

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21585

研究課題名（和文）シヌクレインの凝集抵抗性変異構造の網羅的探索と疾患予防応用

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of aggregate-resistant structure and its application for disease prevention

研究代表者

星野 温（Hoshino, Atsushi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50737210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：シヌクレインタンパク質において全1アミノ酸置換ライブラリを用いて網羅的凝集性変化の評価を行い、ヒトでSNPの報告があり、進化的にも多くの種で保存されているアミノ酸置換XXXで凝集性がほぼ解消されることが分かった。XXXのノックインマウスを作製し凝集核を線条体へ定位固定注入してフィブリルの伝播を評価するパーキンソン病モデルで評価したところ、フィブリル伝播が完全に消失することが確認できたため、XXXは疾患保護的多型で、将来的にゲノム編集による疾患予防に応用可能であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではパーキンソン病に保護的にはたらく、安全な遺伝子変異を同定することに成功した。この遺伝子変異はパーキンソン病の原因物質であるシヌクレインの凝集を抑制するもので、既にヒトでの保有が確認され、一部の生物でも保存されているので安全な遺伝子変異と考えられる。今後はこの遺伝子変異を最近発展が目覚ましいゲノム編集技術で導入することができれば画期的なパーキンソン病予防方法が確立されることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Comprehensive analysis of aggregation property in α -synuclein protein was conducted using all single amino acid substitution library. Among aggregation-resistant single substitutions, the XXX substitution has been reported as human SNP and is evolutionarily conserved in many species. The XXX knock-in mouse was generated and underwent fibril seed injection in striatum as Parkinson's disease model. Fibril transmission was observed in the control wild-type mice. In contrast, the knock-in mice exhibited the clear disappearance of α -synuclein fibril. These results indicate that XXX is disease-protective polymorphism can be applied to disease prevention by genome editing in the future.

研究分野：循環器内科学

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン 凝集抵抗性 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

SNCA 遺伝子がコードする α シヌクレインタンパク質は易凝集性で細胞毒性のある線維構造を形成し、パーキンソン病、レビー小体型認知症、および多系統萎縮症等の神経変性疾患を引き起こす。しかし、その易凝集性がどのようなアミノ酸配列に起因するかは十分に解明されていない。家族性パーキンソン病の原因変異からは1アミノ酸変異により易凝集性が大きく変化することが示唆される。また疾患変異の A53T は霊長類以外では野生型として存在し、霊長類は進化の過程でより安定したアミノ酸配列を獲得したとも推測される。

一方、CRISPR-Cas の発見によりゲノム編集技術が爆発的に向上し、医療応用に向けた研究が展開されている。その対象として、まずは遺伝性疾患の変異遺伝子の修復が想定されているが、その先には難治性の慢性疾患も対象となる可能性が考えられる。そこでは疾患原因変異の修復だけでなく、疾患抵抗性変異の導入による疾患予防も選択肢となる。世界的な人口高齢化で患者数が爆発的に増加しているアルツハイマー病やパーキンソン病は、従来の方法では長期的介入が必要で医療経済的問題も大きい。ゲノム編集を用いた疾患抵抗性変異導入による疾患予防は非常に魅力的な戦略となる。そのため、インパクトのある疾患抵抗性変異を同定しそのゲノム編集方法を確立し、新しい疾患予防の技術的可能性を世界に先駆けて提示し、疾患抵抗性ゲノム編集による疾患克服という新しい研究分野を展開している。

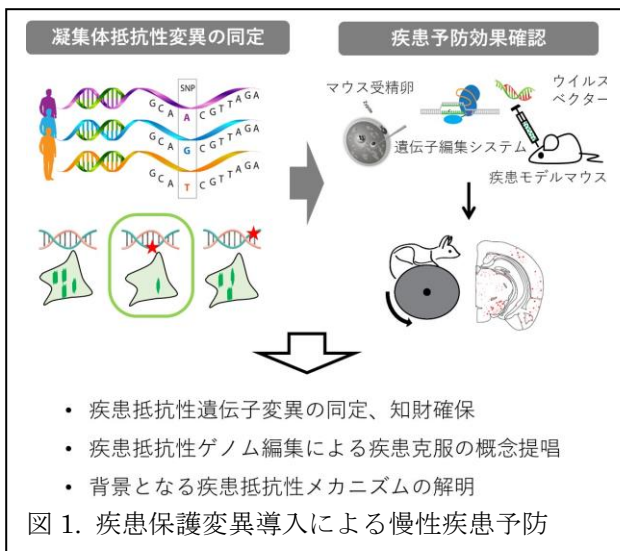


図 1. 疾患保護変異導入による慢性疾患予防

2. 研究の目的

これまでに、臨床応用を想定し、一塩基多型 (SNP) データベースである dbSNP や gnomAD、ToMMo から SNCA 遺伝子で報告されているミスセンス変異を抽出し、カスタムライブラリ作成によるアンバイアスな凝集体形成アッセイ系にて凝集抵抗性の評価を行った。その結果、A53T は最も凝集性の高い変異として確認され、さらに凝集抵抗性変異も多数同定された (図 2)。本研究では、この事前研究で見出した凝集抵抗性変異のパーキンソン病予防効果をヒト化 SNCA マウスにおいて、ゲノム編集で確認する。また、これまでにヒトで報告されていない一塩基変異についても同様のスクリーニングを行い、凝集抵抗性構造の網羅的評価を進め、疾患抵抗性変異ゲノム編集によるパーキンソン病予防法を確立する。

