

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07016

研究課題名（和文）RNA結合タンパク質量の増減による、筋萎縮性側索硬化症ALSの治療法開発

研究課題名（英文）Development of Therapeutic Strategies for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) through Modulation of RNA-Binding Protein Levels

研究代表者

築地 仁美 (TSUIJI, Hitomi)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：40455358

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）：家族性ALS患者の約5%ではRNA結合タンパク質FUSの変異がみられ、細胞質でFUSが異常に蓄積している。本研究では、FUSとAtaxin-2に着目し、それらを介した運動ニューロン変性機構の解明を目指した。まず変異FUSを発現するALSモデルマウスを作成したところ、体重減少、生存率低下、神経異常といったALS類似の症状を示した。このマウスにFUSノックアウトマウスを交配させることで核のFUSタンパク質の発現量を減少させたところ、神経異常が改善した。また、Ataxin-2のノックアウトマウスと交配させたところ、運動機能は悪化した。また、体重や生存率は改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
筋萎縮性側索硬化症ALSは根治療法がない神経難病である。本研究により、FUSやAtaxin-2タンパク質量を減少させることがALS病態を改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mutations in the RNA-binding protein FUS are observed in approximately 5% of familial ALS patients. In this study, we focused on FUS and Ataxin-2, aiming to elucidate the mechanisms of motor neuron degeneration mediated by these proteins. We generated ALS model mice expressing mutant FUS. The mutant FUS transgenic mice exhibited ALS-like symptoms such as weight loss, decreased survival rate, and neurological abnormalities. By crossing these mice with FUS knockout mice or Ataxin-2 knockout mice, we generated mice with a reduced level of nuclear FUS protein or Ataxin-2 protein. We observed an improvement in neurological abnormalities, as indicated by clasping behavior, in mice with a reduced level of nuclear FUS protein. While motor function deteriorated, there was an improvement in weight and survival rate of mice with a reduced level of Ataxin-2. These findings suggest that reducing the levels of FUS or Ataxin-2 may ameliorate ALS pathology in mutant FUS transgenic mice.

研究分野：神経病態学

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 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は運動ニューロンの変性を伴う進行性の神経変性疾患であり、前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia) は反社会的行動を伴う認知症である。両者は発症に寄与すると考えられる遺伝子に共通性があり、同一スペクトラム上に位置すると考えられている。ほぼ全ての ALS 患者と約半数の FTD 患者の変性した神経細胞では、RNA 結合タンパク質 TDP-43 または FUS の異常蓄積が観察されている。ALS 患者のうち約 10% では家族性であり、ゲノム変異が報告されている。TDP-43 や FUS を含む複数の RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の変異が、遺伝性 ALS/FTD 患者で報告されていることから、特定の機能を持つ RNA 結合タンパク質群の異常が ALS/FTD の発症と進行に寄与すると考えられる。さらに、最も頻度の高い家族性 ALS の遺伝子変異は、C9orf72 遺伝子の非翻訳領域におけるサテライトリピート (GGGGCC 配列の繰り返し) 数の上昇である。このサテライトリピート数の上昇により、異常に長い RNA が核内に蓄積し毒性を獲得する。さらに異常に長い RNA が細胞質に移行すると、正常では起こらない翻訳が起こる。この翻訳は繰り返し配列が長い場合にのみ起こり、かつ開始コドン AUG に依存せず、3 フレーム全てで起こる。さらにセンス鎖アンチセンス鎖の両方から翻訳されるため、5 種類のジペプチドリピータンパク質が合成される。これらジペプチドリピータンパク質も毒性を発揮することがわかっている。このように、ALS/FTD の発症と病態の進行は、RNA 代謝異常や翻訳異常と密接に関連している。しかしその発症や病態悪化の機構はほとんど解明されておらず、有効な治療法は開発されていなかった。

家族性 ALS 患者の約 5% では RNA 結合タンパク質 FUS の変異が見つかり、FUS-ALS と称される。また一部の遺伝性および孤発性 ALS 患者の変性運動ニューロンでは、FUS が凝集体を形成し蓄積しており、蓄積した FUS が神経毒性を発揮することが示唆されている。FUS は通常核に存在する RNA 結合タンパク質であり、転写、DNA 修復、RNA 輸送などに関わる。FUS の機能喪失と異常な凝集体形成による毒性の獲得のいずれかもしくは両方が、FUS-ALS の発症と病態進行に寄与すると考えられる。

