

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07984

研究課題名(和文) ATXN80S関連筋萎縮性側索硬化症における介在蛋白同定とiPS細胞モデル治療

研究課題名(英文) Identification of proteins associated with ATXN80S-related amyotrophic lateral sclerosis and treatment of iPS cell models

研究代表者

平野 牧人(Hirano, Makito)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：50347548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ATXN80S関連筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態解明とiPS細胞由来の運動ニューロンモデルの構築と治療法開発を目標とした。ブレインバンクから提供された病理学的確診ALSのDNAを解析した。その結果、1例でATXN80S変異を同定した。本例では、脊髄前角運動ニューロンにTDP43の凝集が見られた。また、別のATXN80S関連ALS患者のiPS細胞を運動ニューロンへ誘導した。正常対照と比べ、明らかに生細胞数が減少していた。残存細胞内にRNA凝集が観察され、それらはTDP43と共存した。鎖特異的siRNAを発現させたところ、2種類のsiRNAで患者由来細胞の生存が有意に改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果により、ATXN80S関連ALSは、古典的ALSと共有するTDP43が介在する病態機序が考えられた。また、患者iPS由来運動ニューロンでは、細胞生存率が低下しており、細胞内凝集も再現されたことから、この細胞はALSのモデル細胞として使用できると考えられた。また、遺伝子発現低下を目指したsiRNA導入にて細胞死が減少することから、ATXN80S変異による毒性が病態に関与していることが示唆された。さらに、モデル細胞をsiRNAにより治療させることができる可能性を示した点で、今後の治療開発に対して、重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to elucidate the pathogenesis of ATXN80S-related amyotrophic lateral sclerosis (ALS), to establish an iPS cell-derived motor neuron model, and to develop a therapeutic approach. We received tissue samples of pathologically confirmed ALS from the Brain Bank and analyzed their DNA. We identified an ATXN80S mutation in one patient. In this patient, TDP43 aggregation was found in the anterior horn motoneurons of the spinal cord. In addition, induced pluripotent stem (iPS) cells from another ATXN80S-related ALS patient were induced into motor neurons. A substantial decrease in the number of viable cells was observed, as compared to normal controls. In situ hybridization using fluorescent probes to detect repetitive sequences revealed intracellular aggregates, which were co-localized with TDP43. For therapeutic intervention, strand-specific siRNAs were expressed, and two siRNAs significantly increased the number of viable cells in patient-derived motor neurons.

研究分野：脳神経内科

キーワード：核酸医薬品 筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、著名人がバケツで氷水をかぶるバケツチャレンジで話題となった疾患である。顔面、四肢、体幹、呼吸筋が徐々に萎縮、機能不全に至る予後不良の神経難病である。世間からの注目を浴びる一方、現在、原因・根治療法は確立されていない。また、年単位で全介助を要し、病態機序解明や治療法開発は医学的のみならず社会的にも重要である。しかし、ヒトの病態を再現する、細胞・動物モデル少なく、分子病態機序は十分に解明されていない。これを解決する一つの方法として、私たちは本研究の予備実験で正常人および ALS 患者の人工多能性幹(iPS)細胞を樹立し、さらに正常の iPS 細胞から比較的短期間に運動ニューロンへ誘導することに成功している。最近、家族歴のない孤発例に遺伝子異常が報告されており、申請者も、大阪南部の孤発性 ALS 患者において、ALS 原因遺伝子を検索した結果、15%の患者に遺伝子変異を見出した(Neurology 2013;8:458, Neurobiol Aging 2015;36:1604 e1)。本研究では、私たちが孤発例の解析から新規に同定した *ATXN8OS* 関連 ALS にどのような蛋白が関与して発症するかを同定し、iPS 細胞由来の運動ニューロンモデルを確立して、治療法開発を行う。

孤発性疾患に遺伝子異常が見つかるということは、遺伝子の関与が少ないとされた孤発性 ALS においても、一部では遺伝子異常がその病因となることを意味し、さらに、遺伝子異常のある孤発例細胞由来の人工多能性幹 (iPS)細胞を用いた実験は、孤発性 ALS の解明に寄与することが示唆される。

