

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：25503
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K07837
研究課題名(和文) RNAを標的とした新規ALS/FTLD治療法の検討

研究課題名(英文) Novel ALS/FTLD Therapy by Targeting RNA

研究代表者

中川 直 (Nakagawa, Tadashi)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・講師

研究者番号：30707013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TDP-43凝集体を減少させるT-RNaseがALS/FTLDモデルマウスの病態を改善できるか検討するため、T-RNase発現マウスの作製を試みた。神経細胞以外の影響を排除するため、T-RNaseを神経細胞のみに発現させることを目指した。神経細胞のみにT-RNaseを発現させる遺伝子改変マウスを作製するためのベクターを導入したマウスは生まれなかったため、テトラサイクリン誘導的にT-RNaseを発現させる遺伝子改変マウスの作成に変更した。ベクターの作成を行ったが、マウスの作製には至らなかった。一方で、TDP-43の凝集体形成を阻害する新たな試薬を発見できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T-RNaseは培養細胞では顕著な毒性を示さないものの、生体における神経細胞では細胞死を引き起こすほどの毒性を示すことが示唆された。そのため、基礎医学実験のためには有用なツールであると考えているが、医療への応用は難しいことがわかった。TDP-43の凝集体形成を阻害する試薬を発見できたが、これを医療応用する際にもマウス等モデル生物を用いた毒性検証が重要と考えられる。ALSとFTLDに対する有効な治療法の開発が望まれている。失敗のリスクが高い本研究のような内容の研究も積極的に行い、得られた情報を開示することがそのような治療法の開発に必要と考えている。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether T-RNase, which reduces TDP-43 aggregation, a causative agent of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTLD), can reduce TDP-43 aggregation in vivo in ALS/FTLD model mice and improve the pathological phenotype, I tried to generate T-RNase-expressing mice.

To eliminate non-neuronal effects, we aimed to express T-RNase in a neuron-specific manner. We succeeded in creating a vector for producing genetically engineered mice that express T-RNase specifically in neurons (T-RNase neuro-Tg mice), but when I actually created the mice, I found that they died before they were born. Therefore, I switched to creating genetically engineered mice that express T-RNase in a tetracycline-inducible manner (inducible T-RNase neuro-Tg mice). Vectors for this purpose were created, but mice were not produced. On the other hand, I was able to discover a new reagent (NMS-873) that inhibits TDP-43 aggregate formation.

研究分野：分子生物学

キーワード：ALS FTLD モデルマウス TDP-43凝集体 RNase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動神経の脱落、機能不全が急激に起こり、発症後数年で死に至る重篤な神経変性疾患である。長らくその発症メカニズムが不明であったが、ゲノム解析技術の進展で原因遺伝子の同定が進み、前頭側頭型認知症 (FTLD) と共通の遺伝子変異で発症することが明らかとなってきた。一方、ALS/FTLD 患者の死後脳で特徴的にみられるタンパク質凝集体が検出され、その構成タンパク質の一つとして TDP-43 が同定された。ALS/FTLD 患者でこの TDP-43 をコードする遺伝子変異が認められることから、TDP-43 に着目した研究が飛躍的に進み、その成果から、TDP-43 タンパク質の細胞質における凝集体形成が ALS と FTLD の発症原因として考えられていた。

凝集体形成メカニズムの解析がいくつかなされていたが、これを止める方法、ならびに既に形成された凝集体を脱凝集させる方法についての研究が遅れていた。申請者は、TDP-43 凝集体を減少させることで、ALS/FTLD を改善できると考え、まず TDP-43 凝集体の形成機構を培養細胞レベルで調べた。TDP-43 は RNA の様々な部位に結合することが知られていたため、一つの RNA に複数の TDP-43 が結合し、その結果 TDP-43 同士の距離が近接することで凝集体形成が促進される可能性を検討した。予想通り、TDP-43 の RNA 結合能を減少させると TDP-43 の凝集体形成が減少したことから、TDP-43 は自身に結合する RNA を介して凝集体を形成することが示唆された。RNA を分解するタンパク質 (RNase) が知られていたため、自身に結合した RNA を分解する目的で、TDP-43 に RNase を融合させたタンパク質 (T-RNase) を作成したところ、T-RNase が自身の凝集体形成を抑制できることが分かった。さらに、T-RNase が、既に形成された TDP-43 凝集体も減少させることを見出した。

T-RNase はタンパク質であるため、ALS/FTLD に対する治療目的のためには、T-RNase を発現する遺伝子の運動神経への導入が必要と考えられた。もし TDP-43 凝集体を脱凝集させることができる化合物があれば、T-RNase の遺伝子導入よりも ALS/FTLD に対する治療応用へのハードルが低いと考えられた。

2. 研究の目的

(1) T-RNase が生体内においても TDP-43 の凝集体を減少させ、ALS/FTLD モデルマウスの病的表現型を改善できるか検討する。

(2) 新たな TDP-43 凝集体形成阻害薬、脱凝集薬を発見する。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞特異的に T-RNase を発現させる遺伝子改変マウス (T-RNase neuro-Tg マウス) を作製する。このマウスと、ALS/FTLD モデルマウスを掛け合わせ、ALS/FTLD 症状が改善するか検討する。

