

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19519

研究課題名(和文)モデルショウジョウバエを用いたALSの分子病態の解明と新規標的治療薬の開発

研究課題名(英文) The analyses of pathomechanisms of ALS and its development of therapeutic strategy by using Drosophila model.

研究代表者

東 裕美子 (AZUMA, YUMIKO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：00453093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロン変性により筋力低下、呼吸筋麻痺をきたす疾患である。ALSに共通する病態メカニズムを解明するために、我々はショウジョウバエFUS, TDP-43, FIG4ノックダウンモデルを樹立し、共通して作用する遺伝子を探索した。TDP-43と相互作用する分子としてautophagyに関与するVCPを同定し、FUS及びFIG4と相互作用する分子としてMSTを同定した。MSTは細胞死、細胞分化、autophagyなどに関与している。VCP及びMSTいずれもALSの病因に共通して作用している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ショウジョウバエは遺伝学・発生学のモデル生物の中でも最も多様な解析手法が確立しており、病態解明に大きな貢献を果たしてきた。model flyを用いた研究は、世代時間が短く、遺伝子組換え体の作成が簡便にでき、ヒト疾患関連遺伝子の約75%が相同遺伝子として存在し、多数の遺伝子変異体株がストックセンターから容易に入手することが出来る。このようなショウジョウバエの特性を最大限に活用して、複数の異なるALSの原因遺伝子を用いたモデルショウジョウバエを解析することにより、共通する分子メカニズムが明らかになれば、家族性および孤発性ALS全体の病態解明や根本治療の開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) causes the progressive loss of motor neurons leading to muscle weakening and respiratory paralysis. To elucidate the common pathomechanisms of neurodegeneration in ALS in vivo, we explored common modifier genes by using Drosophila FUS, TDP-43 and FIG4 knockdown. We identified autophagy-related genes VCP as modifiers of neurodegeneration in ALS model flies expressing TDP-43. Moreover, We identified MST as modifiers of neurodegeneration in ALS model flies expressing Drosophila FUS and Drosophila FIG4. MST is associated with the regulatory mechanisms for many biological events including cell death, cell proliferation, autophagy, and others. Our results suggest that both VCP and MST is involved in common pathogenesis of neurodegeneration in ALS.

研究分野：分子生物学 遺伝学 神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ショウジョウバエ FUS TDP-43 FIG4 遺伝学 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

ヒト希少疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症(ALS)の分子機序は未解明であり、現在根本治療薬はなく病態の解明及び治療法の確立が急務となっている。ALS患者は日本でおよそ約1万人、全世界では推定12万人と言われ、その約90-95%が孤発性である。ALSの5-10%を占める家族性ALSでは、RNA代謝に関与する*TDP-43*や*FUS*の他、蛋白質分解に関与する*FIG4*、*VCP*など重要な原因遺伝子が報告されている。また、孤発性ALSにおいても、*TDP-43*が運動ニューロンに異常蓄積することが報告されており、*TDP-43* proteinopathy という概念が提唱されている。これらの遺伝子はRNA代謝や蛋白質分解などに関連することが知られており、治療標的として注目されている。

遺伝学・発生学・解剖学・発生学などの研究においてモデル生物として長年使用されてきたショウジョウバエは、近年ヒト疾患研究のモデル生物として頻りに活用されるようになってきた。ショウジョウバエにはヒト疾患原因遺伝子の約75%が存在し、多数の遺伝子変異体株(ライブラリー)をストックセンターから容易に入手することが出来るためヒト疾患研究の有用なモデル動物である。またライフサイクルが10日間と短く、多数の個体を同時に取り扱うことができるので、大規模な遺伝学的スクリーニングを迅速に行うことができる。我々はこれまでに複数のALSモデルショウジョウバエが複眼及び神経筋接合部のニューロン形態異常、運動能力低下等共通の表現型を示すことを見出している。このうち*FUS*-ALSモデルを用いた遺伝学的スクリーニングにより、核細胞質輸送や細胞増殖に関連する分子等複数の遺伝的相互作用遺伝子を同定した。ALSの病因に関わる共通経路を見出すために、これらが複数のALS原因遺伝子にも相互作用するか検討することにより、ALS全体の病因・病態解明及び新規治療法の開発に繋いでゆく考えに至った。

