

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21521

研究課題名（和文）RNA fociをターゲットにした人工的オートファジー誘導システムの構築

研究課題名（英文）Establishment of autophagy-inducing system to degrade RNA foci

研究代表者

井上 敬一（Inoue, Keiichi）

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：30396981

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）：ALSやFTDは進行性・致死性の神経変性疾患で、これまで多くの研究者・製薬企業がその治療法の開発に挑んできたが、現在のところ有効な治療法がない。申請者は、これらの疾患を治療するための2種類の遺伝子プラスミドシステムを考案し構築することができた。現在、さまざまな病態モデル細胞や動物を用いて、その効果を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSやFTDは進行性・致死性の神経変性疾患で、これまで多くの研究者・製薬企業がその治療法の開発に挑んできたが、現在のところ有効な治療法がない。申請者は、本研究において、これらの疾患を治療するための2種類の遺伝子プラスミドシステムを構築することができた。今後、これらを実際の患者や患者由来組織に導入し、期待される効果が得られるか検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：ALS and FTD are progressive and fatal neurodegenerative diseases, and many researchers and pharmaceutical companies have tried to develop treatments for them, but there is currently no effective treatment. The applicant was able to devise and construct two gene plasmid systems for treating these diseases. Currently, the effects are being investigated using various pathological model cells and animals.

研究分野：病態医化学

キーワード：オートファジー RNA foci 神経変性疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

機能未知の遺伝子 C9orf72 のイントロンへの GGGGCC リピートの挿入変異は、進行性の神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)と前頭側頭型認知症(FTD)の最大の原因である。この変異は異常 mRNA を発現させ、凝集性の高いタンパク質を産生すると同時に、mRNA 自身も核内で凝集し(RNA foci と呼ぶ)細胞毒性を示す。このような病態機構は筋緊張性ジストロフィーや脆弱 X 症候群でも報告されている。実験的には、リピート配列に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより、RNA foci の増加や病態の進行を止めることはできるが、すでにできてしまった RNA foci を除去することは出来ない(Sareenら *Sci Transl Med*, 2013)。それゆえ、RNA foci の除去を目的とした治療法が求められる。

オートファジーは、タンパク質やオルガネラをオートファゴソームに取り込み、リソソームで分解する。近年さまざまな疾患で見られる細胞内凝集体を、オートファジー活性化により分解することが治療法として試みられている。しかしながら、RNA foci は核内に形成されることから、オートファジーによる直接の分解を受けえない。そこで申請者は、核内で形成された RNA foci を人為的に核外へ移行させ、オートファゴソームに認識させることができれば、RNA foci の分解除去が可能になるのではないかと考えた。

一方、ALS をふくむ多くの神経編成疾患において、ミトコンドリアの異常とその分解不全(マイトファジーの不全)が知られている。そのため、マイトファジーの人為的な誘導は、これらの疾患の治療に有効と考えられるが、これまでのところ実現していない。そこで、ミトコンドリア選択的なオートファジー分解(マイトファジー)を特異的に誘導するために、マイトファジー誘導遺伝子を見つけ出し、クリスパー転写活性化法によりその遺伝子の発現を誘導することとした。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、本研究では、神経変性疾患の遺伝子治療を目的として、オートファジーを誘導する方法を開発する。以下の目的を設定する：

- (1) C9orf72 変異により形成される RNA foci を分解する遺伝子ベクターの構築
 - (2) in vivo マイトファジー誘導遺伝子の同定
 - (3) マイトファジー誘導遺伝子のクリスパー転写活性化システムの構築
- をおこなう。

