

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16128

研究課題名（和文）シグマ1受容体変異を伴う筋萎縮性側索硬化症の病態解明と創薬

研究課題名（英文）Pathogenesis of Sigmar1 Genetic Mutation-related ALS and Drug Discovery

研究代表者

篠田 康晴（Shinoda, Yasuharu）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70806405

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）で報告されているシグマ1受容体の遺伝子変異（E102Q）がどのように運動神経細胞に毒性を示すのかについて検討した。同変異がシグマ1受容体とコレステロールとの結合を促進し、凝集体形成や毒性発現を惹起することを明らかにした。あわせて、シグマ1受容体作動薬やコレステロール生合成の抑制により、ALS関連変異体（E102Q）の凝集体形成や細胞毒性を軽減できることが明らかになった。

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、難治性の神経変性疾患で根本的な治療薬の開発が望まれている。これまで、シグマ1受容体の遺伝子変異や異常な局在が、ALS発症につながることを示唆する報告がなされており、薬物標的としての有用性が注目されている。本研究では、ALS変異に伴い生じる脂質によるシグマ1受容体の調節が、神経細胞毒性やALS発症につながるという知見を初めて明らかにした。今後のさらなる病態機序の解明や有効な治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated how ALS-related mutation of Sigmar1 gene leads to the toxicity in motor neurons and the disease onset. In this study, we focused on the association between a mutation, E102Q of Sigma1R and cholesterol, thereby found that Sigma1R (E102Q) showed increased affinity to cholesterol, which leads to accumulation and toxicity in NSC-34 motor neuronal cell line. Furthermore, we also revealed that Sigma1R agonist and the inhibition of cholesterol biosynthesis ameliorated neuronal toxicity induced by Sigma1R(E102Q) expression.

研究分野：薬理学一般

キーワード：シグマ1受容体 筋萎縮性側索硬化症 シグマ1受容体作動薬 創薬

1. 研究開始当初の背景

これまで筋萎縮性側索硬化症、遠位遺伝性運動ニューロパチーといった運動神経障害を生じる神経変性疾患においてシグマ1受容体をコードする遺伝子の突然変異が報告されている(図1)。これらの遺伝子変異に伴うシグマ1受容体の機能低下あるいは異常な機能(毒性)が発症につながると考えられる。前者に関する知見として、シグマ1受容体の遺伝子欠損マウスが複数のグループにより樹立されているが、ALSのような重篤な病態を示すという報告はなされていない。このことから、シグマ1受容体の遺伝子変異により生じる異常な機能(毒性)がALSの原因であると考えられる。そこで、若年性ALS家系において初めて同定されたシグマ1受容体のアミノ酸変異(E102Q)が、どのように運動神経細胞に障害を与え、ALSの発症につながるかを検討する。

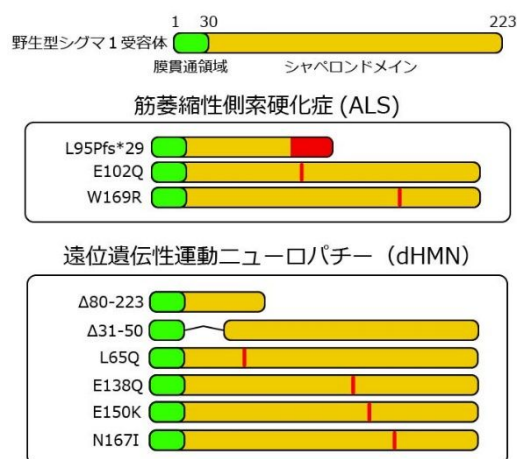


図1. 運動神経障害を呈する疾患に見られるシグマ1受容体の変異

2. 研究の目的

本研究課題では、若年性ALS家系で同定されているシグマ1受容体の遺伝子変異(E102Q)を導入したノックインマウスを作製し表現型を解析するとともに、シグマ1受容体作動薬やミトコンドリア保護薬の効果を検討することを目的とする。また、運動神経細胞様の培養細胞であるNSC-34細胞を用いて、細胞毒性が生じる機序を検討するとともに、作動薬の効果について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)シグマ1受容体 ALS 関連変異体 の遺伝子導入

