

RNA結合タンパク質を標的にした ポリグルタミン病に対する病態解明と治療法開発



大阪大学大学院医学系研究科神経遺伝子学 特任助教 宮崎 雄

【はじめに】

ポリグルタミン病は遺伝性の神経難病として知られ、歩行の障害（脊髄小脳失調症）、自分の意思によらず身体の一部が動く不随意運動や認知症（ハンチントン病）などの症状を生じます。ポリグルタミン病は脊髄小脳失調症1型（SCA1）、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、SCA17、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病などが該当します。これらの中でもSCAは、遺伝性と孤発性の双方を含めると本邦における患者数が約30,000人と多いにもかかわらず、現在のところ有効な治療法は存在しません（出典：難病情報センター）。これには、ポリグルタミン病の病気のメカニズムが依然として未解明であり、ゆえに根治療法の鍵となる標的因子が不明であることが一因としてあげられます。

我々はこれまでに、ポリグルタミン病の球脊髄性筋萎縮症と脊髄小脳失調症6型において、リボ核酸（RNA）の代謝異常が病気の発症に強く関与していることを明らかにしてきました（Miyazaki Y, *et al. Nature Medicine*, 2012, Miyazaki Y, *et al. Science Translational Medicine*, 2016）。その過程で、いくつかのポリグルタミン病原因遺伝子のメッセンジャーRNA（DNAに書き込まれた遺伝情報からタンパク質を作り出すための伝令役）に結合して分解を促進するRNA結合タンパク質CELF3を新たに見出しました。これは、CELF3が複数のポリグルタミン病の病気のメカニズムに関与している可能性を示唆するものであり、ポリグルタミン病に共通した治療法を開発できる潜在性があるという点に我々は着目しました。一方、CELF3は脳や脊髄といった中枢神経系と精巣に特異的に産生されるタンパク質であることがすでに知られていますが、CELF3が本来もつ生理的な機能や、中枢神経系の組織が障害されるポリグルタミン病との関連はこれまでに報告が皆無であり、詳細は不明のままでした。

【研究の目的】

今回の研究では、1）CELF3が結合するRNAを網羅的に同定すること、2）CELF3を欠失したマウス（CELF3ノックアウトマウス：CELF3 KOマウス）を解析しCELF3が本来もつ生理的な機能を明らかにすることを目的としました。さらに、3）ポリグルタミン病をはじめとする神経難病に対するCELF3の関与の可能性について結論を導き出すことを最終目標としました。

【研究の方法】

1）神経系の培養細胞であるNeuro2a細胞を用いて、CELF3に結合するRNAを回収し、網羅的な結合遺伝子の同定と1塩基レベルで結合部位を決定できるPAR-CLIP（Photoactivatable ribonucleoside-enhanced

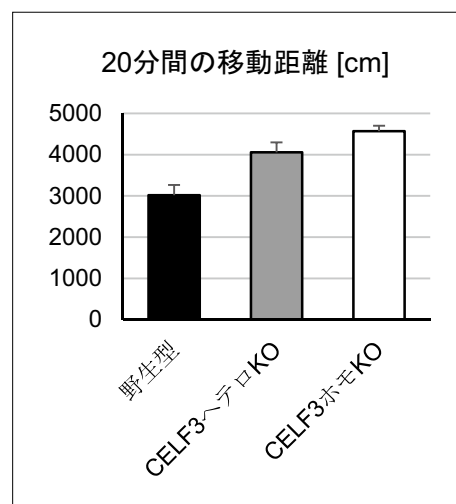
crosslinking and immunoprecipitation) 法を行いました。

2) ゲノム編集技術CRISPR-Cas9によってCELF3 KOマウスを作製した。その後、マウス行動解析機器を用いて、CELF3 KOマウスの運動機能（行動距離など）や高次脳機能（記憶力や、マウス同士の反応パターン）を解析しました。

【研究の結果と今後の方針】

1) 現在、CELF3抗体を用いたPAR-CLIP法を確立し、CELF3-RNA複合体の回収に成功しました。今後、RNAを単離し、CELF3に結合したRNAの情報解析を行う予定です。

2) これまでの行動解析において、2か月齢のCELF3 KOマウスが明瞭な多動性を呈することを見出しました(右図)。今後、運動機能に加えて、高次脳機能を解析して詳細を詰めていく方針です。次に、CELF3 KOマウスの中枢神経組織を用いた病理学的解析により、行動異常の原因となる中枢神経組織内の部位を特定します。特にCELF3の発現が強くみられる脳内の部位(海馬など)に焦点を当て病理学的な染色を行い、神経細胞の数や位置などを評価し、行動異常の原因となる部位の絞り込みを行っていきます。



研究開始当初、ポリグルタミン病とCELF3の関連性を想定していましたが、CELF3 KOマウスが脳の発達段階の異常として特徴的な多動性を示したことより、CELF3欠失による脳機能障害が、若年期においては神経発達段階の障害にみられる病態を反映しているのではないかという解釈に至りました。今後、CELF3 KOマウスの行動解析を長期にわたり継続し、マウスの成体期から老齢期にかけてポリグルタミン病に特徴的な症状が出現しないかを慎重に検討していく計画です。

上記のように、培養細胞とマウスの実験結果を統合して、CELF3が神経発達の過程やポリグルタミン病などの神経難病においてどのようなRNA代謝経路をコントロールし脳の発達や病気の発症に寄与しているのかを解明できるものと考えています。

【謝 辞】

このような研究機会を頂いた難病医学研究財団ならびにご支援を賜りました方々に深く感謝申し上げます。貴財団からの研究助成金は上記のような研究結果を得ることにつながりました。今後、さらに研究を発展させ、研究成果を学術論文として海外医学誌に投稿したいと考えております。ここに謝意を表します。

また、抗Celf3抗体産生ハイブリドーマ細胞（RCB4684）をご供与頂きました中川真一先生（北海道大学大学院 薬学研究院教授）に深く感謝申し上げます。