

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17043

研究課題名（和文）リピート異常に起因する神経筋疾患の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of non-coding repeat expansion disorders

研究代表者

塩田 智（Shiota, Tomo）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：70837062

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）：C9orf72 遺伝子のGGGGCCリピート配列から産生されるプロリン：アルギニン（PR）ポリペプチドは細胞毒性を有し、中間径フィラメント（IF）に結合する。しかし、PRポリペプチドが細胞骨格や接着斑に与える影響は不明であった。PRポリペプチドは、IFの分岐部の増加、細胞の硬さの増加、アクチンフィラメントの分布変化、FAサイズの増加を誘導した。また、PRポリペプチドとIF阻害剤は細胞の剥離を抑制した。さらに、PRポリペプチドは機械的ストレス応答因子の発現を増加した。これらの結果は、PRポリペプチドが細胞の機械的特性や機械的ストレス応答を変化させ、ALSの病態に関わる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の機械的特性や機械的ストレス応答は、細胞の恒常性に関与し重要である。しかし、筋萎縮性側索硬化症（ALS）においてこれらがどのように変化しているか不明であった。本研究は、細胞の表面の硬さの変化や機械的ストレス応答の変化が、ALSの病態に関与する可能性があることを始めて明らかにしたもので、ALSの病態解明の一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Proline:arginine (PR) poly-dipeptides from the GGGGCC repeat expansion in C9orf72 have cytotoxicity and bind intermediate filaments (IFs). However, it remains unknown how PR poly-dipeptides affect the cytoskeletal organization and focal adhesion (FA) formation. Here, we show that the changes of cytoskeleton and FA by PR poly-dipeptides result in the alteration of cell stiffness and mechanical stress response. PR poly-dipeptides increased the junctions and branches of the IF network, increased cell stiffness, changed the distribution of actin filaments and increased the size of FA. In addition, PR poly-dipeptides or an inhibitor of IF organization prevented the cell detachment. Furthermore, PR poly-dipeptides upregulated mechanical stress response factors and led to a maladaptive response to cyclic stretch. These results suggest that the effects of PR poly-dipeptides on mechanical properties and mechanical stress response may serve as a pathogenesis of C9orf72-related neurodegeneration.

研究分野：神経

キーワード：ALS

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は選択的かつ進行性に運動ニューロンが侵される疾患である。病気の進展は比較的早く、四肢の筋力低下のために ADL は低下し、呼吸筋障害によって人工呼吸器を使用しなければ発症後数年で死に至る難病ですが、病態機序は不明な点が多く、治療法は確立されていない。

前頭側頭葉変性症を伴う筋萎縮性側索硬化症 (ALS/FTD) の遺伝子異常として、C9orf72 遺伝子の異常な繰返し配列 (リピート異常) が報告されている (Renton et al. *Neuron* 2011)。C9orf72 遺伝子異常を伴う ALS/FTD (C9-ALS) の患者由来の細胞では、PR (プロリン・アルギニン) ポリペプチドという細胞膜透過性を有する毒性ポリペプチドが産生され (Mori et al. *Science* 2013)、その細胞内における標的タンパク質の中に細胞骨格成分である中間径フィラメントがある (Lin, Mori et al. *Cell* 2016)。

すでに C9-ALS 以外の家族性 ALS では細胞骨格の構造異常と疾患の関連が報告されており (Wu et al. *Nature* 2012, Smith et al. *Neuron* 2014)、C9-ALS においても細胞骨格異常が病態と関与している可能性が考えられるが細胞内での変化については明らかになっていない。また、細胞骨格は細胞の局所接着構造とともに細胞の運動や接着に関与し、いずれも細胞の形態変化や移動における力学的な基盤となる。

細胞の内外に関わらず細胞に負荷される様々なメカニカルストレスに対する応答は、メカトランスダクションと呼ばれるシグナル伝達を生じさせて、細胞のホメオスタシスを保つために重要と考えられているが (BurrIDGE et al. *Exp Cell Res* 2016)、これらが ALS の病態にどのように影響を与えているかはこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

細胞骨格は、細胞と基質間の接着を担う接着斑構造とともに細胞の生存に重要な分化や形態維持における力学的基盤として働き、細胞の恒常性に重要である (BurrIDGE et al. *Exp Cell Res* 2016)。また、細胞骨格や接着斑は張力を生じさせ、細胞の硬さや高さ、基質との接着力など機械的特性を決定すると同時に、絶え間ない力学的ストレスでもある。

細胞に加わる力学的ストレスは化学的シグナル伝達に変換され (メカトランスダクション)、アポトーシスやオートファジーなど生理的に重要である。C9-ALS の病態にも細胞骨格変化に基づく恒常性異常が関与する可能性があるが、これまでにこのような知見は得られていない。本研究では PR ポリペプチドが細胞骨格や細胞の機械的特性、メカニカルストレス応答に影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の目的は PR ポリペプチドにより細胞骨格・接着斑の分布や編成の変化と、これらによって細胞の機械的特性の変化やメカトランスダクションが誘導されることを明らかにすることである。

そのために、PR ポリペプチドを細胞に添加して培養して細胞への影響を下記の方法を用いて検討した。

1) 細胞骨格や接着斑分子について蛍光染色を用いた解析、2) 原子間力顕微鏡による細胞の物理的な硬さや高さの評価、3) キレート剤を用いた基質からの細胞のはがれにくさの検討、4) 繰返し伸展刺激による細胞配向の変化動的に評価し、またや機械的ストレス応答に関与するシグナル伝達分子の変化についてウェスタンブロット法を用いて検討を行った

4. 研究成果

本研究では、ほ乳類細胞において、PR ポリペプチドが、細胞骨格、細胞表面の硬さ、局所接着の編成やメカニカルストレス応答に及ぼす影響を評価した。その結果、PR ポリペプチドは、細胞質にある中間径フィラメントの高密度な網目状のネットワークの形成を誘導し、アクチンフィラメントや局所接着のリモデリング異常と連動して細胞表面の硬さを増加させた。また、PR ポリペプチド、アクチンフィラメント・微小管・中間径フィラメントそれぞれの細胞骨格阻害薬で処理した細胞に、EDTA を使用して細胞剥離処理を行うと、PR ポリペプチドと中間径フィラメント阻害剤を処理した細胞では基質からの細胞剥離が阻害された。さらに、PR ポリペプチドは、メカニカルストレス応答因子であるトロンボスポンジン1の発現を誘導し、メカニカルストレスに対する不適応応答を引き起こした。

この研究において、我々は、PR ポリペプチドが、細胞内で形成される中間径フィラメントの網目状ネットワーク構造を動的に変化させ、細胞の力学的な強度や局所接着の異常なリモデリング、メカニカルストレス応答の変化をもたらすことを明らかにした。これらの結果は、PR ポリペプチドが関与する ALS/FTD の発症メカニズムに、細胞骨格や局所接着の分布やリモデリングの異常のみならず、細胞の力学的特性や力学的ストレス応答の変化が関与している可能性を示唆するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomo Shiota	4. 巻 -
2. 論文標題 C9orf72- derived proline:arginine poly-dipeptides disturb cytoskeletal architecture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	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） 10.1101/2020.10.14.338566	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomo Shiota
2. 発表標題 C9orf72- derived proline:arginine poly-dipeptides interfere with cytoskeletal architecture
3. 学会等名 日本神経学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------