

## 審査の結果の要旨

氏名 赤芝 洋紀

脊髄小脳変性症6型(Spinocerebellar ataxia type 6; SCA6)は小脳プルキンエ細胞の選択的な脱落により主に運動失調を呈する優性遺伝性神経変性疾患の一つである。変異アレルでは電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルの  $\alpha 1A$  サブユニットをコードする *CACNA1A* 遺伝子のエクソン 47 における CAG リピートが伸長していることが見出された。SCA6 の特徴としてこの CAG リピート部位の翻訳が *CACNA1A* 遺伝子のエクソン 46 / エクソン 47 境界領域のオルタナティブスプライシングに依存していることが挙げられる。マウス *Cacna1a* 遺伝子エクソン 47 開始領域には AGGGCAGTAG 配列が存在し、どの AG をスプライスアクセプターとするかによって3種類の異なるスプライスアイソフォーム MPI, MPc, MPII が形成される。このうちヒト由来配列のエクソン 47 に存在する CAG リピートがポリグルタミンとして翻訳されるのは MPI が形成された場合のみである。過去に SCA6 患者の小脳プルキンエ細胞由来の cDNA を用いた定量リアルタイム PCR 解析において正常人と比較して MPI 発現量が増大することが観察され、SCA6 変異が同領域のスプライスパターンに影響を及ぼすことが示唆された。

これらの結果から、本研究では「SCA6 変異が *Cacna1a* 遺伝子のエクソン 47 開始領域のスプライス効率に変化を及ぼして MPI の相対的発現量を増大させ、結果的に伸長ポリグルタミン鎖を有する変異タンパク質の発現増大と蓄積に伴って SCA6 病態発症に関わる」との仮説を提唱した。本仮説に基づき、同領域におけるオルタナティブスプライシングの制御メカニズムを解明し、スプライス効率を変化させる因子を探索して SCA6 の治療戦略の手がかりを得ることを本研究の目的とした。

### 1. *Cacna1a* ゲノム DNA 断片の CAG リピート伸長に伴うスプライシングの変化

*Cacna1a* 遺伝子のエクソン 46-47 領域のスプライシングを評価するため、*Cacna1a* ゲノム DNA のイントロン 44-エクソン 47 領域を含むミニジーン SS19-2 を培養細胞へ導入する系を構築した。マウス由来配列には CAG リピートが存在しないため、ヒト由来配列を持つ  $\alpha 1A$  cDNA から 11 個、30 個、72 個の CAG リピートとその周辺配列を制限酵素 *SacII* で切り出して SS19-2 のエクソン 47 へ挿入し、SS19-2(11Q), SS19-2(30Q), SS19-2(72Q)とした。その結果、SS19-2(72Q)導入群において SS19-2, SS19-2(11Q), SS19-2(30Q)導入群と比較して MPI の発現比率が有意に増大し、MPc の発現比率が有意に減少した。MPII の配列を持つクローンは観察されなかった。よって SS19-2 の CAG リピート伸長によって *Cacna1a* 遺伝子エクソン 47 開始領域のスプライスパターンが変化することが示唆された。

次にこのスプライスパターン変化のメカニズムについて、スプライソーム構成分子の SR (Serine-Arginine rich)タンパク質に着目した。SR タンパク質はエクソン内の特異的配列への結合に伴うイントロンの構造変化、除去を介してスプライシングを調節することが知られ、SR タンパク質の発現変動に伴うスプライス機能不全がいくつかの神経変性疾患に関わることが示唆されている。SR タンパク質の中で、SRp75 のみが SS19-2 に含まれる CAG リピートの伸長に伴い発現量が増大することを確認した。ノーザンブロット法により、この CAG リピート伸長に伴う SRp75 の発現増大は転写レベルで起きていることも確認した。SRp75 と *Cacna1a* 遺伝子エクソン 47 開始領域のスプライスパターンとの関連を探るため、PC12 細胞に各ミニジーンと SRp75 siRNA を共導入して内在性の SRp75 の発現を約 80%低下させた際のスプライスアイソフォームの比率を算出した。その結果、SS19-2(72Q)導入時の MPI, MPc の比率は SRp75 siRNA 導入により共に SS19-2(11Q)導入時と同等のレベルにまで抑制された。また SRp75 プラスミド DNA を SS19-2 と共導入して SRp75 を強制発現させた場合、MPI の発現比率が増大することを見出した。以上の結果より、*Cacna1a* 遺伝子の CAG リピート伸長に伴うエクソン 47 開始領域のスプライスパターンの変化に SR タンパク質の一つ SRp75 の転写促進が関与していることが示唆された。