運動神経細胞様の培養細胞であるNSC-34細胞に野生型シグマ1受容体およびALS関連変異体(E102Q)をリポフェクションにより遺伝子導入を行った。野生型・変異体をコードするプラスミドを含む培地を用いて6時間培養したのち、通常血清入り培地へと交換した。その後、48時間培養を行い、実験に用いた。

(2)シグマ1受容体 ALS 関連変異体 の毒性発現機序の検討

これまでシグマ1受容体が多量体を形成することなどが報告されていることから、ALS変異体の多量体・凝集体形成を評価するために以下の実験を行った。

多量体形成の評価

遺伝子導入を行ったNSC-34細胞にタンパク質架橋剤であるDSS(2 mM)を30分間処置したのち、界面活性剤に可溶性の分画および不溶性の分画へと遠心分離し、免疫プロットにより多量体形成を評価した。

凝集体形成の評価

蛍光タンパク質(mCherry)を融合したプラスミドを遺伝子導入後、免疫染色法および光退色後蛍光回復(FRAP)により、細胞内における凝集体形成を評価した。免疫染色においては、細胞内の主要な分解経路に関わるプロテアソームやオートファジーのマーカー(ユビキチン・p62)や小胞体ストレスのマーカー(リン酸化PERK)、アポトーシスマーカー(活性化Caspase-3)などに対する抗体で染色を行い、共焦点顕微鏡で観察を行った。

(3)凝集体形成における脂質(コレステロール)の関与の評価

シグマ1受容体(E102Q)の凝集体形成におけるコレステロールの役割を検討するために、上記免疫染色の代わりに、蛍光標識したコレステロール(BODIPY-コレステロール)を細胞に取り込ませたのち、共焦点顕微鏡により細胞内局在を検討した。さらに、細胞内におけるシグマ1受容体とコレステロールの相互作用を検討するために、コレステロール結合アガロースビーズを用いてプルダウンアッセイを行った。

(4)細胞毒性の評価

遺伝子導入を行ったNSC-34細胞の細胞死(アポトーシス)を評価するため、DNA拡散アッセイにより、核(ゲノムDNA)の傷害を評価した。

4. 研究成果

これまで、シグマ 1 受容体は脂質などと結合し界面活性剤に不溶性の分画へ移行することが報告されており、同時に、シグマ 1 受容体が多量体を形成することが報告されている。このことから、シグマ 1 受容体 ALS 変異体 (E102Q) が脂質 (コレステロール) との結合により、多量体を形成し、さらには細胞内における凝集や細胞毒性につながっているという仮説を立て、検証することとした。

まず初めに、遺伝子導入を行った NSC-34 細胞を遠心分離により界面活性剤 (NP-40) に可溶性の分画および不溶性の分画に分離し、免疫プロットにより野生型および ALS 関連変異体の分布を評価した。結果として、野生型シグマ 1 受容体は可溶性分画にのみ分布するのに対し、E102Q 変異体は主に不溶性分画に分布した。さらに、タンパク質架橋剤により多量体形成の評価を行ったところ、野生型シグマ 1 受容体は可溶性分画に単量体や二量体として存在する一方、E102Q 変異体は不溶性分画に単量体～四量体として存在した。さらに、FRAP により細胞内局在を評価した結果、E102Q 変異体は細胞内において凝集体を形成していることが明らかになった。このような凝集体は、タンパク質分解経路のマーカー (コピキチン、p62) や小胞体ストレスマーカー (リン酸化 PERK) により染色された (図 2)。このことから、E102Q 変異体がタンパク質分解経路に抵抗性の凝集体を形成することで小胞体内に蓄積し、小胞体ストレスを伴う細胞死が惹起されることが示唆された。実際に、E102Q 変異体の凝集が生じている細胞はアポトーシスマーカー (活性化 Caspase-3) により染色され、同時に DNA 拡散アッセイによる細胞死評価においても細胞死が顕著に誘導された。

