

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16489

研究課題名(和文) RNA結合蛋白質FUSのmRNA過結合を介した筋萎縮性側索硬化症の病態解明

研究課題名(英文) Study of pathogenic mechanism of amyotrophic lateral sclerosis through excessive recruitment of RNA-binding protein FUS

研究代表者

横井 聡 (Yokoi, Satoshi)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：30815460

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)：シナプス蛋白質のSynGAPが筋萎縮性側索硬化症の病態生理に関係しているかを調べるべく、JaCALSデータベースからSynGAP 3'UTRの新規変異を発見し、患者由来のSynGAP新規変異を導入したiPS細胞由来運動神経ではSynGAPのスプライシング変化およびシナプス数の減少が確認された。さらにFUSとhnRNPKは新規変異によりSynGAP mRNAに過結合していることも新たに発見した。hnRNPKの過結合を抑制するアンチセンスオリゴはシナプス数を回復することが分かった。患者由来SynGAP変異は早期病態を引き起こし、RNA結合タンパク質の過結合は新たな病態機序である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だに発症原因が解明されていない筋萎縮性側索硬化症において、本研究はシナプスタンパク質が病態に関わっており、さらにRNA結合蛋白質の過結合がシナプス異常を引き起こすスプライシング異常にかかわっていることも初めて発見した。さらに過結合を是正するアンチセンスオリゴがシナプス異常を是正できた。これらの知見は、治療薬がない筋萎縮性側索硬化症の今後の治療薬開発において、ごく局所のRNA代謝異常をターゲットにする重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate whether the synaptic protein SynGAP could be pathogenic for amyotrophic lateral sclerosis(ALS), we found a novel variant in SynGAP 3'UTR from the JaCALS database. We inserted this variant into iPS cells and differentiated to motor neurons. We found that this variant causes splicing of SynGAP and a decrease in the number of synapses. Furthermore, FUS and hnRNPK are excessively recruited to SynGAP mRNA by this mutation. Antisense oligonucleotides which block hnRNPK binding site could recover the number of synapses. These data suggested that novel SynGAP variant causes early pathology of ALS, and excessive recruitment of RNA-binding proteins could be a novel pathological mechanism of ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 シナプス アンチセンスオリゴ iPS細胞由来運動神経

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は運動神経の変性により全身の筋力が低下し死に至る神経変性疾患である。国内では約 10,000 例の患者が存在し、若年者にも発症する。ALS は 9 割が孤発性とされ、遺伝的背景が不明であることから、疾患の発症機序のほとんどが解明されておらず、根治的な治療法も存在しない。遺伝性 ALS では、疾患原因として Fused-in-sarcoma (FUS) や TAR DNA-binding protein (TDP-43) などの RNA 結合蛋白質が同定され、患者組織では本来核に留まるべきこれらの蛋白質が細胞質に移動して蓄積している。様々な網羅解析によりこれらの蛋白質が多様な RNA 代謝に関与していることが明らかになっているが、どの特異的な RNA 代謝が ALS 発症に寄与しているかが不明なままである。また、ALS 患者から作成した iPS 細胞由来の運動ニューロンを用いた疾患研究でも、薬剤スクリーニングを起点とした治療薬開発が主体であり、疾患克服のためには詳細な病態解明に基づいた治療薬開発が必須である。本研究は研究代表者が発見した、FTLD/ALS 疾患関連の RNA 結合蛋白質である FUS が 3' UTR に結合してシナプス蛋白質の mRNA 分解を抑制しスパイン成熟や認知行動を制御する機構に着目した。FUS がシナプス蛋白質の 3' UTR において mRNA 分解抑制を制御している機構は、病態生理に直接関与する普遍的なシステムであると考えられた。ALS/FTLD 疾患関連の RNA 結合蛋白質が、3' UTR においてシナプス蛋白質の mRNA を制御している既報はない。FUS そのものではなく、FUS の下流因子である SynGAP の 3' UTR への結合が低下する変異を同定し、標的 mRNA の発現が低下し、シナプス機能異常を再現できれば、FUS の機能喪失が疾患発症に重要であることが立証でき、FUS を起点に発症する ALS/FTLD の新たな患者群を抽出できると考えた。