一方我々は、FUS と結合するタンパク質として survival of motor neuron (SMN) タンパク質を見出し、ALS 患者脊髄運動ニューロンにおける SMN の異常を発見し報告した (Tsujii et al., 2013, EMBO Mol Med)。SMN は運動ニューロンの生存に必須のタンパク質であり、その異常は遺伝性の小児発症の運動ニューロン変性疾患である脊髄性筋萎縮症の原因となる。さらに、SMN はスプライシング反応の担う本体であるスプライソソームの成熟に欠かせないタンパク質であることから、SMN の異常はスプライシングの全般的な異常を引き起こす。RNA 代謝の異常に ALS 病態における RNA 代謝異常に寄与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) FUS-ALS の発症機構

本研究では、FUS-ALS の発症機構の解明を目指す。まず家族性 ALS の原因となる変異 (P525L) を持つ FUS を発現させた ALS モデルマウスを作成し、さらに ALS の発症の原因となるタンパク質を減少させることで、ALS モデルマウスの発症や病気の進行を遅らせることができるかを検証する。特に、ALS 発症の原因となる遺伝子として、Ataxin-2 に着目する。Ataxin-2 のポリグルタミン伸長があると ALS 発症の要因となることから、Ataxin-2 の異常が ALS の発症と病態進行に関連することが示唆されている。また、ALS 発症に寄与する変異を持つヒト TDP-43 を発現するマウスにおいて、Ataxin-2 の発現量を減少させると、マウスの病態が改善することが報告されている (Becker LA et al., 2017 Nature)。TDP-43 と FUS は類似の機能を持つ RNA 結合分子であることから、FUS 異常により発症する ALS 患者においても、Ataxin-2 発現抑制が ALS 病態の改善につながるかを解明することを目的とする。特に我々は、FUS と結合するタンパク質として survival of motor neuron (SMN) タンパク質を見出し、ALS 患者脊髄運動ニューロンにおける SMN の異常を発見しているため、SMN の機能異常に着目し、FUS-ALS の発症機構を探る。

(2) C9orf72 遺伝子変異による毒性

また、C9orf72 遺伝子の非翻訳領域におけるサテライトリピート数の上昇に着目し、この変異により産生されるジペプチドタンパク質が神経細胞において毒性を発揮する機構の解明を目指す。特に、SMN タンパク質との相互作用と SMN の機能喪失に着目する。

3. 研究の方法

(1) FUS-ALS の発症機構

ALS モデルマウスとして複数の系統を作成または購入することで準備し病態を解析した。それらマウスモデルにおいて複数の RNA 結合タンパク質の発現量を増減させ、病態を解析した。変異 FUS モデルとして、ヒト ALS 変異を持つ FUS (P525L) に FLAG タグが付加されたタンパク質を、プリオンプロモーター下で発現するトランスジェニックマウスを作成した (以後変異 FUS マウスと表記する)。この変異 FUS マウスでは、生後に主に神経細胞で導入遺伝子が過剰発現される。

バッククロスにより遺伝的背景を C57BL/6J とした。FUS ノックアウトマウスと Ataxin-2 ノックアウトマウスを共同研究先より導入し、変異 FUS マウスと交配し、FUS または Ataxin-2 の発現が減少した個体を作成した。

ALS/FLD モデルマウスの病態解析のため、生存率、体重変化、ロタロッド試験による運動機能を測定した。マウスを灌流固定したのちに脳や脊髄の組織を取り出し、薄く切り、免疫染色にて組織学的解析を行なった。また、脳や脊髄の組織を採取し、Western Blot 法でタンパク質の発現量や凝集形成の程度を解析した。また、脳や脊髄の組織から RNA を単離し、RNA sequencing や定量的 PCR などの方法で、遺伝子発現を解析した。

(2) C9orf72 遺伝子変異による毒性

また、C9orf72 遺伝子の非翻訳領域におけるサテライトリピート数の上昇に伴う毒性として、ジペプチドリピータンパク質であるポリ GR とポリ PR の毒性を解析した。これらは特に運動ニューロンにおいて毒性が高いと示唆されている。グリシンとアルギニン、もしくはプロリンとアルギニンが 50 回繰り返した配列（それぞれポリ GR、ポリ PR と呼ぶ）を細胞に発現させ、SMN タンパク質との相互作用と RNA 顆粒形成を観察した。細胞は、ヒト癌化細胞株 HeLa 細胞と、ヒト iPS 細胞から誘導した運動ニューロンを用いた。コントロール患者もしくは ALS 患者由来のヒト iPS 細胞は共同研究者より供与いただいた。

