

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06247

研究課題名（和文）オミクス技術を駆使した包括的ALS 治療戦略の確立

研究課題名（英文）Establishment of ALS treatment strategy using Multi-omics technology

研究代表者

金蔵 孝介（Kanekura, Kohsuke）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10508568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 15,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではタンパク質の網羅的解析や細胞毒性経路の網羅的解析を通じて、ALSの最も重要な原因遺伝子であるC9orf72遺伝子産物polyPRの毒性機構とそれに対する治療法の検討を行なった。その結果、polyPRが核小体へ集積し、蛋白翻訳阻害を行うことや、相分離を起こして多数のタンパクの機能阻害を行うことを見出し報告した。また、polyPRの産生を抑制する化合物を同定し、現在将来の臨床応用にむけた試験を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はALSの最も重要な原因遺伝子であるC9orf72遺伝子産物polyPRの毒性機構解析を行い、特異的に核小体へ集積し、蛋白翻訳抑制を介して神経細胞死を起こすことを見出した。本知見は様々なグループから追試されており、蛋白翻訳抑制はpoly-PRによる毒性機構として広く認知されている。また、今回同定したpolyPRの産生を抑制する化合物はすでに他疾患で臨床応用に向けた治験が進んでおり、臨床化されればその社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the pathophysiology of polyPR peptide, produced from ALS-causative C9orf72 gene, and the treatment methods through comprehensive analysis of proteome and cytotoxic pathways. As a result, we found that polyPR accumulated in nucleoli and inhibited protein translation, and caused phase separation to inhibit the function of many proteins. In addition, we have identified a compound that suppresses the production of polyPR and we are continuing the experiments for future clinical application.

研究分野：神経内科学

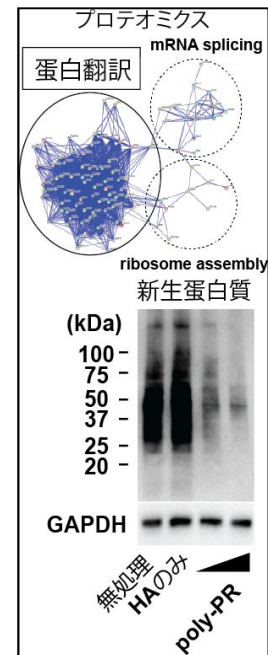
キーワード：ALS C9orf72

1. 研究開始当初の背景

難治性神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, 以下 ALS) は進行性に上位下位運動神経細胞が脱落し最終的には意識が最期まで保たれながらも呼吸器不全で死に至る非常に過酷な疾患であり、その原因解明と根治療法開発への医学的および社会的需要は極めて高い。全 ALS 患者の 9 割は遺伝的背景が存在しない孤発例であるが、原因が不明なため疾患モデル作製は非常に困難である。そのために、世界的には 1 割を占める家族性 ALS の原因遺伝子の機能および異常の解析が行われ、得られた知見の孤発例への還元が試みられている。すなわち孤発例が大半を占める本疾患の根治薬開発には家族性 ALS の研究から孤発例に通ずる創薬標的分子を同定し、その分子に対する小化合物スクリーニングを行うことが重要である。1993 年に初の ALS 原因遺伝子 superoxide dismutase 1 (SOD1) が同定され、全 ALS の 2-3% を占める SOD1 をモデルとした研究が広く行われてきた。しかし、世界で最も頻用されている ALS モデルの G93A-SOD1 高発現マウスを用いた動物実験において有効とされた多数の治療薬シードのうちこれまでの臨床試験において有効性が実証された例は皆無に等しく、SOD1 変異による ALS 発症機構と孤発性 ALS の発症機構との関連性が見直されつつある。そのため申請者は孤発性 ALS の原因解明において他の ALS 原因遺伝子の機能解析が果たす役割は極めて大きいと考えた。

