs that are predominantly present in young mouse serum on myogenic differentiation in C2C12 cells and primary myoblasts, Poster, Fukuoka M., Ito N., Takeda S. and Hohjoh H, 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2016/10/19, 海外.
18. 若齢および老齢マウスの血中 miRNA 解析: 若齢マウスで見出された高発現 miRNA が C2C12 細胞およびマウス初代筋芽細胞に与える筋分化誘導効果、ポスター、福岡聖之、伊藤尚樹、武田伸一、北條浩彦、第 39 回日本分子生物学会大会、2016/12/1、国内.
19. 神経変性疾患治療剤、口頭、北條浩彦、H28 年度 medU-net アカデミックシーズ発表会、2016/8/19、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 遺伝子導入用ウイルスベクター開発の現状と今後の展望, 岡田尚巳, ヒューマンサイエンス振興財団 規制動向調査班, 2016/9/15, 国内.
2. AAV ベクターを用いた遺伝子治療の現状と展望, 岡田尚巳, バイオロジクスフォーラム第 13 回学術集会, 2016/2/29, 国内.

(4) 特許出願

特になし。