

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591254

研究課題名(和文)新規病態スペクトラムALS/FTLD-Uにおける分子病態の解明

研究課題名(英文)Novel pathological pathway of ALS/FTLD-U

研究代表者

伊東 大介 (Ito, Daisuke)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80286450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子optineurin (OPNL)、ubiquitin (UBQLN)2が次々と同定されたが、その分子メカニズムは不明である。OPNLとUBQLN2はいずれも蛋白分解機構に關与することが知られており、我々の研究成果では、両分子がRab11陽性endosomal vesicleに共局在し、OPNLとUBQLN2のALS関連変異は、いずれもこのvesicleに障害を引き起こすことを観察している。さらに、このvesicleは、p62、ULK1陽性でありendosomeとautophagyをつなぐ蛋白品質管理に關連した新規の細胞内メカニズムである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin (UBQLN) 2 localized in endosomal vesicles formed by the ALS-linked molecule optineurin (OPTN) and also co-localized with an initiator of the autophagic process, ULK1, after amino acid starvation. OPTN-vesicles were ubiquitin- and p62-immunopositive. An ALS-linked mutation (E478G) in OPTN abolished vesicle formation. ALS-linked mutations in UBQLN2 additively enhanced UBQLN2 aggregation and formation of inclusion bodies, resulting in mislocation from OPTN-vesicles. UBQLN2 was found to be a potent regulator of the levels of OPTN and the FTD-linked secretory factor progranulin, possibly via the endosomal system, and ALS-linked mutations disturbed these functional consequences. This study demonstrates that ALS-linked mutations in both OPTN and UBQLN2 interfere with the constitution of specific endosomal vesicles, suggesting that the vesicles are involved in protein homeostasis and that these proteins function in common pathological processes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ubiquitin optineurin 筋萎縮性側索硬化症 endosome autophagy

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は進行性に上位, 下位の運動ニューロンが障害を受け、数年のうちに呼吸不全に陥る難治性疾患である。しかしその疾患概念の確立から 140 年間を経た現在まで孤発性 ALS の原因は不明であった。一方、2006 年に 2 つのグループより、ALS とユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions; FTL-D) の封入体の構成蛋白として TAR DNA Binding Protein-43 (TDP-43) が同定された。さらに本邦では三山型 ALS として知られていた認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症 (ALS with dementia; ALS-D) でも運動ニューロン以外に大脳皮質に TDP-43 陽性封入体が観察され、FTL-D、ALS-D と ALS が共通の分子生物学的基盤をもつ疾患スペクトラムであることが病理学上示めされた。このことは遺伝学からも支持され、2008 年に複数のグループから家族性 ALS、FTL-D の中で TDP-43 変異が相次いで見出され、TDP-43 が ALS/FTL-D における神経変性の一次的原因となりうることを示されたとともに、TDP-43 プロテノパチーという新たな疾患概念の確立に結び付いた。ALS/FTL-D 疾患スペクトラムは更なる広がりを見せた。2009 年、TDP-43 と同じ RNA 結合蛋白の Fused in sarcoma (FUS) が染色体 16 番に連鎖する ALS6 の原因遺伝子であることが同定された。一方、Neumann M. らをはじめ複数のグループが、ユビキチン陽性タウ、TDP-43 陰性封入体を持つ FTL-D において、FUS 蛋白の細胞質蓄積を報告した。したがって、TDP-43 と同様に、FUS プロテノパチーとして新規疾患概念として提唱されるにいたった。最近の検討では、孤発性 ALS で FUS、TDP-43 が共存する封入体が報告されており二つの RNA 結合蛋白がクロストークして、ALS/FTL-D 疾患スペクトラムの分子メカニズムを構成している可能性が示唆されている。

