

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を複合ヘテロ接合性にもつ一群が発見された。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 発現、*RFC1* タンパク質レベルの低下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、リピート配列依存的な神経障害機構が存在する可能性が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 ホモマウス (*Rfc1*^{flox/flox}) を作成し、*Thy1.2*-Cre マウスとの掛け合わせにより *Rfc1*^{flox/+};*Thy1.2*-Cre マウスを作成した。

D. 考察

令和7年度は、*Rfc1*^{flox/+};*Thy1.2*-Cre マウスと *Rfc1*^{flox/flox} を掛け合わせることで実験に使用するマウスを作成し、行動解析、病理学的解析を実施して、成果報告を目指す。

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*^{flox/flox} および *Rfc1*^{flox/+};*Thy1.2*-Cre 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

該当なし。

2. 学会発表

1. 森下良志, 中村治子, 後藤友梨香, 和田大司, 古宮裕泰, 大久保正紀, 橋口俊太, 松本直通, 森本悟, 岡野栄之, 土井宏, 田中章景: Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome (CANVAS) の iPSC 由来感覚ニューロンの樹立と解析. 日本小脳学会第15回学術大会・総会, 東京, 2025年3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。