

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10089

研究課題名(和文) mRNA前駆体制御機構を基盤とした脊髄性筋萎縮症の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of the phenotype of spinal muscular atrophy based on pre-mRNA regulation

研究代表者

荒川 正行(Arakawa, Masayuki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・上級研究員

研究者番号：90398868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は原因遺伝子SMN1の翻訳産物survival motor neuron (SMN)蛋白質の減少により病態が生じる。本研究では、SMN蛋白質発現量の異なるSMA患者由来皮膚線維芽細胞を網羅的に遺伝子発現解析を行った結果、神経分化や細胞骨格系の遺伝子発現変化を同定した。さらに、SMN蛋白質の減少とヒト脊髄由来神経幹細胞から分化誘導した運動神経細胞の形態変化について考察する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄性筋萎縮症(SMA)は原因遺伝子SMN1の変異による常染色体劣性遺伝性疾患であり、脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする下位運動ニューロン病である。近年、本疾患は新規な治療法が開発され注目を浴びている。本研究では、SMN1変異によるSMN蛋白質の発現減少から生じるSMAの病態を分子細胞生物学に解析することによって、個別化医療への学術的な意義と社会的意義に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA) is caused by the reduction of survival motor neuron (SMN) protein from the SMN1 gene variations. In this study, we analyzed the exhaustive gene expression of two SMA patients-derived fibroblasts with the different amount of the SMN protein expression. Moreover, we discuss the phenotype of the motor neuron cells from human spinal-derived neural stem cells and the reduction of SMN protein expression.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脊髄性筋萎縮症 運動神経細胞 SMN蛋白質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において、セントラルドグマ連の流れにある選択的スプライシングや翻訳機構は、一つの遺伝子転写産物から発生段階や組織依存的に多様な成熟 mRNA を産生し、最終遺伝子産物(蛋白質)を産生させる重要な生命機構である。RNA の多様性が、細胞内で時・空間的に制御されていることが近年明らかにされてきたが、様々な遺伝子の mRNA 前駆体が臓器やその発生プロセスに応じて各々特異的・選択的にプロセシングされていく過程は複雑で実態が解明されていないことが多い。このような複雑で巧妙な選択的スプライシング制御や翻訳制御機構の破綻は様々な疾患を引き起こすことが知られている。遺伝性疾患の一つである脊髄性筋萎縮症(SMA)は原因遺伝子が(Survival Motor Neuron 1) *SMN1* の変異で生じ、脊髄前角細胞の変性、神経筋接合部の脆弱そして進行性筋力低下を伴う下位ニューロン病である。*SMN1* の変異による原因遺伝子産物の Survival motor neuron (SMN)蛋白質の発現低下と内在性のホモログ遺伝子である *SMN2* のスプライシング制御及び翻訳制御による SMN 蛋白質発現量の差異が病態を起因していることが知られている。しかし、SMN 蛋白質の発現量の差異による SMA の病態メカニズムは明らかにされていない。近年、SMA はスプライシング制御による新規な治療法や遺伝子治療も開発され、SMN 蛋白質の発現量を補う治療法が注目をされている。

2. 研究の目的

先行研究において、様々な組織由来の細胞株による *SMN1* 及び *SMN2* の mRNA 発現量を調べたところ、*SMN1* に変異のない細胞株では、*SMN2* mRNA の発現量が低下していることが明らかになった。さらに、*SMN1* を欠失している SMA 患者由来皮膚線維芽細胞 2 株について *SMN2* mRNA の発現量が異なることが明らかになった(基盤研究(C)「脊髄性筋萎縮症原因遺伝子産物による mRNA 前駆体制御機構の解析」研究代表者 荒川正行 2014-2016)。これらの研究結果を基に、SMA 患者由来の皮膚線維芽細胞 2 株の SMN 蛋白質の発現量を調べたところ、*SMN2* mRNA 量と相関して蛋白質量が異なることが明らかとなった。そこで、本研究では、これら 2 つの患者由来の細胞を用いて、*SMN2* コピー数及び SMN 蛋白質の発現量の違いによる SMA 病態に関連する因子を同定する。さらに、SMN 蛋白質量の変化に及ぼす因子とヒト脊髄由来神経幹細胞を分化誘導した運動神経細胞の解析により SMA の病態を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞及び脊髄性筋萎縮症(SMA) I 型患者由来皮膚線維芽細胞 2 株に対して、20%FBS-DMEM(1g/L glucose)の培地で維持し、継代数は 9 以下のものを使用した。ヒト脊髄由来神経幹細胞(hNSC, タカラバイオ社)は、ラミネンコートしたフラスコを用いて増殖培地(RHB-A 含 20 ng/ml ヒト EGF, 20 ng/ml ヒト FGF-2)で増殖させた。継代数 3 の細胞を $3-4 \times 10^4$ cells/cm² の密度で播種し、分化誘導培地(DMEM 含 BDNF, GDNF 等)により、神経分化誘導を行い、培養 15 日目、30 日目による分化誘導能について評価を行った。