TDP-43 蛋白は、脳組織では、全長以外に 35kDa、25kDa の C 末端断片が存在し、ALS/FTL-D では C 末端断片の異常リン酸化と蓄積が報告されている。これまでに、35kDa、25kDa の C 末端断片 (p35f, p25f) は、caspase-3 依存性に産生されていることが報告されていた。我々は、caspase-3 欠損細胞を用いた解析で、従来報告されている caspase-3 依存性の p35f、p25f 以外に、caspase-3 非依存性の新規アイソフォーム (p35iso, p25iso) が存在することを見出した。さらにアラニンスキャンにより、p35iso, p25iso が開始コドンのシフトにより産生される新規のアイソフォーム (p35iso: aa 85-414, p25iso: aa ~170-414) であることを同定した。重要な点は、p35f、p35iso は、核移行シグナルをもたないが RNA 認識モチーフは完全に保たれていることである。この

p35f, p35iso を培養細胞に発現させることにより、RNA の代謝や品質管理に關与する SG が誘導されることが示された。したがって、TDP-43 蛋白の新規機能として SG を介し RNA の安定化に關与することが示された。以上より、TDP-43 プロテノパチーの病態に RNA 品質管理機構が關与していることが示唆された。一方、我々は FUS においても C 末端の欠損株 (C-FUS) では核輸送が著明に障害されており、FUS C 末端の ALS 関連変異は相対的にその局在が核から細胞質に移行していることを確認した。したがって、FUS の C 末端は核移行シグナルで ALS 関連変異はその作用を障害していることが示された。さらに、変異型 FUS の発現により TDP-43 の p35 断片と同様に高率に SG を形成することを示した。以上より、ALS 関連変異は核輸送に障害を引き起こし、FUS の細胞質への過剰移行、蓄積が ALS /FTL-D の変性カスケードのトリガーであることが示された。このことから TDP-43 と FUS は RNA 結合蛋白という共通性だけでなく、核から細胞質への移行と SG の形成という点からも ALS/FTL-D の病態カスケードを協同して構成している可能性が推測された。これらの知見をもとに、我々は TDP-43 と FUS などの RNA 結合蛋白の細胞質移行と過剰蓄積が、RNA 代謝を攪乱し神経変性を引き起こすとの仮説を提唱している。さらにこの RNA 品質管理機構が ALS の新しい治療ターゲットとなりうると期待している。

2. 研究の目的

本研究では、TDP-43、FUS の細胞質内蓄積と神経変性への分子メカニズムを *in vitro* で解析し、他の ALS 関連遺伝子との分子 pathway を明らかとし、新しい治療ターゲットを見出すことを第一の目標とする。さらに、細胞質移行、SG 形成を引き起こす細胞質移行型 TDP-43 (35iso)、FUS (変異型 FUS、C-FUS) の Tg マウスを作成し、RNA 結合蛋白の過剰細胞質移行が、運動ニューロン変性を引き起こすか個体レベルで検証し、ALS の疾患モデルマウスとして確立することを最終目的とする。Aim (1): ALS 関連分子、OPNL、UBQLN2、C9orf72 と TDP-43、FUS のクロストーク解明 OPNL 変異、UBQLN2 変異に伴う家族性 ALS では、いずれも TDP-43 蛋白の蓄積が病理学的に観察されている。Aim2 では、上述のごとく我々がすでに樹立している TDP-43、FUS 発現細胞、ALS 患者由来 iPS 細胞 (第 28 回日本認知症学会発表, 2009) を用いて、OPNL や UBQLN2 による TDP-43、FUS の分解、SG 形成や細胞内異常局在への関与を検討する。本研究により、ALS の病態メカニズムにおいて我々が提唱している RNA 品質管理機構の破たん OPNL と UBQLN2 による新規の蛋白品質管理機構とのクロストーク解明を目指す。また、もっとも頻度の高い家族性 ALS の原因遺伝子として C9orf72 非翻訳領域 6 塩基反復配列の異常伸長が注目されている。とくに、孤