4 . 研究成果

(1) FUS-ALS の発症機構

ALS モデルマウスを作成する目的で、ヒト ALS 変異を持つ FUS (P525L) に FLAG タグが付加されたタンパク質をプリオンプロモーター下で発現するトランスジェニックマウス（以後、変異 FUS マウスと表記する）を作成した。この変異 FUS マウスでは生存率と体重の減少が観察された。また、クラスピングが観察されたことから神経症状があることがわかった。ロタロッド試験により、運動機能の減少が観察された。運動機能の学習は異常が見られなかった。これらの結果は他のグループから報告された変異 FUS 発現マウスと類似の症状であり、ALS モデルマウスとして有用であることがわかった。FUS は核タンパク質であり、P525L 変異は核移行シグナルに影響を与えることが知られている。この変異 FUS マウスの組織を解析したところ、変異 FUS の発現は核と細胞質の両方に観察された。明確な凝集体形成は見られなかったことから、凝集体の形成する前に毒性を発揮することが示された。野生型マウスと変異 FUS 発現マウスの脊髄における遺伝子発現の相違を RNA sequencing により解析し、発現の異なる遺伝子を同定した。それらの中からいくつかの遺伝子に着目し、神経毒性を発揮する機構の解析を行っている。また、細胞質での変異 FUS は、Survival of Motor Neuron (SMN) タンパク質と相互作用し、軸索と樹状突起にまで分布していた。SMN タンパク質は運動ニューロンの生存に必須なタンパク質であり、この相互作用による細胞毒性の機構を引き続き検証している。

変異 FUS の核における発現上昇により毒性が現れている可能性を検証するため、マウス FUS ノックアウトマウスと変異 FUS マウスを掛け合わせ、内在性のマウス FUS の発現量を減少させた。このマウスの病態を観察したところ、クラスピングが改善傾向にあった。このことから、核内の FUS の発現を減少させることも、細胞毒性減少の効果、病態改善効果がある可能性が示された。一方で、核内の FUS を減少させても、体重と生存率は改善傾向にあったが依然として野生型と比較し異常が顕著であった。よって、主に細胞質における変異 FUS の毒性により、変異 FUS 発現マウスの症状が出ていることが示唆された。

また、ALS 発症の原因となる遺伝子として、RNA 結合タンパク質である Ataxin-2 に着目した。Ataxin-2 遺伝子の非翻訳領域にはサテライトリピートがあり、その数が増加すると ALS 発症の要因となることから、Ataxin-2 の異常が ALS を関連することが示唆されている。また、ALS 発症に寄与する変異を持つヒト TDP-43 を発現するマウスにおいて、Ataxin-2 の発現量を減少させると、マウスの病態が改善することが報告されている。そこで、FUS 異常により発症する ALS においても、Ataxin-2 発現抑制が ALS 病態の改善につながるかを検証した。変異 FUS マウスを、Ataxin-2 ノックアウトマウスと交配させることで、マウス Ataxin-2 の発現量を半減させたところ、ロタロッドテストで運動機能は悪化が見られた。Ataxin-2 は小脳で発現が高いため、運動調整機能をつかさどる小脳で、Ataxin-2 が重要な機能を果たしている可能性がある。一方、生存率と体重は増加し ALS 様症状としては改善傾向が見られた。これらより、特定の神経細胞で FUS タンパク質の減少や Ataxin-2 タンパク質の減少を起こさせることができれば、ALS 病態を改善する可能性があることがわかった。

(2) C9orf72 遺伝子変異による毒性

また、C9orf72 遺伝子における GGGGCC リピート伸長による毒性を模倣するため、ポリ GR を HeLa 細胞に発現させた。SMN タンパク質の核内構造体である GEM 小体の数を計測したところ、コントロール細胞と比較し GEM 小体の数が大幅に減少していた。GEM 小体は ALS 患者の変性した運動ニューロンにおいて消失しており、ポリ GR が GEM 小体の消失という ALS 病態の一つを引き起こすことが可能であることが示された。またポリ GR が発現することによる核内毒性の一つに SMN 障害があることが判明した。また、GR の発現により、細胞質で PolyA 結合タンパク質 PABP と SMN を含む RNA 顆粒が形成されることがわかった。さらに、酸化ストレスで誘導されるストレス顆粒

