

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07880

研究課題名（和文）選択的スプライシングの操作により天然変性領域を制御するALS治療戦略の検証

研究課題名（英文）Assessing the Therapeutic Potential of Alternative Splicing Manipulation in ALS Treatment for Intrinsically Disordered Regions

研究代表者

須貝 章弘（SUGAI, Akihiro）

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：70758903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）の新たな治療戦略開発を目指し、本研究では病源性タンパク質TDP-43の天然変性領域の選択的スプライシングの役割を解明した。TDP-43の制御異常は、ALSの発症や進行に寄与し、天然変性領域はタンパク質のミスフォールディングを引き起こし線維化や凝集に大きく関わっている。本研究は、TDP-43の天然変性領域の選択的スプライシングとその産生物の関係を明らかにし、この選択的スプライシングを制御するアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発に成功した。この成果は、新たな治療法の開発に繋がる可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ALSの発症と進行に関わる病源性タンパク質TDP-43の役割の理解を深める点で学術的意義があります。特に、TDP-43の天然変性領域、選択的スプライシング、そしてALS関連RNA結合タンパク質との関連性を明らかにし、これを制御するアンチセンスオリゴヌクレオチドを開発しました。これはALS治療の開発に向けた革新的進展であり、他の神経変性疾患への応用も期待できます。また、社会的意義としては、ALSという重篤な疾患への新治療法開発は、患者の生存期間延長とQOL向上に寄与することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop novel therapeutic strategies for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) by elucidating the role of alternative splicing of the intrinsically disordered region of the pathogenic protein TDP-43. Dysregulation of TDP-43 is known to contribute to the onset and progression of ALS, with the intrinsically disordered region potentially leading to protein misfolding, which in turn can cause fibrosis and aggregation. We have revealed the relationship between alternative splicing of TDP-43 and ALS-associated RNA-binding proteins, and have successfully developed antisense oligonucleotides to regulate this alternative splicing. The findings suggest promising avenues for the development of new therapeutic strategies for ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 TDP-43 天然変性領域 選択的スプライシング アンチセンスオリゴヌクレオチド

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位と下位の運動ニューロンが変性・消失し、筋力低下・筋萎縮を引き起こす神経変性疾患であり、その原因や治療法はまだ完全には解明されていない。この疾患の特徴の一つとして、核内タンパク質である TDP-43 の断片化や細胞質への凝集・蓄積が挙げられる。TDP-43 には、特定の構造をもたないフラフラした領域である天然変性領域 (intrinsic disorder region: IDR) が存在する。この IDR は、RNA 顆粒などの膜をもたないオルガネラを形成する液-液相分離の形成に重要な役割を果たしている。しかし、IDR はそのフレキシブルな構造ゆえに線維化や凝集化のリスクをもっており、その局所濃度は凝集を引き起こす重要な因子となる。この液-液相分離と凝集の過程は、神経変性疾患における異常タンパク質の蓄積を説明する新しい病態として、注目を集めている。

TDP-43 の IDR は選択的にスプライシングされるイントロン 6 に存在する。イントロン 6 のスプライシングは遺伝子発現調節メカニズムに重要な役割を果たす。TDP-43 は自己調節機能を持ち、核内 TDP-43 量依存性に、自身の mRNA 発現量を制御している。イントロン 6 のスプライシングはこの自己調節機構の重要な過程である (Koyama A, Sugai A, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2016) ALS では核内タンパク質である TDP-43 が、核で減少し細胞質で凝集体を形成する。したがって、自己調節による TDP-43 発現抑制が働かなくなり、この結果、イントロン 6 のスプライシングが減少する。我々は、TDP-43 細胞内代謝の数理モデルから、TDP-43 の自己調節不全を含む擾乱が、TDP-43 発現を上昇させ、ALS の病態に密接に関与していることを予測した (Sugai A, *et al.*, *Front Neurosci.* 2018) 実際、イントロン 6 のスプライシングを特異的に阻害すると、マウス脊髄組織において、不溶性・断片化 TDP-43 が蓄積し、運動ニューロンの喪失が起きることを我々は明らかにしている (Sugai A *et al.*, *Neurobiol. Dis.* 2019)

