

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16452

研究課題名（和文）lncRNAを基盤とした神経変性疾患に対する核酸医薬シードの開発

研究課題名（英文）Development of seed sequences for oligonucleotide therapeutics targeting neurodegenerative disorders

研究代表者

米田 竜馬（YONEDA, Ryoma）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00734881

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）：本研究では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子であるFUSの、凝集体形成を阻害するRNA配列を探索した。その結果、20ntのRNA配列にm6A修飾というメチル化修飾を入れることで、その凝集体形成阻害効果が大幅に増強されることを見出した。m6A修飾RNAによる、FUSの凝集体形成の阻害効果は、さまざまな細胞株で確認しており、その普遍性が確認できた。またoff target効果を細胞増殖で検証したところ、導入したm6A修飾RNA自体には細胞毒性がないことも確認した。これらの結果より、FUSを原因とするALSの核酸医薬シードとして、非常に有効なRNA配列を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSはいまだに治療法が確立されていない難病の一つである。孤発性と家族性とがあり、FUSはその両方に関わっているとされる。FUSを含むRNA結合タンパク質は、多くの神経変性疾患の原因遺伝子とされており、これらのタンパク質が細胞質で凝集体を形成することが、発症の一因とされている。したがって、これらの凝集体形成を阻害する薬剤の探究が急務である。我々が同定したRNA配列は、FUSに特異的に結合してその相分離を阻害する。この研究を進めていけば、ALSのみならず、その他の神経変性疾患をターゲットとした核酸医薬の開発へとつながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to search for RNA sequences which inhibits LLPS of FUS, a causative gene for ALS. We found that 20nt RNA, derived from lncRNA, efficiently inhibited the formation of FUS droplets and gels, and m6A modification enhanced the effect dramatically. This effect was observed in many cell lines, the RNA itself did not have cytotoxicity. In conclusion, we were able to determine the RNA sequence which is very probable for the seed sequence for targeting ALS caused by FUS.

研究分野：RNA

キーワード：ALS m6A修飾 核酸医薬 FUS lncRNA LLPS

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ALS やアルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患では、神経細胞のアポトーシスが引き金となり発症に至る。その原因のうち「*CCND1* の過剰発現」と「RNA 結合タンパク質 FUS の不溶性凝集体形成」に焦点を当てた。神経変性疾患では *CCND1* の過剰発現により細胞周期の再活性化が起こり、DNA の複製異常に伴いアポトーシスを引き起こす。また FUS の細胞質における不溶性凝集体形成は、神経変性疾患の運動ニューロンに多く観察される現象である。相分離により FUS が不溶性の凝集体を形成し、繊維化してしまうと FUS は通常の機能を果たせず、それが細胞毒性、ひいてはアポトーシスへとつながる。lncRNA である *pncRNA-D* は、*CCND1* プロモーターから発現し FUS をリクルートし、*CCND1* の転写を抑制する。神経変性疾患細胞では、FUS の核局在が一部失われ細胞質に蓄積することで、*CCND1* の過剰発現と FUS の相分離が起こる。したがって本研究では、*pncRNA-D* 由来の配列により *CCND1* の過剰発現と FUS の凝集体形成を同時に抑制することで、ALS 運動ニューロンのアポトーシスを防ぐかについて検証した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*pncRNA-D* の配列から *CCND1* の発現、および FUS の相分離を抑制する効果を持つ RNA 配列(シード配列)を探索、作製することである。我々は全長 602 塩基の *pncRNA-D* の中から、FUS と非常に強い相互作用を示す 13 塩基の RNA 配列(5'1-1)を同定していた。しかし 5'1-1 のみでは、*pncRNA-D* 全長ほどの *CCND1* 発現抑制効果がなかった。したがって FUS を *CCND1* プロモーターにリクルートする配列を探索し、*CCND1* の発現を効率良く抑制する RNA 断片の作製を目指した。さらにその RNA 断片は FUS と強く結合することが予想されるので、FUS の高次構造を変化させ相分離に影響を与える可能性がある。そこで本研究では *CCND1* の発現を抑制し、かつ FUS の相分離や繊維化を阻害する RNA 断片を作製することを目的とした。