欧米では、孤発性 ALS で見つかる遺伝子異常の多くは non-coding RNA に関連する *C9ORF72* 遺伝子の GGGGCC 反復配列の延長である。残念ながら日本では、同遺伝子陽性率は 0.5%未満と大きくない。私たちは、日本にも non-coding RNA に関連する ALS が存在する可能性を考えて、先行研究として様々な non-coding RNA に関連するリピート遺伝子を解析し、脊髄小脳萎縮症 8 型 (SCA8) の原因遺伝子 *ATXN8OS* における非翻訳領域のリピート延長が ALS の約 3% の患者に認められることを発見し、報告した(Neurol Genet 2018;4:e252)。この 3% というのは、本邦で最も多い ALS 原因遺伝子変異の *SOD1* や *SQSTM1/p62* 遺伝子がそれぞれ孤発性の約 2% であることを考えると、決して少なくない。また、SCA8 は、遺伝子異常があっても発症しないとの報告も多いため、以前は小脳失調の原因遺伝子かどうかの議論があったが、最近の私たちの研究により(Cerebellum 2018 e-pub)、これまで世界中で 123 例以上が報告されており、それらには、リピート数と発症年齢に負の相関が成立することを見出した。また、非発症者とされる多くは、当該リピート数で発症する最高齢の年齢を超えていないことが判明した。別の研究者が報告したトランスジェニックマウスで病気が再現されたことから(Nat Genet 2006;38:758)、現在では、浸透率は少し低いが優性遺伝病であると考えられている。

2. 研究の目的

海外の ALS に関係する非翻訳 RNA 研究は *C9ORF72* 遺伝子に関するものばかりである。これらは、治療のターゲットとして様々なアプローチがなされている。しかし、残念ながら日本には患者が少ない。*C9ORF72* 遺伝子では GGGGCC 反復配列であるため、repeat-associated non-AUG (RAN) 翻訳の確認(RAN)翻訳ではポリ GP や GA などのジペプチドが生じるとされる。一方、*ATXN8OS* 遺伝子は CTA 反復配列に続く CTG 反復配列であるため、ポリスレオニン-ポリアラニン、ポリロイシン、ポリチロシン-ポリシステインさらにアンチセンス鎖も転写翻訳されるとされ、ポリセリン、ポリアラニン-ポリバリン、ポリグルタミンなど全く異なるペプチドが産生されると考えられる。したがって、反復配列による発症機序という点で、共通する部分も多いと推定されるが、それぞれ、異なる方法論が必要になると推測される。

本研究は、患者由来の iPS 細胞を用いて、日本で発見された *ATXN8OS* 関連 ALS の病態機序や治療薬候補を見出そうとする初めての試みである。

3. 研究の方法

(1) 病的に ALS と確認されている患者および新規患者の遺伝子のスクリーニング

コホート・生体試料支援プラットフォームにより、ALS の病理組織提供を東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク(代表村山繁雄先生)から検体を供給していただき、遺伝子検査を施行する。*ATXN8OS* 遺伝子および、それ以外の原因を除外するため、その他の原因遺伝子について本学にて行っている ALS 遺伝子スクリーニングを行う。本疾患は約 3% であり、少なくとも 30 例以上を検査する。また、新規患者も、スクリーニングに加える。仮に遺伝子異常が検出されない場合にも、下記の研究にて関連蛋白が同定された際、遺伝子陰性例における、その蛋白の動向を検査する。

(2) ATXN80S 変異陽性患者の iPS 細胞の樹立・運動ニューロンへの分化
ATXN80S 遺伝子変異陽性 ALS 及び小脳失調が主体の SCA8 患者線維芽細胞から iPS 細胞は 1 例分樹立している。すでに正常細胞から運動ニューロンへの誘導は成功しており、同様の方法で患者細胞を運動ニューロンへ誘導し、その形態などを正常対照と比較する。

