

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659453

研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症の病因ウイルス同定への挑戦

研究課題名（英文） Challenge for the identification of ALS-related viruses

研究代表者

河原 行郎 (KAWAHARA YUKIO)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：80542563

研究成果の概要（和文）：本研究では、ALS 脊髄由来の RNA を網羅的に解析し、疾患特異的なウイルスの同定を目指した。はじめに、培養細胞由来の RNA からリボソーム RNA を高率的に除去し、シーケンス用のライブラリーが作成できるようになった。次に、実際に入手できた 1 例の ALS 剖検脊髄から RNA を抽出したが、予想以上に RNA の分解が進んでいた。この結果、質的に十分なレベルに達しておらず、網羅的シーケンスはできなかった。組織から抽出した RNA を用いて次世代シーケンサーで解析可能なライブラリーを構築できるようになった点は有用であり、別の剖検組織が入手でき次第、再解析を目指したい。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to identify RNAs derived from viruses as a causative origin from the autopsied spinal cord of ALS patients. We have successfully established the method to create a cDNA library from RNAs extracted from cultured cells after removal of ribosomal RNAs. We had obtained one autopsied spinal cord of ALS patients. Then, we extracted RNAs from this samples, but it was degraded more severely than expected. We tried to create a cDNA library from this degraded RNAs, but failed in. Since we could not establish the method to create cDNA library for deep sequencing, it is promising to analyze whether viral RNAs are involved in or not in ALS samples if we can obtain another samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：神経分子病態学・ALS・ウイルス・神経変性疾患

### 1. 研究開始当初の背景

ALS は、運動ニューロンの選択的脱落によって全身の筋力が低下する神経変性疾患である。発症すると数年以内に死に至るが、有効な治療法がなく、一日も早い病態解明が急務である。これまで病態へ迫る手がかりは乏しかったが、近年、ALS 脊髄において、TDP-43 がユビキチン陽性封入体の構成タンパク質として同定された (Neumann et al, Science, 2006)。さらに、頻度は稀ながら TDP-43 遺伝子点変異が見つかり、ALS 病態に TDP-43 が深

く関連していることが明らかとなった (Sreedharan et al, Science, 2008)。その後、ヒト TDP-43 過剰発現マウスが ALS 様症状を呈し、TDP-43 発現量が多いほど発症が早く重篤化することが報告された (Wils et al, PNAS, 2010)。この結果は、TDP-43 の発現量上昇そのものが運動神経細胞死誘導に必要十分であることを意味しているが、実際の ALS において、なぜ TDP-43 の発現調節が異常になるのか、その分子機構は全く不明である。TDP-43 は核酸の安定化や RNA の転写後調節

などに関与しているが、もともと HIV ゲノムの両端に由来する TAR DNA に結合する因子として同定された (Ou et al, J Virol, 1995)。また HIV 感染者の中には ALS 様症状を呈する患者もいる (McCormick et al, Neurology, 2008)。更に、ALS の 90% が非遺伝性であり、比較的急速に症状が進行することから、我々は、何らかのウイルス核酸の代謝に TDP-43 が過剰に消費されることが TDP-43 の発現異常を招く原因ではないかと考えた。

過去に ALS の原因となりうるウイルスを同定する試みは何度かあったが、全く未知のウイルスを検出する手法がなかったため、確定的な結果を得られていない。しかし 1 回の解析で数十億塩基もシーケンス可能な次世代シーケンサーを駆使すれば、原理的に未知のウイルスでも同定可能である。このため、本研究では、はじめに ALS 脊髄由来の RNA を網羅的に解析し、疾患特異的なウイルスを同定することを目指す。次に、同定されたウイルス由来の核酸が TDP-43 の発現調節異常を招くのかどうか、ウイルス核酸の一部をマウスに過剰発現させると ALS 様症状を呈するのかなどを解析することによって、ウイルス感染が ALS の本質的な原因であることを明らかにする。

本研究は、ALS 病態の最も上流にある原因の解明に挑戦するという特色がある。現在の ALS 研究は、全般に TDP-43 が細胞死を誘導する分子機構の研究に集中している。しかし、なぜ TDP-43 の発現が ALS で異常になるのかという上流のメカニズムは、現在あるモデル動物などを用いた解析では解明できないと考える。本研究の結果、疾患特異的なウイルスが同定され、その核酸が TDP-43 発現異常を引き起こすことが ALS 病態の本質であることが解明されれば、ALS の治療・予防法の確立に向けて大きく前進するだけでなく、他の神経変性疾患研究全体に対する波及効果も大きいので、高い社会的意義を持つものと考えた。