(2) ALS/FTLD 原因タンパク質のうち、TDP-43 凝集体形成を促進するタンパク質を同定する。そのタンパク質に対する阻害薬が TDP-43 凝集体形成を減少させるか、また既に形成された TDP-43 の凝集体を脱凝集できるか検討する。

4. 研究成果

(1) 神経細胞特異的に転写を活性化するプリオン遺伝子のプロモーター配列を C57BL/6-Tg(Prnp-TARDBP*M337V)4Ptrc/J (Jackson laboratory Strain #:017604, 引用文献) マウスゲノムからクローニングした。次に T-RNase 配列をプリオンプロモーターの下流に挿入した。

このベクターを受精卵にインジェクションし、仮親に移植した。この仮親から生まれたオスマウスを野生型 C57BL/6J メスマウスと掛け合わせ、その仔のゲノムを抽出した。このゲノムの PCR を行い、T-RNase 遺伝子がゲノムに挿入されていることを確認した。次にこのマウスをさらに掛け合わせ、そのうち T-RNase がゲノムに挿入されたものについて、全脳を離乳時に摘出し、T-RNase の発現を調べたが、全くその発現が認められなかった。T-RNase には TDP-43 と RNase の間にリンカーとして 9myc タグが挿入してあるため、本実験では抗 myc タグ抗体を用いた。すべてのマウスについて T-RNase に発現が認められなかったため、T-RNase を発現するマウスは T-RNase 遺伝子を生殖系列に有していないか、または離乳時まで生存できなかったと想像できた (図 1、トライアル 1)。

これを回避するために、試薬(テトラサイクリン)依存的に T-RNase の発現を調節できる T-RNase マウスの作製を試みた(図 1、トライアル 2)。このシステムでは Jackson laboratory から入手可能な NEFH-tTA マウス (Strain #:025397, 引用文献) と tet オペレーター-T-RNase マウスを掛け合わせ、テトラサイクリンを除くことで T-RNase の発現を神経特異的に誘導できる。tet オペレーター-T-RNase マウスは自身で作製する必要があるので、Tet オペレーター下流に T-RNase 配列を挿入したターゲティングベクターを作製した。本ベクターを受精卵にインジェクションするには至らなかった。また、NEFH-tTA マウスの購入にも至らなかった。

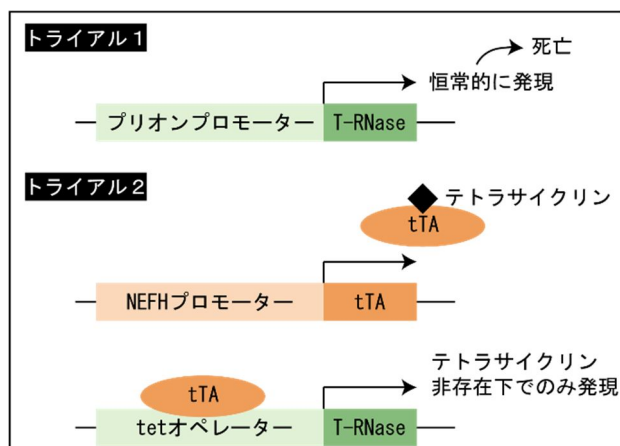


図 1 : T-RNase 発現方法の戦略の変更。

恒常的発現から誘導的発現に変更した。

(2) ALS/FTLD 原因タンパク質として報告されている 12 種類のタンパク質 (C210RF2, Cyclin F, FUS, NEK1, OPTN, SOD1, SQSTM1, TAF15, TBK1, TDP-43, UBQLN2, VCP) をクローニングした。それぞれにタグをつけた発現ベクターを作製し、HEK293T 細胞に発現させ、それらのタンパク質同士の結合を検討した。その結果、TDP-43 が Cyclin F および VCP に結合することを見出した。VCP は ATPase 活性を有しており、ALS 患者変異体ではこの活性が変化することが報告されていたため、VCP ATPase 活性を促進する変異体と減少させる変異体を発現するベクターを作製し、U2OS 細胞に発現させた。続いて TDP-43 の凝集体を誘導したところ、VCP ATPase 活性と相関して TDP-43 凝集体が形成されることを見出した。VCP ATPase 活性に対する阻害薬 NMS873 を処理した後 TDP-43 の凝集体を誘導したところ、その形成が有意に減少していた。しかし、T-RNase とは異なり、NMS873 は既に形成された TDP-43 凝集体に対しては効果が認められなかった。最後に Cyclin F は VCP ATPase 活性を増加させること、また ALS 変異を導入した Cyclin F はこの活性化効果が高く、VCP ATPase の過剰活性化を介して TDP-43 凝集体形成を促進し、ALS/FTLD の発症に寄与することを見出した。この成果は論文で報告した(引用文献)。