#### 2. 研究の目的

ALSにおいて全体の表現型がどのように修飾されるかを明らかにするために、家族性ALSの原因遺伝子である*FUS*及び*TAR DNA-Binding protein43(TDP-43)*、そして家族性ALSの危険因子でありCharcot-Marie-Tooth(CMT)病の原因遺伝子である*Factor-Induced-Gene 4(FIG4)*をノックダウンして作成したmodel flyを用いて、複数のALSの病態に関わる因子に共通して作用する遺伝子を探索し、ALSの病因に関わる共通経路を見出すことを目的とした。

#### 3. 研究の方法

複数のALS原因遺伝子に共通に関わる遺伝子を同定するために、我々が既に樹立した*Caz(Drosophila FUS)*-KD model flyのこれまでの結果を基に、*TBPH(Drosophila TDP-43)*-KD及び*dFIG4(Drosophila FIG4)*-KD model flyを用いて以下に示す実験計画に沿う。

- (1) 遺伝学的スクリーニングによる修飾する遺伝子の同定; Model flyと、相互作用候補遺伝子の野生型、変異型及び過剰発現型を交配し表現型を比較する。解析はスクリーニングに適した成虫複眼を用いる。
- (2) Model flyの運動能力の評価; 成虫のclimbing assay、幼虫のcrawling assayによって評価する。
- (3) 運動神経変性の評価; 神経筋接合部(NMJ)における運動神経終末の形態学的変化を検討する。3齢幼虫で筋肉上のNMJを分離し、抗HRP抗体を用いてNMJにおける運動神経終末のシナプス長およびsynaptic boutonの総数、形態を比較する。
- (4) 中枢神経系における*Caz*及び*TBPH*の発現量の検討; 3齢幼虫の中枢神経系において抗*Caz*抗体及び抗*TBPH*抗体を用いて免疫組織化学染色をおこない、核及び細胞質における染色性と局在を確認する。核はDAPI、細胞質はphalloidinで可視化する。またWestern blottingを用いてタンパク質組織化学的分析やmRNAレベルでの発現量比較解析を行う。
- (5) リソソームの形態学的検討; 3齢幼虫の脂肪体を分離し、Lysotrackerを用いて可視化し比較検討を行う。

#### 4. 研究成果

- (1) *Drosophila TDP-43*のノックダウンモデルの表現型を改善する新たな遺伝子として*VCP*(ショウジョウバエホモログ*ter94*)を同定した。オートファジーおよび核細胞質輸送に関与する蛋白質である*VCP*が、*Drosophila TDP-43*ノックダウンモデルにより認められる運動障害及び運動神経変性の表現型を改善することを明らかにし、*Am J Neurodegener Dis*に報告した(Kushimura et al. *Am J Neurodegener Dis* 7:11-31, 2018)。
- (2) *Drosophila FIG4*のノックダウンモデルの表現型を修飾する新たな遺伝子として*Hippo*(*hpo*) (ヒトホモログ*MST*)を同定した。*Hpo*は*dFIG4*ノックダウンにより認められる運動障害、神経変性、リソソームの拡大などの表現型を改善することを明らかにした。*Hpo*経路はautophagyの制御に関わっており、*dFIG4*はエンドソーム・リソソームの膜に関わることから、*hpo*の新たな分子機能としてエンドソーム・リソソーム膜のホメオスタシスに関与していることが示唆され*Neuroreport*に報告した(Kushimura et al. *Neuroreport* 29: 856-62, 2018)。
- (3) *Drosophila FUS*のノックダウンモデルの表現型を修飾する新たな遺伝子として*hpo*を同定した。*hpo*の機能を低下させると*caz*の機能喪失によって引き起こされる複眼の形態