3. 研究の方法

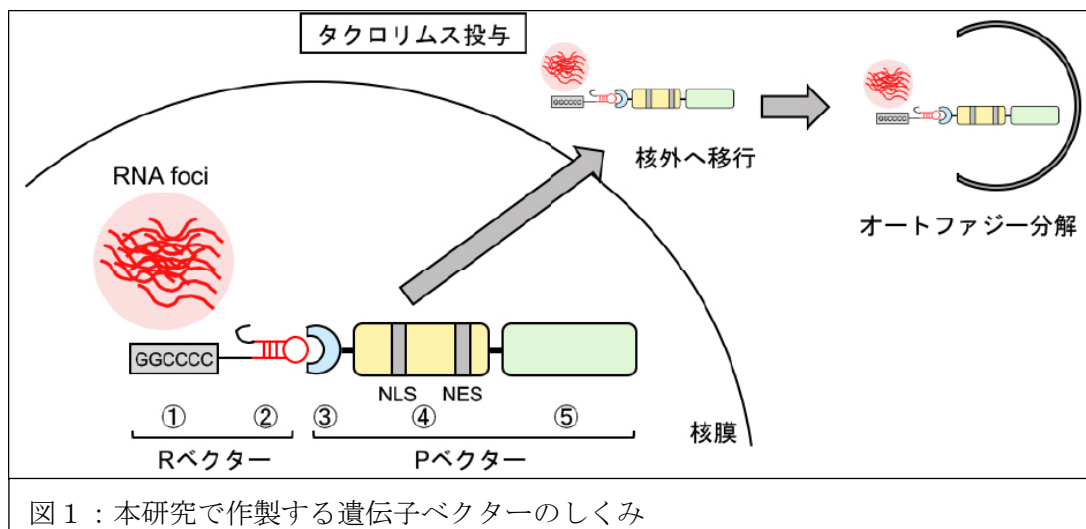
●本研究で設計する遺伝子ベクターに関して、その構造と期待される作用メカニズムは以下である(図1)。本研究では、2種類のベクターを構築する：一つは RNA ベクター(R ベクター)、もう一つはタンパク質ベクター(P ベクター)。

・R ベクターは、①C9orf72 のリピート配列のアンチセンス配列と②MS2 と結合する配列、の融

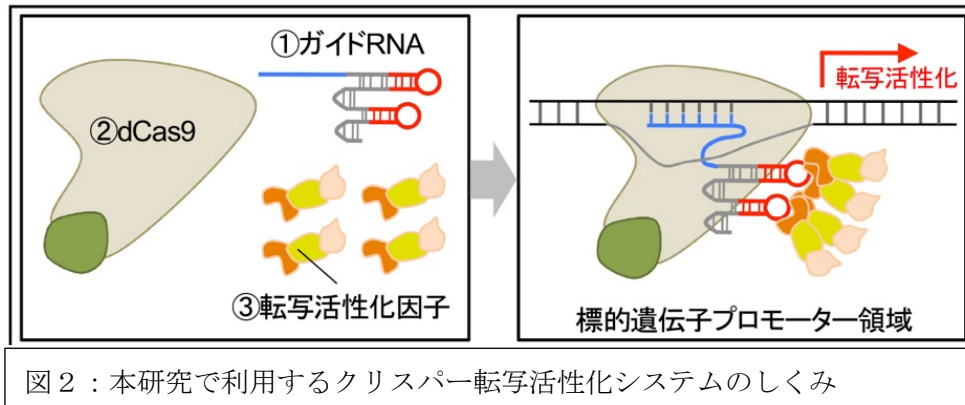
合 RNA を発現する。

・P ベクターは、③MS2 タンパク質、④NFATc3 遺伝子の核移行制御領域、⑤オートファジーアダプタータンパク質、の融合タンパク質を発現する。

変異 C9orf72 を持つ細胞に両方のベクターを導入すると、融合 RNA はアンチセンス配列(①)を介して RNA foci と結合し、かつ MS2 結合配列(②)を介して融合タンパク質の MS2 領域(③)と結合することで、RNA foci・融合 RNA・融合タンパク質の複合体が核内に形成される。ここにタクロリムスを投与しカルシニューリンを阻害すると、NFATc3 の核内移行配列 NLS(④)が阻害され、核外移行配列 NES が機能することで、複合体が核外へ移行する。核外へ移行した複合体は、融合タンパク質のオートファジーアダプター質(⑤)を介してオートファゴソームに取り込まれ、最終的にリソソームで分解される。



●クリスパー転写活性化は、クリスパー/Cas9 システムを改変して開発された、任意の遺伝子発現を増加させる方法である。任意の標的遺伝子のプロモーター配列の約 20 塩基を含む「①ガイド RNA」と、ガイド RNA と結合する「②dCas9 (DNA 切断活性はない)」、そして「③転写活性化因子」を、ガイド RNA により規定されるプロモーター領域で複合体を形成させることで、標的遺伝子の転写活性を促進する(図2)。この手法の利点は、(1)標的遺伝子のプロモーター配列に相補なガイド RNA (約 20 塩基)を設計するだけでよい、(2)内在性の転写機構に基づくため、発現増加率はさほど高くないが生理的である。そのため cDNA の強制発現でしばしば見られる非生理的な2次的効果(細胞死や凝集など)が起こりにくい、などがある。分子 X は、ミトコンドリア外膜に存在するレセプター分子で、オートファジー関連タンパク質と結合することで、オートファジーによるミトコンドリアの分解(マイトファジー)を誘導する。同様のレセプター分子はこれまで5つ報告があるが、生理的条件下のマウスでどの分子がマイトファジーを誘導しているか不明であった。応募者らがマイトファジー活性モニターマウスを用いて解析した結果、遺伝子 X の欠損(KO)マウスではマイトファジー活性が激減していた(未発表データ、図3)。このことから生理的条件下のマウスでは、主に X がマイトファジーを誘導していると結論づけた。