3. 研究の方法

pncRNA-D の中で、FUS と強い相互作用を示す領域を、RNA pull down 解析により同定した。その RNA 配列に、 m^6A 修飾を施したもので RNA を、細胞に導入することで、FUS の相分離や *CCND1* の発現への影響をみた。FUS の相分離は、高浸透圧ストレスにより再現し、RNA の導入には Lipofectamine や JetMessenger を用いた。さらに、FUS の相分離を阻害したことによる、細胞への影響を、細胞増殖を測定することで検証した。用いた細胞株はヒトの細胞株である HeLa, HAP1, MCF7, A549, SHSY-5Y 細胞である。

4. 研究成果

本研究の期間内に 3 本の論文を筆頭著者として発表した。そのうち一本は責任著者でもあり、主にその論文の内容について記載する。

pncRNA-D の配列で、FUS と強い結合を示すものとして、5'1-1 以外に Fragment 6 と名付けた 20nt の領域を同定した。この配列中には、RNA 修飾の一つである m^6A 修飾を受けやすいモチーフが存在したため、 m^6A 修飾の有無による FUS と RNA との結合を検証した。その結果、FUS は同じ RNA 配列でも m^6A 修飾が入った RNA と強く相互作用することを明らかにした(図 1)。

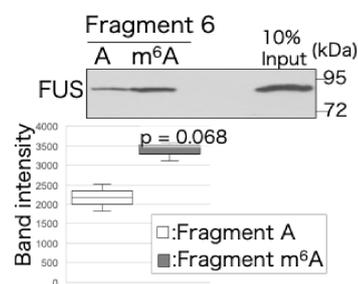


図 1. RNA pull down 解析による FUS と m^6A 修飾 RNA との相互作用

次にこれらの RNA 配列による FUS の相分離への影響を検証した。まず Fragment 6 を細胞に導入し、その後、細胞をストレスにさらすことで、FUS の相分離を再現した。その結果、m⁶A 修飾のない Fragment 6 では、RNA を導入していないものと同様に、FUS の相分離が起こった(図 2, No RNA, Fragment 6)。一方で、m⁶A 修飾を施した Fragment 6 を導入すると、FUS の細胞質でも相分離が明らかに阻害されていることがわかった(図 2, m⁶A 修飾 Fragment 6)。以上より、m⁶A 修飾 Fragment 6 は、FUS と強い相互作用を示すだけでなく、その相分離による液滴形成まで阻害することが示唆された。

