

令和元年5月24日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16118

研究課題名(和文) 運動ニューロン疾患におけるオートファジー関連分子の病態への関与

研究課題名(英文) Expression and role of autophagy-related molecules in motor neuron disease

研究代表者

藤内 玄規 (Tohnai, Genki)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：00748353

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)：本研究では日本人筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者におけるTBK1遺伝子変異の頻度と特徴を解析した。患者において高頻度で変異を検出し、TBK1がALSの関連遺伝子であることが示唆された。今回検出した変異は培養細胞実験においてTBK1の正常な機能を阻害することがわかり、変異を持つ患者由来のリンパ球ではTBK1の発現低下が見られた。また球脊髄性筋萎縮症(SBMA)モデルにおいてTBK1の発現低下が見られ、この発現低下はSBMA治療薬の投与で改善した。以上の結果からTBK1は運動ニューロン疾患であるALSとSBMAの病態に大きく関わることが示唆され治療の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、運動ニューロン疾患のタンパク質品質管理機構におけるTBK1の役割の解析とTBK1と病因分子との相互作用解明を目的としている。TBK1が運動ニューロン疾患であるALSとSBMAにおいて病態に関与する可能性が示唆されたことで、運動ニューロン疾患共通の機能異常・細胞死のメカニズムの解明が期待できる。またTBK1シグナリングを標的とした治療法を模索することで運動ニューロン疾患全般に応用可能な治療法が開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed frequencies and characteristics of TBK1 gene variants in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). TBK1 variants were frequently detected in ALS patients, suggesting that variations in TBK1 could be related to ALS. We found that the loss of function (LoF) variants rendered TBK1 unable to bind to optineurin in immunoprecipitation. Decreased expression of TBK1 was observed in the lymphocytes of patients with TBK1 LoF variants. Furthermore, decreased expression of TBK1 was observed in the spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) model cells, the expression of TBK1 was increased on administration of SBMA therapeutic agent.

Our findings suggest that TBK1 is involved in the pathogenesis of motor neuron diseases and further indicate that it may be a potential therapeutic target.

研究分野：神経内科学

キーワード：運動ニューロン疾患 SBMA ALS 球脊髄性筋萎縮症 筋萎縮性側索硬化症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動ニューロン疾患は上位および下位運動ニューロンの両方あるいはいずれかが障害される神経変性疾患であり進行性の筋力低下、筋萎縮、呼吸筋麻痺、嚥下障害などを呈する致死性疾患である。成人発症の運動ニューロン疾患の多くは筋萎縮性側索硬化症 (ALS) および球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) である。これらの疾患における病態形成のメカニズムは依然不明な点が多く、根本的治療が提供されずにいる。これらの疾患では異常なタンパク質の蓄積と神経細胞の維持機構の破綻が見られ、その結果特定の神経細胞の機能が失われ変性・細胞死に至る特徴がある。異常タンパク質の蓄積の原因として、ユビキチンプロテアソーム系 (UPS) やオートファジーといったタンパク質の品質管理、分解に関わる機構の機能低下あるいは破綻、品質管理機構の分解能力を超えた異常タンパク質の産生が考えられる。近年、孤発性 ALS 患者の関連遺伝子探索が国内外で行われており、タンパク質品質管理に関わる遺伝子もいくつか同定されている。その中で、オートファジーや免疫に関わる TANK-binding kinase 1 (TBK1) の変異の頻度が健常者にくらべ孤発性 ALS 患者において高いことが分かり新たな関連遺伝子として注目されている。この TBK1 の変異はヨーロッパを始め、中国、台湾の ALS コホートでも報告されている。TBK1 がリン酸化し制御する分子には、ALS の関連遺伝子として報告があり、オートファジーに関わるオプチニューリン (OPTN) と p62 が含まれており、ALS における TBK1 を中心とするオートファジーの重要性が示唆されている。そのこともあり運動ニューロン疾患におけるオートファジーの解析が国内外で活発に進められている。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) および球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) などの運動ニューロン疾患は根本的治療のない致死性神経変性疾患である。これらの疾患の特徴として神経細胞の変性と蓄積が見られる。近年孤発性 ALS 患者の遺伝子解析によりタンパク質分解機構であるオートファジーに関わる TBK1 の変異が確認され、運動ニューロン疾患の原因となる変異タンパク質のオートファジーによる分解が注目されている。本研究では TBK1 遺伝子の変異を日本人孤発性 ALS コホートでも検証しその変異の病原性を解析する。SBMA における TBK1 の発現やその病態への影響を解析し ALS との共通の病態形成メカニズムを探索する。さらには運動ニューロン疾患の分解系に TBK1 が及ぼす影響を解明し、TBK1 を標的とした治療法の開発を目標とする。