発性 ALS においても 4-8% に同遺伝子変異が存在することから、その病態メカニズムの理解は極めて重要である。現在、3 つの病態メカニズムが想定されている。すなわち 異常伸長による C9orf72 の発現低下、 異常伸長反復配列 mRNA への核内 RNA 結合蛋白異常集積、 異常伸長反復配列から DRP (poly glycine-alanine (GA), poly glycine-proline (GP), poly glycine-arginine (GR)) の non ATG 翻訳と DRP の蓄積があげられる。我々は DRP に注目し、それぞれ (poly-GA, GP, GR) の人工合成遺伝子を作成し発現ベクターに導入し解析する。本研究では、DRP が、蛋白品質管理機構や RNA 品質管理機構に与える影響を明らかにする。各 DRP 発現細胞を作成し、細胞死、TDP-43/FUS 陽性 SG の形成過程、UPS、小胞体ストレスのレポーター分子の動態を検討する。また、同発現細胞における発現 mRNA の変動をトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) し RNA 品質管理機構への関与を検討する。

Aim (2): 細胞質移行 TDP-43、FUS Tg マウスの作製と分子メカニズムの in vivo 解析 これまでに、TDP-43 の Tg マウスは数多く作成されている。興味深い点は、野生型 TDP-43 の Tg マウスでも ALS と酷似した表現型を呈する点にあるがその分子病態は不明である。上述のごとく、細胞質移行型 TDP-43、FUS (p35iso、変異型 FUS、 C-FUS) の発現、細胞質蓄積は ALS/FTLD の分子病態のトリガーとなることが示唆される。すなわち、野生型 TDP-43 での過剰発現でも細胞質移行型 TDP-43 (p35iso) が細胞質に蓄積すれば神経変性を起こしうると解釈できる。Aim(2)では、細胞質移行型 TDP-43(35iso)、FUS (変異型 FUS、 C-FUS) の Tg マウスを作成し、in vivo で神経変性を誘導できるかを検討する。これまで、TDP-43 研究では RNA 結合能の欠損した 25kDaC 末端断片 (p25f) が注目されていた。しかし、最近の一連の研究より RNA 結合能の有した p35iso、p35f、変異型 FUS の細胞質移行と RNA 代謝を攪乱が変性カスケードのトリガーであると我々は考えている。Aim (1) では、TDP-43、FUS が細胞質に移行した際に生じる共通の分子機構を明らかにするとともに、創薬、治療ターゲットの確立につながると考えている。Aim(2)では Tg マウスから、細胞質移行型 RNA 結合蛋白が運動ニューロン変性のトリガーとなるとの我々の仮説を in vivo で証明するとともに、ALS の神経変性過程が個体レベルで詳細に解析できることとなり、ALS のモデルマウスとして利用できると考えている。

3. 研究の方法

Aim (1): TDP-43 と FUS などの RNA 結合蛋白の細胞質移行と過剰蓄積が、RNA 代謝を攪乱し (RNA 品質管理機構の破たん) 神経変性を引き起こすとの仮説を提唱している (Ito et al. Neurology, 2011) . 本研究では、OPNL、

UBQLN2 による RNA 品質管理機構への関与を検討する。我々がすでに樹立している TDP-43、FUS 定常発現細胞、ALS 患者由来 iPS 細胞に、OPNL、UBQLN2 変異株を強制発現させて分子レベルで解析する。SG の形成頻度、TDP-43、FUS の細胞質への移行を subcellular fractionation にて評価し、OPNL/UBQLN と FUS/TDP-43 の二つの病態カスケードの関連を明らかにする。C9orf72 6 塩基反復配列異常伸長の分子病態の解明に関しては、人工合成遺伝子より GGGGCC の繰り返し配列をさけて対応コドンより DRP (poly-GA、GP、GR) cDNA をそれぞれ合成、pcDNA にサブクローニングし発現ベクターを作成する。蛋白品質管理機構に注目して DRP 発現による影響を UPS、小胞体ストレス、endosomal traffic のそれぞれのレポーター分子である Ubiquitin-G76V-GFP、pCAX-F-XBP1-DBD-Venus、分泌型 progranulin で評価する。さらに、細胞障害、細胞死を LDH assay、CellTiter、caspase-3 assay にて評価し poly-GA、GP、GR のそれぞれの毒性を明らかにする。さらに、Atg5 欠損線維芽細胞、薬剤 (MG132, Lactacystin, 3-MA, Bafilomycin A1) で評価し DRP の分解処理過程を明らかにする。また、本疾患では、病理学的に TDP-43 の異常局在と蓄積が報告されており、DRP が RNA 品質管理機構に及ぼす影響に注目する。Aim2 と同様に TDP-43 定常発現細胞、ALS 患者由来 iPS 細胞に、DRP を強制発現させ、SG の形成、TDP-43 の細胞質への移行を解析する。さらに、定常発現細胞を樹立し DRP に相互作用する分子を免疫沈降法により解析する。共沈する分子を SDS-PAGE で展開し、nanoLC-MS/MS 法を用いて同定する。さらに同発現細胞における RNA 品質管理機構を網羅的に解析するため、変動する mRNA 群をトランスクリプトーム解析し RNA 品質管理機構への関与を検討する。本研究では、ALS にかかわる分子群の複雑な病態パスウェイを明らかにすることにより、新規治療ターゲットの同定が期待できる。

Aim (2): 細胞質移行 TDP-43、FUS Tg マウスの作製と分子メカニズムの in vivo 解析 これまでに TDP-43 の Tg マウスは作成されているが、野生型 TDP-43 の Tg マウスでも ALS と酷似した表現型を呈することが報告されている。したがって、TDP-43 の蛋白量は厳格に制御され、生理的範囲を少しでも逸脱すると神経変性を引き起こすと考えられているが、その詳細な分子病態は不明である。一方、ALS 関連 FUS Tg マウスは、いまだ報告がない。Aim (2)では、細胞質移行型 RNA 結合蛋白が運動ニューロン変性の中核的役割を果たすとの仮説のもと、細胞質移行型 TDP-43、FUS (p35iso、変異型 FUS、 C-FUS) Tg マウスを作成し、神経変性を誘導できるかを検討する。ここでもちいる変異型 FUS は、ALS 関連変異 R514S、R521C と P525L の 3 つを導入する。これらの変異は FUS の細胞質移行を相加

的に働くことが我々の検討から示されており、Tg マウスでもより強い表現型を示すものと予想される。これら cDNA は、Thy-1 プロモーターの下流に導入し、トランスジェニックベクターとする。このベクターでは、目的遺伝子を神経細胞に安定に発現し、多くの Tg マウスの作製に利用されており信頼度が高い。我々も本ベクターをもちいて、運動神経系に強い障害を持つ変異 seipin Tg マウスを産出することに成功している。F1 ヘテロ変異体獲得後は、細胞質移行型 TDP-43、FUS Tg マウスが樹立した場合、生化学的 (SG マーカー、TDP-43、FUS 発現、不溶分画、細胞質分画) 組織学的 (H&E、TUNEL 染色、TDP-43、FUS、ユビキチン免疫染色) 検査を行いその神経変性過程を検討する。特に、脊髄前角、末梢神経の変性は詳細に行う。行動解析としては生存曲線を比較するとともに、footprint、rota-rod treadmill (ENV-577, neuroscience, Tokyo)、hanging wire test を評価して運動能力、活動性を定量的に解析する。本研究により、細胞質移行型 RNA 結合蛋白の蓄積が神経変性のトリガーとなることを *in vivo* で証明するとともに、運動ニューロン変性の分子機構を *in vivo* レベルで解析できることとなる。我々の *in vitro* データからは、ALS 関連変異単独導入 TDP-43 や FUS よりも強力な早い表現型を呈する ALS のモデルマウスを得ることができ、新規治療戦略の確立、薬剤の評価に強力な役割を担うことが期待できる。