2. 研究の目的

FUS-SynGAP mRNA の RNA 代謝機構が ALS の病態に真に関与しているかを調べるため、日本の ALS レジストリである Japanese Consortium of Amyotrophic Lateral Sclerosis (JaCALS) のデータベースに登録された ALS 患者 696 例から、FUS の結合部位である SynGAP 3' UTR に新規変異のある患者 5 例を見出した。既存の RNA 結合解析から、FUS の 3' UTR への結合パターンはヒトとマウスで大きく異なっている為に、ヒトモデルである iPS 細胞由来の神経細胞での実験が不可欠と考えた。そこで iPS 細胞株 (201B7) に遺伝子編集 (CRISPR/Cas9) で点変異を導入し、運動神経に分化させ、シナプス異常や変異による SynGAP の RNA 代謝の変化の検討を試みた (2018-2019 年 若手研究課題)。iPS 細胞に点変異のみを導入する foot-print free の遺伝子編集法を確立し、6 週間かけて分化誘導を行った運動ニューロンに分化した SynGAP 変異株ではシナプス数の減少を見出した。また、FUS は SynGAP 3' UTR に変異があるとより結合しやすい、過結合が生じていることも見出した。

本研究は、研究代表者が発見したシナプス成熟に関わる FUS-SynGAP mRNA 安定化機構を起点に、新規編集技術で確立した iPS 細胞由来運動ニューロンを用い、FUS の過結合が引き起こす SynGAP mRNA 代謝異常がどのようにシナプス障害を引き起こすかを同定する。さらに過結合の是正が RNA 代謝を改善し、その結果としてシナプス障害を改善できるかをリードアウトに、根治療法が存在しない ALS に詳細な病態機序に基づいた治療方法の開発に発展させる。

3. 研究の方法

(1) FUS 過結合が引き起こす SynGAP mRNA 代謝異常の同定とシナプス異常への関与
SynGAP 新規変異導入 iPS 細胞由来運動ニューロンの RNA 解析：確立した SynGAP 変異株を用いて、RNA を抽出し、それぞれ qPCR, RT-PCR で SynGAP の発現解析を行う。マウスにおいて FUS は SynGAP mRNA の安定化に寄与していたため、過結合により想定される RNA 代謝異常の機序は、mRNA の安定化亢進による発現上昇や、スプライシング変化が推定される。ヒトにおいても SynGAP 3' UTR には full length と、途中の配列がスプライスアウトされる short form が存在するため、3' UTR のスプライシングを RT-PCR で解析する。また、mRNA 安定化の評価には、Actinomycin D を投与し RNA 分解を time course で解析する RNA stability assay を行う。さらに、FUS の shRNA を搭載したレンチウイルスを SynGAP 変異運動ニューロンに感染させ、FUS の過結合にて生じた SynGAP mRNA の変化が是正されるかを確認する。また、抗 FUS 抗体で免疫沈降し結合する RNA 解析 (RNA-IP) を行い、SynGAP 変異に対する FUS の過結合を蛋白側からも証明し、SynGAP およびそれ以外の RNA 代謝変化についても解析を行う。

SynGAP 変異による SynGAP isoform 変化の評価：SynGAP 蛋白質には複数の isoform が同定されており、シナプス増強作用のある 2 と、シナプス減弱作用のある 1 が存在する。これらの

isoform が変異によりどのように変化しているかを同定し、関与する蛋白質のノックダウンあるいは過剰発現実験にてシナプス障害が再現できるかを確認し機序を証明する。
 FUS 変異 iPS 細胞株の樹立：さらに FUS 側の変異でも同様の過結合、シナプス障害が生じるかを調べるべく、前述の遺伝子編集技術を用いて FUS 変異 iPS 細胞株を樹立する。家族性 ALS-FUS では核移行シグナルなど C-terminal に変異を持つ家系が多く報告されている。本邦および世界でも多く確認されている R521C 変異を上述の CRISPR/Cas9 の遺伝子編集技術で iPS 細胞に導入する。FUS 変異株も評価することで、FUS-SynGAP の機構がより多くの患者において共通していることを証明する。また、FUS の過結合が長期に継続した場合に、ALS-FUS 患者の病理組織のように細胞質への蓄積が生じるのか、運動ニューロンを長期培養し観察する。