しかし、この IDR 発現に関わる選択的スプライシングの人為的な制御が、ALS の病態を改善する可能性についてはまだ明らかにされていない。また、既存の実験ツールとして利用されているアンチセンスオリゴ (ASO) は、TDP-43 の発現量の異常が細胞毒性を引き起こすという証拠が蓄積されており、そのままの形で ALS 治療に用いることは適切ではない。これらのことから、新たな治療モデルの構築が求められている。

本研究は、そうした課題に挑み、TDP-43 の IDR の選択的スプライシングを制御する新たな手法を開発することを目指している。具体的には、IDR を含む領域をコードするイントロン 6 のスプライシングの制御を試みている。このアプローチは、TDP-43 のタンパク質凝集を引き起こす IDR の発現を抑制する。その結果として ALS の病態を改善する可能性がある。

2. 研究の目的

IDR に関連する選択的スプライシングの制御方法を確立し、スプライシングによって誘導される IDR を欠く TDP-43 アイソフォーム (sTDP) が、TDP-43 の凝集にどのように影響を与えるかを明らかにする。TDP-43 は、N 末端ドメイン (NTD) を介してダイマーを形成する。したがって、sTDP は NTD を介して TDP-43 とヘテロダイマーを形成することが予想される。これにより、C 末端の TDP-43 IDR の密集が緩和され、これにより TDP-43 の凝集が抑制されると仮説を立てた。この仮説を検証する。

IDR の選択的スプライシングを制御する ASO の生体内での効果を明らかにする。マウス中枢神経系への投与により、どれだけスプライシング編集効果があるのか、どれだけの期間、その効果が持続するのかを明らかにする。このスプライシング促進が、野生型マウスの表現型に影響を及ぼすのかを検証する。

TDP-43 が蓄積する ALS 病態に対して、IDR の選択的スプライシングを制御する戦略が効果を示すかについて、マウスモデルを用いて検証する。これらにより、ALS 治療への応用可能性を探ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) スプライシング由来タンパク質の評価

TDP-43 タンパク質を精製し、その凝集性を評価する。さらに、選択的スプライシングによって誘導される sTDP、および、NTD を欠く sTDP タンパク質を精製する。これらの凝集性を評価する。加えて、TDP-43 溶液に sTDP、または N 末端ドメインを欠く sTDP を加えたときの凝集性の変化を調べる。この事によって、選択的スプライシングによって産生され得る IDR を欠く sTDP が、TDP-43 の凝集に影響するかを検証する。

(2) マウス中枢神経系における選択的スプライシング制御

TDP-43 の選択的スプライシングを制御する ASO の効果をマウス中枢神経系において検証する。新生児への脳室内投与、成体マウスへの腰椎穿刺による髄腔内投与によって、ASO を導入する。野生型マウスへの投与によって、表現型 (体重、握力) に、非投与群との差がないかを検証する。一定期間後に脊髄組織を調べ、標的スプライシングの変化を確認する。

(3) TDP-43 病態モデルマウスを用いた検証

TDP-43 病態を認めるマウスモデルとして、プロテアソーム機能の低下により TDP-43 の凝集を認める運動ニューロン特異的 Rpt3 コンディショナル・ノックアウトマウス (Rpt3 flox/flox; VAcHt-Cre+/-) (Tashiro et al., JBC 2012) を用いる。このマウスでは、生後 6 週以降で TDP-43 病態を認め、その後、運動機能の低下、体重減少を認める。このモデルマウスに対して、AS0 を投与し、病態抑制効果について検証する。

