

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21278

研究課題名(和文)治療を目的とした筋萎縮性側索硬化症でのMT- 発現低下エピゲノムメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of epigenetics mechanism of metallothionein-3 decrease in amyotrophic lateral sclerosis patients

研究代表者

栗田 尚佳 (Kurita, Hisaka)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00746315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者において金属代謝関連タンパクであるメタロチオネイン(MT)-3や、亜鉛輸送体であるZnT3の脊髄中の発現量の減少を確認している。ALS発症に小胞体ストレスの関与が示唆され、本解析で小胞体ストレスによるMT3発現低下、ZnT3発現上昇が認められた。ZnT3については小胞体ストレスに対する防御効果を示すことが示唆された。ヒト剖検解析のエピゲノム解析は、マイクロRNAについてALS剖検にて有意に変動するものを2種類見出すことができた。一方は標的予測プログラムからZnT3を直接調節する可能性があり、ALSにおけるエピゲノムメカニズムの一端を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have shown that decrease of metallothionein-3 (MT3) and zinc transporter-3 (ZnT3) were observed in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). It has been reported that endoplasmic reticulum (ER) stress would be associated with cause of ALS. In this study, the decrease of MT3 or increase of ZnT3 mRNA was observed under ER stress condition. In addition, we showed that the protective role of ZnT3 against ER stress, which is supposed to be involved to ALS. We further performed epigenetic analysis about human ALS samples. We found two novel microRNAs (miRNAs) were significantly altered in ALS patients. One of these miRNAs is thought to regulate ZnT3 expression by binding to 3-prime untranslated region (3'-UTR) of its mRNA, judged from the result of computational algorithm. This study is supposed to reveal a part of epigenetic mechanisms in ALS related to metal homeostasis and cellular stress.

研究分野：薬物治療学、分子生物学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 エピジェネティクス 亜鉛

## 1. 研究開始当初の背景

(1). ALS 患者では金属蓄積量上昇、MT3 などの金属代謝関連遺伝子の発現低下が認められるが、そのメカニズムは不明である。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は原因不明の神経変性疾患であり、重篤な筋肉の委縮と筋力低下が起こり、進行は速く約 3~5 年の内に呼吸困難で死亡する。世界中で 10 万人に約 2 人の割合で ALS は発症していると見積もられている (Chio et al., 2013)。ALS の約 95% は家族的な遺伝歴を持たない孤発性であり、遺伝的背景に加えて、ALS 発症の原因には日常生活における生活習慣、環境、化学物質の曝露などの外的な要因も考えられる (Modgil et al., 2014)。これまでに ALS 患者の脳髄液、ALS モデルマウスであるヒト SOD1 変異マウスの脊髄において亜鉛と銅の濃度の上昇 (Hozumi et al., 2011) およびメタロチオネイン 3 (MT3) の発現量の低下が報告されている (Hozumi et al., 2008)。さらに亜鉛トランスポーターの SLC30A3 発現量低下も報告されている (Kaneko et al., 2014)。これらの報告からも脳神経における金属代謝異常が ALS 発症に関わっている可能性が示唆される。メタロチオネイン (MT) は金属の代謝・調節の他に重金属毒性、酸化ストレスや小胞体ストレス防御など、外的因子に対する生体防御に重要な役割をもつ低分子タンパク質である。MT のアイソフォームのうち特に MT3 は脳神経に局在する。また、ALS 等の神経変性疾患の原因には金属の異常蓄積ならびに小胞体ストレスが考えられており (Lovejoy and Guillemin 2014)、MT3 は金属代謝調節、小胞体ストレス防御などを介して、神経変性疾患に対して防御的な働きをしていると考えられる。実際に、MT3 ノックアウトマウスと ALS モデルマウスを掛け合わせたマウスでは ALS 症状が増悪し (Nagano et al., 2001)、さらにアデノウイルスを用いた MT3 発現増強によって ALS モデルマウスでの症状改善が報告されている (Hashimoto et al., 2011)。これらのことから、ALS 治療において神経保護因子として MT3 は有望な候補分子である。しかし MT3 遺伝子発現調節の分子メカニズムは全く解明されておらず、それゆえに、ALS 患者での MT3 発現量低下の分子メカニズムも未だ不明である。その MT- 発現量低下の原因となる標的分子群を解明できれば、ALS における MT3 自体の発現を回復させる可能性があり、ALS 治療法の研究に大きく寄与するものと考えられる。

(2). MT3 のエピゲノム発現調節機構を標的とした ALS 治療の可能性

近年、エピジェネティクスと疾患発症との関連が注目されている。エピジェネティクスとは、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節機構ならびにそれを追及する学問と定義される。このことから、原因遺伝子の塩基の変異だけでは説明できない孤発性 ALS の

