

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09310

研究課題名(和文) ALS/FTLDの高次機能障害におけるadult neurogenesisの役割

研究課題名(英文) Adult neurogenesis in the mouse models of ALS/FTLD

研究代表者

石垣 診祐 (Ishigaki, Shinsuke)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：40378170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ALS/FTLDの原因遺伝子であるFUSの発現抑制がタウisoformの発現変化を通じて、抑制後6週間で海馬のadult neurogenesisを低下させ、FTLD様の情動異常を呈し、18ヶ月以上の長期観察によって、リン酸化タウの蓄積、神経脱落を呈する。ヒト野生型FUS発現によってこれらのフェノタイプは回復したが、ALS/FTLDに認められる変異R521Gを有するヒトFUSの発現では回復しなかった。以上のことからタウisoformを介したadult neurogenesisはFTLDにおいて神経脱落を呈する前の神経機能の異常を反映しているものと考えた。

研究成果の概要(英文)：Fused in sarcoma (FUS) and splicing factor, proline- and glutamine-rich (SFPQ) are RNA binding proteins that regulate RNA metabolism. We found that alternative splicing of the Mapt gene at exon 10, which generates 4-repeat tau (4R-T) and 3-repeat tau (3R-T), is regulated by interactions between FUS and SFPQ in the nuclei of neurons. Hippocampus-specific FUS- or SFPQ-knockdown mice exhibit frontotemporal lobar degeneration (FTLD)-like behaviors, reduced adult neurogenesis, accumulation of phosphorylated tau, and hippocampal atrophy with neuronal loss through an increased 4R-T/3R-T ratio. Normalization of this increased ratio by 4R-T specific silencing resulted in recovery of the normal phenotype. These findings suggest a biological link among FUS/SFPQ, tau isoform alteration, and phenotypic expression, which may function in the early pathomechanism of ALS/FTLD.

研究分野：神経内科

キーワード：Adult neurogenesis FTLD ALS tau FUS SFPQ

1. 研究開始当初の背景

成体神経新生 (adult neurogenesis) はヒトやマウスにおいて海馬歯状回、側脳室下帯、線条体、嗅球などで成体において認められる新規神経産生の現象であるが、神経変性疾患との関わりは多くが不明であった。

2. 研究の目的

ALS/FTLD の高次機能障害における成体神経新生 (adult neurogenesis) の役割の解明をマウスモデルと ALS/FTLD 剖検脳における検討から行い、病態解明と治療法開発の一助とする。

3. 研究の方法

ALS/FTLD の原因遺伝子である FUS を全海馬で抑制したマウスモデルでは FTLD 様の情動異常を来す (図 1) が、同時にタウ isoform の発現変化を介して海馬歯状回における adult neurogenesis を抑制する。この知見をもとに本研究では神経幹細胞特異的な FUS 発現回復および 4-repeat Tau 抑制 (タウ isoform の発現正常化) による adult neurogenesis のレスキューを行うマウスモデルを作成し、これらのレスキューモデルにおいて高次脳機能障害が回復するか検討する。

FUS KDマウスの表現型

高次機能解析	結果
Y maze	有意差なし
Elevated plus maze	open areaへのEntry数が多く、滞在時間が長い
Open field	total およびouter areaの移動距離が長い
Novel object recognition	investigationの時間が長い
Fear conditioning	有意差無し
Social interaction	interactionが増加、Fightingの頻度が多い

まとめ: 不安欠如、脱抑制、多動

FTLDのphenotypeのある部分を表している

図 1

FUS KD マウスでは情動を中心とした高次脳機能障害を来す。これは実際の FTLD 患者に認められる行動以上に類似していると考えられる。

4. 研究成果

ALS/FTLD の原因遺伝子である FUS の発現抑制がタウ isoform の発現変化を通じて、抑制後 6 週間で海馬の adult neurogenesis (成体神経新生) を低下させ、FTLD 様の情動異常を呈することを確認した (図 2)。ヒト野生型 FUS 発現によってこれらのフェノタイプは回復したが、ALS/FTLD に認められる変異 R521G を有するヒト FUS の発現では回復しなかった

(図 3)