近年のシーケンス技術の進歩により 2011 年に新規に同定された原因遺伝子 C9orf72 は家族性 ALS の約 40% および孤発性 ALS の約 10% に変異が見られ、ALS の最大の原因分子であることが報告された(Majounie et al., Lancet Neurol. 2012)。ALS 患者においては C9orf72 の intron 1 に存在する GGGGCC 配列の繰り返しが増加し、正常人に比べて過剰に延長することにより何らかの神経毒性が発揮され、運動神経細胞が変性する。GGGGCC 配列の繰り返しによる神経毒性機構としてリピート長依存性 ATG 非依存性翻訳 (repeat-associated non-ATG translation: RAN 翻訳) と呼ばれる特殊な翻訳機構によるジペプチド反復蛋白が in vivo において神経毒性を発揮することが報告された。このジペプチド反復蛋白は ALS 患者の脳内および脳脊髄液中でも検出されていることから、ALS の創薬標的として極めて有用であるが、RAN 翻訳産物による神経毒性機構は不明であった。

本研究では様々なオミクス技術を駆使し、C9orf72 変異による ALS 発症機構の解明と ALS 根治薬を開発することを目標とした。C9orf72 遺伝子は 2011 年に同定された家族性 ALS の原因遺伝子であり、イントロン中に存在する (GGGGCC) 繰り返し配列が異常に進展し、結果として poly(PR) や poly(GR) といったジペプチドが産生され、神経毒性を発揮すると考えられている。そこで、我々は poly(PR) と結合する分子の同定を行い、poly(PR) がリボソームタンパクや RNA 結合タンパクと結合し、タンパク翻訳抑制を起こすことで神経細胞死を起こすことを見出した(Kanekura et al., Hum Mol Genet. 2016)。しかし、なぜ poly(PR) という比較的単純なペプチドが強い毒性を持ちうるのか、さらにどのようにしてこれらの異常ペプチドが産生されるか不明であり、それを標的とした治療法が存在しなかった。



2. 研究の目的

本研究では詳細が不明であったジペプチド反復配列による神経毒性機構を明らかとし、下記の実験を通して ALS 根治薬開発の礎を築くことを目標とした。

1) C9orf72 由来ジペプチドと結合する因子の同定

我々は C9orf72 による運動神経細胞死機構を解明するために予備的実験として株化細胞を用いてプロテオミクスによる解析を行った。その結果 C9orf72 由来ジペプチド反復蛋白は培養上清に添加すると細胞内へ侵入して蛋白翻訳に関連する蛋白群と結合し、蛋白翻訳を抑制することを確認している。また細胞死の程度は蛋白翻訳の抑制率と一致したことから、翻訳抑制が C9orf72 が誘導する神経細胞死に重要と考えられる。

2) C9orf72 由来ジペプチドによる神経細胞死機構の解明

ジペプチド反復蛋白による翻訳抑制および細胞死惹起の分子機構は未だ不明であり ALS の根治薬を開発するためには創薬標的となる分子の同定が必要である。既知の手法では分子機構の全容を包括的に解析することは困難であったが、近年開発された CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊系と改変 Cas9 を用いた内在性遺伝子高発現系はゲノムワイドに全ての遺伝子に対し、完全な遺伝子破壊もしくは高発現を誘導することが可能である。現在までに毒性物質をモデルとしたシステムでその有用性が確認されている。本研究ではプロテオミクスに加え、新規に開発されたゲノミクス手法 CRISPR/Cas9 ライブラリを用いたゲノムワイドスクリーニングを用いることにより C9orf72 による細胞死機構を詳細に解明する。

3) C9orf72 由来ジペプチドによる細胞死を抑制する小分子の同定と評価

上記オミクス解析によって明らかとなったシグナル経路から創薬標的となり得る分子を選択し、同分子を標的とした小分子スクリーニングを試行する。実際に ALS 根治薬のシードとなり得る化合物の同定を目指す。シード化合物については *in vitro* および *in vivo* モデルを用いて評価する。