異常、運動能力低下、神経筋接合部における synaptic branch 及び synaptic bouton の減少が改善した。さらに、hpo の機能を低下させることにより、核内で低下した Caz が、再び核内で部分的に機能していることを免疫組織学的及びタンパク化学的分析により明らかにし、autophagy の制御が caz と hpo の相互作用分子メカニズムに関わっていることを考察した。また Caz ノックダウンモデルショウジョウバエでは hpo の mRNA が劇的に上昇しており、Caz は hpo を負に制御していることも示唆された。

MST は他の家族性 ALS の原因遺伝子である SOD1、VAPB との相互作用も報告されており、MST は神経変性に重要な役割を果たしていることが考えられる。我々は ALS の病因に関わる重要な共通分子として MST を見出し、これらの結果を Exp Cell Res に報告した (Azuma et al. Exp Cell Res 371: 311-21, 2018)。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. [Azuma Y](#), Tokuda T, Kushimura Y, Yamamoto I, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Ueyama M, Nagai Y, Iwasaki Y, Yoshida M, Pan D, Yoshida H, Yamaguchi M. *Hippo*, *Drosophila* MST, is a novel modifier of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila* FUS. Exp Cell Res. 371:311-321, 2018. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.08.001. 査読有
2. Kushimura Y, [Azuma Y](#), Mizuta I, Muraoka Y, Kyotani A, Yoshida H, Tokuda T, Mizuno T, Yamaguchi M. Loss-of-function mutation in *Hippo* suppressed enlargement of lysosomes and neurodegeneration caused by *dFIG4* knockdown. Neuroreport. 29:856-862, 2018. doi: 10.1097/WNR.0000000000001044. 査読有
3. Kushimura Y, Tokuda T, [Azuma Y](#), Yamamoto I, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Ueyama M, Nagai Y, Yoshida H, Yamaguchi M. Overexpression of *ter94*, *Drosophila* VCP, improves motor neuron degeneration induced by knockdown of *TBPH*, *Drosophila* TDP-43. Am J Neurodegener Dis. 7:11-31, 2018. 査読有
4. Yamamoto I, [Azuma Y](#), Kushimura Y, Yoshida H, Mizuta I, Mizuno T, Ueyama M, Nagai Y, Tokuda T, Yamaguchi M. NPM-hMLF1 fusion protein suppresses defects of a *Drosophila* FTL model expressing the human FUS gene. Sci Rep. 8:11291, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-29716-9. 査読有
5. Muraoka Y, Nakamura A, Tanaka R, Suda K, [Azuma Y](#), Kushimura Y, Lo Piccolo L, Yoshida H, Mizuta I, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Yamaguchi M. Genetic screening of the genes interacting with *Drosophila* FIG4 identified a novel link between CMT-causing gene and long noncoding RNAs. Exp Neurol. 310:1-13, 2018. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.08.009. 査読有
6. Suda K, Ueoka I, [Azuma Y](#), Muraoka Y, Yoshida H, Yamaguchi M. Novel *Drosophila* model for mitochondrial diseases by targeting of a solute carrier protein SLC25A46. Brain Res. 1689:30-44, 2018. doi: 10.1016/j.brainres.2018.03.028. 査読有
7. Wakisaka K.T, Tanaka R, Hirashima T, Muraoka Y, [Azuma Y](#), Yoshida H, Tokuda T, Asada S, Suda K, Ichiyanagi K, Ohno S, Itoh M, Yamaguchi M. Novel roles of *Drosophila* FUS and Aub responsible for piRNA biogenesis in neuronal disorders. Brain Research. pii: S0006-8993(18)30646-2. doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.028>. 2018 査読有

[学会発表](計 11 件)

