

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19479

研究課題名(和文) 介在ニューロンにおけるTDP-43機能に注目したALSシステム選択性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a mechanism of ALS system selectivity focusing on TDP-43 function in interneurons.

研究代表者

石原 智彦 (Ishihara, Tomohiko)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：70612232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態機序解明を目的とし、ALS罹患組織におけるスプライシング調節機構 U snRNAs およびGEM小体の減少と、複数のスプライシング異常を報告している。本研究ではALSでの介在ニューロンの役割と、そのRNA代謝障害の検討を目的とした。ホルマリン固定パラフィン包埋組織からのmRNAの回収、定量では、RNAの断片化に留意する必要があることを見出した。さらに脊髄性筋萎縮症モデル動物での介在ニューロンを介した運動ニューロン変性の原因として報告されているstasimon mRNAに注目し、同スプライシング変異をTDP-43発現抑制細胞において確認した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the mechanism of the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We have already reported the decrease of the main component of splicing machinery, U snRNAs and GEM bodies, and several aberrant splicing in ALS affected tissues. In this study, we intended to clarify the role of interneurons in ALS and its RNA metabolism disorder. We found that it is necessary to pay attention to RNA fragmentation in the isolation and quantification of mRNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Furthermore, we focused on stasimon mRNA splicing which was reported as a cause of motor neuron degeneration mediated by interneurons disability in spinal muscular atrophy model animals, and confirmed the same splicing mutation in TDP-43 expression suppressing cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ALS スプライシング 介在ニューロン stasimon

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) は運動神経が選択的に障害される致死的な神経変性疾患である。過去 30 年間に病理学的な組織障害の広がり、封入体を構成する蛋白質の同定、複数の責任遺伝子の同定など、本症の研究は飛躍的な進展を見せた。しかし運動神経システムが選択的に侵される事、すなわちシステム選択性に関する分子病態機序は解明されていない。神経系の個々の細胞、組織はそれぞれ多様性を有するが、その一部はシステムを形成する細胞の RNA の多様性 (mRNA や non coding RNA の量的、質的多様性) により形成される。このシステム特異的な RNA の多様性を維持する RNA 代謝機構を 'Ribostasis' と呼ぶ (Ramaswami M. et al. Cell, 2013)。ALS 関連蛋白が RNA 結合蛋白であることから、ALS のシステム選択性の背景にシステム特異的な Ribostasis の乱れが有る可能性が提唱されている。

TDP-43 は ALS の Key molecule である。本蛋白質は mRNA 前駆体 (pre-mRNA) splicing 等に関連する核内蛋白であり、孤発性 ALS の残存運動神経細胞質内のユビキチン陽性封入体の主要成分である (Neumann M. et al. Science, 2006)。さらに家族性/孤発性 ALS にて 30 種類以上の TDP-43 遺伝子変異が同定されている (Yokoseki A. et al. Ann Neurol, 2008)。ALS 罹患組織では TDP-43 蛋白が核から消失するため、TDP-43 の機能低下が病態に寄与すると推察される (Neumann M. et al. Science, 2006)。

実際に ALS 罹患運動神経細胞では広範な splicing 異常が報告されている (Shiga A. et al. PLoS One, 2012, Lagier T. et al. Nat Neurosci, 2012)。しかし、これらの異常と運動神経細胞死との直接的な関連は明らかでない。さらに、TDP-43 は全身に普く発現するが、TDP-43 遺伝子変異をもつ症例でも、病態は運動神経システムを中心とする (Yokoseki A. et al. Ann Neurol, 2008)。このことから ALS のシステム選択性を TDP-43 の発現量の相異や、TDP-43 の一律な機能低下に求めることは困難である。TDP-43 関連 ALS のシステム選択性を説明するには罹患組織の特性を考慮する必要がある。

近年、神経変性疾患でのシステム選択性に関して、脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy: SMA) 研究から 2 つの重要な報告がなされた。SMA は全身性に発現する survival of motor neuron (SMN) 遺伝子の喪失で引き起こされる遺伝性運動ニューロン疾患である。モデル動物の解析から 1) SMN により構成される核内小体 GEM の減少を介した、pre-mRNA の splicing 制御機構ある minor spliceosome の組織特異的な機能低下 (Zhang Z. et al. Cell, 2008) と、2)

cholinergic 脊髄介在ニューロンの異常による運動ニューロンの過剰興奮を介した選択的運動神経細胞死が見出された (Lotti F. et al. Cell, 2012)。脊髄介在ニューロンでは 1) の機序により複数の mRNA の splicing 異常が認められた。そのうち Stasimon 遺伝子の全身性発現抑制のみが、運動ニューロン細胞死に関与した。さらに運動ニューロンでの Stasimon の発現抑制では運動神経細胞死を引き起こさなかった。このモデルでの運動神経細胞死は non-cell autonomous の機序によることが解明された。本発見は、遺伝性運動ニューロン疾患における運動神経システムの選択性が、運動神経細胞以外の特定の細胞での特定の遺伝子の splicing 異常により引き起こされうることを明らかにした。