4. 研究成果

(1) 以下のプラスミドベクターを作製した。

R ベクター：plenti-U6_Promotor-(GGGGCC)n-MS2_Seq; 3 種類

P ベクター：plenti-EF1a_Promotor-MS2-NFATc3_domain-Adaptor; 5種類

R ベクターのリピートは、1、5、9回を作製した。また、Adaptor は、p62、NBR1、NDP52、OPTN、TAX1BP1 を用いた。

培養細胞に遺伝子導入すると、すべてのベクターが予定どおり発現した。現在、これらのベクターを病態モデル細胞に発現させることで、治療効果が見られるか検討中である。

(2) 現在、生体内でのマイトファジー誘導遺伝子は不明である。一方、*in vitro* の研究から、9種類のマイトファジー誘導遺伝子(PINK1、Parkin、BNIP3、Nix、FUNDC1、FKBP8、Bcl2L13、MUL1、ARIH1)が報告されている。一方、マウスを数日おき間欠的に絶食にさらすと、心臓においてマイトファジーが誘導される(図3a)。そこで、間欠的絶食とともに心臓で発現が増加する遺伝子を決定した。qPCR 法により、遺伝子発現を解析したところ、9種類のうち X、Y、Z が、間欠的絶食によるマイトファジー誘導とともに発現が増加したため(図3b)、このいずれかがマイトファジー誘導遺伝子であると予想した。

それぞれの遺伝子欠損(KO)マウスを作製し、モニターマウスと交配した結果、X_KO マウスでのみ心筋で定常的マイトファジーの有意な低下が見られた(図3c)。さらに、この X_KO マウスでは、絶食による心筋のマイトファジー誘導も抑制されていた。また、X_KO マウスの心筋・骨格筋では、ミトコンドリア量が増加していた。Y_KO マウスや Z_KO マウスの心筋では、マイトファジーの低下は見られなかった。以上から、X_KO マウスはマイトファジー不全マウスであり、X が生体内でマイトファジーを誘導する遺伝子であると結論づけた。

(3) マウス X ならびにヒト X の転写制御領域を認識するガイド RNA 配列をそれぞれ3種類設計し、それぞれ発現ベクターを作成した(mX_sgRNA-1、-2、-3; hX_sgRNA-1、-2、-3)。それぞれのガイド RNA ベクターと、dCas9 ベクター、転写活性化因子ベクターを培養細胞(N2A 細胞、HEK293T 細胞)に導入し、X の発現量の増加をウエスタンブロット法により検討した。その

結果、マウス X に対しては25%~67%、ヒト X に対しては80%~210%の発現量の増加を示した(図4)。最も転写活性化効率の高い mX_sgRNA-3 と hX_sgRNA-2 を今後の解析に利用する。

