

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15362

研究課題名(和文) ALS発症に関与する新たなシナプス蛋白質の病態機序解明研究

研究課題名(英文) Study of the pathogenesis of ALS toward the novel synaptic protein

研究代表者

横井 聡 (Yokoi, Satoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30815460

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の原因であるRNA結合蛋白質のFUSが、マウスモデルにおいてシナプス蛋白であるSynGAPのmRNAを安定化し、シナプス成熟を司っている研究代表者らの既報を基に、日本のALSデータベースであるJaCALSから患者においてFUS結合部位であるSynGAP 3'UTRに新規変異を有する患者を同定した。iPS細胞にCRISPR/Cas9で遺伝子編集を行い、当該変異を導入し、運動神経に分化したところ、変異を有する神経ではシナプス数の減少が確認された。また、変異によりFUSが3'UTRに過結合することも証明され、これらの現象により当該変異がALSの病原性を有す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

本研究により、シナプス蛋白の異常が筋萎縮性側索硬化症を引き起こす可能性が初めて見いだされた。変異を有した運動神経の詳細なRNA代謝異常を同定し、今まで不明であった筋萎縮性側索硬化症がなぜ起こるかを証明していく。また、RNA代謝異常やシナプス異常を是正する化合物開発のモデルが構築できた。さらなる検討により、筋萎縮性側索硬化症に対する治療薬開発に発展させることが可能である。

研究成果の概要(英文)：FUS is one of the pathogenic RNA-binding proteins for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We reported that FUS stabilizes SynGAP mRNA at its 3'UTR and this mechanism is important for spine maturation and cognitive function in mice model. To elucidate the pathogenesis for ALS, first we explored the exome data of JaCALS cohort and identified the novel mutation in SynGAP 3'UTR at the binding site of FUS. Next we inserted the novel mutation to hiPSC (201B7) by CRISPR/Cas9. Then motor neurons were differentiated from edited hiPSCs and are cultured for 4 weeks. We identified the number of spines decreased in motor neurons with the novel mutation. Pull-down assay revealed that SynGAP 3'UTR mutation causes an increase of FUS binding. The novel SynGAP 3'UTR mutation causes an increase of FUS binding, resulting decreased spine number. The aberrant FUS-SynGAP mRNA regulation might be pathogenic for ALS.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 FUS シナプス iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) および前頭側頭葉変性症 (Fronto-temporal lobe degeneration; FTLD) は神経変性疾患の中でも、根本的治療法が未だに存在しない神経難病である。ALS は運動ニューロンを障害することで、四肢麻痺、呼吸障害、嚥下障害を発症し致命的となる疾患であり、FTLD は反社会的行動、脱抑制などの行動異常を主体に認知機能が低下する疾患である。これらの疾患は若年者にも発症するため、治療法の開発は学術的意義のみならず、社会的意義も大きい。ALS と FTLD に共通する病理学的特徴は、本来核内に分布する RNA 結合蛋白質である Fused in Sarcoma (FUS) や TAR DNA-binding protein (TDP-43) などが、患者病理組織では細胞質に移行して異常蓄積することである。蛋白質が異常蓄積することによる gain-of-toxic function モデルや、核から細胞質に移行することで機能喪失を生じる loss-of function モデルが推定されているが、詳細な病態機序は不明である。これらの RNA 結合蛋白質が様々な RNA 代謝に関与していることが、高度な網羅的解析により明らかになっているが、いずれの RNA 代謝が疾患発症に寄与しているかは未だに解明されていない。

本研究は研究代表者が発見した、FTLD/ALS 疾患関連の RNA 結合蛋白質である FUS が 3' UTR に結合してシナプス蛋白質の mRNA 分解を抑制しスパイン成熟や認知行動を制御する機構に着目した (Yokoi, et al; Cell Rep, 2017)。HITS-CLIP による網羅的解析によって、FUS はターゲットの mRNA の主にイントロンに結合することはすでに知られているが、FUS の結合のピークは 3' UTR に存在する共通点を見出した。研究代表者らの先行研究では、同じシナプス蛋白質である GluA1 (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1) の mRNA 3' UTR に FUS が結合し、mRNA の分解を抑制していることを報告した (Nat Commun, 2015)。今回 FUS のシナプス形態を制御する新たなターゲットとして SynGAP を見出したが、FUS の mRNA 分解における詳細なメカニズムを証明すべく、FUS と協働して mRNA の分解を制御している因子を同定したところ、ELAV-like protein ファミリーの関与を発見した (Yokoi, et al; Cell Rep, 2017)。興味深いことに、3' UTR において ELAVL4 が FUS と共に mRNA 分解を抑制し、ELAVL1 が FUS と反対に mRNA 分解を促進する機構は、SynGAP のみでなく、GluA1 でも共通であった。このことから、FUS がシナプス蛋白質の 3' UTR において mRNA 分解抑制を制御している機構は、病態生理に直接関与する普遍的なシステムであると考えられた。ALS/FTLD 疾患関連の RNA 結合蛋白質が、3' UTR においてシナプス蛋白質の mRNA を制御している既報はない。FUS そのものではなく、FUS の下流因子である SynGAP の 3' UTR への結合が低下する変異を同定し、標的 mRNA の発現が低下し、シナプス機能異常を再現できれば、FUS の機能喪失が疾患発症に重要であることが立証でき、さらに FUS を起点に発症する ALS/FTLD の新たな患者群を抽出できると考えている。