発症メカニズムを考える上で、エピジェネティクスは重要な概念である。ゲノムにおけるエピジェネティクスな変化、つまりエピゲノム変化は胎児期環境、日常生活環境による外的要因により後天的に引き起こされる可能性があり、その変化が疾患発症の引き金になると考えられている (Modgil et al., 2014)。エピゲノム変化を担う主な分子機構は DNA メチル化とヒストン修飾が挙げられる。DNA メチル化は DNA への転写因子の結合を阻害することで遺伝子発現抑制に働く。一方、ヒストン修飾変化はクロマチン構造を変化させることで、DNA への転写因子のアクセスを制御し、遺伝子発現を調節する。一方で転写因子自身もエピゲノム変化を引き起こすトリガーとなる (Kurita et al., 2014)。これまでに申請者は、胎生期低亜鉛環境が仔の MT 遺伝子の DNA メチル化ならびにヒストン修飾を変化させ、その変化が成熟期まで残り、後天的な疾患発症のリスクになる可能性を世界にさきがけて報告している (Kurita et al., 2013)。これは、外的因子による MT などの金属代謝関連遺伝子のエピゲノム変化が引き起こす後天的な ALS 発症の可能性を支持する知見と言える。

以上のことから、申請者は ALS 患者における MT3 発現量の低下は、MT3 発現調節におけるエピゲノムの破綻が原因であると考えた。したがって、このエピゲノムメカニズムの解明および原因分子の同定が、MT3 を用いた孤発性 ALS 治療進展における有用な一つの道筋になると考える。

## 2. 研究の目的

MT3 を用いた孤発性の ALS 治療を達成するために、ALS 患者または ALS モデルマウスにおける MT3 の発現量の低下に注目しその分子エピゲノムメカニズムの解明を目的とする。家族性の遺伝子変異のみでは説明できない、後天的な要因で発症する孤発性 ALS にはエピジェネティクスが関与すると考えられる。したがって、本研究によって同定される ALS 患者での MT3 発現低下を担うエピゲノム関連因子は、将来における低分子化合物等を用いた MT3 発現誘導による孤発性 ALS 治療のターゲットとして重要である。

## 3. 研究の方法

ALS 発症における MT3 発現量の低下に注目し、特にエピジェネティクスの観点よりメカニズムを解明することで、MT3 を用いた孤発性 ALS 治療研究に寄与することが目的である。MT3 における DNA メチル化およびヒストン修飾を始めとするエピゲノム変化を ALS 患者ならびに ALS モデルマウスの脊髄のサンプルを用いて解析を行う。それらのエピゲノム変化データを基にヒトならびにマウス細胞の *in vitro* 遺伝子発現解析系を用い、未知の MT3 の転写因子の同定を含め、それらの転写調節エピゲノム分子メカニズムを

詳細に解析し責任分子群を絞り込む。その *in vitro* 評価系で同定された分子群について、再びマウス、臨床サンプルを用い生体内でそのメカニズムが再現されているかを確認する。最終的に ALS 発症に関する MT3 発現低下エピゲノムメカニズムをヒト、*in vivo* ならびに *in vitro* における結果から総合的に解明する。

#### 4. 研究成果

これまでに、ALS 患者の脳脊髄液中の亜鉛濃度の上昇、ならびに金属代謝関連タンパクである MT3 や、亜鉛輸送体である SLC30A3 の脊髄中の発現量の減少を確認している。これらの発現量の低下に、遺伝子プロモーター領域におけるエピジェネティクス変化が関与していると考え、ヒト神経芽細胞株 (SH-SY5Y 細胞) やヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) を用いて、解析を行った。まずは、MT3 や SLC30A3 の遺伝子誘導機構は全く解明されていないのと、ALS 発症に小胞体ストレスが関与している可能性があることから、小胞体ストレス誘導剤に対する反応性を検討した。小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン曝露により、SLC30A3 の遺伝子発現量の上昇が認められた。また一方、ツニカマイシン曝露による、MT3 遺伝子発現量の減少傾向が認められた (図 1)。よって、これらの遺伝子が小胞体ストレスによって、反応する可能性があることが示された。

また、MT3 を過剰発現させた HEK293 細胞において、ツニカマイシン曝露による細胞死が抑制されたこと、また SLC30A3 のノックダウン細胞において、ツニカマイシン曝露による細胞死が促進されたことから、MT3 と SLC30A3 は小胞体ストレスに対する防御効果を有する可能性が示唆された (図 2)。従って、この 2 つの分子は、細胞内ストレスから起因する孤発性 ALS の治療標的としての可能性が示唆された。さらに SLC30A3 については、小胞体ストレスに対する防御効果に ERK1/2 の関与が示唆された (図 3)。

