

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

CANVAS 病態解明を目指した *RFC1* ノックアウトマウスの開発

研究代表者 土井 宏¹⁾
研究分担者 笹岡 俊邦²⁾, 田中 章景¹⁾

- 1) 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科学・脳卒中医学
- 2) 新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野

研究要旨

Cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome (CANVAS) は *RFC1* イントロンの主に AAGGG または ACAGG リピート配列の両アレル性伸長に起因し、小脳失調、末梢神経由来の固有感覚障害、前庭神経障害を主徴とする常染色体潜性(劣性)遺伝性疾患である。2022年に AAGGG リピート伸長とフレームシフトバリエーションの複合ヘテロ接合性にもつ CANVAS 患者が発見され、*RFC1* 機能喪失仮説が疾患原因として提唱されている。一方 AAGGG リピート症例と ACAGG リピート症例の間には臨床所見の差異が見られるなど、リピート依存的な毒性獲得による神経障害の可能性も否定できない。本研究では、*Rfc1* コンディショナルノックアウトマウスの作成を通じて機能喪失仮説を検証することを目的とし、研究を遂行する。

A. 研究目的

近年 Cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome (CANVAS) 患者において AAGGG リピート伸長とフレームシフトバリエーションの複合ヘテロ接合性にもつ CANVAS 患者が発見された。この遺伝学的研究から *RFC1* 機能喪失仮説が疾患原因として提唱されるに至っている。しかし一方で、両アレル性 AAGGG リピート伸長をもつ患者脳・末梢組織では *RFC1* の mRNA、*RFC1* タンパク質発現レベルに変化やスプライシング異常など *RFC1* 機能喪失を直接示す所見は証明されていない。さらに申請者らは両アレル性 AAGGG 伸長および ACAGG 伸長に起因する CANVAS の剖検 2 例の解析から、AAGGG リピート症例と ACAGG リピート症例の間には特に運動ニューロンにおいて病理学的な差異が見られることを見出し、リピート依存的な神経障害の可能性も否定はできない結果を得ている。これらの所見から、申

請者らは CANVAS の病態を *RFC1* の機能喪失のみで説明可能か、動物モデルを用いた検証が必要と考えるに至った。以上の背景から本研究では、*Rfc1* コンディショナルノックアウトマウス (*Rfc1*-CKO) の作成を通じて機能喪失仮説を検証することを目的とする。本研究では *Rfc1* の exon3 を flox 配列で挟み込んだ *Rfc1*-floxed マウスと全組織で Cre リコンビナーゼを発現する *Actb*-Cre マウスおよび薬剤(タモキシフェン)誘導性に神経細胞のみに Cre リコンビナーゼを発現する *Thy1.2*-Cre マウスを掛け合わせ、成長したマウスにタモキシフェンを投与して *Rfc1* を神経細胞のみでノックアウトする。この方法により神経細胞における *Rfc1* の先天的および後天的喪失が CANVAS で見られる神経細胞変性(Purkinje 細胞、後根神経節細胞)を引き起こすかについて検証することを目的とする。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

申請者らは機能喪失仮説を検証するため、*Rfc1*-floxed マウスの作成に着手している。本研究では *Rfc1*-floxed と全組織で Cre リコンビナーゼを発現する *Actb*-Cre マウスと掛け合わせることでどのような表現型を呈するか検証する。また、薬剤(タモキシフェン)誘導性に神経細胞のみに Cre リコンビナーゼを発現する *Thy1.2*-Cre マウス(入手済)を掛け合わせ、10-15 週程度に成長したマウスにタモキシフェンを投与して *Rfc1* を神経細胞のみでノックアウトし、Rotarod test、ビームテスト、Foot Stamp により失調症状を評価し、神経変性の有無、分布について病理学的に検討する。令和5年度は *Rfc1*-floxed の作成に着手し、年度末までに *Rfc1*-floxed ヘテロマウス (flox +/-) を取得することを目標とする。令和6年度以降、上記行動解析、病理学的解析を実施し令和7年度の成果報告を目指す。*Actb*-Cre は新潟大学脳研究所に提供いただいている。分担者笹岡俊邦教授は *Rfc1*-floxed マウスと各種 Cre マウスの交配計画について、専門的な見地からアドバイスをしている。

動物実験は横浜市立大学医学部等遺伝子組換え実験安全委員会の承認 (F-D-22-18-4) および動物実験委員会の承認 (F-A-22-068) を得ている。

C. 研究結果

本年度の予定通り *Rfc1*-floxed ヘテロマウス (flox +/-) を取得した。

D. 考察

Rfc1-CKO を用いた本格的実験は次年度以降に実施する。

E. 結論

CANVASにおける機能喪失仮説を検証することを目的とした *Rfc1*-CKO の土台となる *Rfc1*-floxed マウスの作成を行った。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. Wada T, Doi H, Okubo M, Tada M, Ueda N, Suzuki H, Tominaga W, Koike H, Komiya H, Kubota S, Hashiguchi S, Nakamura H, Takahashi K, Kunii M, Tanaka K, Miyaji Y, Higashiyama Y, Koshimizu E, Miyatake S, Katsuno M, Fujii S, Takahashi H,

Matsumoto N, Takeuchi H, Tanaka F. RNA Foci in Two bi-Allelic *RFC1* Expansion Carriers. *Ann Neurol* 95(3):607-613, 2024.

2. Ylikotila P, Sipilä J, Alapirtti T, Ahmasalo R, Koshimizu E, Miyatake S, Hurme-Niiranen A, Siitonen A, Doi H, Tanaka F, Matsumoto N, Majamaa K, Kytövuori L. Association of biallelic *RFC1* expansion with early-onset Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 30(5):1256-1261, 2023.

2. 学会発表

1. 土井宏, 大久保正紀, 深井綾子, 國井美紗子, 和田大司, 岸田日帯, 工藤洋祐, 山口滋紀, 高橋慶太, 多田美紀子, 宮武聡子, 伊藤泰広, 上田直久, 児矢野繁, 竹内英之, 松本直通, 田中章景: Analysis of genetic background of adult leukoencephalopathies. 第64回日本神経学会学術大会, 千葉、2023年6月.
2. 和田大司, 土井宏, 大久保正紀, 多田美紀子, 上田直久, 富永和奏, 小池春樹, 細田航平, 中村治子, 高橋慶太, 國井美紗子, 宮地洋輔, 東山雄一, 宮武聡子, 勝野雅央, 藤井誠志, 松本直通, 竹内英之, 田中章景: Pathological evaluations of patients of CANVAS with biallelic expansion of AAGGG and ACAGG repeats. 第64回日本神経学会学術大会, 千葉、2023年6月.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。