2. 研究の目的

研究代表者らは発症原因 RNA 結合蛋白質の 1 つである FUS の機能喪失モデルを用いて、神経変性疾患の早期病変であるシナプス障害に注目して病態解析を行ってきた。その中で、FUS がシナプス蛋白質をコードする mRNA の 3' UTR に結合し、mRNA 分解抑制することがシナプス制御に重要であることを初めて見出した。特に、シナプス蛋白質である SynGAP (Synaptic Ras GTPase activating protein 1) の isoform である alpha2 の 3' UTR に FUS が結合することで発現が安定化し、後シナプスであるスパインの形態成熟および認知行動を制御していることを見出した。SynGAP alpha 2 の発現低下が ALS および FTLD に関連する報告は存在せず、スパイン成熟障害の改善効果がある SynGAP alpha 2 の遺伝子治療を特許申請した (出願番号 2016-139308)。本研究の目的は、SynGAP alpha 2 の発現低下が神経変性疾患の発症に関与することを、患者検体を用いたヒトのモデルで証明することである。研究代表者らの新たな知見である、FUS が 3' UTR に結合して mRNA 分解抑制することに着目し、SynGAP 3' UTR 内の FUS 結合部位の変異を探索し、FUS の結合不安定による RNA 代謝不全という新たな ALS/FTLD の発症機序を証明する。

3. 研究の方法

(1) ALS 患者データベース JaCALS のエクソーム解析データを用いた SynGAP 病的変異の抽出

ヒト脳サンプルにおける FUS の HITS-CLIP 既報によると、FUS はマウスとは異なり、SynGAP mRNA の 3' UTR 近傍に結合することが報告されている。これを元に ALS 患者データベースである Japanese Consortium of Amyotrophic Lateral Sclerosis (JaCALS) に登録された 696 名の血清サンプルを用いたエクソーム解析の結果を分析したところ、FUS の結合領域である 3' UTR 近傍に変異を有する患者が 5 例存在し、コントロール 188 例には認めなかった。この変異を含んだ 300bp のビオチン化 RNA probe を作成し、HEK 細胞溶解液と混合し streptavidin beads で pull-down 実験をしたところ、変異導入した probe への結合率の低下を認めた。この結果は、データベースから抽出した SynGAP mRNA 3' UTR 変異が FUS との結合低下を引き起こしていると考えら

れる。この変異を有する患者の臨床症状、経過を詳細に分析し、本変異に特徴的な臨床像を見出す。

(2) SynGAP 変異導入したヒト iPS 細胞由来運動ニューロンの樹立

上記の予備実験の結果をもとに、SynGAP 変異の ALS 発症への影響を実証するために、ヒト iPS 細胞 (201B7) に患者変異を遺伝子編集にて導入し、分化誘導した運動ニューロンを作成する。ヒト iPS 細胞への遺伝子導入は CRISPR/Cas9 システムを用いる。ネオマイシン耐性遺伝子を含んだ変異テンプレートベクターを gRNA/Cas9 蛋白複合体と共に electroporation 法または lipofection 法で導入し、薬剤スクリーニング後にシングルコロニーから変異導入株を複数抽出する。この方法は患者由来の細胞から直接 iPS 細胞を作成することに比して background が一定となるため、変異の機能をより詳細に検討できる。ヒト iPS 細胞を運動ニューロンに分化誘導する技術は、研究協力者である愛知医科大学 岡田洋平准教授がすでに手法を確立している (Shimojo et al., 2015 Mol Brain; DOI:10.1186/s13041-015-0172-4)。作成した変異導入ヒト iPS 細胞を同手法で運動ニューロンに分化させ、4 週間培養し成熟したニューロンを用いて、スパインの形態解析を免疫染色で行う。研究代表者は FUS を発現抑制すると SynGAP alpha2 蛋白質の低下が生じ、マウス初代培養神経細胞およびマウス海馬において成熟スパインが減少することはすでに報告しており、定量解析の方法も確立している。同様の手法を用いてヒト iPS 細胞由来成熟運動ニューロンの成熟スパインを定量解析する。神経細胞死が生じる前段階で、シナプス障害が神経変性疾患の初期病変として生じることが概念としては提唱されているが、直接証明をすることは困難であったため、これらの手法がヒト iPS 細胞由来の運動ニューロンで検証可能となれば、患者病態を *in vitro* で mimic できる神経変性疾患の初期病変モデルという新たな実験系を確立できる。