(3) iPS 細胞由来運動ニューロンの染色と RAN 翻訳および関連蛋白の解析
ATXN80S 遺伝子異常陽性剖検小脳では、異常な RNA 凝集(RNA foci)が生じるとされる。患者 iPS 細胞由来の運動ニューロンあるいは、上記 1 で陽性が判明した運動ニューロンに、蛍光標識したリピートのプローブを用いて、RNA foci を検出する。さらに、非翻訳 RNA におけるリピート延長時生じる RAN 翻訳について、病的意義が知られている抗ポリグルタミン特異的抗体 1C2 で、免疫染色を行う。また、その他のポリアミノ酸に対するポリクローナル抗体を作成し、免疫染色を行う。さらに、GFP 融合のポリアミノ酸を発現するプラスミドベクターを構築し、神経様細胞へ導入し、GFP 抗体で pull-down アッセイを行い、ウエスタンブロットや 2 次元電気泳動にて、関連する蛋白の同定を図る。

(4) TDP43 や FUS 局在と異常伸長した RNA foci との関連
RNA foci と TDP43、FUS さらに別の ALS 原因蛋白 hnRNP A1 などの RNA 結合蛋白との二重染色を行う。C9ORF72 遺伝子では hnRNP A1 と類縁の hnRNP A3 蛋白が RNA と結合することが報告されている(EMBO Rep.2016;17:1314)。これら蛋白と ATXN80S RNA foci との関連を調べる。

(5) iPS 細胞由来運動ニューロンへの治療介入
形態変化や免疫染色等の結果を指標として、実験的治療を行う。siRNA 等で発現量を低下させて、形態や免疫染色性への効果を検討する。また、活性酸素が ALS の病態機序・治療方法に関わるとされるので、もし、形態や免疫染色性の変化などが明らかでない場合には、H2O2 などの酸化ストレス負荷をかけることで、正常との差が検出できるかを検討する。また、逆に、ビタミン C、E や Coenzyme Q10、その誘導体などの抗酸化剤が指標の改善に関連しているかも検討する。

4. 研究成果

(1) 病理確定 ALS の遺伝子解析と RAN 翻訳蛋白解析

病的に ALS と確認されている患者の遺伝子のスクリーニングを実施した。予定は 30 例であったが、49 例提供していただき、全例で検査を施行した。その結果 1 例で ATXN80S 変異陽性者が同定された。この ATXN80S 関連 ALS 患者の免疫染色の検討により、運動ニューロンに TDP43 の凝集を認めた。RAN 翻訳に基づき作製したペプチドに対するウサギポリクローナル抗体は ELISA にて反応がある事を確認後、これを用いて免疫染色を行ったところ、患者運動ニューロンの一部に凝集が観察された。また、RAN 翻訳にて生じるポリアミノ酸と関連する蛋白の同定のために、GFP 融合の正常長 ATXN80S を発現するプラスミドベクターを構築し、その発現を確認したところ、リピートに続く GFP の発現が認められたが、電気泳動上同定できるような結合蛋白は同定できなかった。しかし、病理学的検討から、古典的 ALS と同様に、ATXN80S 関連 ALS においても、TDP43 が介在していると考えられた。

(2) 患者 iPS 由来運動ニューロンの形態的、免疫染色的解析

ATXN80S 変異陽性患者の iPS 細胞の運動ニューロンへの誘導を行い、運動ニューロンへ誘導することができ、形態的・生化学的な性質を解析した。その結果、正常細胞に比べて、極端に細胞生存率が悪化していた。さらに、iPS 細胞由来運動ニューロンの染色と RNA foci を検討したところ、TDP43 の凝集と共存することが判明した。一方で、残存する運動ニューロンの形態的な変化は少ないことが分かった。iPS 細胞由来運動ニューロンの染色と RAN 翻訳の確認を行っていくために、ポリクローナル抗体を作成し、病理組織にて染色を行ったところ、一部に集積が見られた。