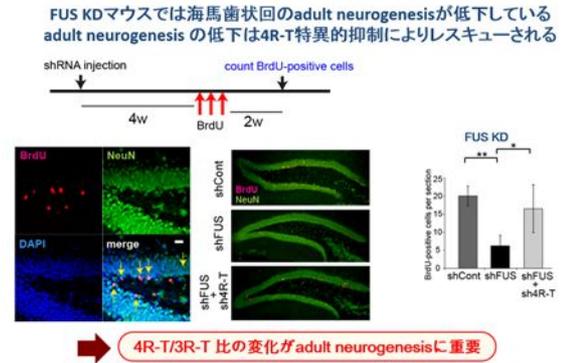


図 2

成体神経新生 (adult neurogenesis) を BrdU 投与による増殖細胞への取り込みを指標にして定量した。FUS KD マウスでは海馬歯状回における adult neurogenesis が抑制された。この変化は、FUS 抑制によって生じる 4-repeat Tau の増加を 4-repeat Tau 特異的な shRNA を用いて正常に戻すことで、レスキューされた。

FUS^{WT} overexpressionによりshFUSによるadult neurogenesisの低下は回復するがFUS^{R521G} overexpressionでは回復しない

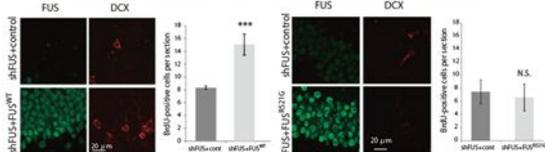


図 3

FUS KD マウスで低下していた adult neurogenesis はヒト野生型 FUS の発現によってレスキューされた。しかし、ALS/FTLD に認められる変異 R521G を有するヒト FUS の発現では回復しなかった

また FUS と核内で結合したタウ isoform の発現変化を制御する SFPQ についても同様に FUS 抑制マウスと近似した情動異常、adult neurogenesis の低下を認め、これらは SFPQ の抑制によって生じる 4-repeat Tau の増加を 4-repeat Tau 特異的な shRNA を用いて正

常に戻すことで、レスキューされた(図4)

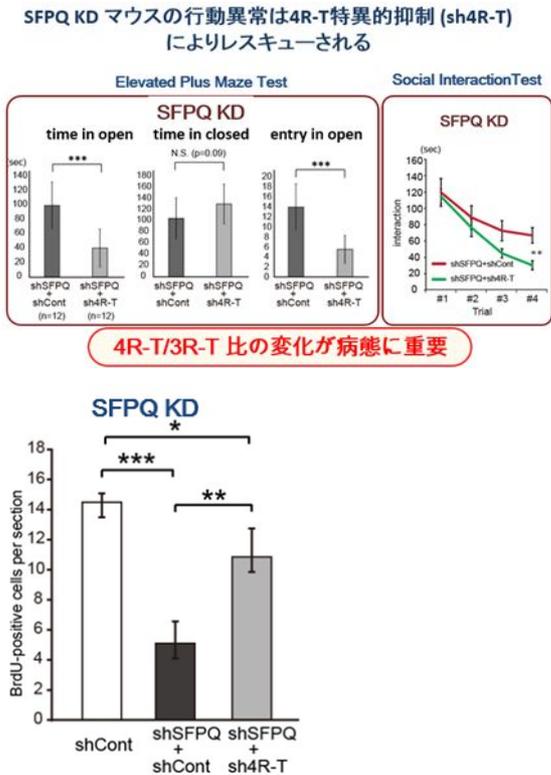


図4

FUS と核内で結合シタウ isoform の発現変化を制御する SFPQ についても同様に AAV を用いて海馬特異的抑制マウスを作成したところ FUS KD マウスと近似した情動異常(上)、adult neurogenesis の低下を認めた(下)。これらのフェノタイプは SFPQ の抑制によって生じる 4-repeat Tau の増加を 4-repeat Tau 特異的な shRNA を用いて正常に戻すことで、レスキューされた。

以上の高次脳機能の異常は FUS もしくは SFPQ を AAV injection によって shRNA を発現させることによって生じたものであるが、いずれの実験も injection して 6 週後の早期に解析を行ったものであり、疾患の非常に早期の症状を反映しているものと考えられた。これらのマウスモデルについて長期観察をおこなったところ、1 年経過した時点で FUS 抑制マウスでは、マンガン MRI によって海馬の過興奮が生じていることを確認した(図5)