2) トータル RNA 精製と qRT-PCR 法分析

各細胞を PBS 洗浄後、トータル RNA を RNeasy キット(キアゲン)を用いて精製し、逆転写反応(PrimeScript RT Master Mix: タカラ)を 500 ng/10 μ l の反応系で行った。RT 産物を定量的 PCR 法(リアルタイム PCR: CFX96 Real-Time System, Bio-RAD)を行った。各サンプル 12.5 ng/well に調整した 25 μ l の系で行った。特異的 primer (cSMN7F: 5'-GAAGTGCTCACATTCCTAAAT-3', cSMN8R: 5'-ATCAAGAAGAGTTACCCATTCCA-3') PCR 40 サイクル(95 °C, 30s, 95 °C, 5s, 60 °C, 10s)で増幅した。

3) RNAseq 解析(理研ジェネシス)

上記の細胞から得られたトータル RNA の品質評価を行い、TruSeq Stranded mRNA Library Prep により得られたライブラリを次世代シーケンサーにより解析を行った。

4) ウェスタンブロット分析

正常ヒト皮膚線維芽細胞及び脊髄性筋萎縮症 I 型患者由来皮膚線維芽細胞 2 株に対して、増殖培地で 2 日間培養後、PBS で洗浄し、蛋白質抽出液で抽出後、遠心上清をサンプルとする。SDS-PAGE 電気泳動後、PDVF 膜に転写したメンブレンをブロッキング室温 1 時間、1 次抗体として抗 SMN 抗体(mouse monoclonal human SMN antibody, BD 社)を用いて 4 overnight でインキュベートした。メンブレンを 0.01% Tween20 in PBS で洗浄後、2 次抗体で室温 1 時間インキュベートし、0.01% Tween20 in PBS で洗浄後、検出した。

5) 免疫染色

①各細胞を PBS で 2 回洗浄後、4%パラホルムアルデヒド-PBS 溶液で固定し、0.2% Triton-X100 in PBS を用いて室温、10 分で膜透過処理を行い、②10%馬血清または 10%ヤギ血清 in PBS にて室温 60 分ブロッキングを行った。③一次抗体(mouse monoclonal human SMN antibody BD 社, anti-human gemin 2 antibody, human antibody Abcam 社, anti-FMN1

antibody, anti-FMN2 antibody, anti-FHOD3 antibody MBL社)を用いて各希釈液(ブロッキング溶液)で調整し、室温、60分インキュベーションを行った。④二次抗体 anti-mouse IgG conjugated Alexa 488 antibody, anti-rabbit IgG conjugated Alexa 594 antibody を用いて室温 60分で染色した。⑤染色後、PBSで洗浄後、ヘキスト 33342 を用いて核染色を行って蛍光顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

脊髄性筋萎縮症(SMA)は原因遺伝子産物 SMN 蛋白質の発現量の低下によることが知られている。本研究では、SMN2 由来の SMN 蛋白質の発現量が異なる SMA 患者由来皮膚線維芽細胞 2 株を用いて、SMN 蛋白質の発現量とそれと相関する因子の探索を行った。まず、SMN 蛋白質の発現レベルをウェスタンブロット分析で確認した(図1)

その結果、SMA 患者由来皮膚線維芽細胞の 2 株 P1 と P2 の SMN 蛋白質の発現量を比較した所、コントロールの正常ヒト皮膚線維芽細胞と比較して両株は減少傾向であるが、SMN2 由来の SMN 蛋白質の発現量は P1<P2 であった。この発現量は、先行研究で MLPA 法に基づいた遺伝子コピー数の結果と相関できる結果であった。