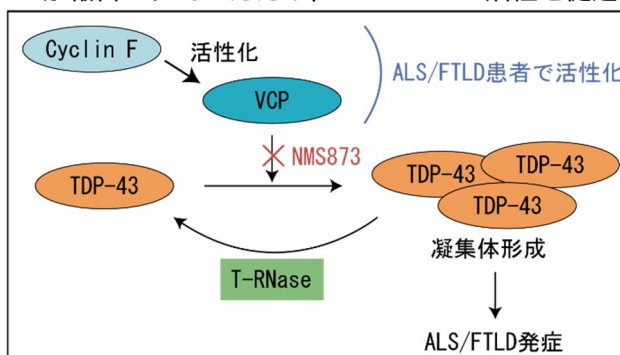


図 2 : NMS873 による TDP-43 凝集体形成阻害。

T-RNase は既に形成された TDP-43 凝集体を脱凝集させることができるが、NMS873 はこの効果が認められなかった。

本知見を ALS/FTLD に対する治療へ展開するために、今後 NMS873 が ALS/FTLD の発症を抑制、または遅らせることができるか、マウスレベルで検討することが求められる。

< 引用文献 >

Xu Y-F. *et al.*, *Mol Neurodegener.* 6: 73 (2011)
 Walter A.K. *et al.*, *Acta Neuropathol.* 130: 643-660 (2015)
 Yu Y., Nakagawa T. *et al.*, *Hum Mol Genet.* 28: 3486-3497 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakagawa T, Hattori S, Nobuta R, Kimura R, Nakagawa M, Matsumoto M, Nagasawa Y, Funayama R, Miyakawa T, Inada T, Osumi N, Nakayama KI, Nakayama K.	4. 巻 23
2. 論文標題 The Autism-Related Protein SETD5 Controls Neural Cell Proliferation through Epigenetic Regulation of rDNA Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Y, Nakagawa T, Akiyama T, Nakagawa M, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Nakayama K.	4. 巻 23
2. 論文標題 An Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated Mutant of C21ORF2 Is Stabilized by NEK1-Mediated Hyperphosphorylation and the Inability to Bind FBXO3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101491.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chen LL, Smith MD, Lv L, Nakagawa T, Li Z, Sun SC, Brown NG, Xiong Y, Xu YP.	4. 巻 6
2. 論文標題 USP15 suppresses tumor immunity via deubiquitylation and inactivation of TET2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abc9730.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakagawa T, Nakayama K, Nakayama KI.	4. 巻 -
2. 論文標題 Knockout Mouse Models Provide Insight into the Biological Functions of CRL1 Components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 147 ~ 171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-15-1025-0_10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yu Y, Nakagawa T, Morohoshi A, Nakagawa M, Ishida No, Suzuki N, Aoki M, Nakayama K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Pathogenic mutations in the ALS gene C9orf72 cause cytoplasmic mislocalization of Cyclin F and elevated VCP ATPase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3486 ~ 3497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Shirota M, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Osana S, Nakagawa T, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, Aoki M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1527-1541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.04.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中川 直、中川 真喜子、細井 徹、中山 啓子
2. 発表標題 自閉症関連タンパク質USP9XによるSETD5を介したrDNAのエピジェネティック制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadashi Nakagawa, Yasuaki Watanabe, Naoki Suzuki, Hitoshi Warita, Masashi Aoki, Keiko Nakayama
2. 発表標題 An Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated Mutant of C21ORF2 Is Stabilized by NEK1-Mediated Hyperphosphorylation and the Inability to Bind FBX03
3. 学会等名 31ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川 直、余 玉嬌、細井 徹、中山 啓子
2. 発表標題 VCP阻害薬によるALS関連因子TDP-43の凝集体形成抑制
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川 直、細井 徹、中山 啓子
2. 発表標題 RNAによるALS関連因子TDP-43凝集体の形成と維持
3. 学会等名 第141日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 靖章, 中川 直, 鈴木 直輝, 割田 仁, 中山 啓子, 青木 正志
2. 発表標題 蛋白分解異常による新規筋萎縮性側索硬化症の発症機構
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 直, 中山 啓子
2. 発表標題 知的障害・自閉症関連因子SETD5によるrDNAのエピジェネティック制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 直、細井 徹
2. 発表標題 抗てんかん薬バルプロ酸による自閉症発症機構の解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本 理子、栗屋 花蓮、指山 祥子、井上 夏奈、中川 直、野田 泰裕、細井 徹
2. 発表標題 オランザピン誘発性肥満病態発現メカニズムの解明 レプチン抵抗性の関与
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川 直、諸星 茜、細井 徹、中山 啓子
2. 発表標題 CUL4コヒキチンリガーゼによるヒストンシャペロンFACTの機能制御
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野田 泰裕、中川 直、細井 徹
2. 発表標題 PERK阻害剤GSK2606414のパーキンソン病モデル細胞に対する小胞体ストレス非依存的保護作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センターがん医学コアセンター細胞増殖制御分野
<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/>
山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部臨床薬理学
<http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/index.html#yakugaku>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 未来子 (Suzuki Mikiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------