FUS KD マウスは長期観察(12ヶ月)で海馬過興奮を呈する

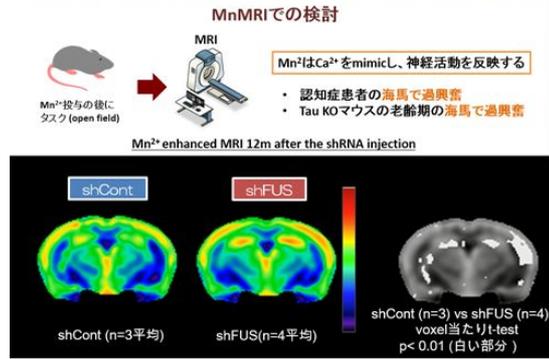


図5

FUS KD マウスについてマンガン MRI を AAV injection 後 12 ヶ月経過して時点で施行したところ、海馬で過興奮が生じていることが明らかになった。

海馬の過興奮はアルツハイマー病などヒトの認知症患者で認められることが知られており、FUS KD マウスモデルでも神経脱落が生じる前の神経細胞の活動異常を反映しているものと考えられた。

さらに 18 ヶ月以上の長期観察によって、FUS 抑制マウスは海馬におけるリン酸化タウの蓄積、神経脱落を呈した。これらはヒト野生型 FUS 発現によってこれらのフェノタイプは回復したが、ALS/FTLD に認められる変異 R521G を有するヒト FUS の発現では回復しなかった。

以上のことからタウ isoform を介した adult neurogenesis は FTLD において神経脱落を呈する前の神経機能の異常を反映しているものと考えた(図6)

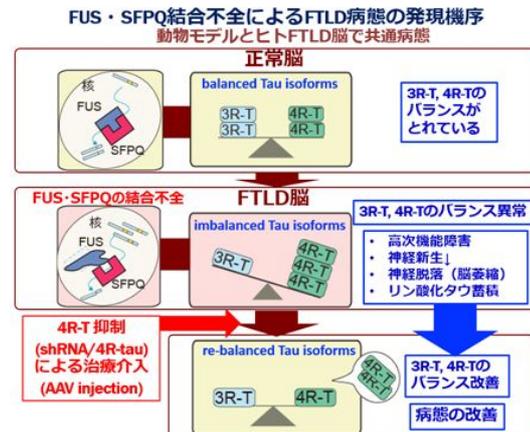


図6

FUS KD マウス、SFPQ KD マウスの病態機序のまとめ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件、すべて査読あり)

1. Riku, Y., Watanabe H., Yoshida M., Mimuro M., Iwasaki Y., Masuda M., Ishigaki S., Katsuno M., and Sobue G. (2017). Pathologic Involvement of Glutamatergic Striatal Inputs From the Cortices in TAR DNA-Binding Protein 43 kDa-Related Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 76, 759-768.
2. Endo, K., Ishigaki, S.*, Masamizu Y., Fujioka, Y., Watakabe A., Yamamori T., Hatanaka N., Nambu A., Okado, H., Katsuno, M., Watanabe H., Matsuzaki M., and Sobue, G. (2017). Silencing of FUS in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) brain via stereotaxic injection of an adeno-associated virus encoding shRNA. *Neurosci Res* in press. (*corresponding author)
3. Yokoi, S., Udagawa, T., Fujioka, Y., Honda, D., Okado, H., Watanabe, H., Katsuno, M., Ishigaki, S.*, and Sobue, G. (2017). 3'UTR length-dependent control of SynGAP isoform $\alpha 2$ mRNA by FUS and ELAV-like proteins promotes dendritic spine maturation and cognitive function. *Cell Rep* 20, 3071-3084. (*corresponding author)
4. Parekh P.K., Becker-Krail D., Sundaravelu P., Ishigaki S., Okado H., Sobue G., Huang Y., McClung C.A. (2017). Altered GluA1 (Gria1) Function and Accumbal Synaptic Plasticity in the Clock Δ 19 Model of Bipolar Mania. *Biol Psychiatry*. Epub ahead of print
5. Ishigaki, S.*, Fujioka, Y., Okada, Y., Riku, Y., Udagawa, T., Honda, D., Yokoi, S., Endo, K., Ikenaka, K., Takagi, S., Iguchi, Y., Sahara, N., Takashima, A., Okano, H., Yoshida, M., Warita, H., Aoki, M., Watanabe, H., Okado, H., Katsuno, M., and Sobue, G. (2017). Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTLD-like Phenotypes. *Cell Rep* 18, 1118-1131. (*corresponding author)
6. Noda, T., Iijima, M., Noda, S., Maeshima, S., Nakanishi, H., Kimura, S., Koike, H., Ishigaki, S., Iguchi, Y., Katsuno, M., and Sobue, G. (2016). Gene Expression Profile of Inflammatory Myopathy with Malignancy is Similar to that of Dermatomyositis rather than Polymyositis. *Intern Med* 55, 2571-2580.
7. Masuda, M., Senda, J., Watanabe, H., Epifanio, B., Tanaka, Y., Imai, K., Riku, Y., Li, Y., Nakamura, R., Ito, M., Ishigaki, S., Atsuta, N., Koike, H., Katsuno, M., Hattori, N., Naganawa, S., and Sobue, G. (2016). Involvement of the caudate nucleus head and its networks in sporadic amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia continuum. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 17, 571-579.
8. Riku Y, Watanabe H., Yoshida M, Mimuro M, Iwasaki Y, Masuda M, Ishigaki S., Katsuno M, Sobue G. (2016) Marked Involvement of the Striatal Efferent System in TAR DNA-Binding Protein 43 kDa-Related Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* [Epub ahead of print]
9. Nakashima H, Ohkawara B, Ishigaki S., Fukudome T, Ito K, Tsushima M, Konishi H, Okuno T, Yoshimura T, Ito M, Masuda A, Sobue G., Kiyama H, Ishiguro N, Ohno K. (2016) R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5. *Sci Rep* 22, 28512.
10. Watanabe, H., Atsuta, N., Hirakawa, A., Nakamura, R., Nakatochi, M., Ishigaki S.