(3) iPS 由来運動ニューロンへの siRNA による治療実験

iPS 由来運動ニューロンは、TDP43 の細胞内凝集があり、生存率が低下しているため、ALS のモデル細胞として用いることができると判断した。また、治療介入のため、6 種類の strand-specific siRNA を設計・作製し、一過性トランスフェクションにより発現させたところ、このうち 2 種類の siRNA で ALS 患者由来運動ニューロンの生細胞数は有意に増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inada Rino, Hirano Makito, Oka Nobuyuki, Samukawa Makoto, Saigoh Kazumasa, Suzuki Hidekazu, Udaka Fukashi, Hashiguchi Akihiro, Takashima Hiroshi, Hamada Yukihiro, Nakamura Yusaku, Kusunoki Susumu	4. 巻 268
2. 論文標題 Phenotypic and molecular diversities of spinocerebellar ataxia type 2 in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 2933-2942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-021-10467-z	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 Fujii Kanako, Hirano Makito, Terayama Atsushi, Inada Rino, Saito Yoshihiko, Nishino Ichizo, Nagai Yoshitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of a novel mutation and genotype?phenotype relationship in MEGF10 myopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuromuscular Disorders	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) 10.1016/j.nmd.2022.01.009	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 Hirano Makito, Isono Chiharu, Samukawa Makoto, Fukuda Kanji, Kusunoki Susumu	4. 巻 78
2. 論文標題 Rasagiline monotherapy improves swallowing in patients with Parkinson's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 98 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2020.07.010	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 Hirano M, Isono C, Fukuda K, Ueno S, Nakamura Y, Kusunoki S	4. 巻 404
2. 論文標題 Effects of the rotigotine transdermal patch versus oral levodopa on swallowing in patients with Parkinson's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 5-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.07.003	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 Hirano M, Itoh T, Fujimura H, Inoue K, Samukawa M, Nose K, Sakamoto H, Maekura S, Ueno S, Satou T, Nishioka T, Kusunoki S, Nakamura Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Pathological Findings in Male Patients With Anti-N-methyl-d-Aspartate Receptor Encephalitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuropathol Exp Neurol	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) 10.1093/jnen/nlz052	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 仲間美奈、西郷和真、平野牧人、濱田征宏、金城ちなつ、寒川 真、長谷川隆典、北口正孝、三井良之、巽 順子、田村和朗、楠 進	4. 巻 40
2. 論文標題 脊髄小脳変性症の遺伝子診断と近畿圏における病型	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本カウンセリング学会誌	6. 最初と最後の頁 95-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Makito Hirano, Toshiyuki Takehara, Shigeo Murayama, Yuishin Izumi, Makoto Samukawa, Tomoyasu Matsubara, Yuko Saito, Kazumasa Saigoh, Yusaku Nakamura, Kanji Fukuda, Susumu Kusunoki, Yoshitaka Nagai
2. 発表標題 Phenotypic variation and therapeutic strategy of SCA8-associated amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第63回日本神経学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makito Hirano, Shigeo Murayama, Yuishin Izumi, Makoto Samukawa, Tomoyasu Matsubara, Kazumasa Saigoh, Yusaku Nakamura, Susumu Kusunoki
2. 発表標題 The first patient with pathologically-definite ATXN80S-associated amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第61回日本神経学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野牧人
2. 発表標題 神経筋疾患の嚥下障害 ～基本から最新知見まで～
3. 学会等名 第61回日本神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makito Hirano, Makoto Samukawa, Chiharu Isono, Kazumasa Saigoh, Yusaku Nakamura, Susumu Kusunoki
2. 発表標題 NON-CODING REPEAT EXPANSIONS IN THE ATXN80S GENE ARE IDENTIFIED IN JAPANESE PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS.
3. 学会等名 World Congress of Neurology 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiharu Isono, Makito Hirano, Kanji Fukuda, Makoto Samukawa, Kazumasa Saigoh, Yusaku Nakamura, Susumu Kusunoki
2. 発表標題 Clinical features and progression of dysphagia in bulbar-onset or limb-onset amyotrophic lateral sclerosis between patients with genetic mutations and those without mutations
3. 学会等名 World Congress of Neurology 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makito Hirano, Makoto Samukawa, Chiharu Isono, Kazumasa Saigoh, Yusaku Nakamura, Susumu Kusunoki
2. 発表標題 Non-coding repeats in the ATXN80S gene are expanded in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 2019 Annual Meeting - American Academy of Neurology（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	竹原 俊幸 (Takehara Toshiyuki) (60580561)	近畿大学・大学病院・助教 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------