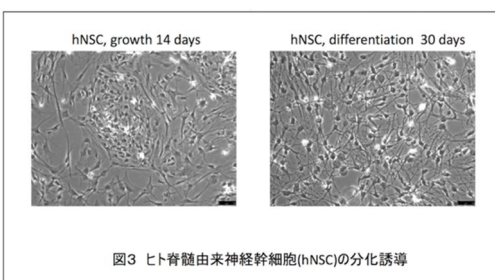
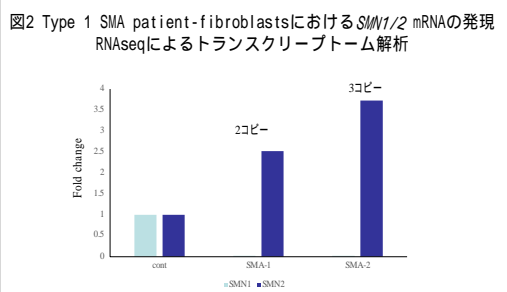
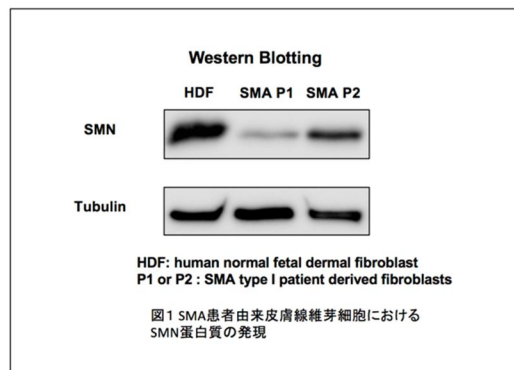
次に、各細胞のトータル RNA を用いて、SMN 蛋白質の発現量の違いによる遺伝子発現を網羅的に調べるために、次世代シーケンサーを用いた RNAseq 解析によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、網羅的なトランスクリプトーム解析によっても *SMN2* 遺伝子の発現量も相対的にコピー数と同様の結果を得た(図2)。

次に、網羅的なトランスクリプトーム解析を行った結果、SMA 患者由来皮膚線維芽細胞の 2 株と正常ヒト皮膚線維芽細胞との比較解析で、SMA 患者由来細胞において神経分化関連因子の発現減少及び細胞骨格系遺伝子群の高発現が確認された。神経分化関連因子の mRNA の発現では、*SERPINF1*, *DAB1*, *SEMA3D*, *SEMA3A* が 2 株で共通に減少していた。また、細胞骨格系関連因子では、アクチン制御及び Rho/ROCK signal 系の因子である *FHOD3* (+3.5~4.6 倍), *FHOD1* (0.98~+1.44 倍増), *FMN1* (+4.3~5.0 倍), *FMN2* (+1.3~1.4 倍), *PLS3* (+1.3~2.8 倍) の変化が見られた。

これらの結果を確かめるために、蛍光免疫染色法を用いて、顕著に高発現していた *FMN1* と *FMN2* について細胞内発現と局在を調べた。その結果、正常ヒト皮膚線維芽細胞では、細胞質に発現が見られた。SMA 患者由来細胞では、SMN 蛋白質の発現量の違いによる解析では、発現量の低い患者由来細胞で *FMN1* の発現が、高く、細胞質及び核内で発現が蓄積していることが確認された。一方、*FMN2* の発現は、違いが見られなかった。現在、他の発現の異なる蛋白質の解析を行っている。

次に、SMA 患者由来皮膚線維芽細胞から得られた因子について解析するために、ヒト脊髄由来神経幹細胞(hNSC)の増殖及び運動神経細胞への分化条件の検討を行なった。その結果、hNSC を増殖培地で 2~3 継代したものを凍結ストックして、起こし直し分化誘導実験を行った。その結果、基本的な分化誘導培地よりも増殖培地で、2 日置きに培地交換した場合のほうが、神経様細胞に分化することが明らかとなった(図3)。