- Iida, A., Ikegawa, S., Kubo, M., Yokoi, D., Watanabe, H., Ito, M., Katsuno, M., Izumi, Y., Morita, M., Kanai, K., Taniguchi, A., Aiba, I., Abe, K., Mizoguchi, K., Oda, M., Kano, O., Okamoto, K., Kuwabara, S., Hasegawa, K., Imai, T., Kawata, A., Aoki, M., Tsuji, S., Nakashima, K., Kaji, R., and Sobue, G. (2016). A rapid functional decline type of amyotrophic lateral sclerosis is linked to low expression of TTN. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 851-858.
11. Udagawa, T., Fujioka, Y., Tanaka, M., Honda, D., Yokoi, S., Riku, Y., Ibi, D., Nagai, T., Yamada, K., Watanabe, H., Katsuno, M., Inada, T., Ohno, K., Sokabe, M., Okado, H., Ishigaki S*, and Sobue, G. (2015). FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun* 6, 7098. (***corresponding author**)
12. Oh-Hashi, K., Sone, A., Hikiji, T., Hirata, Y., Vitiello, M., Fedele, M., Ishigaki S, Sobue, G., and Kiuchi, K. (2015). Transcriptional and post-transcriptional regulation of transmembrane protein 132A. *Mol Cell Biochem* 405, 291-299.
13. Masuda, A., Takeda, J., Okuno, T., Okamoto, T., Ohkawara, B., Ito, M., Ishigaki S, Sobue, G., and Ohno, K. (2015). Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length. *Genes Dev* 29, 1045-1057.
14. Hikiji, T., Norisada, J., Hirata, Y., Okuda, K., Nagasawa, H., Ishigaki S, Sobue, G., Kiuchi, K., and Oh-hash, K. (2015). A highly sensitive assay of IRE1 activity using the small luciferase NanoLuc: Evaluation of ALS-related genetic and pathological factors. *Biochem Biophys Res Commun* 463, 881-887.
15. Foyez, T., Takeda-Uchimura, Y., Ishigaki S, Narentuya, Zhang, Z., Sobue, G., Kadomatsu, K., and Uchimura, K. (2015). Microglial Keratan Sulfate Epitope Elicits in Central Nervous Tissues of Transgenic Model Mice and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Am J Pathol* 185, 3053-3065.
- [学会発表](計11件)
1. Ishigaki S, Riku Y, Fujioka Y, Honda D, Yokoi S, Endo K., Kawai K, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G. Aberrant interaction between FUS and SFPQ in 4R-tau dominant tauopathy brains. The 47th Society for Neuroscience annual meeting, Washington, D.C., 2017/11/11-15
 2. Endo K, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G. Silencing of FUS in the non-human primate brain via stereotaxic injection of an adeno-associated virus encoding shRNA. The 47th Society for Neuroscience annual meeting, Washington, D.C., 2017/11/11-15
 3. Yokoi S, Udagawa T, Fujioka Y, Honda D, Okado H, Watanabe H, Katsuno M, Ishigaki S, Sobue G. FUS and ELAV-like proteins cooperatively control SynGAP isoform $\alpha 2$ in a 3'UTR length-dependent manner to promote dendritic spine maturation and cognitive function. The 47th Society for Neuroscience annual meeting, Washington, D.C., 2017/11/11-15
 4. Yokoi S, Udagawa T, Fujioka Y, Honda D, Okado H, Watanabe H, Katsuno M, Ishigaki S, Sobue G. 3'UTR length-dependent control of SynGAP isoform $\alpha 2$ mRNA by FUS and ELAV-like proteins promotes dendritic spine maturation and cognitive function. WCN 2017, Kyoto, 2017/9/16-21
 5. Endo K, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G. Silencing of FUS in the brain of non-human primates via stereotaxic injection of an adeno-associated virus encoding shRNA. WCN 2017, Kyoto, 2017/9/16-21
 6. Ishigaki S, Fujioka Y, Honda D, Yokoi S, Endo K., Okado H, Watanabe H, Katsuno M, Takashima A., Sobue G. Accumulation of phosphorylated tau in neurons in FUS-silenced mice. The 46th Society for Neuroscience annual meeting, San Diego, CA, 2016/11/12-16
 7. Fujioka Y, Ishigaki S, Yokoi S, Honda D, Okado H, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G. Loss of SFPQ, an intra-nuclear counterpart of FUS causes FTL/ALS-like phenotypes. The 46th Society for Neuroscience annual