の分散が、ポリ GR 発現により、障害されることがわかった。酸化ストレスで誘導されるストレス顆粒には SMN が隔離されるが、酸化ストレス下で GR が発現することにより、酸化ストレスが除去された後に顆粒が分散せず、SMN は細胞質に異常な RNA 顆粒として残存していた。その際の SMN の核内構造体である GEM 小体の数は大幅に減少していた。これは、ポリ GR が SMN の正常な核内構造体である GEM 小体の形成を阻害し、細胞質で異常な SMN を含む構造体を形成させ、SMN の機能破綻を誘導する可能性を示している。

また、ヒト ALS 患者の死後検体で見られる変性した運動ニューロンでは、GEM 小体が消失しているが、GEM 小体の消失は神経変性の原因となるのか変性の結果起こった現象であるかは明確ではなかった。その検証のため、C9orf72 変異を持つ ALS 患者の iPS 細胞を運動ニューロンに分化させ、培養した運動ニューロンでの GEM 小体数を計測した。コントロール患者由来の運動ニューロンではほぼ全ての細胞で GEM 小体が観察されたが、C9orf72-ALS 患者由来の運動ニューロンでは GEM 小体が消失した細胞が存在していた。これは C9orf72 変異が病態の早い段階で GEM 消失を引き起こす可能性を示している。引き続き複数の患者由来 iPS 細胞から分化させた運動ニューロンを解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Kato Yuma, Yokogawa Minnie, Nakagawa Ikuma, Onodera Kazunari, Okano Hideyuki, Inoue Haruhisa, Hattori Mitsuharu, Okada Yohei, Tsuiji Hitomi	4. 巻 -
2. 論文標題 <i>C9ORF72</i> dipeptide repeat proteins disrupt formation of GEM bodies and induce aberrant accumulation of survival of motor neuron protein	5. 発行年 2021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） 10.1101/2021.03.24.436890	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 -

1. 著者名 Inagaki Hiroto, Hosoda Nao, Tsuiji Hitomi, Hoshino Shin-ichi	4. 巻 295
2. 論文標題 Direct evidence that Ataxin-2 is a translational activator mediating cytoplasmic polyadenylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15810 ~ 15825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013835	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 Apostolopoulos Antonios, Kawamoto Naohiro, Chow Siu Yu A., Tsuiji Hitomi, Ikeuchi Yoshiho, Shichino Yuichi, Iwasaki Shintaro	4. 巻 15
2. 論文標題 dCas13-mediated translational repression for accurate gene silencing in mammalian cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-024-46412-7	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8件（うち招待講演 3件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hitomi Tsuiji
2. 発表標題 C9ORF72 dipeptide repeat proteins disrupt formation of GEM bodies and induce aberrant accumulation of survival of motor neuron protein
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitomi Tsuiji
2. 発表標題 Disruption of RNA metabolism in motor neuron diseases
3. 学会等名 The 28th Tokyo RNA Club (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitomi Tsuiji
2. 発表標題 Disruption of RNA metabolism in motor neuron diseases, ALS and SMA
3. 学会等名 OIST Workshop Axonal Degeneration and Regeneration (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsuiji H. , Kato Y., Yokogawa M., Nakagawa I., Onodera K., Okano H., Inoue H., Hattori M., Okada Y.
2. 発表標題 C9ORF72 dipeptide repeat proteins disrupt formation of GEM bodies and induce aberrant accumulation of survival of motor neuron protein
3. 学会等名 The 1st China-Japan-Korea International Meeting/The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitomi Tsuiji
2. 発表標題 C9ORF72 dipeptide repeat proteins disrupt formation of GEM bodies and induce aberrant accumulation of survival of motor neuron proteins.
3. 学会等名 The 19th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 築地仁美
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症ALS患者ニューロンにおけるRNA顆粒の異常形成の分子機構解明とその制御
3. 学会等名 日本薬学会第114年会（シンポジウム）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質TDP-43の凝集を抑制する分子の探索
2. 発表標題 宮田識園、河鱒公孝、玉井理也、小林祐基、築地仁美
3. 学会等名 第69回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田識園、中川行真、服部光治、築地仁美
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症ALS患者脳でみられるTDP-43凝集体の形成を抑制する化合物のスクリーニング
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2022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
---------	---------