4. 研究成果

(1) sTDP の TDP-43 凝集抑制効果

C 末端に MBP タグを付けた TDP-43 タンパク質と、選択的スプライシングにより生じる sTDP タンパク質を精製した。さらに、NTD を介してヘテロダイマーを形成しない実験コントロールとして、NTD を欠く sTDP (NTD-sTDP) タンパク質を精製した。TEV プロテアーゼ添加による MBP 切断後の液-液相分離を微分干渉顕微鏡で観察したところ、TDP-43 を混合した sTDP は、コントロールとして混合した NTD-sTDP に比べて液-液相分離を示す液滴の数およびサイズが減少した。さらに、これらのタンパク質を振盪しながら濁度を経時的に測定する凝集アッセイでは、NTD-sTDP は TDP-43 の凝集を弱めないが、TDP-43 溶液に sTDP を混合すると凝集が阻害されることが示された。凝集アッセイ後の透過型電子顕微鏡観察により、NTD-sTDP と比較して sTDP が TDP-43 の凝集を阻害することが裏付けられた。TARDBP エクソン 5 までがコードする、NTD は保持するが IDR を欠いた sTDP-ex5 も同様に TDP-43 の凝集を阻害した。このことから、TDP-43 の凝集を抑制する sTDP の効果は、NTD を保持しながら IDR を欠く構造によるものであることを明らかにした (特願 2022-070532)。

(2) 野生型マウスに対する AS0 効果

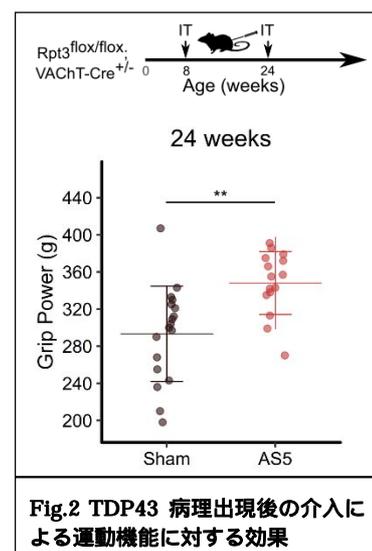
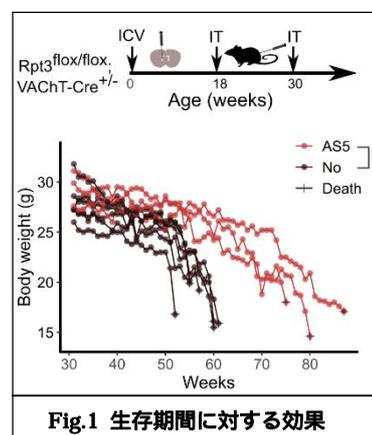
ヒトとマウスで同じ標的配列を持つ AS5 を野生型新生児マウスに脳室内投与した。1 週間後、8 週間後、12 週間後の脊髄の解析では、標的スプライシングの促進が確認された。このとき、TDP-43 タンパク質はわずかに減少していた。

次に、成体マウスに AS5 を腰椎穿刺で髄腔内投与した。同様に標的スプライシングの促進が確認され、投与 8 週間経過後も、標的スプライシングの促進作用が維持されていた。このとき、体重増加および握力には、無投与のマウスと比較して差はなかった。さらに、炎症のマーカー (Aif mRNA) は増加しなかった (PCT/JP2021/41895)。

(3) プロテアソーム欠損による TDP-43 病態に対する選択的スプライシングの促進効果

運動ニューロン特異的 Rpt3 ノックアウトマウス (Rpt3 flox/flox; VAcHt-Cre+/-) では、TDP-43 を含む ALS 関連タンパク質が 6 週齢以降に運動神経細胞に蓄積することが報告されている (Tashiro et al., 2012)。実際、8 週齢の Rpt3 flox/flox; VAcHt-Cre マウスの脊髄運動ニューロンを調べると、Rpt3 ノックアウト運動神経細胞は抗ユビキチン抗体陽性であり、時折、Iba1 陽性ミクログリアに囲まれたユビキチン陽性運動神経細胞が死んだ痕跡が観察され、運動神経細胞死の進行を示唆した。Rpt3 ノックアウト運動神経細胞では、核内 TDP-43 の減少を認める細胞が散見され、これらの細胞では核内の TDP-43 凝集や、まれに細胞質の TDP-43 の増加や凝集が観察された。