(3) SynGAP ゲノムに変異多型を導入した iPS 細胞由来運動ニューロンにおける RNA 代謝不全の解析

SynGAP は alpha2 以外にも C 末端側に spliced variant が存在し、特に alpha isoform は Ex18-19-3' UTR のスプライシングにより、alpha2 とは反対にシナプス成熟を抑制する alpha1 が存在する。マウスモデルでは SynGAP alpha2 のみが低下していたが、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた事前検討では、FUS の発現を抑制すると SynGAP alpha2 の蛋白発現は予想通り低下したが、SynGAP alpha 1 の発現はむしろ増加していた。FUS の SynGAP mRNA への結合部位も、マウスでは 3' UTR 遠位側であるのに対し、ヒトでは 3' UTR 近傍と異なっている。この結果から、ヒトにおける FUS の SynGAP mRNA 制御は、mRNA 分解抑制のみでなくスプライシングの関与が予想される。上記で作成したヒト iPS 細胞由来成熟運動ニューロンを用いて、Actinomycin D で RNA 合成を人工的に停止させる mRNA stability assay にて変異の有無による mRNA 分解の変化を検証する。またスプライシングの変化も解析する。これらの RNA 代謝変化を引き起こす 3' UTR 上の関連領域を同定するために、レポーター蛋白質に 3' UTR に変異や部分欠損を導入した配列をつなぎ、mRNA 発現の変化を検証する。同定した領域に対して、pull-down 実験で FUS およびその他の RNA 結合蛋白を同定する。このように *in vitro* で iPS 細胞を用いた実験系における FUS-SynGAP mRNA の詳細な RNA 代謝機構を同定することにより、実際に治療薬を開発する段階において、特異的に RNA 代謝を改善するアンチセンスオリゴやマイクロ RNA の開発に応用できる。

4. 研究成果

2018 年度は共同研究者と共に iPS 細胞株 (201B7) から運動神経に分化誘導する技術を習得し、安定して培養できる環境を確立した。また表現型解析を行うためにシナプス形態を観察できる条件検討を行い、後述する新規変異モデルの解析が可能な状態になった。

データベースから見出した点変異を有するモデル iPS 細胞を作成するため、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集を行った。通常は Cas9 が変異を有するテンプレートを切断しないようにするために目的の変異以外にアミノ酸配列が変化しないような変異をテンプレートに導入することや、導入後に Cre-loxP などを用いて recombination して配列を作成する場合には使用する loxP 配列などが残存することがあるが、今回は 1 箇所の点変異の機能を解析するために、foot-print free に点変異を導入する技術を用いた。これにより iPS 細胞株 (201B7) に新規変異を導入し、運動神経に分化誘導が可能であることを確認し、表現型解析が可能なモデルの作成に成功した。研究室は既報で FUS 機能喪失マウスモデルを用い、FUS の SynGAP mRNA 安定化機構の破綻がシナプス形態異常を引き起こし、認知行動障害を引き起こすことを明らかにした。この機構が筋萎縮性側索硬化症の病態生理に関係しているかどうかを調べるべく、JaCALS データベースから SynGAP 3'UTR の新規変異を発見し、ヒトモデルでの確認を行うために、iPS 細胞から分化誘導した運動神経でその変異の機能解析を行った。

また、マウスにおける FUS ノックダウンと同じ表現型を呈するかどうかを確認するために、正常 iPS 株細胞から作成した運動神経を用いて、レンチウイルスで FUS に対する shRNA を導入し、シナプスの評価を行ったところ、FUS 喪失によって、シナプス数の減少が確認された。これはマウスにおける表現型を再現する結果であった。

2019 年度は、前年度に確立した実験条件において、患者由来の SynGAP 新規変異を導入した iPS 細胞由来運動神経の機能解析を行ったところ、患者変異のある遺伝子編集株において、シナプス数の減少が確認された。これは、マウスにおけるフェノタイプと同様であり、今回発見した SynGAP 新規変異が ALS を起こしうる病原性を有している可能性が示唆された。また、この変異を含んだビオチン化 RNA probe を作成し、iPS 細胞由来運動神経 lysate と混和し、probe への結合能を評価した RNA pulldown assay では、FUS が新規変異により SynGAP mRNA に過結合していることも新たに発見した。また、FUS と共に probe に過結合する、あるいは反対に結合能が低下する蛋白質を同定することができた。

本研究の成果として、2019 年に第 60 回日本神経学会学術集会において、ポスター発表を行った(タイトル: FUS depletion induces spine abnormality and SynGAP depletion in hiPSC-derived motor neuron)。

今後はこの過結合がどのような RNA 代謝異常を引き起こし、シナプス障害を引き起こすかを詳しく解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----