## 2. 研究の目的

近年 ALS では、DNA/RNA 結合タンパク質 TDP-43 が疾患病態と深く関連し、TDP-43 過剰発現マウスが ALS 様症状を呈することが明らかとなった。しかし、実際の ALS において、TDP-43 の発現異常が生じる分子メカニズムは依然として不明であり、我々は、何らかのウイルスに由来する核酸の代謝に TDP-43 が過剰消費されることがその原因ではないかと考えた。このため、本研究では、ALS 脊髄由来の RNA を次世代シーケンサーにより網羅的に解析し、疾患特異的なウイルスの同定を目指す。更に、TDP-43 を必要とするウイルス核酸の一部をマウスに過剰発現させ、ALS 様症状を呈するのかなどを解析し、ALS の根本

的な病態解明に迫ることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### 1) ALS 脊髄に由来する RNA の網羅的シーケンスによるウイルス核酸の同定

どのようなタイプのウイルスであっても、ウイルスゲノムにある遺伝子は必ず RNA として転写される。したがって、ALS 由来の RNA を用いて、病因となりうるウイルスの同定を試みる。具体的には、凍結保存されている ALS 剖検脊髄組織から total RNA を抽出し、ここからその大半を占めるリボソーム RNA を除去する (Guo et al, Nature, 2010)。次に、RNAlIII を用いて RNA をランダムに断片化し、ゲルに電気泳動後、100~200 塩基の断片を分離する。その後、断片化した RNA の両端に異なるアダプターを付加し、方向性が認識できるようにする。これ以降のステップは、すべて次世代シーケンサー SOLiD のプロトコールに従って RT-PCR を行い、シーケンス可能な PCR 産物を作製する。

シーケンス後、ヒトゲノムデータベースにある配列情報と比較し、完全に一致するものは除去する。次にヒトゲノムに一致しなかったシーケンスデータの中から、既知のウイルス配列に合致または相同性のある配列がないかどうか、全く未知の配列がないかどうかを検索する (Chen et al, PLoS One, 2010)。この解析を通じてウイルス由来と考えられる複数の RNA 断片を抽出し、どのようなファミリーに属するのか、あるいは全く未知で新種のウイルスなのかどうかを明らかにする。

### 2) 同定されたウイルスが、ALS に疾患特異的な感染をしているかどうかの解析

研究計画 1) で得られたウイルス核酸の断片配列情報をもとに、このウイルスが ALS 特異的な感染をしているのか、特異的であった場合、運動ニューロンやその周辺の組織のみに感染しているのかなどを解析する。はじめに、ALS 剖検脊髄組織及び対照となる non-ALS 剖検脊髄組織から total RNA を抽出する。この RNA を用いて、ウイルス特異的な塩基配列の一部を RT-PCR 法によって増幅し、ALS 群だけに感染しているのかなどを解析する。実際には、ALS 特異的な感染性を示さなくても、潜伏期にあるウイルスが ALS 発症前に増幅期に移行することが TDP-43 の発現調節異常を招く可能性も考えられる。このため、このウイルスが non-ALS 群にも認められた場合には、定量 RT-PCR 法によって ALS 群で極端にウイルス由来の転写産物が増加していないのかなどを解析する。

次に、ウイルス感染の組織・細胞特異性を明らかにするため、ALS 患者由来の脊髄以外の脳組織 (大脳皮質運動野など) や血清などを

用いて、ウイルス特異的な塩基配列の一部を RT-PCR 法によって増幅し、感染が認められるかどうかを解析する。脊髄や運動野などに限局した感染と考えられた場合には、ALS 脊髄や大脳皮質切片に対して *in situ* hybridization を行い、ウイルス由来の RNA が、運動ニューロンやその周囲の組織のどこに強い局在性を示すのかを明らかにする。