3. 研究の方法

本研究では SBMA 細胞における TBK1 の発現をウェスタンブロット法、real-time PCR を用いて解析した。また SBMA 患者剖検組織における TBK1 の発現と局在を免疫組織化学、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。また SBMA の病因となるアンドロゲン受容体 (AR) タンパク質と TBK1 タンパク質との相互作用を免疫沈降法により解析した。SBMA 培養細胞モデルに TBK1 遺伝子の高発現もしくは siRNA を用いたノックダウンを行い TBK1 の発現量の変化が病態に与える影響をウェスタンブロット法や real-time PCR により解析した。日本人 ALS 患者の TBK1 遺伝子変異の頻度と特徴の解析するため孤発性 ALS 患者 713 例のエクソーム解析を行った。エクソーム解析により見出した TBK1 遺伝子の変異の毒性を評価するため、ヒト TBK1 遺伝子をクローニングし、site directed mutagenesis により変異を持つ TBK1 遺伝子を作成し TBK1 と観戦分子との相互作用を解析した。さらにこれらの変異を持つマウスをゲノム編集により作成し、SBMA マウスおよび ALS マウスとの交配によりその影響を解析

した。

4. 研究成果

(1) 本研究では日本人における ALS 患者 TBK1 遺伝子変異の頻度と特徴を解析するために日本人の孤発性 ALS 患者 713 例のエクソーム解析を行い、新規を含む 9 例の TBK1 遺伝子の rare variant を同定した(図 1、表 1)。コントロール 800 例では TBK1 遺伝子の variant は 1 例のみであった(OR = 10.2 ; p = 0.008, 95% CI = 1.67 - 62.47)。また loss of function(LoF)変異は 3 例で認められた (nonsense 変異 1 例、deletion による frame shift 変異 2 例)。日本人患者においても TBK1 遺伝子の variant の頻度が多いことが判明し、またいくつかの stop gain となる変異も見つかった。このことは TBK1 が ALS 関連遺伝子と示唆する欧米の研究を支持する結果となった。