meeting, San Diego, CA, 2016/11/12-16

8. Quality loss of FUS and SFPQ alters the ratio of Tau isoforms, which recapitulates FTLD accompanied with aberrant adult neurogenesis.
Ishigaki S, Fujioka Y, Honda D, Yokoi S, Okado H, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G. The 45th Society for Neuroscience annual meeting, Chicago, IL, 2015/10/17-21
9. Fujioka Y, Ishigaki S, Yokoi S, Honda D, Udagawa T, Okado H, Yoshikawa M, Takashima A, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G. Loss of FUS causes a decrease in brain volume accompanied with neuronal loss The 45th Society for Neuroscience annual meeting, Chicago, IL, 2015/10/17-21
10. FTLD-like phenotypes accompanied with aberrant adult neurogenesis are regulated by altered Tau isoforms in FUS-silenced mice
Ishigaki S, Fujioka Y, Honda D, Yokoi S, Okado H, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G. The 10th brain research conference Chicago, IL, 2015/10/15-16
11. Loss of FUS causes a decrease in brain volume accompanied with neuronal loss
Fujioka Y, Ishigaki S, Yokoi S, Honda D, Udagawa T, Okado H, Yoshikawa M, Takashima A, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G. The 10th brain research conference Chicago, IL, 2015/10/15-16

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：細胞内容物の回収方法および回収装置
発明者：石垣診祐、宇野秀隆、高村禅
権利者：名古屋大学、北陸先端科学技術大学院大学
種類：特許
番号：2017-160962
出願年月日：2017年08月24日
国内外の別：国内

名称：TDP-43の発現量を調節するアンチセンスオリゴヌクレオチド及びその用途
発明者：祖父江元、石垣診祐、佐橋健太郎、永井義隆、前田和宏、武内敏秀、関正博、藤原健志、松田誠司
権利者：名古屋大学、大阪大学、神戸天然物化学
種類：特許

番号：2017-134890

出願年月日：2017年07月10日

国内外の別：国内

名称：疾患モデル動物および疾患治療剤

発明者：祖父江元、石垣診祐、横井聡

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2016-139308

出願年月日：2016/7/14

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 石垣診祐

(ISHIGAKI Shinsuke)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：40378170

(2)研究分担者 渡辺宏久

(WATANABE Hirohisa)

名古屋大学・脳とこころの研究センター・特任教授

研究者番号：10378177

研究分担者 祖父江元

(SOBUE Gen)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任教授

研究者番号：20148315