(2)FUS 過結合を是正し、シナプス異常を改善するアンチセンスオリゴ (ASO) の開発
 FUS の過結合を是正する ASO の設計：ASO は標的の RNA に結合することでスプライシング制御などが可能である化合物であり、脊髄性筋萎縮症においては、すでに治療薬として欧米、本邦などで承認されており、実臨床に応用可能な低分子化合物である。SynGAP 3' UTR の変異周辺配列を標的に FUS の過結合を阻害する ASO を 2'-O-Me RNA で設計する。ASO は直接培地に添加、lipofectamine などの導入試薬を用いるなどの delivery の方法に加え、投与濃度、塩基配列と順次検討する。FUS の過結合への阻害効果は上述の RNA pulldown assay で、変異 RNA probe と ASO を同時に投与し、FUS の結合能の変化を確認する。(1)でシナプス障害につながる SynGAP RNA 代謝、蛋白質の発現変化が同定できれば、ASO を SynGAP 変異モデル運動ニューロンに投与し、シナプス障害や SynGAP の変化が是正されるかを検討する。

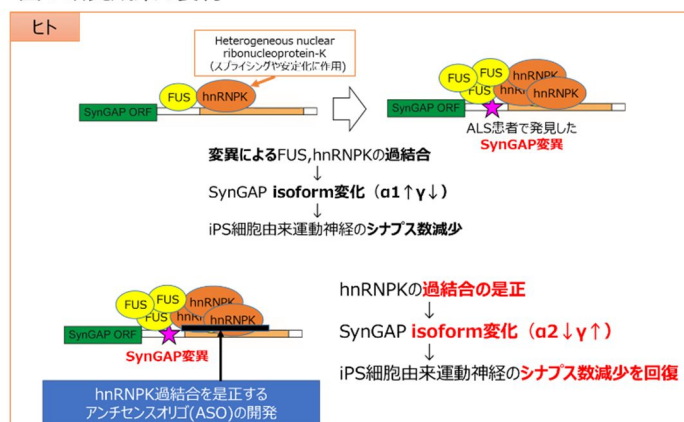
SynGAP 変異株における ASO のシナプス是正効果の評価：シナプス形態の免疫染色を用いて、ASO が SynGAP RNA の代謝変化を是正した場合にシナプス形態異常への改善効果が得られるかを評価し、当指標をもとに治療薬としての適性条件を検討する。臨床応用のため、低濃度で効果が得られる ASO の探索・適正化を行う。また、ASO は炎症を惹起することが知られており、シナプス障害を是正する条件が検討できれば、その条件下で GFAP, Iba1 などの炎症マーカーの検討を行い、臨床応用にむけた副反応を低減させる検討を行う。

4. 研究成果

(1)の実験では、SynGAP 変異株においては、SynGAP の isoform 1 の上昇、および 2 の低下が確認された。1 および 2 の過剰発現実験で確認したところ、1 の上昇、および 2 の低下はそれぞれシナプス数減少に寄与していることが示された。また、RNA pulldown assay において結合タンパク質の網羅解析を行ったところ、FUS と共に probe に過結合する hnRNPK を新たに同定した。これらの過結合を生じる RNA 結合蛋白質のノックダウン実験を行ったところ、特に hnRNPK のノックダウンにおいて SynGAP のスプライシング変化が生じることがわかった。つまり、hnRNPK が変異により SynGAP 3' UTR に過結合することが、SynGAP のスプライシング異常を生じていることを初めて見出した。本成果から、RNA 結合蛋白質の 3' UTR への過結合という新たな機序が ALS の病態において重要であることが見出された。

(2)の実験では上記の知見に基づき、hnRNPK の過結合を是正するアンチセンスオリゴを開発した。hnRNPK の結合モチーフは SynGAP 変異の 3' 側に存在し、さらに exonic splice enhancer を有していたことから、SynGAP 変異による異常スプライシングを引き起こす標的と考えられた。そのため、この部位に結合するアンチセンスオリゴを複数作成し、スプライシング是正効果からスクリーニングを行い、特定の配列を見出した。Pull down assay によりこのアンチセンスオリゴが変異を含んだ RNA probe への結合を阻害することを確認した。また、このアンチセンスオリゴは導入試薬なしに、培地に添加することで効果を発揮することを確認した。このアンチセンスオリゴは SynGAP 変異株に投与するとスプライシングやシナプス異常を回復することを見出した。このようなシナプス特異的な RNA に対する過結合を是正するアンチセンスオリゴは、今後 ALS および神経変性疾患において、新たな治療薬開発候補になると考えられた。

図：研究成果の要約



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Satoshi Yokoi, Takuji Ito, Kentaro Sahashi, Ryoichi Nakamura, Shinsuke Ishigaki, Naoki Atsuta, Masahisa Katsuno, Yohei Okada, Gen Sobue
2. 発表標題 SynGAP 3'UTR mutation from ALS cohort causes aberrant FUS-SynG AP mRNA regulation and spine formation
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------