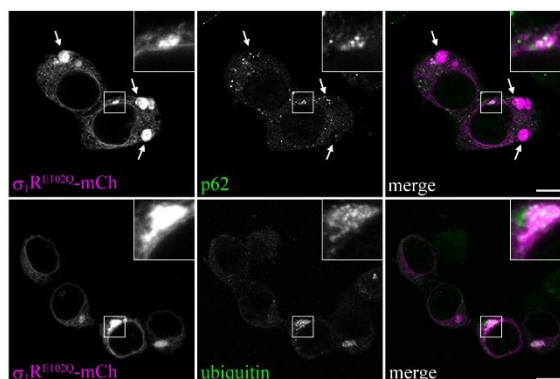


図 2 .E102Q 変異体の凝集体形成<引用文献 >

次に、シグマ 1 受容体作動薬および野生型シグマ 1 受容体の共発現が、E102Q 変異体の不溶性分画への移行や凝集体形成、細胞毒性に与える効果を検討した。結果として、シグマ 1 受容体作動薬 SA4503 (20 μ M, 48 時間) の処置や野生型シグマ 1 受容体の共発現は、E102Q 変異体の不溶性分画への移行を抑制するとともに、多量体形成を軽減した。さらに、SA4503 の処置は E102Q 変異体の発現による細胞死の誘導を顕著に抑制した。これらの結果は、シグマ 1 受容体を標的とした作動薬や正常な機能を保った野生型シグマ 1 受容体が、ALS 変異に伴う異常な不溶性分画への移行や、それに続く多量体 (凝集体) 形成・細胞毒性を改善できることを示唆している。

E102Q 変異体がどのようにして不溶性分画へ移行するのかを明らかにするため、脂質の一つであるコレステロールに着目し、実験を行った。コレステロールビーズを用いたプルダウンアッセイにより、NSC-34 細胞において野生型シグマ 1 受容体はコレステロールとほとんど結合しないのに対し、E102Q 変異体は結合が増強することが明らかになった。加えて、NSC-34 細胞に蛍光標識コレステロールを取り込ませた結果、E102Q 変異体の凝集体に顕著に集積することが明らかになった。これらの結果は、シグマ 1 受容体が ALS 関連変異 (E102Q) によりコレステロールと結合しやすくなることで、界面活性剤に不溶性の多量体や凝集体の形成が促進され、細胞毒性を惹起することを示唆している (図 3)。

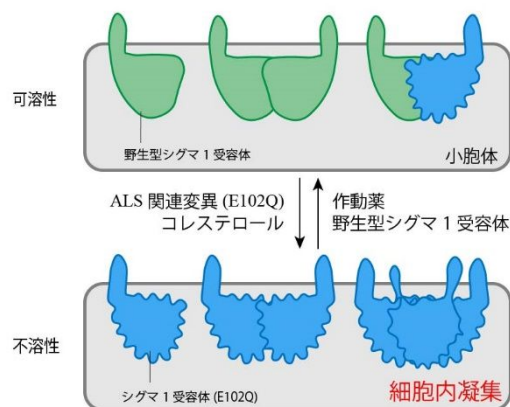


図 3 .E102Q 変異体の凝集体形成におけるコレステロールの関与モデル

本研究課題により、これまで知られていたコレステロールによるシグマ 1 受容体の発現・機能調節と、シグマ 1 受容体遺伝子変異による運動神経細胞障害の間に関連があることが初めて明らかになった。一方で、ALS や遠位型遺伝性運動ニューロパチーなどの疾患において、本課題で検討した変異 (E102Q) 以外にも十を超える遺伝子変異が同定されている。本課題で示唆された毒性発現機構がこれらの遺伝子変異に共通の機構であるのか、今後さらなる研究が進展することが期待される。

<引用文献>

Yasuharu Shinoda, Yudai Haga, Koichiro Akagawa, Kohji Fukunaga. Wildtype sigma-1 receptor and the receptor agonist improve ALS-associated mutation-induced insolubility and toxicity. J Biol Chem. 295:17573-17587. (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shinoda Yasuharu, Haga Yudai, Akagawa Koichiro, Fukunaga Kohji	4. 巻 295
2. 論文標題 Wildtype 1 receptor and the receptor agonist improve ALS-associated mutation-induced insolubility and toxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17573 ~ 17587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.015012	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠田康晴、芳賀悠大、佐々木拓哉、福永浩司
2. 発表標題 ALS関連変異（E102Q）がシグマ1受容体の脂質結合に与える影響とアゴニストの作用の関連
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 篠田康晴、芳賀悠大、赤川公一朗、福永浩司
2. 発表標題 シグマ1受容体ALS変異体の異常な不溶化と毒性に対するシグマ1受容体 アゴニスト・野生型シグマ1受容体の作用
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
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
---------	---------