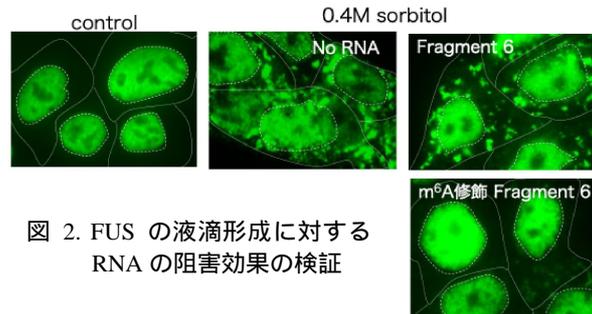


図 2. FUS の液滴形成に対する RNA の阻害効果の検証

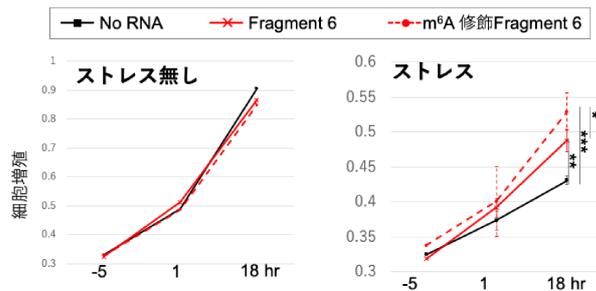


図 3. RNA の導入による細胞増殖への影響

m⁶A 修飾 RNA の導入により、FUS の相分離を阻害することは分かったが、その結果として細胞に何か良い影響はあるのだろうか。今回は、細胞質における FUS の液滴形成阻害による影響として、細胞増殖への影響を確認した。ストレスを与えていない細胞では、RNA 導入の有無による影響は見られなかった(図 3, ストレス無し)。つまり、これらの RNA 配列自体には、細胞毒性はないことが確認できた。次に、RNA を導入した細胞に、ストレスを与えると、RNA を導入していない細胞に比べ、有意に細胞増殖の回復が早まった(図 3, ストレス)。その効果は m⁶A 修飾 RNA において特に高かった。以上の結果より、m⁶A 修飾 RNA が FUS の液滴形成を阻害することで、細胞が受けたストレスからの回復が早まることが示唆された。

上記の実験では、m⁶A 修飾 RNA がすでに細胞質に存在する細胞に、ストレスをかけても FUS の相分離を阻害することを示した。しかし、ALS に対する核酸医薬とするには、すでに形成された FUS の液滴や凝集体を分散できるかが重要である。そこで、RNA の導入とストレス処理の順序を逆に、上記と同様の実験を行った。その結果、順序を逆にしても、m⁶A 修飾 RNA の導入により FUS の液滴数が減少する結果を得た。これらの結果は、方法の欄に記述したさまざまな細胞でその効果を確認してある。

以上の結果をまとめると、今回検証した 20 塩基の m⁶A 修飾 Fragment 6 は、それ自体には細胞毒性はなく、FUS の相分離による液滴を分散させる効果をもつ RNA であることがわかった。したがって ALS をターゲットとした核酸医薬のシード配列として、期待の持てる配列を同定したと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ueda Naomi, Yoneda Ryoma, Kurokawa Riki	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of Essential Components of RNA Binding Domain of TLS/FUS	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 30~43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11648/j.bs.20241002.13	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 Naomi Ueda, Ryoma Yoneda, Riki Kurokawa	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 Identification of Long Noncoding RNA Recognized by RNA-Binding Protein TLS/FUS: Purification of RNAs by Affinity Chromatography of GST-TLS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 144-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11648/j.bs.20220804.15	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 Yoneda Ryoma, Ueda Naomi, Kurokawa Riki	4. 巻 22
2. 論文標題 m6A Modified Short RNA Fragments Inhibit Cytoplasmic TLS/FUS Aggregation Induced by Hyperosmotic Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11014~11014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222011014	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 -

1. 著者名 Hamad Nesreen, Yoneda Ryoma, So Masatomo, Kurokawa Riki, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 11
2. 論文標題 Non-coding RNA suppresses FUS aggregation caused by mechanistic shear stress on pipetting in a sequence-dependent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89075-w	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 -

1. 著者名 Naomi Ueda, Yuki Hirose, Ryoma Yoneda, Toshikazu Bando, Riki Kurokawa	4. 巻 6
2. 論文標題 Potential Inhibitor Against Phase Separation, 1, 6-hexanediol Specifically Binds to Beta Actin in Nuclear Extract of Human Cell Line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 88-97
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 米田竜馬、上田奈緒美、黒川理樹
2. 発表標題 m6A修飾認識タンパク質としてのTLS/FUS
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米田竜馬、上田奈緒美、黒川理樹
2. 発表標題 TLS/FUSのm6A修飾readerとしての可能性
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米田竜馬、上田奈緒美、黒川理樹
2. 発表標題 The effect of m6A RNA on LLPS of TLS/FUS
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田竜馬、上田奈緒美、浦西洸介、平崎正孝、黒川理樹
2. 発表標題 CCND1遺伝子発現におけるlncRNAのm6A修飾の役割
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
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