### 3) 免疫沈降法と網羅的シーケンスによる TDP-43 との結合に必須のウイルス核酸配列の同定

ALS 特異的なウイルスが、運動神経細胞死を誘導する分子メカニズムとして、ウイルス増幅に伴う核酸の増加が、その代謝に必要なとする TDP-43 を過剰に消費するからではないかと考える。このため、ChIP-Seq 解析と言われる免疫沈降法と次世代シーケンサーによる網羅的シーケンスを組み合わせた手法を用いることによって、TDP-43 に結合するウイルス核酸配列の同定を試みる。具体的には、凍結保存された ALS 剖検脊髄組織を超音波破碎し、ここから抗 TDP-43 抗体を用いた免疫沈降法により TDP-43 タンパク質を回収する。次に、Proteinase K によって TDP-43 を分解し、TDP-43 に結合する核酸をエタノール沈殿法により回収する。TDP-43 に結合するウイルス由来の核酸が DNA か RNA なのか不明なので、両者に対する網羅的シーケンスを行う。すなわち、DNA シーケンスであれば、ゲルに電気泳動後サイズ分画し、150-300bp のサイズ域にある DNA を分離する。RNA の場合には、DNaseI で消化後、電気泳動によるサイズ分画を行う。これ以降のデータ解析を含めたすべてのステップは、研究計画 1) で述べた方法と同様に SOLiD のプロトコールに従って行う。これらの実験を通じて、ウイルス由来の核酸のどのような部分が TDP-43 に結合しているのか、その種類 (DNA か RNA か) や配列特異性などを明らかにする。

### 4) 培養細胞を用いた、ウイルス核酸が TDP-43 の発現調節異常を招く分子メカニズムの解明

ウイルス増幅に伴う核酸の増加が、TDP-43 の発現調節異常を招くのかどうかを明らかにするため、はじめに *in vitro* 実験系にて解析する。これまでに、野生型 TDP-43 を培養細胞に過剰発現させると、細胞死は誘導されないものの、ALS に認められるような細胞内凝集体を形成することが知られている (Barmada et al, J Neurosci, 2010)。したがって、培養ラット primary cortical neuron に、TDP-43 に結合する部位を含んだウイルス由来の核酸を導入し、TDP-43 の発現量が増加するかどうかをウエスタンブロット法により解析する。この際、TDP-43 に結合する核

酸が DNA の場合には DNA 断片を直接導入し、RNA の場合には発現ベクターに組み込んで細胞内導入する。さらに導入後、細胞内凝集体を形成するかどうかを共焦点顕微鏡で観察し、TDP-43 を過剰発現した場合と同様の表現系が認められるかどうかを解析する。

### 5) ウイルス核酸の一部を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスの作製と表現系の解析

これまでに、培養細胞に TDP-43 を過剰発現させても細胞死は誘導されない一方で、ヒト TDP-43 Tg マウスは、運動神経細胞死による筋力低下を呈することが報告されている (Wils et al, PNAS, 2010)。したがって、同定されたウイルスが ALS の本質的な原因であるかどうかを直接明らかにするためには、*in vivo* 解析が不可欠である。このため、研究計画 3), 4) によって決定された TDP-43 の発現調節異常をもたらすウイルス核酸の一部を過剰発現する Tg マウスを作製する。TDP-43 に結合するウイルス由来の核酸が RNA の場合には、この配列を Prp プロモーター下に組み込んだコンストラクトを作製する。DNA の場合には、DNA を過剰発現させる代替手段として、相同な配列をもつ RNA を過剰発現させる。実際、TDP-43 は、TG repeat と UG repeat など DNA、RNA に関わらず相同な塩基配列を好むことが知られている (Buratti et al, JBC, 2001)。その後、作製したベクターをマウス胚に導入し Tg マウスを樹立する。この際、目的の RNA 発現が比較的弱いものから極めて強いものまで複数の系統をスクリーニングする。

TDP-43 Tg マウスは、生後 3 週間で筋力低下を呈し、1-2 カ月以内に有意に死亡率が高くなる (Wils et al, PNAS, 2010)。したがって、ウイルス核酸過剰発現マウスにおいても、同じようなタイムコースで ALS 様の症状を呈するかどうか、発現の強さと重症度に相関関係があるかどうかを解析する。また、明らかな異常が認められた場合には、病理学的な解析を行い、免疫染色による TDP-43 の発現量・局在解析、凝集体形成の有無、運動神経細胞変性の有無などを明らかにする。

以上のような研究計画により、ALS の病因となるウイルスを同定し、このウイルスが運動神経細胞死を誘導する分子メカニズムを、*in vitro* 系と *in vivo* 系の両面から統合的に解明する。