## 2. SCA6 変異によるエクソン 47 開始領域のスプライシング変化の薬理的解析

CAG リピート伸長に伴うスプライシングの変化を回復させる薬物を過去に報告のあるものから探索し、本現象を薬理的に解析した。定量的リアルタイム PCR 法により MPI, MPc, MPlI の mRNA 量を個別に定量評価する系を構築して解析したところ、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)阻害薬の Sodium Butyrate (SB)の処置によって SS19-2(72Q)導入時の MPI 発現量が有意に低下し(Fig.3A)、また MPI / MPc の発現比率は SB の処置によって SS19-2(11Q)導入時とほぼ同等のレベルにまで抑制された。さらに SB 処置群における SRp75 の発現を解析したところ、SS19-2(72Q)導入群における SRp75 の発現増大は SB の共添加によって mRNA レベル、タンパク質レベルともに SS19-2(11Q)導入群と同程度にまで抑制された。さらに上記の SB のオルタナティブスプライシングへの回復作用は SRp75 を強制発現させることによって一部が解除された。以上の結果より、SB は CAG リピート伸長に伴う *Cacna1a* 遺伝子エクソン 47 開始領域のスプライシング変化を回復させる作用を有し、この作用に SRp75 の発現量の増大抑制が関与することが明らかとなった。

## 3. Sca6 ノックインマウスを用いた個体動物レベルにおけるスプライシングの解析

上記現象を個体レベルで確認するため、*Cacna1a* 遺伝子のエクソン 47 にヒト *CACNA1A* 遺伝子エクソン 47 由来の CAG リピート 14 個、84 個とその周辺配列をゲノムノックインした Sca6 ノックインマウス(14Q マウス、84Q マウス)を用いて解析を行った。SCA6 において特に神経変性が著明な小脳で SR タンパク質の発現量をイムノブロット法により解析したところ、84Q ホモ型において SRp75 の発現量が同腹の野生型マウスと比較して増大していることが確認された。この変化は大脳皮質では認められず、また 14Q ホモ型マウス小脳での SRp75 の発現量は同腹の野生型マウスと比較して変化は認められなかった。さらに 84Q ホモ型の小脳における *Cacna1a* 遺

伝子エクソン 47 開始領域のスプライスアイソフォームの比率をシーケンス解析によって算出したところ、14Q ホモ型と比較して MPI の比率が増大し、逆に MPc の比率が有意に減少する結果が得られた。

次に SB の同領域へのスプライス回復作用を個体動物レベルで検討した。84Q ホモ型マウスの給水中に SB を 2.0 mg/ml で加え 2 週間または 4 週間慢性投与した。投与完了後に小脳由来の cDNA、タンパク質を用いて解析した結果、まず 84Q ホモ型における SRp75 タンパク質の発現増大が同腹の野生型マウスと同程度のレベルにまで抑制された。定量的リアルタイム PCR 法により MPI 発現量を定量評価したところ、SB の慢性投与によって MPI 発現量が有意に減少した。さらに SB 投与群の小脳における *Cacna1a* 遺伝子エクソン 47 開始領域のスプライスアイソフォームの比率をシーケンス解析によって算出したところ、84Q ホモ型におけるスプライスパターンの変化が回復することを見出した。以上の結果より、Sca6 ノックインマウスの小脳においては、*Cacna1a* 遺伝子の CAG リピート伸長によって SRp75 の発現が増大し、エクソン 47 開始領域のスプライスパターンが変化すること、そして SB は SRp75 の発現増大を抑制させてスプライシングの変化を回復させることが示唆された。

#### 4. SCA6 患者剖検脳を用いたスプライシングの解析

これまで細胞モデル、個体動物レベルで認められた SRp75 の発現変化、オルタナティブスプライシングの変化が SCA6 患者小脳でも認められるか否かを検討した。SCA6 患者剖検脳の小脳抽出物を用いて解析したところ、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、血管障害患者の対照群と比較して SRp75 の発現がタンパク質レベル、mRNA レベルともに増大する傾向が観察された。また患者由来の cDNA を用いて解析した結果、SCA6 患者小脳においてはコントロール群と比較して MPI 型アイソフォームの比率が増大し、MPc 型アイソフォームの比率が減少する傾向が観察された。以上の結果より、SCA6 患者脳においても SRp75 の発現が変動し、*CACNA1A* 遺伝子エクソン 47 開始領域のスプライスパターンが変化している可能性が示唆された。

本研究では SCA6 の病態発症要因を遺伝子変異に伴うオルタナティブスプライシングの異常、という観点から捉え、SCA6 変異により *Cacna1a* 遺伝子エクソン 47 開始領域のスプライスパターンが変化することを明らかにした。また培養細胞への変異遺伝子導入、Sca6 ノックインマウス、SCA6 患者剖検脳の 3 つの実験系を組み合わせることで *Cacna1a* 遺伝子エクソン 47 領域のスプライシング機構における SRp75 の重要性を示唆した。SCA6 において遺伝子変異が自らのオルタナティブスプライシングのパターンを変化させて変異タンパク質の翻訳に直接影響を及ぼす可能性を示唆する。さらにこれら CAG リピート伸長に伴う SRp75 の発現増大、スプライシング変化が SB によって抑制されることを示し、本薬物が SCA6 治療薬のリードとなる可能性を示した。以上、本研究は、脊髄小脳変性症 6 型の病態解明を前進させ、さらには治療薬開発に結びつくものであり、博士(薬学)の学位に値すると認定した。