3. 研究の方法

- 1) 初代培養神経細胞を用いたジペプチド反復蛋白結合因子のプロテオミクススクリーニング
- 2) CRISPR ライブラリーを用いた遺伝子破壊スクリーニングによる神経細胞死機構の解明
- 3) 改変 CRISPR ライブラリーを用いた遺伝子高発現性スクリーニングによる神経保護因子の同定
- 4) 創薬標的に対するレポーターの作製と安定発現株の樹立
- 5) 創薬標的に対する小分子化合物スクリーニング
- 6) 患者由来 iPS 細胞および動物モデルを用いた治療薬シードの有効性の確認

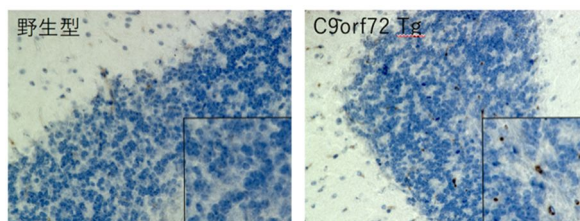
4. 研究成果

1) 我々は従来の LC-MS を用いたプロテオミクススクリーニングよりも定量性を持つ定量的プロテオミクス技術を導入し、poly(PR) や poly(GR) と結合する因子を同定した。その結果、*in vitro* での毒性が強い poly(PR) では明らかに poly(GR) と異なるプロテオームが得られ、かつ結合シグナルが数十～数千倍強まることが明らかとなった。現在その理由について、分子動力的計算などを通して検討中である。翻訳抑制に関わる分子としてはタンパク翻訳因子、伸張因子と強く結合したものの、リボソームタンパクについては poly(GR) と poly(PR) で大きな違いは見られず、リボソームというよりはタンパク翻訳因子を標的にしていると考えられる。

2) および 3) CRISPR ライブラリーを用いたスクリーニングを複数回行い、細胞死関連遺伝子群の同定を試みたが、細胞死関連遺伝子群については、群間のばらつきが大きく、再現性が不十分であった。一方で本研究期間中に全く同様のプロジェクトが米国のグループより Nature Genetics 誌に報告されたが (Kramer et al., Nat. Genet. 2018)、同グループによって得られた遺伝子群については我々のスクリーニングでも陽性であったため、本スクリーニングシステム自体は動いており、再現性の改善が今後検討課題であると考えられた。一方で我々は poly(PR) の毒性機構の一端を明らかにするために poly(PR) と類似したカチオン系ペプチドとの比較を行い、poly(PR) が pH 依存性に膜を透過し、核小体へ集積すること、細胞毒性および膜透過性はペプチド長に依存することなどを確認し、発表した (Kanekura et al., Sci. Repo. 2018)。

4) および 5) 上記の結果より、我々はプロテオミクススクリーニングから得られた結合因子を元に C9orf72 遺伝子の毒性に関与する因子について siRNA ライブラリーでスクリーニングを行い、C9orf72 変異 ALS の発症に重要である repeat-associated non-ATG translation (RAN 翻訳) の促進因子および抑制因子を同定した。特に促進因子については阻害剤を用いて RAN 翻訳を抑制しうることを確認した。

6) C9orf72 遺伝子変異を持つ患者由来皮膚線維芽細胞を米国 Coriell 研究所より購入し、表現系を調べたが、これらの細胞は生育には違いがなく、また線維芽細胞のままでは RAN 翻訳は検出されなかったため、神経細胞への differentiation が必要であると考えられたため、現在患者由来 iPS 細胞を用いた脳オルガノイドを作成中である。また C9orf72 変異 ALS のモデル動物として Jackson laboratory より C9orf72 遺伝子トランスジェニックマウスを購入し、表現系を明確にするためにホモ化を行った。ホモ個体では脳内に RAN 翻訳産物の沈着 (右図 poly(PR) 抗体にて染色) を確認しており、今後 screening で得られた化合物の *in vivo* での作用を確認する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanekura Kohsuke, Harada Yuichiro, Fujimoto Mao, Yagi Takuya, Hayamizu Yuhei, Nagaoka Kentaro, Kuroda Masahiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization of membrane penetration and cytotoxicity of C9orf72-encoding arginine-rich dipeptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-018-31096-z	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 Hiraide Takahiro, Kataoka Masaharu, Suzuki Hisato, Aimi Yuki, Chiba Tomohiro, Kanekura Kohsuke, Satoh Toru, Fukuda Keiichi, Gamou Shinobu, Kosaki Kenjiro	4. 巻 198
2. 論文標題 SOX17 Mutations in Japanese Patients with Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 1231 ~ 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1164/rccm.201804-0766LE	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 Suzuki Hisato, Kataoka Masaharu, Hiraide Takahiro, Aimi Yuki, Yamada Yoshitake, Katsumata Yoshinori, Chiba Tomohiro, Kanekura Kohsuke, Isobe Sarasa, Sato Yasunori, Satoh Toru, Gamou Shinobu, Fukuda Keiichi, Kosaki Kenjiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomic Comparison With Supercentenarians Identifies RNF213 as a Risk Gene for Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.118.002317	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 Clark AL, Kanekura K, Lavagnino Z, Spears LD, Abreu D, Mahadevan J, Yagi T, Semenkovich CF, Ppiston DW, Urano F	4. 巻 7
2. 論文標題 Targeting Cellular Calcium Homeostasis to Prevent Cytokine-Mediated Beta Cell Death	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05935-4	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 該当する