1. Kushimura Y, [Azuma Y](#), Mizuta I, Muraoka Y, Kyotani A, Yoshida H, Tokuda T, Mizuno T, Yamaguchi M. The loss-of-function mutation of *Hippo* improves enlargement of lysosome and neurodegeneration caused by *dFIG4* knockdown. 16<sup>th</sup> Asian Oceanian Congress of Neurology. 8-11 Nov 2018; Seoul, Korea.
2. [Azuma Y](#), Tokuda T, Kushimura Y, Yamamoto I, Ueoka I, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Ueyama M, Nagai Y, Yoshida H, Yamaguchi M. The search for genes that modulate FUS-mediated phenotypes by *Drosophila* amyotrophic lateral sclerosis model. Cold Spring Harbor Meeting: Neurobiology of *Drosophila*. 4 Oct., 2017; New York, USA
3. Kushimura Y, Tokuda T, [Azuma Y](#), Yamamoto I, Ueoka I, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Ueyama M, Nagai Y, Yoshida H, Yamaguchi M. Loss of function mutation of *ter94*, *Drosophila* VCP, partially enhanced motor neuron degeneration induced by knockdown of *TBPH*, *Drosophila* TDP-43. Cold Spring Harbor Meeting: Neurobiology of *Drosophila*. 4 Oct., 2017; New York, USA
4. 水田依久子, 東裕美子, 吉田英樹, 山口政光, 水野敏樹. キメラ NOTCH3 導入ショウジョウバエモデルを用いた遺伝性脳小血管病 CADASIL 病態解明へのアプローチ. 第 40 回日本分子生物学会. 2017 年 12 月 6-9 日 ;神戸

5. 浅田賢志, 鈴木孝禎, 東裕美子, 徳田隆彦, 吉田英樹, 山口政光 ALS 原因遺伝子 *FUS* のショウジョウバエホモログ *Cabeza* と遺伝学的相互作用すビジェネティック制御因子の同定. 第 40 回日本分子生物学会. 2017 年 12 月 6-9 日 ;神戸
6. 清水丈, 笠井高士, 東裕美子, 吉田英樹, 山口政光. ショウジョウバエモデルを用いたパーキンソン病 (PD) 原因候補遺伝子の解析. 第 40 回日本分子生物学会. 2017 年 12 月 6-9 日 ;神戸
7. 村岡夕香, 中村綾, 田中領, 東裕美子, 櫛村由紀恵, Luca Lo Piccolo, 須田晃治郎, 吉田英樹, 水野敏樹, 徳田隆彦, 山口政光. ショウジョウバエ CMT 原因遺伝子 *dFIG4* の新規遺伝学的相互作用因子としての長鎖非コード RNA, *CR18854* の同定. 第 40 回日本分子生物学会. 2017 年 12 月 6-9 日 ;神戸
8. 東裕美子, 徳田隆彦, 櫛村由紀恵, 山本格, 京谷茜, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 上山盛夫, 永井義隆, 吉田英樹, 山口政光. *FUS* regulates synapse structure and function at the neuromuscular junctions by *Drosophila* ALS model. 第 57 回日本神経学会総会. 2016 年 5 月 18-21 日; 神戸
9. 櫛村由紀恵, 徳田隆彦, 東裕美子, 山本格, 京谷茜, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 上山盛夫, 永井義隆, 吉田英樹, 山口政光. The functional analysis of TDP-43 by *Drosophila* model. 第 57 回日本神経学会総会. 2016 年 5 月 18-21 日; 神戸
10. 山本格, 東裕美子, 櫛村由紀恵, 吉田英樹, 水田依久子, 奥主隆太, 上山盛夫, 藤掛伸宏, 水野敏樹, 徳田隆彦, 山口 政光. ヒト NPM-hMLF1 融合タンパク質は ALS 原因因子 *FUS* が誘導する凝集体形成を阻害する. 第 39 回日本分子生物学会. 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日; 神戸
11. 中村綾, 山本格, 吉田英樹, 東裕美子, 水田依久子, 水野敏樹, 中川正法, 徳田隆彦. 山口政光. ショウジョウバエ CMT 原因遺伝子 / ALS 関連遺伝子 *FIG4* の遺伝学的相互作用因子としてのイオンチャンネル活性化因子と long non-coding RNA の同定. 第 39 回日本分子生物学会. 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日; 神戸

〔図書〕(計 2 件)

1. Yamaguchi M, Azuma Y, Yoshida H. ALS and cancer. *J Carcinog Mutagen* 7: e122. doi:10.4172/2157-2518.1000e122
2. Azuma Y, Mizuta I, Tokuda T, and Mizuno T. Amyotrophic Lateral Sclerosis model. Yamaguchi M, Editor. *Drosophila models for human disease*. Singapore: Springer.pp 79-95, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。