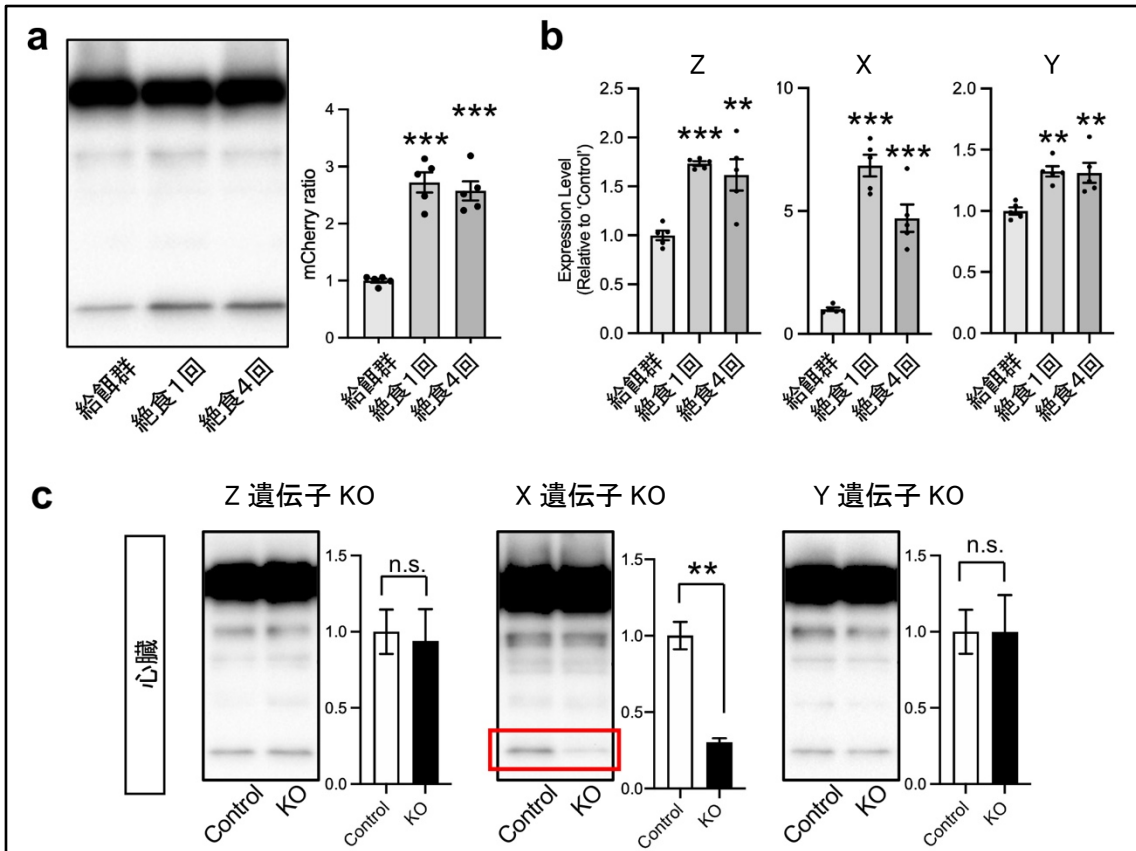


図3: X_KO マウス心臓におけるミトファジー活性の消失

(a)間欠的絶食によるミトファジー活性の増加 n=6. (b)間欠的絶食時のミトファジー誘導遺伝子の発現変化 n=6. (c)Z, X, Y_KO マウス心臓におけるミトファジ活性レベル n=6.

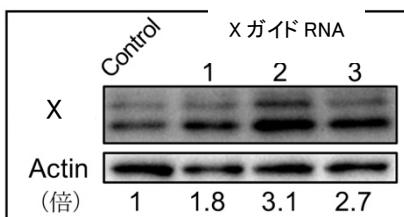


図4: ヒト X クリスポー転写活性化

(1) (3) で得られたベクターを、今後さらに患者由来細胞や病態モデル細胞に導入することで、病態の治療へ向けた研究を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita Shun Ichi, Kyuuma Masanao, Inoue Keiichi, Hata Yuki, Kawada Ryu, Yamabi Masaki, Fujii Yasuyuki, Sakagami Junko, Fukuda Tomoyuki, Furukawa Kentaro, Tsukamoto Satoshi, Kanki Tomotake	4. 巻 236
2. 論文標題 Mitophagy reporter mouse analysis reveals increased mitophagy activity in disuse induced muscle atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 7612-7624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30404	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 Innokentev Aleksej, Furukawa Kentaro, Fukuda Tomoyuki, Saigusa Tetsu, Inoue Keiichi, Yamashita Shun-ichi, Kanki Tomotake	4. 巻 9
2. 論文標題 Association and dissociation between the mitochondrial Far complex and Atg32 regulate mitophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e63694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.63694	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 Fukuda Tomoyuki, Ebi Yuki, Saigusa Tetsu, Furukawa Kentaro, Yamashita Shun-ichi, Inoue Keiichi, Kobayashi Daiki, Yoshida Yutaka, Kanki Tomotake	4. 巻 9
2. 論文標題 Atg43 tethers isolation membranes to mitochondria to promote starvation-induced mitophagy in fission yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61245	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 Inoue Keiichi	4. 巻 172
2. 論文標題 CRISPR-activated patient fibroblasts for modeling of familial Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 7-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.03.008	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 井上敬一	4. 巻 38
2. 論文標題 クリスパー転写活性化によるアルツハイマー病線維芽細胞モデルの作製	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CLINICAL NEUROSCIENCE	6. 最初と最後の頁 1052-1054
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 井上敬一、神吉智丈	4. 巻 281
2. 論文標題 マイトファジーとミトコンドリア病	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 印刷中
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学機能制御学分野ホームページ https://www.med.niigata-u.ac.jp/mit/ ミトコンドリアオートファジーの制御機構を解明 https://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/info/news_topics/144_index.html オートファジーによるミトコンドリアの分解を促進する新しい因子を発見 https://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/info/news_topics/141_index.html

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