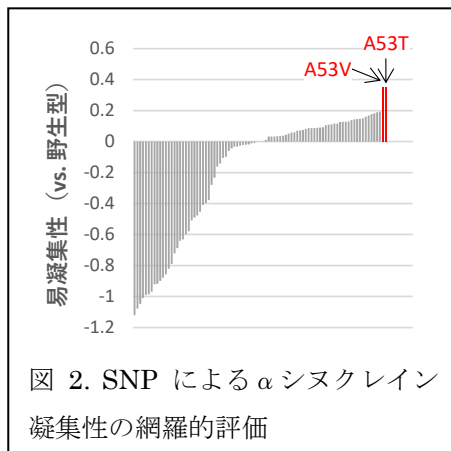


図 2. SNP による α シヌクレイン凝集性の網羅的評価

3. 研究の方法

1) 全一アミノ酸変異ライブラリによる凝集性評価 (Deep mutational scan : DMS)

ヒトで報告されている SNCA SNPs 87 個に加えて、全一アミノ酸変異を対象に同様のスクリーニングを行い、アミノ酸置換による凝集性変化を網羅的に評価する。ライブラリはレンチウイルススペースで NNK の混合塩基により α シヌクレイン - GFP 結合タンパク (aSyn-GFP) を発現させる様式で作製する。アッセイ系はライブラリ発現細胞に凝集核を投与し、凝集体形成を誘導する。凝集体形成後に界面活性剤で細胞膜を処理して、凝集していない可溶性 aSyn-GFP のみを除去す

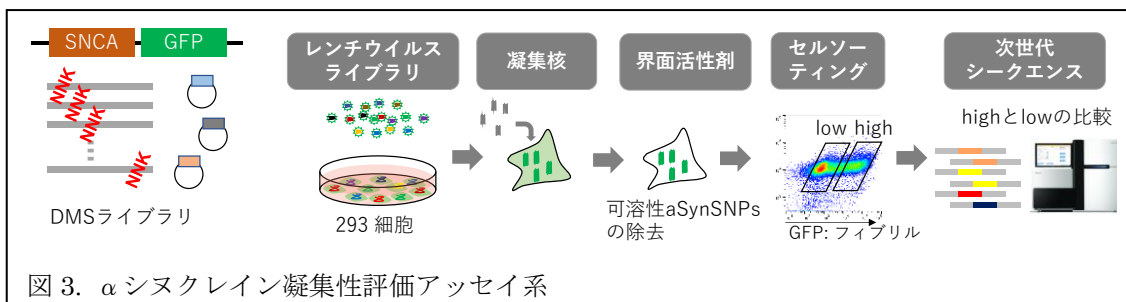


図 3. α シヌクレイン凝集性評価アッセイ系

ることで GFP シグナルによる凝集体の定量評価を可能とした。セルソーターにて凝集体の多い細胞群 (high) と少ない細胞群 (low) を回収し、アミノ酸変異を直接次世代シーケンスで評価し high と low における各変異の比を Fibril score として算出し、凝集性をスコア化する (図 3)。

2) パーキンソン病モデルマウスにおける凝集抵抗性変異における疾患予防効果の確認

スクリーニングで同定した凝集抵抗性変異に対して、個別に確認実験を行う。また現在の技術で編集可能なものは、HEK293 細胞でゲノム編集効率を確認する。ゲノム編集は HDR (相同組換え修復)、または Base editor を用いる。Cas は現時点では spCas9 または 濡木理先生が開発した spCas9-NG を使用する。以上より、ゲノム編集可能で ClinVar (ゲノムの多様性と疾患関連のデータベース) で疾患表現型が報告されていない候補変異に対して、ヒト化 SNCA マウスを用いて、①ノックインマウスで凝集抵抗性変異のパーキンソン病予防効果を確認、②アデノ随伴ウイルス (AAV) の乳児マウス脳室投与にて体細胞ゲノム編集による疾患予防効果確認、の 2 つのマウス実験を行う。パーキンソン病モデルでは 8 週齢時に α シヌクレインフィブリルを線条体へ定位固定注入し、6 か月後にフィブリルの伝播、ドパミンニューロンの脱落、マウスの運動能評価を行う (図 3)。