1. 著者名 Kanekura K, Yagi T, Carmack AJ, Mahadevan J, Kuroda M, Harms MB, Miller TM, Urano F	4. 巻 25
2. 論文標題 Poly-dipeptides encoded by the C9ORF72 repeats block global protein translation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1803-1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddw052.	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 該当する

1. 著者名 Kanekura K, Nishi H, Isaka K, Kuroda M	4. 巻 42
2. 論文標題 MicroRNA and gynecologic cancers	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 612-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.12995.	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 Ueda Shinobu, Takanashi Masakatsu, Sudo Katsuko, Kanekura Kohsuke, Kuroda Masahiko	4. 巻 -
2. 論文標題 miR-27a ameliorates chemoresistance of breast cancer cells by disruption of reactive oxygen species homeostasis and impairment of autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41374-020-0409-4	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 Hiraide T, Karaoke M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Isobe S, Katsumata Y, Goto S, Kanekura K, Yamada Y, Moriyama H, Kitakata H, Endo J, Yuasa S, Arai Y, Hirose N, Satoh T, Hakamata Y, Sano M, Gamou S, Kosaki K, Fukuda K	4. 巻 39
2. 論文標題 Poor outcomes in carriers of the RNF213 variant (p.Arg4810Lys) with pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.healun.2019.08.022	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 Ueda Ai, Oikawa Keiki, Fujita Koji, Ishikawa Akio, Sato Eiichi, Ishikawa Takashi, Kuroda Masahiko, Kanekura Kohsuke	4. 巻 99
2. 論文標題 Therapeutic potential of PLK1 inhibition in triple-negative breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1275 ~ 1286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0247-4	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kohsuke Kanekura
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying Neurodegenerative disorders: From Braak to exosome and cell-breadboard in future
3. 学会等名 The second international workshop by the 174th committee JSPS on Symbiosis of Biology and Nanodevices (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohsuke Kanekura
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying Neurodegenerative disorders
3. 学会等名 The second international workshop by the 174th committee JSPS on Symbiosis of Biology and Nanodevices (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 オミクス技術を駆使した希少疾患研究
3. 学会等名 Re-PCR 2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 プロテオミクスによる神経変性疾患研究
3. 学会等名 第13回日本臨床プロテオーム研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 デバイスに期待する医学
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金蔵孝介、Chen Chen、山中喜晃、早水裕平、黒田雅彦
2. 発表標題 ALS/FTD原因遺伝子C9orf72のRAN翻訳産物poly-PRによる神経細胞死機構の解析
3. 学会等名 第38回本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金蔵孝介
2. 発表標題 ALS 原因遺伝子C9orf72 遺伝子産物によるProteostasis 破綻機構の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田亜衣、金蔵孝介、黒田雅彦、石川孝
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌におけるPLK1阻害の治療的有用性
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ResearchGate https://www.researchgate.net/profile/Kohsuke_Kanekura

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