

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890228

研究課題名(和文) iPS細胞とモデル動物を用いたFUS遺伝子変異を伴う家族性ALSの病態解析

研究課題名(英文) Characterization of ALS-Associated FUS Mutations using iPSCs and mouse models.

研究代表者

八木 拓也 (YAGI, TAKUYA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30528740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：1. 百寿者iPS細胞由来神経細胞は、その他の疾患由来iPS細胞と比較して、神経変性疾患におけるバイオマーカーを評価した研究におけるコントロールとして応用可能であることが示された。本研究より、超高齢者の亡くなられたあとの皮膚からでもiPS細胞樹立は可能であり、神経変性疾患研究へ応用が可能であることが示された。

2. C末端の欠損株(C-FUS)の変異型FUS Tgマウスの樹立を行った。表現型の検討で運動ニューロン疾患を示唆する所見は認められなかったが、組織学的な検討において、C-FUSの変異型マウスにおいて核移行の障害を認めた。

研究成果の概要(英文)：1. We generated iPSCs from fibroblasts obtained immediately postmortem from centenarian donors who were extremely healthy until an advanced age. The series of iPSCs would be useful in neurodegeneration and longevity research and as valid super-controls for use in studies of various late-onset diseases.

2. We generated transgenic mutant FUS mice under the control of thy-1 promoter who express mutant FUS protein (C-terminal region deleted protein) particularly in the central nervous system. Motor phenotype evaluation showed no significant motor dysfunction through 50 weeks follow-up. Immunohistochemical study showed nuclear transport impairment, resulting in cytoplasmic accumulation of FUS protein. This finding is compatible with in vitro studies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 遺伝子改変マウス iPS細胞

## 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 プロテオ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 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 プロテオ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。筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭葉変性症の共通の分子基盤として、RNA 結合蛋白である TDP-43 と FUS が同定された。

我々は、これまでの研究で TDP-43 蛋白の新規機能として SG を介し RNA の安定化に関わることが示された。さらには、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 関連変異は相加的にその局在が核から細胞質に移行していることを明らかにした。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。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。

2007 年、山中らはヒト線維芽細胞を用いて、ES 細胞に匹敵する多分化能を有する iPS (induced pluripotent stem) 細胞の樹立に成功した。この技法を応用して患者由来 iPS 細胞を樹立することができれば、その多能性を基に、疾患に関連した臓器を含む種々の組織を誘導することが可能となる。そのため、生体からの入手が困難である中枢神経系の組織の作成も可能となり、従来にはない観点からの疾患研究が期待できる。さらに、将来的に、再生医療に応用する場合、疾患由来の幹細胞レベルでの異常を把握することは、有効性・安全性を担保するために必須である。我々はすでに、多数の神経疾患患者由来 iPS 細胞に成功しており、それらを神経細胞へ分化誘導を行い、解析を行ってきた経験がある。本研究では、FUS の核内輸送と細胞質内蓄積と神経変性への分子メカニズムについて iPS 細胞技術を用いて、変異 FUS 患者由来 iPS 細胞の樹立、神経細胞への分化誘導を行い、*in vitro* での網羅的解析 (特に Exon Array 解析) を行ない、RNA dysregulation を明らかにするとともに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 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標とする。

## 2. 研究の目的

Aim 1: 変異 FUS 患者由来 iPS 細胞を用いた TDP-43/FUS と RNA 軸索輸送および RNA dysregulation に関する検討

我々の検討では、TDP-43、FUS といった RNA 結合蛋白の細胞質内蓄積が変性カスケードのトリガーとなることが示されているが、その神経変性分子機構の詳細は不明である。Aim1 では、患者由来皮膚線維芽細胞より疾患由来 iPS 細胞の樹立を行い、それらを神経細胞 (さらには運動ニューロン) へ分化誘導を行い、疾患由来神経細胞を、生化学的、細胞生物学的解析を行う。生化学的解析として、TDP-43・FUS の発現量、プロセッシング、リン酸化をウエスタンブロット、蛍光免疫染色により正常対象者と神経疾患を比較する。細胞生物学的解析として、RNA の軸索輸送の障害に着目し、RNA 輸送と運動ニューロン変性の分子メカニズムの関連を検討する。さらには、マイクロアレイ、Exon Array 解析、プロテオミクス解析により mRNA、蛋白質の発現を網羅的に解析する。特に、スプライシング

バリエーションの異常に注目し、RNA dysregulationを解析する。

Aim 2: 変異型 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、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。上述のごとく、FUS (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。

Aim2 では、細胞質移行型 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。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ことの我々の仮説を in vivo で証明するとともに、ALS の神経変性過程・RNA dysregulation 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: 変異 FUS 患者由来 iPS 細胞を用いた検討