我々は TDP-43 が minor spliceosome の成熟に関与する核内小体である GEM に局在する (Wang F. et al. PNAS, 2002) ことから、ALS においても GEM 小体における minor spliceosome の機能異常が生じているとする仮説を立てこれを検討し、ALS 患者由来の脊髄にて GEM の低下、脊髄、大脳皮質運動野において minor spliceosome の異常を見出した。また、同様の変化が非障害組織である小脳、腎臓では認めないことを示した (Ishihara T. et al. Hum Mol Genet, 2013)。このことから、ALS においても、minor spliceosome の関連する splicing 異常が、神経細胞死を引き起こす可能性が示唆された。

さらに ALS での介在ニューロンの異常は、形態学的に病初期からあることが指摘されてきた (Oyanagi K. et al. Acta neuropathologica, 1989, Casas C. et al. Brain and behavior, 2013)。この事から、ALS でも、運動神経細胞に対して抑制的に働く介在ニューロンの機能低下による、運動神経細胞の過剰興奮が神経細胞死を誘発するという仮説がある (Martin R. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2013)。ALS における介在ニューロンの関与については、形態学的には研究は進められているが、分子生化学的解析は十分でない。

2. 研究の目的

我々は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) にて、pre-mRNA の splicing に寄与する minor spliceosome の、罹患組織特異的な低下を見出している。minor spliceosome の特異的な低下は、同様に運動ニューロン疾患である SMA にても報告されている。さらに SMA では、脊髄介在ニューロンでの minor spliceosome 依存性の特定の遺伝子 (Stasimon) の splicing 異常が運動神経細胞死に重要であることが示された。申請者は、ALS においても同様の機序が背景にあるという仮説を立て、ALS における介在ニューロンでの minor spliceosome 依存性の splicing

異常を検討し、本症の、運動神経細胞の選択的変性機序に迫る事を目的とした

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞からの運動ニューロンの作成 . iPS 細胞はコントロールおよび TDP-43 遺伝子変異を有する ALS 患者由来のものを、理研 細胞材料開発室より購入した . 同 iPS 細胞は、日本人の TDP-43 変異 (Q343R 変異) を有する ALS 症例由来の線維芽細胞より樹立されている . まず Dorsomorphin , SB431542 を添加した培地にて 5 日間培養し , Primary neurosphere (PNS) 形成誘導のために ,Rock inhibitor 投与下で 2 日培養した . その後 Retinoic acid , Purmorphamine を加えた培地にて , 形成を誘導した . medium 中の bFGF を減量しつつ継代を行い , PNS 形成誘導開始から , 15 日で polyQ/Laminin コートした plate に播種を行った . さらに Ascorbic acid , Retinoic acid , rhSHH , rhBDNF を含有する medium にて 7-10 日間培養し , 運動ニューロンへの分化を行った .

(2) ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (Formalin Fixed Paraffin Embedded : FFPE) からのレーザーマイクロダイセクション (LMD) を使用した RNA 回収と解析方法についての検討 . 当施設で保有するヒト脊髄の FFPE 標本を 14 μm 厚切片として使用した . 脱パラフィン、および Cresyl violet 染色を室温にて行った . LMD は Leica LMD 7000 (Leica Microsystems) を使用した . 脊髄前角の運動神経細胞を形状から選択し、1 症例につき 100 細胞ずつ回収した . proteinase K 処理を 56 °C で一晩行った後に miRNeasy FFPE kit (Qiagen) にて , total RNA を回収した . 逆転写反応により相補的 RNA (cDNA) を作成した . mRNA の発現解析法を確立するため、遺伝子 X を対象に検討を行った . 回収される mRNA は少量であるため、定量に際しては微量の検体を正確に測定可能な、digital droplet PCR (ddPCR) 法を用いた . 実験機器は QX200 (BioRad 社) を使用した .

(3) TDP-43 発現低下培養細胞および ALS 罹患組織における Stasimon スプライシング異常の検討 . 実際に ALS においては複数の遺伝子のスプライシング異常が報告されているが (Rabin SJ et al . HMG 2010) , Stasimon 遺伝子に注目した検索はなされていない . Stasimon mRNA splicing 異常の ALS 病態への関与を示すために、TDP-43 発現低下培養細胞および ALS 罹患組織にて splicing の変化を逆転写定量 PCR 法を用いて検討した . 逆転写定量 PCR 法の条件設定は、国際的な実験ガイドラインである MIQE ガイドラインに準じて行った . Stasimon は 7 つの exon を有し、そのうち exon3-4 間の intron が minor spliceosome 依存性の intron である . 同 intron の splicing 変異、および Stasimon

mRNA の発現量を測定するための primer を設計し、定量を行った (図 1) .