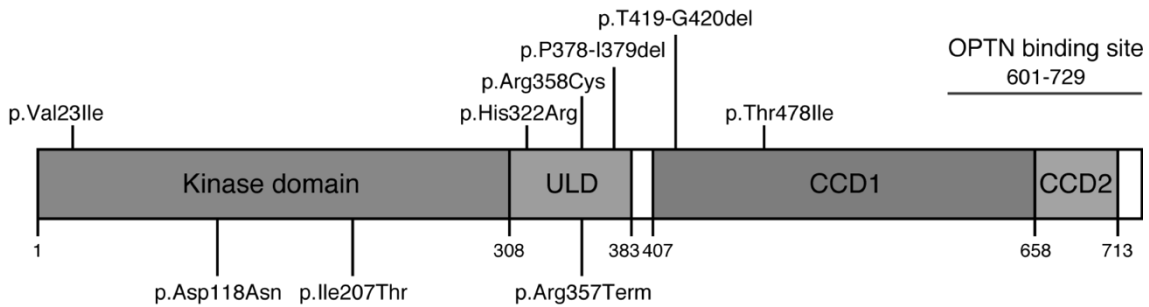


図 1 日本人の孤発性ALS患者で見つかった TBK1 遺伝子の rare variants

Type of variant	Genomic position	Consequence at protein level	Case	Control	ExAC	ExAC frequency	SIFT Prediction (score)	Polyphen-2 Prediction (score)	CADD score
Missense	g.64849717G>A	p.Val23Ile	1	0	----	0	Damaging (0.00)	Probably damaging (0.992)	28.3
Missense	g.64858237G>A	p.Asp118Asn	1	0	1/121032	0.000008262	Tolerated (0.85)	Possibly damaging (0.939)	23.8
Missense	g.64868089T>C	p.Ile207Thr	1	0	3/121402	0.00002471	Damaging (0.00)	Probably damaging (0.991)	25.7
Missense	g.64875774A>G	p.His322Arg	1	0	1/118326	0.000008451	Damaging (0.04)	Possibly damaging (0.901)	23.2
Missense	g.64878162C>T	p.Arg358Cys	1	0	1/120168	0.000008322	Tolerated (0.08)	Probably damaging (1.000)	26.1
Missense	g.64882359C>T	p.Thr478Ile	1	0	1/85656	0.00001167	Tolerated (0.29)	Benign (0.010)	20.2
Nonsense	g.64878159C>T	p.Arg357X	1	0	----	0	---	---	37.0
Frameshift	g.64878224delTA		1	0	----	0	---	---	
Frameshift	g.64879714delAG		1	0	----	0	---	---	

表 1 日本人の孤発性 ALS 患者で見つかった variant の毒性予測

今回見出した変異が TBK1 の機能に与える影響を解析するため、ヒト TBK1 遺伝子をクローニングし、site directed mutagenesis により変異を持つ TBK1 遺伝子を作成した。TBK1 が作用すると報告のある分子と変異を持つ TBK1 を培養細胞モデルに発現させ相互作用を解析したところ、LoF 変異を持つ TBK1 は ALS 関連遺伝子であるオプチニューリン(OPTN)との相互作用で機能不全が見られた。さらに孤発性 ALS 患者由来の不死化リンパ球における TBK1 の発現を解析すると LoF 変異を持つ患者において正常な TBK1 タンパク質の発現量が低下していた。また各国の ALS コホート研究における TBK1 遺伝子の variant の頻度を解析し、LoF variant の頻度に大きな地域差がないことを見出した(表 2)。

Population	LoF variants	Missense variants	Frequency of LoF variants			Patients	Cohort	Year	引用文献
			fALS patients	sALS patients	Total ALS patients				
Caucasian	8	33	-	-	0.28%(8/2874)	2874 (fALS105/sALS1563)	European	2015	①
Caucasian	12	100	3.5% (9/252)	0.28% (3/1010)	0.95%(11/1262)	1262(fALS252/sALS1010)	European	2015	②
Caucasian	1	0	0.79%(1/127)	-	0.79%(1/127)	127(fALS)	Australian	2015	③
Asian	0	2	0(0/23)	0(0/271)	0(0/294)	294(fALS23/sALS271)	Chinese	2016	④
Asian	1	2	0(0/32)	0.57%(1/175)	0.48%(1/207)	207(sALS175)	Taiwanese	2016	⑤
Asian	1	3	-	0.78%(1/129)	0.78%(1/129)	129(sALS)	Korean	2016	⑥
Caucasian	2	5	0(0/30)	1.6%(2/124)	1.3%(2/154)	154(fALS30/sALS124)	Italian	2017	⑦
Asian	3	6	-	0.42%(3/713)	0.42%(3/713)	713(sALS)	Japanese	2018	

表 2 各国の ALS コホートにおける LoF variant の頻度

(2) SBMA における TBK1 の働きを解析するため、SBMA 培養細胞モデルを用いて SBMA 病因タンパク質である AR タンパク質と TBK1 タンパク質との相互作用を免疫沈殿法により解析し、異常伸長した CAG リピートを持つ AR タンパク質と TBK1 との相互作用が見られた (図 2)。