4. 研究成果

Aim(1): 近年新たな ALS 原因遺伝子 optineurin (OPNL)、ubiquilin (UBQLN)2、C9orf72 非翻訳領域 6 塩基反復配列の異常伸長が次々と同定されたが、その分子メカニズムは不明である。OPNL と UBQLN2 はいずれも蛋白分解機構に関与することが知られており、我々の研究成果では、両分子が Rab11 陽性 endosomal vesicle に共局在し、OPNL と UBQLN2 の ALS 関連変異は、いずれもこの vesicle に障害を引き起こすことを観察している。さらに、この vesicle は、ubiquitin、p62、ULK1 陽性であり endosomal traffic と autophagy をつなぐ蛋白品質管理に関連した新規の細胞内メカニズムである可能性が示唆された(図 1, 2)。一方、もうひとつの原因遺伝子 C9orf72 非翻訳領域 6 塩基反復配列から翻訳される DRP においては、Neuro2a 細胞に発現したところ poly-GA が、Ubiquitin 陽性、p62 陽性封入体を形成することを見出した。一方 poly-GP は細胞全体に瀰漫性に、poly-GR は細胞質に局限していた。さらに細胞内異常封入体を形成し、蛋白品質管理機構に影響を及ぼす可能性を見出している(図 3)。今後は RNA 品質管理機構の障害とのクロストークを検討したい。

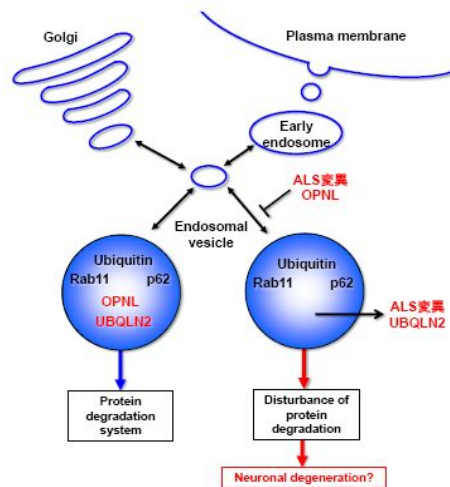


図 1 OPNL+UBQLN2+ vesicle と ALS の病態カスケード。強制発現 OPNL は Ubiquitin、p62 陽性 endosomal vesicle を形成し蛋白品質管理機構に関与すると考えられている。ALS 変異 OPNL は、endosomal vesicle の形成能が障害されている。また、ALS 変異 UBQLN2 は、OPNL vesicle の局在が障害されている。

Aim(2): 変異型 FUS Tg マウス (C-FUS) -

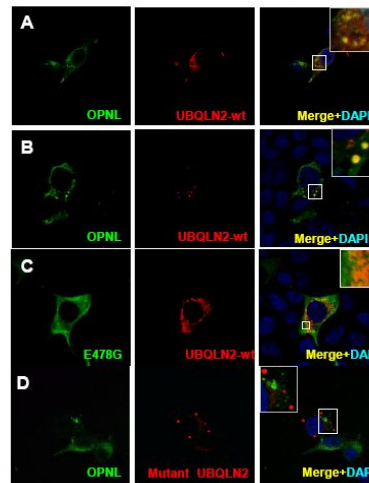


図 2 OPNL+UBQLN2+ vesicle の細胞内分布 HA- OPNL と myc-ubiquilin2 発現ベクターを cDNA を N2a 細胞 (A, C)、HeLa 細胞 (B) にトランスフェクション後、抗 HA もしくは myc 抗体で染色した。野生型 OPNL の強制発現では、UBQLN2 陽性の OPNL-vesicle を形成する。ALS 変異 OPNL では vesicle は形成できない。一方

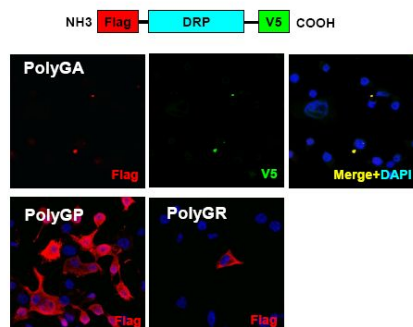
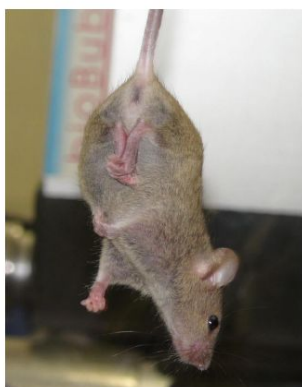