疾患 iPS 細胞を用いた研究を行う際に、重要な問題となるのはコントロールとなる正常 iPS 細胞である。特に、神経変性疾患のような年齢依存性に頻度の上がる高い高齢発症疾患は、細胞提供者が晩年に発症する可能性は否定できない。従って、神経変性疾患患者のコントロールには、重篤な疾患が否定された高齢者から iPS 細胞を作成する必要があると考えた。慶應義塾大学倫理委員会の承認のもと生前重篤な疾患がなく極めて健康な老後を過ごした百寿者 (105 歳以上) の 2 例より iPS 細胞の樹立を行い、特性解析を行った。

Aim 2: FUS Tg マウスの作製と分子メカニズムの in vivo 解析

変異型 FUS は、AC 末端の欠損株 (C-FUS) を 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した。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と考えた。F1 ヘテロ変異体獲得後は、本大学医学部構内の共同動物実験施設で、飼育を行った。FUS Tg マウスを、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した。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 などを評価して運動能力、活動性を定量的に解析した。

### 4. 研究成果

Aim 1: 変異 FUS 患者由来 iPS 細胞を用いた検討

百寿者 (105 歳以上) の 2 例より iPS 細胞の樹立を行い、特性解析を行った。免疫染色において、Tra1-60、Tra1-81、SSEA3、SSEA4 の発現確認を行った。RT-PCR において、transgene の silencing と ES マーカーの確認を行った。三胚葉の分化能を評価するため、in vitro で胚葉体を介して、内胚葉・中胚葉・外胚葉への分化を行った。また in vivo で SCID マウスへ iPS 細胞の皮下注を行い、テラトーマの形成を認め、三胚葉への分化の確認を行った。以上より、超高齢者の皮膚からでも iPS 細胞を作り出せることを示したとともに、重篤な疾患のない理想的な正常 iPS 細胞 (スーパーコントロール) が確立できた。百寿者由来 iPS 細胞を Embryoid Body を介して、神経系への分化誘導を行い、iPS 細胞由来神経細胞レベルでアミロイド の測定を行ったところ、ポジティブコントロールとして用いた家族性アルツハイマー病 (Presenilin1 変異型および Presenilin2 変異型) 由来と比較して、有意に A 42/A 40 ratio が低いことが示された。さらに、神経細胞レベルにおいて、synuclein および tau の発現をみたところ、家族性パーキンソン病 (PARK4; synuclein triplication) と比較して、有意に低いことが示された。以上から、A および synuclein をバイオマーカーとした研究におけるコントロールとして応用可能であることが示された。本研究より、超高齢者の亡くなられたあとの皮膚からでも iPS 細胞樹立は可能であり、神経変性疾患研究へ応用が可能であることが示され、早期診断法や新規治療薬の開発につながるものと考えられる。

Aim 2: 変異型 FUS Tg マウスの作製と分子メカニズムの in vivo 解析

C 末端の欠損株 (C-FUS) の変異型 FUS Tg マウスの表現型評価を行った。経時的に体重測定、運動機能評価 (rota-rod treadmill、hanging wire test)、異常反射 (abnormal limb reflex) の出現の有無について、評価を行ったが、経過期間中 (生後 50 週まで) において明らかな異常所見は認められなかった。ヘテロ接合体の変異型 FUS Tg マウス (C-FUS) において、我々が樹立した系統において、表現型の検討で運動ニューロン疾患を示唆する所見は認められなかった。また、組織学的な検討において、C-FUS の変異型マウスにおいて核移行の障害を認め、細胞質へ FUS の蓄積を認めたが、明らかな神経変性は認められなかった。よって、我々は、さらなる検討を行うために、ホモ接合体の変異型 FUS Tg マウス (C-FUS) の作成を行って、表現型の解析を進めている。さらなる評価として The Jackson Laboratory より購入した wild type TDP-43 の変異型マウスを今回樹立した変異型 FUS Tg マウス (C-FUS) と交配を行い、得

られた仔の genotyping を行い、TDP-43 およ  
びFUSが両方とも陽性のマウスを TDP-43/FUS  
Tg マウスとして、表現型の解析を現在検討中  
である。

#### 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1件)

(1) Yagi T, Ito D, Suzuki N. Evidence of  
TRK-Fused Gene (TFG1) function in the  
ubiquitin-proteasome system. Neurobiol  
Dis. 66:83-91:2014.(査読有)  
doi: 10.1016/j.nbd.2014.02.011.

〔学会発表〕(計1件)

(1) 八木拓也, 小堺有史, 伊東大介, 岡田  
洋平, 赤松和土, 二瓶義廣, 鍋谷彰, 広瀬  
信義, 岡野栄之, 鈴木則宏「疾患特異的 iPS  
細胞を用いたアミロイド と -synuclein  
の評価」第31回日本認知症学会学術集会、  
茨城県つくば市 2012年10月26日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 拓也 (YAGI, Takuya)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 30528740