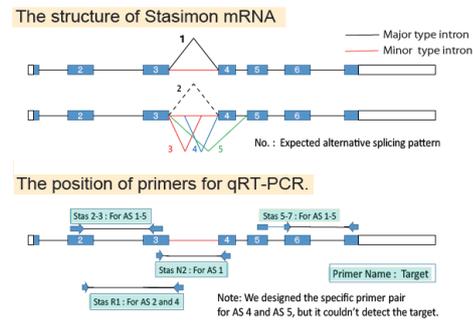


図 1 : Stasimon 遺伝子の模式図と、定量 PCR に使用した Primer の配置 .

4. 研究成果

目的である介在ニューロンの作成に先立ち、iPS 由来のヒト運動ニューロンの作成を行った . 分化誘導後の細胞にて運動ニューロンマーカーである ISL-1, Hb9, ChAT の mRNA , 蛋白質の発現がみられる事を定量 PCR , Western blot 法にて確認した (図 2) .

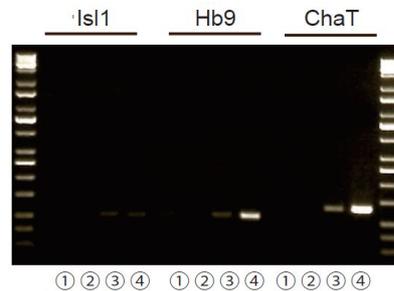


図 2 : 分化誘導細胞での運動神経マーカーの発現確認 . iPS , PNS , 分化 7 日目 , 分化 15 日目由来の DNA を用いた PCR 法で検討 .

また、病理組織から安定して対象組織を選択的に抽出するために、FFPE 検体からの RNA 回収の確立を目指した . 既報では FFRP 検体では mRNA の断片化が生じているとされる (Masuda.N et al . Nucleic Acids Res. 1999) . ddPCR 施行にあたり、増幅産物を 51bp , 108bp の 2 種類で検討したところ、増幅効率に明らかな差を認めた . 今後、他の mRNA 発現量の測定を行う際も、増幅産物サイズに留意して行っていく必要がある .

TDP-43 発現抑制培養細胞での Stasimon mRNA のスプライシング異常の検討では、ヒト由来細胞においても、SMN 発現抑制時と同様に、mRNA のスプライシング異常および発現量低下がみられることを確認した (図 3) . しかし ALS 罹患脊髄ではこの変化は確認されなかった .

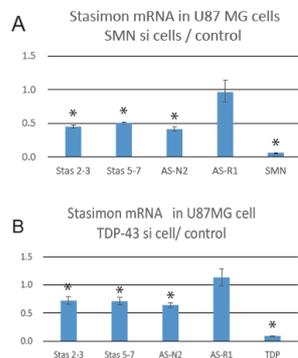


図 3 : Stasimon mRNA の splicing 変化 . 上段は SMN 発現抑制細胞 . 下段は TDP-43 発現抑制細胞 . グラフ下段の表記は , 図 1 の Primer 部位に対応する .

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 4 件)

1. Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(12) 5020-36 (査読あり)

2. Aizawa Y, Koyama A, Ishihara T, Onodera O, Saitoh A. Performance of a real-time PCR-based approach and droplet digital PCR in detecting human parechovirus type 3 RNA. *J Clin Virol* 2016;84 27-31 (査読あり)

3. Takano H, Ishihara T, Kosuga M, Okuyama T. A Senile Case of Late-onset Pompe's Disease. *Intern Med* 2016; 55 (10) 2723-25 (査読あり)

4. 小池 佑佳, 石原 智彦, 西澤 正豊, 小野寺 理. ALS における GEM 小体と U snRNA 異常 ~ RNA 代謝異常は運動神経変性の共通した病態機序となるか. *神経内科* 2015; 83 (2) 175-184 (査読なし)

[学会発表](計 2 件)

発表者名: 石原 智彦,
演題名: The SMN gene copy number states in Japanese ALS patients.
学会名: 3rd RNA Metabolism in Neurological Disease Meeting 発表年月日: 2015年10月16日
場所: シカゴ (USA)

発表者名: 石原 智彦,
演題名: The expression of endogenous

Human retrovirus-K

学会名: Keystone Symposia for the 2016 conference on: Common Mechanisms of Neurodegeneration
発表年月日: 2016年6月15日
場所: Colorado (USA)

[招待講演]

発表者名: 石原 智彦,
演題名: ALS における RNA 代謝障害
学会名: 第 46 回 新潟神経学夏期セミナー
発表年月日: 2016年7月30日
場所: 新潟大学 (新潟県・新潟市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 智彦 (ISHIHARA, TOMOHIKO)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 70612232