MT3 と SLC30A3 の遺伝子プロモーター解析を行うために、レポーター遺伝子アッセイ用のベクターの構築し、これらの発現調節領域の機能解析を試みたが、アッセイ系の構築が上手くできなかった。また MT3 についてはウエスタンブロットによる検出が技術的に困難であり、解析を断念した。そこで、もう一方の SLC30A3 について注目した。さらにヒト剖検解析についてもエピゲノム解析を進めたが、DNA メチル化とヒストン修飾に関しては、技術的な確立を完了することはできなかった。しかしながら、もう 1 つのエピジェネティクス因子であるマイクロ RNA については ALS 剖検にて有意に変動するものを新規に 2 種類、見出すことができた (図 4)。一方は標的予測プログラムから SLC30A3 を直接調節する可能性があり、新規の ALS における金属関連遺伝子調節のエピジェネテ

イクスメカニズムの一端を示すことができた。

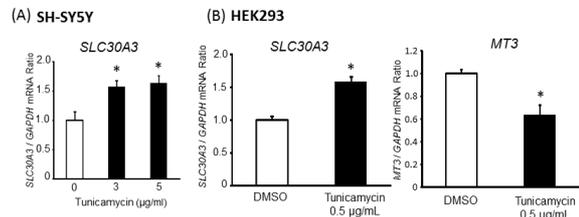


図1. 小胞体ストレスによるSLC30A3およびMT3発現量の変化

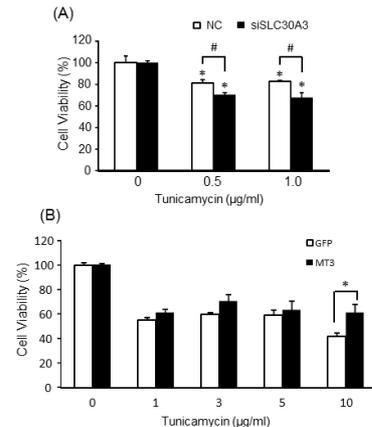


図2. 小胞体ストレス細胞死に対する SLC30A3およびMT3の防御効果

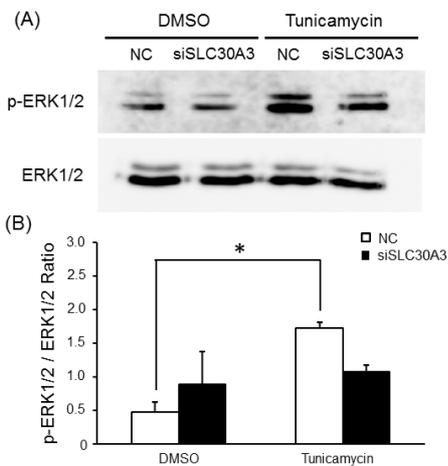


図3. 小胞体ストレスに対するSLC30A3の防御機構におけるERK1/2の関与

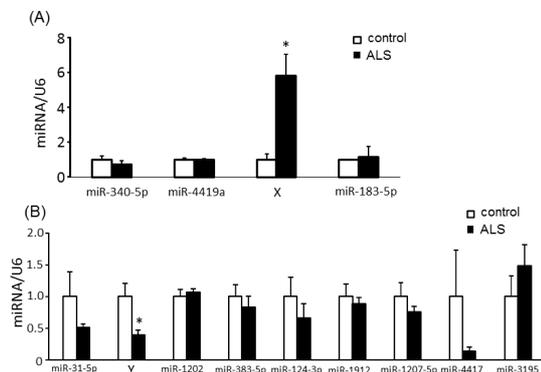


図4. ALS剖検脊髄におけるmiRNA変化の確認(リアルタイムRT-PCR): マイクロアレイで増加 (A) および 減少 (B)

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)

Hisaka Kurita, Rika Okuda, Kazuki Yokoo, Masatoshi Inden, Isao Hozumi.  
Protective roles of SLC30A3 against endoplasmic reticulum stress via ERK1/2 activation. *Biophys Res Commun.* 479:853-859 2016.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.119

〔学会発表〕(計 3 件)

栗田尚佳、奥田莉加、横尾一樹、位田雅俊、保住功  
「SLC30A3 の小胞体ストレスに対する防御機構の検討」メタルバイオサイエンス研究会サテライト (2016 年 8 月 18 日 静岡県立大学 静岡県 静岡市)

横尾一樹、奥田莉加、栗田尚佳、位田雅俊、保住功  
「SLC30A3 の小胞体ストレス応答に対する防御的役割の検討」第 43 回日本毒性学会学術総会 (2016 年 6 月 29 日 ウィンク愛知 愛知県 名古屋市)

奥田莉加、栗田尚佳、井上綾子、市川かおり、位田雅俊、保住功  
「小胞体ストレス曝露による ZnT3 発現量および細胞内亜鉛の検討」メタルバイオサイエンス研究会 2015 (2015 年 8 月 28 日 名古屋国際センター 愛知県 名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
栗田 尚佳 (KURITA, Hisaka)  
岐阜薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：00746315

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )