

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25253063

研究課題名(和文) ALSの発症に関わるADAR2遺伝子発現異常を引き起こす分子病態の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism underlying ADAR2 down-regulation in ALS motor neurons

研究代表者

郭 伸 (Kwak, Shin)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・客員研究員

研究者番号：40160981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性ALSでは、RNA編集酵素 ADAR2の発現が進行性に低下しており、AMPA受容体サブユニットGluA2のRNA編集効率低下を引き起こすことにより運動ニューロン死を引き起こしている。本研究では、ADAR2 遺伝子の制御機構を明らかにし、ADAR2 発現低下の分子メカニズムを解明することを目的とした。ヒト脊髄より単一運動ニューロンを切り出し、運動ニューロンに特異的に発現するエンハンサーRNA (eRNA) をCAGE法により検出した。さらに、プロモーター領域のeRNA発現部位に作用する転写因子を同定し、新たに構築したルシフェラーゼ遺伝子によるレポーターアッセイ系で活性を測定した。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common and fatal adult-onset motor neuron disease. Deficient RNA editing resulting from down-regulation of RNA editing enzyme called adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) is closely relevant pathogenic abnormality to sporadic ALS that accounts for more than 90% of ALS patients. Because how ADAR2 gene expression is regulated is not known, we investigated the transcription factors (TFs) that specifically regulate the ADAR2 gene expression in the human motor neurons in order to elucidate the mechanism underlying ADAR2 down-regulation in ALS. We dissected specific motor neuron tissue by laser-capture microdissection and conducted cap analysis of gene expression (CAGE) on the extracted RNA. We surveyed the TFs binding motifs in the regions expressing CAGE tags in the promoter regions of the ADAR2 gene. Several of the resulting TFs exhibited regulatory activity on the ADAR2 gene by luciferase reporter assay for the ADAR2 gene promoter.

研究分野：神経内科

キーワード：ALS RNA編集 ADAR2遺伝子 転写因子 FUS

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は進行性の運動ニューロン変性により、健康な成年を数年の内に死に至らしめる神経難病である。治療に繋がる病因は未解明で、5-10%は家族性に発症することから、遺伝子変異をもつALSを標的とした研究が行われてきたが、ALS患者の大多数を占める**孤発性ALS**との病因的相違が明らかになり、孤発性ALSを対象とした研究の重要性が認識されるようになってきている。

我々は、**孤発性ALS** 脊髄運動ニューロンでグルタミン酸受容体サブタイプであるAMPA受容体のCa<sup>2+</sup>透過性を決定するサブユニットGluA2に、本来行われるべきRNA編集が行われず、正常では発現しない未編集型GluA2が発現していることを多数例の患者剖検脊髄を用いて明らかにしてきた(Kawahara et al, *Nature* 427:801, 2004)。GluA2のRNA編集はアデノシンをイノシンに変換する(A-to-I RNA editing)酵素 **adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2)** により特異的に触媒され、未編集型GluA2の発現はADAR2遺伝子発現の著明な低下によることを明らかにした(Hideyama et al, *Neurobiol Dis* 2012)。

さらに、この分子変化はAMPA受容体のCa<sup>2+</sup>透過性亢進させ、運動ニューロン死の直接原因であることを**ADAR2遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス**の解析から明らかにし、ALSの病因に深く関わる分子変化であることを示した(Hideyama et al, *J Neurosci* 2010)。

ADAR2発現低下は、**孤発性ALSの大多数例**に生じている分子変化であるのみならず、孤発性ALS運動ニューロンの病理学的指標である**TDP-43病理を引き起こす原因であり**(Aizawa et al, *Acta Neuropathol*, 120:75-84, 2010; Yamashita et al, 当時論文投稿中)しかもALSの責任遺伝子である**変異FUSをもつALS症例**の運動ニューロンにも見られる分子変化であること(当時論文準備中)から、amyotrophic lateral sclerosisの病因に密接に関連していることが想定された。

このように、ADAR2発現低下は、その下流のみならず上流においてもALS責任遺伝子との分子連関をもち、ALSの発症に重要な分子異常であることから、ADAR2遺伝子の制御メカニズムの解明はALSの病因を理解する上に必須であると考えられる。しかし、**ADAR2発現の制御メカニズム**に関する知見は乏しく何故ALSでADAR2が低下しているかは未解明である。

## 2. 研究の目的

患者剖検脊髄組織を用いた検討から、ALS運動ニューロンでは、ADAR2 mRNAの発現レベルが著明に低下し、それが未編集型GluA2の発現を通じて運動ニューロン死を引き起こしていることが明らかになった。本研究では、その上流の分子変化を明らかにするため、**ADAR2遺伝子(ADARB1)発現の制御機構**の分子病態を解明する。**ヒトADARB1遺伝子**の転写因子・制御因子を同定し、孤発性ALS患者運動ニューロンにおけるそれらの因子の発現変化・変異、ADARB1遺伝子の作用部位の変異の有無を抽出する。得られた分子病態を反映する実験系において、ADAR2発現に及ぼす影響を確認し、病的意義を検討すると同時に、適切な培養系、開発済みの病態モデルマウスを用いて分子病態の正常化による孤発性ALSの治療法としての可能性を探る。

## 3. 研究の方法

遺伝子制御機構が組織特異性に富むことから、ヒト運動ニューロンにおけるeRNA発現を解析する必要がある。そのため、レーザーマイクロディセクターで脊髄運動ニューロンを切り出し(計算上25,000~30,000個必要)、運動ニューロン組織から総RNAを抽出し、リボゾームRNAを除去したサンプルにつき、cap analysis of gene expression(CAGE)解析を行う。対照として脊髄後角灰白質、脊髄白質からサンプルを抽出する。CAGE解析は理化学研究所ゲノムネットワーク解析支援施設に委託する。