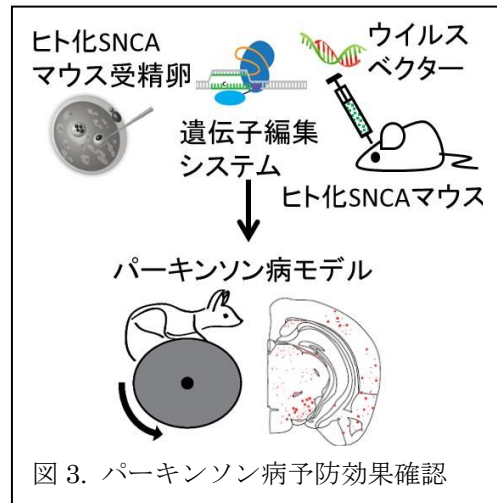


図 3. パーキンソン病予防効果確認

4. 研究成果

1) 全アミノ酸置換ライブラリによる凝集性評価 (Deep mutational scan : DMS)

DMS の結果はヒトの SNP に限局したミニライブラリの結果がそのまま反映されており、よく機能していることが確認できた。 α シヌクレインタンパク質は構造として、両親媒性 N 末端、疎水性 NAC 領域、酸性 C 末端に分けられるが、凝集性に関わることが予測されている疎水性 NAC 領域に凝集性が低下するアミノ酸置換が多数確認された (図 4 上段)。ヒトで家族性パーキンソン病変異と知られる A53T は、霊長類以下の動物では 53T が野生型で知られている。しかし霊長類以下の動物でも長寿の動物は存在し、何らかの凝集抵抗性変異を持っていることが推測される。疎水性 NAC 領域の進化的保存状況は図 4 下段の通りで、そのような視点で結果を見ると、2 つのアミノ酸置換が目される。またそのうちの 1 つ、XXX はヒトでも SNP の報告があり、培養細胞における凝集性評価でも、凝集性が消失していることが確認された (図 5)。

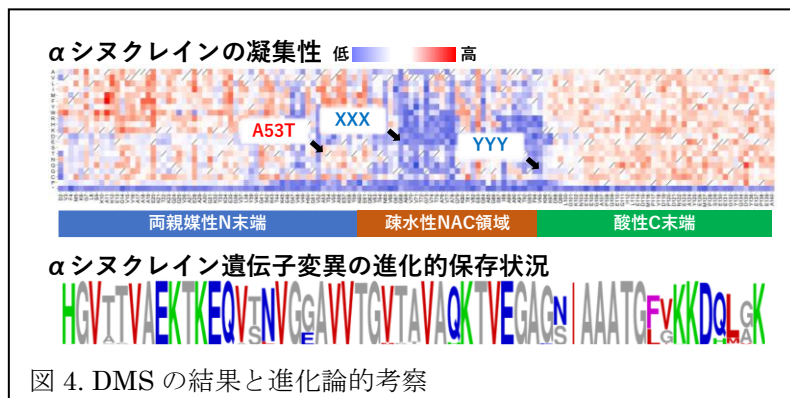


図 4. DMS の結果と進化的考察

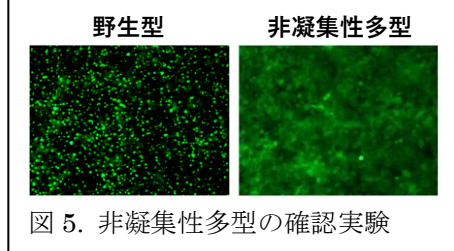


図 5. 非凝集性多型の確認実験

2) 非凝集性アミノ酸置換によるパーキンソン病予防

非凝集性変異 XXX はヒト SNP で報告があり、疾患表現型は確認されていない。また進化的にも多くの生物で保存されているため安全な変異と考えられる。しかしこの変異は塩基編集が難しいため、ノックインマウスを作製して疾患予防効果を確認した。ノックインマウスは Cas9-RNP、gRNA、ssODN を B6 受精卵にエレクトロポレーションすることで作出した。 α シヌクレインフィブリルを線条体へ定位固定注入し、6 か月後にフィブリルの伝播を評価する系ではノックインマウスでフィブリルの伝播が完全に消失していることが確認できた。

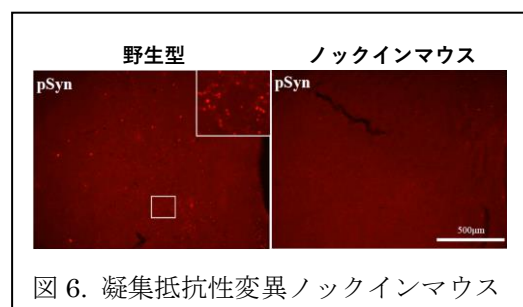


図 6. 凝集抵抗性変異ノックインマウス

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	渡邊 義久 (Watanabe Yoshihisa) (50363990)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

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