現在、研究の進行が遅れていて、現在、siRNA を用いて *SMN1* をノックダウンして、分化誘導に対する神経分化誘導及び運動神経用細胞に対して影響を調べているが、*SMN1* siRNA の影響は、神経分化には影響を及ぼさない結果が示されている。今後、再現性の検討が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Masayuki Arakawa, Akira Wagatsuma	4. 巻 525
2. 論文標題 1, 25(OH)2 D3 regulates agrin-Induced acetylcholine receptor clustering through upregulation of rapsyn expression in C2C12 Myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communication	6. 最初と最後の頁 80-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.027.	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 Masayuki Arakawa, Akira Wagatsuma	4. 巻 30
2. 論文標題 Natural products regulate agrin-induced acetylcholine receptor clustering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Translational Myology	6. 最初と最後の頁 7-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.4081/ejtm.2019.8826	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 Noriko Otsuki, Reiko Arakawa, Kaori Kaneko, Ryoko Aoki, Masayuki Arakawa, Kayoko Saito	4. 巻 13(8)
2. 論文標題 A new biomarker candidate for spinal muscular atrophy : Identification of a peripheral blood cell population capable of monitoring the level of survival motor neuron protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0201764
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pone.0201764.	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Reiko Arakawa, Noriko Otsuki, Masayuki Arakawa, Kayoko Saito
2. 発表標題 Detection of SMN protein from peripheral human blood and fibroblasts as a biomarker for spinal muscular atrophy
3. 学会等名 2020 PaduaMuscleDays（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川正行、我妻玲
2. 発表標題 活性型ビタミンDのagrin誘導性アセチルコリンレセプター凝集に対する役割
3. 学会等名 第5回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 我妻玲、松本葉奈乃、荒川正行
2. 発表標題 カルシトリオールはアグリン誘導性によるニコチン性アセチルコリン受容体のクラスター化を促進する
3. 学会等名 日本スポーツ栄養学会第6回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川貴則、大月典子、今久保桃子、山本毅、山田和弘、荒川玲子、荒川正行、斎藤加代子
2. 発表標題 イメージングFCMを用いた脊髄性筋萎縮症に対する新規バイオマーカーの開発
3. 学会等名 日本薬学会139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Arakawa, Akira Wagatsuma
2. 発表標題 Natural products can modulate agrin-induced acetylcholine receptors clustering
3. 学会等名 2019 Muscle Biology Conference University of Florida (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reiko Arakawa, Noriko Otsuki, Kaori Kaneko, Masayuki Arakawa, Kayoko Saito
2. 発表標題 Evaluation method of survival motor neuron protein as a biomarker for spinal muscular atrophy patient based on imaging flow cytometry
3. 学会等名 2019 Muscle Biology Conference University of Florida (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川貴則、大月典子、今久保桃子、山本毅、山田和弘、荒川玲子、荒川正行、斎藤加代子
2. 発表標題 イメージングフローサイトメーターを用いた脊髄性筋萎縮症に対する新規バイオマーカーの開発
3. 学会等名 第3回 日本遺伝子細胞治療学会若手セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大月典子、荒川玲子、金子芳、青木亮子、荒川正行、斎藤加代子
2. 発表標題 脊髄性筋萎縮症(SMA)のバイオマーカー：末梢血を用いたSMN蛋白質新規開発法の提案
3. 学会等名 第25回日本遺伝子診療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayuki Arakawa, Reiko Arakawa, Kayoko Saito
2. 発表標題 A novel approach to SMN protein-based evaluation as biomarker in spinal muscular atrophy
3. 学会等名 6th International Conference on Neurology and Neuromuscular Diseases (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Reiko Arakawa ,Masayuki Arakawa, Kayoko Saito
2. 発表標題 Imaging flow cytometry for identifying differences in SMN protein expression between spinal muscular atrophy patients and normal subjects
3. 学会等名 6th International Conference on Neurology and Neuromuscular Diseases (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Reiko Arakawa , Masayuki Arakawa ,Noriko Otski, Kaori Kaneko , Ryoko Aoki , Kayoko Saito
2. 発表標題 Method of evaluating survival motor neuron protein as an outcome measure of SMA-modifying therapy
3. 学会等名 第14回アジア大洋州小児神経学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	齋藤 加代子 (Saito Kayoko) (90138834)	東京女子医科大学・医学部・特任教授 (32653)	
連携研究者	久保 祐二 (Kubo Yuji) (50771482)	東京女子医科大学・医学部・非常勤講師 (32653)	