### 4. 研究成果

はじめに、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者由来の剖検脳脊髄脳を集めることから開始した。しかしながら、現在本邦においては、これら剖検サンプルは極めて入手困難な状況にあり、結局一例のみ入手することができた

(60歳男性腰髄、発症から5年後に死亡)。大阪大学医学部の倫理委員会で承認後、本研究を開始した。

まず、次世代シーケンサーで解析可能なcDNAライブラリーを構築するため、培養細胞を用いて予備実験を行った。ライブラリー作成にあたって、total RNAの大部分を占めるリボソームRNAを効率的に除去する手法の確立を行った。さらに、RNAIIIを用いてRNAをランダムに断片化し、ゲルに電気泳動後、100~200塩基の断片を分離した。その後、断片化したRNAの両端に異なるアダプターを付加し、方向性が認識できるようになったので、このRNAを用いRT-PCRを行い、deep sequence可能なPCR産物を作製できるようになった。

次に、実際に入手された一例のALS剖検脊髄からRNAを抽出して、cDNAライブラリーの構築を目指した。しかしながら、予想以上にRNAの分解が進んでおり、質的に十分なレベルに達していなかった。新規の剖検サンプルを入手することが困難であることを念頭に、本RNAを用いてcDNAライブラリーの構築を進めた。その後作成されたライブラリーに対して、deep sequenceを委託したが、シーケンス可能なレベルに達しておらず、網羅的シーケンスはできなかった。

組織から抽出したRNAを用いて次世代シーケンサーで解析可能なライブラリーを構築できるようになった点は有用である。現在、別の剖検脊髄サンプルの入手を待っている状態であり、今後も入手でき次第、再解析を試みたい。今後、シーケンスができた場合には、ヒトゲノムデータベースにある配列情報と比較し、完全に一致するものは除去する。次にヒトゲノムに一致しなかったシーケンスデータの中から、既知のウイルス配列に合致または相同性のある配列がないかどうか、全く未知の配列がないかどうかを検索する。

## 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9件)

- ① Kawahara Y. Quantification of A-to-I editing of microRNAs using a conventional method. *Nature Protocols*, 7(7), 1426-1437, 2012. 査読有
- ② Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, Shirakawa Y, Torikai K, Shimamura K, Kawahara Y., Daimon T, Kuratani T, Sawa Y. Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Journal of the American Heart Association*, 1, e000745, 2012. 査読有

- ③ Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, Usami M, Sasaki T, Sato H, Kawahara Y., Hamasaki T, Nanto S, Hori M and Komuro I. A Subset of Circulating MicroRNAs are Predictive for Cardiac Death After Discharge for Acute Myocardial Infarction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(2), 280-284, 2012. 査読有
- ④ 河原行郎. microRNA. *分子脳血管病*, 11(4), 431-434, 2012. 査読無
- ⑤ 余越萌, 河原行郎. microRNAの機能とその修飾. *実験医学(増刊)*, 31(7), 160-167, 2013. 査読無
- ⑥ Kawahara Y. and Mieda-Sato I. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 109(9), 3347-3352, 2012. 査読有
- ⑦ 河原行郎. マイクロ RNA. *分子精神医学*, 11(3), 172-177, 2011. 査読無
- ⑧ 河原行郎. RNA編集の異常と関連する疾患. *実験医学(増刊)*, 28, 1628-1635, 2010. 査読無
- ⑨ 河原行郎. microRNA発現の転写後調節機構. *生体の科学*, 61(4), 308-314, 2010. 査読無

[学会発表] (計4件)

- ① Kawahara Y. Small RNAs. The 7<sup>th</sup> Japanese-French Frontiers of Science Symposium, Shiga, Japan, January 25-27, 2013.
- ② Yamamoto M, Li Q, Seno S, Matsuda H, Suzuki Y, Kawahara Y. A common RNA targets of TDP-43 and FUS: an investigation into the disease mechanism of ALS. International Symposium on Genome Science, Tokyo, Japan, January 9<sup>th</sup>, 2013.
- ③ Kawahara Y. TDP-43 promotes neurite outgrowth through the regulation of microRNA biogenesis. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan, September 18-22, 2012.
- ④ Li Q, Suzuki Y, Kawahara Y. A message from TDP-43/FUS complexes: narrow down the ALS-associated RNA targets. NGS現場の会第二回研究会, 大阪, 2012年5月25日

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/rna/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 行郎 (KAWAHARA YUKIO)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授（常勤）  
研究者番号：80542563

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし