

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16504

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症におけるCHCHD2遺伝子解析

研究課題名（英文）Genetic analysis of CHCHD2 in ALS cohorts

研究代表者

池田 彩（Ikeda, Aya）

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70867796

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）：CHCHD2 KOのSH-SY5Y細胞にレトロウイルスでWT、P14L、T61Iのベクターを導入し、それぞれの遺伝子の安定発現細胞を樹立した。これらの細胞を用いて、CHCHD2 とATP5Aとの蛍光二重染色と、ミトコンドリア、核、細胞質の分画をした上でWBを行なった。その結果、CHCHD2 P14Lがミトコンドリアの局在から外れる傾向を認めており、脳病理の結果と一致していた。またTDP-43の過剰発現を行ない、サルコシル不溶性分画のWBを行なったところ、CHCHD2 KO、CHCHD2 P14Lでリン酸化 TDP-43の高発現を認めていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHCHD2 T61I変異の病理学的な解析としては、CHCHD2 T61Iが  $\alpha$ -Synucleinの異常な凝集に関わることを患者脳、iPS由来ドパミン神経細胞、ショウジョウバエ、マウスのモデルで示した（申請者ら、Hum Mol Genet, 2019、Kee et al. Hum Mol Genet, 2022）。今回、CHCHD2変異がALSで発見されたことで、PDとALS発症の分子経路を同定することが期待され、ミトコンドリアを標的とした分子標的治療の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：CHCHD2 P14L was dissociated from the mitochondria to the cytoplasm, which was observed in both SH-SY5Y cells as well as Drosophila dopaminergic and motor neurons. CHCHD2 P14L showed reduced mitochondria Ca<sup>2+</sup> uptake and elevated cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> flux, which was observed in both SH-SY5Y cells and Drosophila neuron terminals. Moreover, elevated cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> promoted TDP-43 processing and insolubilization.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：CHCHD2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CHCHD2 と CHCHD10 が PD、ALS の原因遺伝子として報告されて以降、CHCHD2 と CHCHD10 の疾患の発症に関わる機能解析が積極的に行われてきた。CHCHD2 T61I 変異の病理学的な解析としては、CHCHD2 T61I が  $\alpha$ -Synuclein の異常な凝集に関わることを患者脳、iPS 由来ドパミン神経細胞、ショウジョウバエ、マウスのモデルで示した (申請者ら. *Hum Mol Genet*, 2019, *Kee et al. Hum Mol Genet*, 2022)。CHCHD10 S59L 変異の病理学的な解析としては、ショウジョウバエ、HeLa 細胞、SH-SY5Y 細胞、トランスジェニックマウスで TDP-43 凝集およびミトコンドリアへの局在化を認め (*Baek et al. nature communications*, 2021)、ノックインマウスは、神経筋接合部と運動ニューロンの変性、脊髄ニューロンの TDP-43 凝集体を認め、進行性の運動障害、心筋症、および死亡率の増加を認めた (*Genin et al. Acta Neuropathologica*, 2019, *Anderson et al. Acta Neuropathologica*, 2019)。今回、CHCHD2 変異が ALS で発見されたことで、PD と ALS 発症の分子経路を同定することが期待され、ミトコンドリアを標的とした分子標的療法の開発につながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) は、進行性の筋萎縮、筋力低下を呈する神経難病であり、coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10 (CHCHD10) がその原因遺伝子として報告されている。また、Parkinson's disease (PD) は振戦、無動、固縮、姿勢反射障害を呈する神経難病であり、申請者らはこれまで CHCHD10 の相同遺伝子である coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2) 遺伝子変異が、PD の原因遺伝子であることを報告している。今回我々は CHCHD2 もまた ALS の原因遺伝子になりうるという仮説を立て、PD 患者 1091 例、ALS 患者 945 例で CHCHD2 遺伝子の解析を行い、両方のコホートで新規のレアバリエーションが同定された。本研究では新規 CHCHD2 のレアバリエーションをもつ疾患モデルを用いて、CHCHD protein family が PD、ALS 発症の違いにどのように関係しているのかを明らかにし、神経変性疾患の新規の分子標的療法の開発へと展開することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro での表現型解析

ヒト神経系 SH-SY5Y 細胞 (モデル細胞) を用いた病的タンパク質の凝集性の解析

内在性 CHCHD2 遺伝子をノックアウトし、CHCHD2 の野生型、P14L、T61I を再導入したヒト神経系 SH-SY5Y 細胞をモデル細胞として樹立した (以下、モデル細胞と記載)。モデル細胞を用いて、各変異体での CHCHD2、CHCHD10、TDP-43、 $\alpha$ -Synuclein のタンパク質の発現量を解析する。TDP-43 もしくは  $\alpha$ -Synuclein をモデル細胞に一過性に強発現させ、リコンビナント TDP-43 もしくはリコンビナント  $\alpha$ -Synuclein シードを細胞内に導入し、シード依存的に細胞内に凝集体を導入する。これらを免疫染色で観察し、ミトコンドリア内外で凝集体ができるかどうかを評価する。各変異体でこれらの結果に違いがあるかどうかを観察する。

モデル細胞を用いたミトコンドリアによる凝集タンパク質の分解機能の評価

ミトコンドリアには凝集タンパク質を分解する機能があること、ミトコンドリア膜電位低下で凝集タンパク質が分解されずに蓄積することが報告されている (*Linhao et al. Nature*, 2017)。これをふまえて、CHCHD2 変異体における病的タンパク質凝集のメカニズムを調べるため、各変異体の細胞からミトコンドリアを単離し、TDP-43、 $\alpha$ -Synuclein がミトコンドリア内に取り込まれるかどうか、また取り込まれた後タイムコースで観察し、TDP-43、 $\alpha$ -Synuclein のミトコンドリア内の発現がどのように変化するかを解析する。

Mitochondrial calcium uniporter (MCU)、MCU1、MCU2 との関連解析

ミトコンドリアは  $Ca^{2+}$  を取り込むことで細胞内の  $Ca^{2+}$  恒常性の維持に寄与している。ミトコンドリアへの  $Ca^{2+}$  の取込みはカルシウムユニポーターと呼ばれる複数のタンパク質から成る  $Ca^{2+}$  チャネルが担っており、これまでの研究から MCU と呼ばれるタンパク質がオリゴマー化することでチャネル孔の部位を形成することが明らかにされた。CHCHD2 P14L で  $Ca^{2+}$  の細胞質流入増加があることから、カルシウムユニポーターの働きが低下している可能性があり、それらの発現や CHCHD2 P14L との結合性について、免疫沈降で確認する。結合性が弱い場合は、化学架橋も検討する。

タブシガルギン処理による  $Ca^{2+}$  放出促進に伴う変化の観察

モデル細胞にタブシガルギン (小胞体の  $Ca^{2+}$ -ATP 分解酵素を阻害することにより、細胞内に貯蔵された  $Ca^{2+}$  の放出を促進する (*Mutihac et al. Neurobiology of Disease*, 2015)) を用いて細胞に  $Ca^{2+}$  放出の負荷をかけてみて、TDP-43 の細胞内局在に変化があるか確認する。また calpain もしくは caspase-3 によって断片化された TDP-43 があるかどうか、WB で確認する。

#### (2) マウスモデルの行動解析、病理学的評価、プロテオミクス解析

CHCHD2 P14L、T61I のノックインマウス (モデル動物作製支援制度と共同研究者からの譲渡によって作出済) を用いて、行動解析 (握力測定、Rotarod) や病理解析 (脊髄や中脳における TDP-

43、 $\alpha$ -Synuclein の蓄積の有無の観察など)を実施する。表現型解析後、2 変異体が神経におよぼす病態を分子レベルで探索する。具体的には、CHCHD2 P14L、T61I マウス脳のミトコンドリアを単離し、ミトコンドリアプロテオミクスを行う。検出されたタンパク質変化のうち TDP-43 や  $\alpha$ -Synuclein の凝集化に関与すると考えられる候補分子をモデル細胞、マウス組織で検証し、病態に関与する鍵となるタンパク質群を同定する。

(3) iPS 由来神経細胞を用いた機能解析、薬剤スクリーニング

申請者らは、すでに CHCHD2 P14L 変異を有する患者からの iPS 細胞化を進めており、現在品質評価を行っている。CHCHD2 P14L 患者 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞を用いて、CHCHD2 の局在異常・細胞内  $Ca^{2+}$  動態の変調、ミトコンドリアストレスに係る RNA 発現プロファイルを、T61I 変異患者由来 iPS 細胞と比較しつつ解析する。一方で、凝集化 TDP-43 の蓄積、凝集化  $\alpha$ -Synuclein の蓄積、神経細胞死、およびミトコンドリア機能異常に関しても、T61I 変異患者由来 iPS 細胞と比較しながら評価を行う。研究計画(1)、(2) (モデル細胞、マウス組織の解析) また上記の iPS 由来神経細胞の解析で得られた表現型や、病的タンパク質凝集に関わる候補分子を基にして、iPS 由来神経細胞を用いた薬剤スクリーニングを進める。

#### 4. 研究成果

CHCHD2 KO の SH-SY5Y 細胞にレトロウイルスで WT、P14L、T61I のベクターを導入し、それぞれの遺伝子の安定発現細胞を樹立した。これらの細胞を用いて、CHCHD2 と ATP5A との蛍光二重染色と、ミトコンドリア、核、細胞質の分画をした上で WB を行なった。その結果、CHCHD2 P14L がミトコンドリアの局在から外れる傾向を認めており、脳病理の結果と一致していた。また TDP-43 の過剰発現を行ない、サルコシル不溶性分画の WB を行なったところ、CHCHD2 KO、CHCHD2 P14L でリン酸化 TDP-43 の高発現を認めていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Aya Ikeda	4. 巻 10
2. 論文標題 Neurodegeneration-associated mitochondrial proteins, CHCHD2 and CHCHD10-what distinguishes the two?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.996061. eCollection 2022.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Aya Ikeda
2. 発表標題 The research of a mitochondrial protein CHCHD2 that is associated with Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease
3. 学会等名 神経学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田彩
2. 発表標題 Two novel variants in CHCHD2 associate with TDP-43 pathology among amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田彩
2. 発表標題 Mutational and functional analysis of the CHCHD2 gene in amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------