

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) RNA 異常配列による神経難病(SCA31)に対するヘテロ核酸医薬開発
(英語) Development of antisense oligonucleotide for spinocerebellar ataxia type 31.

研究開発担当者 (日本語) 石川欽也・東京医科歯科大学・教授
所属 役職 氏名： (英語) Kinya Ishikawa・Tokyo Medical and Dental University・Professor

実施期間： 平成28年4月1日～平成29年3月31日

II. 成果の概要(総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

2016年度は研究第2年目であり、マイルストーン2として掲げたモデルマウスにおいて核酸治療による非臨床 POC 取得を目指した研究を進めた。併行して別研究で開発に着手したモデルマウスの解析を進め、非臨床 POC に資する基盤的研究を進めた。

石川代表研究者と横田分担研究者らは、初年度に見出した多数の候補配列を用いて、培養 HeLa 細胞で RNA 配列の発現を抑制する配列を同定した。これらの内、最も効果のある配列から、モデルマウスの非臨床 POC 実験を進めた。生後8週から10週の時期のモデルマウスにおいて変異 RNA 配列が確かに発現していることを定量的 RT-PCR 法で確認した。野生型マウスで投与量を4段階に振り脳室内投与して最大投与量を決定したうえで、モデルマウスに同じ量を投与した。その結果、マイルストーン2で掲げた目標である定量的 RT-PCR 法で標的配列の発現が低下する所見が見られた。

SCA31 モデルマウスの表現型解析は、柳原分担研究者が中心となり実施した。本年度は生後45週から100週齢付近のマウスの歩行解析を行った。その結果、この時期のマウスでも既に rota rod 解析だけでなくトレッドミル歩行において異常が見いだされた。初年度にライン A のマウスは生後100~110週齢で歩行状態の異常を見出していたため、60週齢のマウスが100週齢に至った時により歩行能力が増悪するかを検証した。

また、生後 8~10 週齢の若年マウスにアンチセンス核酸を投与することから、この時期のモデルマウスの歩行も解析した。その結果、個体差が見られたものの複数のモデルマウスで、同腹野生型マウスよりも歩行能力の低下を認めたため、モデルマウスでの異常を確認した。次年度でより多数の生後 8~10 週齢のモデルマウスについて歩行解析を行うこととし、この時期での POC 実験を進めることにした。

英文

Spinocerebellar ataxias are an autosomal dominant neurodegenerative disorders that cardinally show progressive cerebellar ataxia. More than 30 different gene mutations have been identified. Among these, SCA31 is a unique form showing a strong founder effect. Indeed, SCA31 is found exclusively in Japanese. The cause of this disease is a complex penta-nucleotide repeat expansion containing (TGGAA)_n in an intronic region shared by two genes called BEAN1 (brain-expressed associated with NEDD4) and TK2 (thymidine kinase 2). SCA31 clinically shows purely cerebellar syndrome with Purkinje cell dominant degeneration. Within the nuclei of Purkinje cells, abnormal structure of RNA containing mutated pentanucleotide repeats is seen.

Toward the development of fundamental therapy for SCA31, we created transgenic mice that overexpress SCA31 mutated gene. In the present study, we found that the abnormal RNA structures as seen in patient brains are seen in these mice. Phenotype analysis on the SCA31 model mice revealed that these mice show abnormal walking behavior from 10 weeks of their ages. Similar walking abnormalities are seen more obviously in 45 and 100 weeks of ages.

We designed and tested multiple antisense oligonucleotides that interferes expression of SCA31 genes. After selecting efficient ASOs, we tested several ASOs in the SCA31 model mice.

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 0 件、国際誌 3 件)

1. 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 Apr 5;94(1):108-124.e7. 10.1016/j.neuron.2017.02.046.
2. Soga K, Ishikawa K*, Furuya T, Iida T, Yamada T, Ando N, Ota K, Kanno-Okada H, Tanaka S, Shintaku M, Eishi Y, Mizusawa H, Yokota T. Gene dosage effect in spinocerebellar ataxia type 6 homozygotes: A clinical and neuropathological study. *J Neurol Sci*. 2017 Feb 15;373:321-328. (*:corresponding author)
3. Ishibashi K, Miura Y, Ishikawa K, Zhang MR, Toyohara J, Ishiwata K, Ishii K. Relationship between type 1 metabotropic glutamate receptors and cerebellar ataxia. *J Neurol*. 263(11):2179-2187. 2016

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
特になし

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

- (4) 特許出願
該当なし