図 3 DRP の細胞内分布 FLAG-DRP-V5 (pol-yGA, -GP, -GR) cDNA 発現ベクターを N2a 細胞にトランスフェクション後、抗 FLAG もしくは V5 抗体で染色した。polyGA では、細胞質内に封入体を形成している。

ラインの樹立を達成した。免疫組織にて、変異 FUS の発現を神経細胞で確認した。さらに、20 週齢の時点では体重減少、振戦、歩行障害、

abnormal limb reflex など明らかな運動障害が出現し、今後、系統としての樹立、病理学的、生化学的解析を進めたい(図4)。TDP-43 の Tg マウスは数多く作成されて、興味深い知見として野生型 TDP-43 の Tg マウスでも ALS と酷似した表現型を呈する点にあるがその分子病態は不明である。これまでに、T FUS Tg マウスの報告はきわめて少ない。変異型 FUS Tg マウスが運動ニューロン症状を呈すれば、新規の ALS モデルマウスとして極めて有用である。



△C-FUSTg mouse

図4. 変異型Fusトランスジェニックマウスの Abnormal limb reflex

(A-B)変異型Fusトランスジェニックマウスは、生後2ヶ月の時点で、全身の振戦と歩行障害、tail lifting test にてAbnormal limb reflex(矢印)を認めた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1)Yagi T, Ito D, Suzuki N. Evidence of TRK-Fused Gene (TFG1) function in the ubiquitin-proteasome system. Neurobiol Dis; 66C:83-91(2014). 査読有
- (2)Koizumi K, Tsukada Y, Ito D, Momoshima S, Okamoto S, Suzuki N. Meningoencephalopathy as a clinical manifestation of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome. Neurology and Clinical Neuroscience; 1(2): 84-86 (2013). 査読有
- (3)Sim MFM, Dennis RJ, Aubry EM, Ramanathan N, Sembongi H, Saudek V, Ito D, O'Rahilly S, Siniouoglou S, Rochford JJ. The human lipodystrophy protein seipin is an ER membrane adaptor for the adipogenic PA phosphatase lipin 1. Molecular Metabolism; 2 (1): 38-46 (2013). 査読有
- (4)Nihei Y, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Yagi T, Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N. Enhanced aggregation of androgen receptor in induced pluripotent stem cell-derived neurons from spinal and bulbar muscular

- atrophy. J Biol Chem;288(12):8043-52 (2013). 査読有
- (5)Yagi T, Osaka M, Ito D, Nihei Y, Ohira T, Takahashi S, Suzuki N. Drug-induced intracranial cystic lesion: a complication of antibiotic treatment via an Ommaya reservoir. Neurology and Clinical Neuroscience;1(1):41 (2013). 査読有
- (6)Garfield AS, Chan WS, Dennis RJ, Ito D, Heisler LK, Rochford JJ. Neuroanatomical characterisation of the expression of the lipodystrophy and motor-neuropathy gene Bsc12 in adult mouse brain. PLoS One.;7(9):e45790 (2012). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- (1)伊東 大介 TDP-43、FUS/TLS と Ataxin2 による ALS/FTLD-U の分子病態. (学会賞受賞講演) 第 32 回日本認知症学会、長野、2013.11.8
- (2)Ito D, Progress in disease specific induced pluripotent stem cell research for age-related neurodegenerative disease. (シンポジウム) 第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013. 9.13
- (3)Ito D, Suzuki N. (Symposium) Modeling of age-related neurodegenerative diseases with induced pluripotent stem cells. Neuro2013, Kyoto, 2013. 6.22

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)
なし

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
伊東 大介 (DAISUKE ITO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 80286450