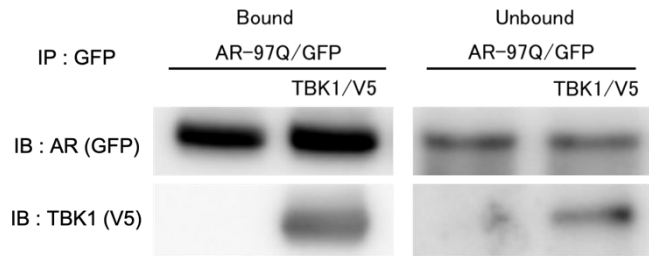


図2 免疫沈殿法を用いた培養細胞における ARタンパク質とTBK1タンパク質との相互作用解析

SBMA 培養細胞モデルにおける TBK1 の

発現解析では TBK1 タンパク質の発現量の低下が見られた。また TBK1 発現低下は SBMA マウスモデルにおいても確認された。さらに FKBP 作用剤を用いて SBMA の病態を回復すると TBK1 の発現低下が改善されることを確認した (図 3)。

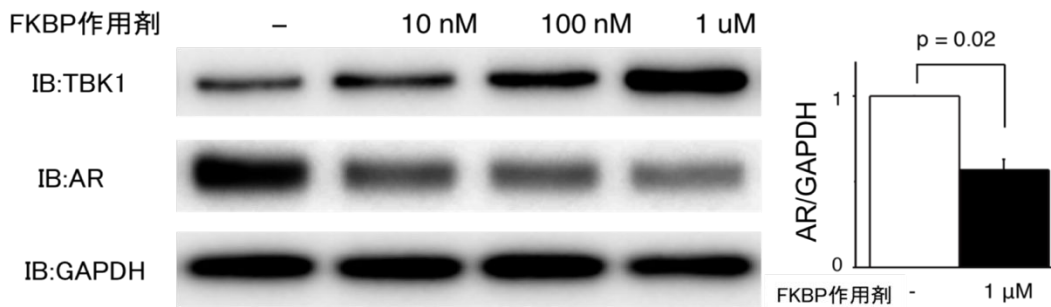


図3 SBMA細胞モデルにおけるFKBP作用剤の効果

今後は現在作成中である TBK1 ノックダウンマウスを用いて SBMA マウス、ALS マウスにおける TBK1 の病態に対する影響の解析を行う。

<引用文献>

- Cirulli ET, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 2015;347:1436-1441.
- Freischmidt A, et al. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci* 2015;18:631-636.
- Williams KL, et al. Novel TBK1 truncating mutation in a familial amyotrophic lateral sclerosis patient of Chinese origin. *Neurobiol Aging* 2015;36:3334 e3331-3334 e3335.
- Shu S, et al. Screening of the TBK1 gene in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients of Chinese origin. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* 2016;17:605-607.
- Tsai PC, et al. Mutational analysis of TBK1 in Taiwanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2016;40:191 e111-191 e116.
- Kim YE, et al. Genetic and functional analysis of TBK1 variants in Korean patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2017; Feb;50:170.e1-170.e6
- Pozzi L, et al. TBK1 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis: genetic and functional characterisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017; Oct;88(10):869-875.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Tohnai G, Nakamura R, Nakatochi M, Atsuta N, Katsuno M, Sobue G: Multi-ethnic comparison of the characteristics of amyotrophic lateral sclerosis-related TBK1 gene variants. *J Neurol Neuromed.* 4(1): 7-11, 2019. (査読あり) DOI : 10.29245/2572.942X/2019/1.1236

Tohnai G, Nakamura R, (他 31 名) Atsuta N, Sobue G: Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* Apr;64:158.e15-158.e19, 2018. (査読あり) DOI : 10.1016/j.neurobiolaging.2017.12.005.

〔学会発表〕(計2件)

藤内玄規、中村亮一、曾根淳、中枋昌弘、横井大知、勝野雅央、和泉唯信、森田光哉、谷口彰、桑原聡、阿部康二、溝口功一、青木正志、服部信孝、辻省次、梶龍兒、熱田直樹、祖父江元、JaCALS. Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic ALS、第59回日本神経学会学術集会、2018年
藤内玄規、中村亮一、佐橋健太郎、近藤直英、飯田円、曾根淳、熱田直樹、祖父江元、勝野雅央、運動ニューロン疾患におけるオートファジー関連分子の役割、第7回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム、2017年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。