

アデノ随伴ウイルスによる乳児期発症神経変性疾患の低侵襲な遺伝子治療解析

【代表者】 荒木 亜寿香 島根大学 医学部附属病院 病理部 准教授

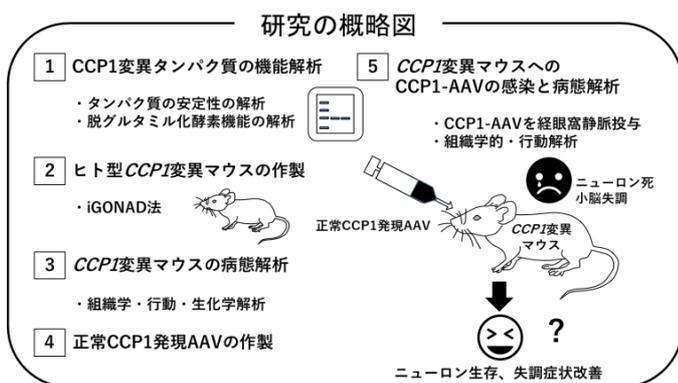
【研究の目的と内容】

本研究の目的および研究計画

【目的】 本研究の目的は、近年、新たな乳児期発症神経変性疾患として同定された *CCP1* 神経変性疾患に対して、低侵襲的に広範囲の中枢ニューロンに遺伝子導入可能なアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いて、*CCP1* 神経変性疾患モデルマウスや自然発症 *CCP1* 変異マウスなどに、正常型 *CCP1* を発現させてその病態進行を抑制できるかどうかを明らかにすることである。これにより、*CCP1* 神経変性疾患の遺伝子治療に繋がる重要な知見を得る。

【研究計画】 本研究では、アデノ随伴ウイルスを用いた生体内遺伝子導入によって *CCP1* 遺伝子変異に起因する小脳変性症の治療が可能かどうかを、ヒト疾患由来変異を含むさまざまな *CCP1* 変異モデルマウスで明らかにする。本研究は、図の研究概略に沿って進めていく。

【研究目的を達成するための準備状況】 これまでの研究で概略図 1, 2 及び 3 の組織学・生化学解析は終了している。研究に必要な解析ツールは申請者所属の教室に備わっている。現在、ヒト疾患 *CCP1* 変異マウスの作製も成功し、その行動解析が進行中である。今後、4. 正常 *CCP1* を発現する AAV 作製と 5. *CCP1*-AAV 感染実験を平行して行う予定であり、支援事業費は AAV 作製やマウス作製の実験試薬に充てる予定である。このように解析ツール、解析技術ともに本研究を遂行するための準備は十分であり、本研究の実現可能性は非常に高い。



【研究の成果（本研究によって得られた知見、成果、論文、学会発表、外部資金への応募見込み等）】 本研究により得られた知見

1. *CCP1* 変異蛋白質の機能解析

CCP1 遺伝子がコードする正常型 *CCP1* タンパク質 (FL) と、ATP/GTP 結合モチーフと酵素活性部位を残して可能な限り短縮した 3 種類の *CCP1* 変異型コンストラクト ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$) を作製し (図 1)、それらの機能解析を行った。*CCP1* タンパク質の機能の 1 つが脱グルタミル化酵素として働き、微小管の翻訳後修飾に関わることが明らかにされている。図 2 に示すように、*CCP1* FL により polyE tubulin は脱グルタミル化され、delta 2 tubulin のバンドが出現している。delta 2 tubulin のバンドは *CCP1* $\Delta 1$ で保たれているものの、 $\Delta 2$ 、 $\Delta 3$ ではバンドが薄くなっている。この結果を定量解析したものを図 3 に示す。*CCP1* $\Delta 1$ により脱グルタミル化された delta 2 tubulin の量は *CCP1* FL と有意差がない。この結果は正常型 *CCP1* 機能を持つ変異型コンストラクトに、*CCP1* $\Delta 1$ が候補になることを意味している。従って概略図 4 : 正常型 *CCP1* を発現する AAV 作製に *CCP1* $\Delta 1$ を使用することとする。

2. タンパク質の安定性の解析

まずヒト疾患においてすでに明らかとなっている *CCP1* 遺伝子の変異箇所より、マウス *CCP1* と同一性がある 2 か所の変異箇所から変異型コンストラクト *CCP1* R791C (disease mutation: human R799C) および *CCP1* Q848* (disease mutation: human Q856*) と、自然発症マウスモデルである AMS マウスが持つ変異型 *CCP1* タンパク質 (*CCP1* R866P, AMS mutation) を用い、それらタンパク質の安定性を解析した。方法として *CCP1* FL と 3 種の変異型 *CCP1* コンストラクトを過剰発現するように培養細胞 HEK239 へ電気穿孔法により遺伝子導入し、培養、蛋白分解阻害剤 (MG132) を添加後に培養細胞を回収し、それらの細胞溶

解液中のタンパク質を western blot 法により解析した。

図4に示すように、CCP1 FL では MG132 を添加することで CCP1 のバンドが増幅して見られる。しかし CCP1 R791C、CCP1 Q848*および CCP1 R866P では多少 CCP1 のバンドが濃く見られるものの、FL と比較すると薄い。現在この後定量解析できるよう、研究を遂行中である。

3. CCP1 変異型マウスの病態解析

自然発症マウスモデルである AMS マウスの病態解析として、ローターロッドテストを行い、失調歩行の有無を検討した。

図5に示すように野生型マウスと比較して、歩幅の不安定な歩行が AMS マウスに見られる。これは AMS マウスが失調性歩行という表現型を持つことを意味している。現在この定量解析に向けて研究準備中である。

4. ヒト CCP1 変異型マウスの作製

ヒト CCP1 変異遺伝子を持つマウスを iGONAD 法により作製した。しかし変異マウスの生産性が非常に低く、また生後直ぐに亡くなってしまふ、あるいは自然発症マウスと比較して、明らかに生後早期に失調性歩行が出現するといった状況である。現在ヒト CCP1 変異型マウスの安定的な生産に向けて研究遂行中である。

5. CCP1-AAV 感染実験

C57BL/6J の生後 1 日のマウスに、CCP1 Δ 1 を搭載した AAV を眼窩静脈叢より投与したところ、図6に示すように、小脳プルキンエ細胞に CCP1 が発現することを確認している。現在、ヒト CCP1 変異型マウスや自然発症モデルマウスである AMS マウスに対して CCP1-AAV 感染実験を遂行する準備を行っている。

論文発表

Bo Pang, **Asuka Araki**,*, Li Zhou, Hirohide Takebayashi, Takayuki Harada, Kyuichi Kadota: CCP1, a Regulator of Tubulin Post-Translational Modifications, Potentially Plays an Essential Role in Cerebellar Development. International Journal of Molecular Science, 2023, 24(6), 5335; <https://doi.org/10.3390/ijms24065335> (IF 6.208)

外部資金獲得

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）基盤研究(C)（一般）

課題番号 23K07311

補助助成機関 令和5年度～令和7年度

研究課題名：アデノ随伴ウイルスベクターによる乳児期発症神経変性疾患の低侵襲な遺伝子治療開発