Rpt3 flox/flox; VAcHt-Cre マウスの新生児期に AS5 を脳室内投与し、さらに 16 週齢と 30 週齢に髄腔内投与した。その結果、無処置群と比較して有意な生存期間の延長が確認された (Fig.1)。さらに、既に TDP-43 が蓄積している病態に対する効果を検討するため、AS5 を 8 週齢で 1 回目、24 週齢で 2 回目を髄腔内投与した。その結果、体重減少や握力低下の抑制が確認された (Fig.2)。以上の結果から、プロテアソーム異常による TDP-43 タンパク質異常症に対して、本治療戦略が有効であることが示された (PCT/JP2021/41895)。



本研究は、ALS/FTLD の病態を理解する上で、TDP-43 の選択的スプライシングの重要性を強調するものである。これらの成果は、TDP-43 タンパク質症において、崩壊した TDP-43 アイソフォームのバランスを回復させるために、選択的スプライシングを標的とした治療の可能性を探るための基盤を提供する。これにより、TDP-43 が蓄積する神経変性疾患の新規治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koike Yuka, Sugai Akihiro, Hara Norikazu, Ito Junko, Yokoseki Akio, Ishihara Tomohiko, Yamagishi Takuma, Tsuboguchi Shintaro, Tada Mari, Ikeuchi Takeshi, Kakita Akiyoshi, Onodera Osamu	4. 巻 4
2. 論文標題 Age-related demethylation of the TDP-43 autoregulatory region in the human motor cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02621-0	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 Kato Taisuke, Manabe Ri-ichiroh, Igarashi Hironaka, Kametani Fuyuki, Hirokawa Sachiko, Sekine Yumi, Fujita Natsumi, Saito Satoshi, Kawashima Yusuke, Hatano Yuya, Ando Shoichiro, Nozaki Hiroaki, Sugai Akihiro, et al.	4. 巻 131
2. 論文標題 Candesartan prevents arteriopathy progression in cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e140555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI140555	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 山岸 拓磨、須貝 章弘	4. 巻 増刊(46)
2. 論文標題 相分離メガネをかけて見直す神経変性疾患（相分離生物学の全貌）	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 現代化学	6. 最初と最後の頁 68-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 須貝 章弘	4. 巻 39
2. 論文標題 運動ニューロン疾患の新規治療とエビデンス 筋萎縮性側索硬化症に対するアンチセンス核酸治療薬の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 311-314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 小出 眞悟、須貝 章弘、小野寺 理	4. 巻 41
2. 論文標題 【ALS-どこまでわかり、どこまで治るか】原因と発症機序 TDP-43	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 338-341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 須貝章弘
2. 発表標題 天然変性領域の発現制御と破綻から捉えるALS病態
3. 学会等名 第62回日本 神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須貝章弘
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症に対するアンチセンス核酸治療薬の可能性
3. 学会等名 第39回日本神経治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamagishi Takuma, Sugai Akihiro, Yamada Yumi, Onodera Osamu
2. 発表標題 TDP isoform lacking the intrinsically disordered region alleviates TDP-43 LLPS and aggregation
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toyama Genri, Sugai Akihiro, Yamada Yumi, Yamagishi Takuma, Kato Taisuke, Onodera Osamu
2. 発表標題 Antisense nucleotides that promote splicing of the exitron encoding the prion-like domain of TDP-43
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiro Sugai, Takuma Yamagishi, Shingo Koide, Osamu Onodera
2. 発表標題 Antisense oligonucleotides that prevent impaired splicing of TARDBP exitron caused by loss of nuclear TDP-43 function
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuma Yamagishi, Shingo Koide, Yumi Yamada, Akihiro Sugai, Osamu Onodera
2. 発表標題 TDP isoform lacking the intrinsically disordered region alleviates in vitro TDP-43 aggregation and restores aberrant splicing in TDP-43 overexpression mice
3. 学会等名 Neuroscience 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 アンチセンス核酸及びその使用	発明者 須貝章弘、小野寺理	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/41895	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 アンチセンス核酸及びその使用	発明者 須貝章弘、小野寺理	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-198595	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------