ADARB1遺伝子におけるpromoter・enhancer部位の同定のため、ADARB1遺伝子のヒストン修飾を、ADAR2高発現系、および低発現系で比較検討する。

CAGE解析と、ヒストン修飾パターンの解析から、ヒトADARB1遺伝子のプロモーター領域を想定し、ヒト由来培養細胞を用いてレポーターアッセイ系を構築する。

CAGE解析よりeRNA発現がみられたADARB1遺伝子プロモーター領域で転写因子結合モチーフを解析し、ADARB1遺伝子発現に関わる転写因子を推定する。

候補転写因子に付きレポーターアッセ

イで転写活性を制御するかどうかを確認する。

絞り込まれた候補転写因子の発現レベルをALS患者運動ニューロン、健康対照者運動ニューロンで比較し、ALSで発現低下が観られる転写因子を特定する。

転写因子の遺伝子変化、*ADARB1*遺伝子の転写因子結合部位のゲノム変化をALSと対照群で比較する。

#### 4. 研究成果

ヒト *ADAR2* 遺伝子の制御に関わる因子の同定のために、ヒストン修飾などから割り出したプロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子をつなげたレポーターアッセイ系を構築した。レポーターアッセイ系および転写因子の siRNA によるノックダウンを用いて、*ADARB1* 遺伝子発現を制御する転写因子のスクリーニングを行い、有意な制御活性を持つ転写因子を数種類同定した。

本研究開始後、RIKEN より FANTOM5 のデータが公開されたため、従来の予測方法に加え、エンハンサーRNA (eRNA) の発現を指標としたヒト *ADARB1* 遺伝子感受性部位の解析を進めた。*ADARB1* のプロモーターと近傍のエンハンサーRNA (eRNA) の発現量について、相関関係 (Spearman の相関係数 =0.52) を持つ eRNA を検索した。

*ADARB1* 近傍の CAGE タグの分布や強度が運動ニューロンと対照組織では大きく異なっており、予想通り組織特異的な遺伝子発現制御機構が働いていることが示唆された。

運動ニューロンでは対照組織との比較で、プロモーター領域に二カ所、それ以外の領域に少なくとも3カ所の特異的 CAGE タグが観察された。また、*ADAR2* 発現レベルの異なる組織における *ADARB1* のヒストン修飾、DNase1 感受性領域、CpG アイランドの比較から、プロモーター領域が3'側5kb弱に想定された。この領域全体および個々の CAGE タグ発現部位に相当するプロモーター領域に対応するレポーターアッセイ系を構築した。

さらに、CAGE タグの発現している部位における転写因子結合モチーフを運動ニューロンに発現している転写因子の中から抽出して候補転写因子とした。

また、*ADARB1* 遺伝子の発現量は細胞種により異なることを利用して、*ADAR2* レベルが高い、または低い組織トップ10を各々

選び出し、計1673個の中から *ADARB1* 遺伝子の発現との間に相関関係が高い転写因子を、グレードを付けて選定した。

上記の方法で抽出した候補転写因子につき生物活性を確認している。絞られた候補遺伝子について運動ニューロン組織を用いて ALS 群と対照群との発現の比較を行う。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15件)

赤松 恵, 山下雄也, 郭 伸: 孤発性 ALS の病態と治療 - AMPA 受容体阻害薬による筋萎縮性側索硬化症治療の可能性 . 神経治療学, 査読有, 印刷中, 2017

Kitaura H, Sonoda M, Teramoto S, Shirozu H, Shimizu H, Kimura M, Masuda H, Ito Y, Takahashi H, Kwak S, Kameyama S, Kakita A: Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors mediate epileptogenesis associated with hypothalamic hamartoma. *Epilepsia*, 査読有, 58-4, 2017, E59-E63.  
DOI : 10.1111/epi.13700

Yamashita T, Akamatsu M, Kwak S: Altered intracellular milieu of *ADAR2*-deficient motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Genes*, 査読有, 8(2)-60, 2017,  
DOI:10.3390/genes8020060

Yamashita T, Aizawa H, Teramoto S, Akamatsu M, Kwak S: Calpain-dependent disruption of nucleo-cytoplasmic transport in ALS motor neurons. *Sci Reports*, 査読有, 7-39994,  
DOI:10.1038/srep39994

山下雄也, 郭 伸: 神経疾患と RNA 編集異常 - 孤発性 ALS の分子病態モデルマウスを用いた ALS の治療法開発, 生化学, 査読有, 88-5, 2016, 600-608

山下雄也, 郭 伸: 分子病態解明から治療へ. 生体の科学, 査読有, 67-4, 2016, 323-328

Akamatsu M, Yamashita T, Hirose N, Teramoto S, Kwak S: The AMPA receptor antagonist perampanel robustly rescues amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathology in sporadic ALS model mice. *Sci Rep*, 査読有, 7-28649, 2016,

DOI: 10.1038/srep28649

Aizawa H, Hideyama T, Yamashita T, Kimura T, Suzuki N, Aoki M, Kwak S: Deficient RNA-editing enzyme ADAR2 in an amyotrophic lateral sclerosis patient with a FUSP525L mutation. *J Clin Neurosci*, 査読有, 32, 2016, 128-129,

DOI: 10.1016/j.jocn.2015.12.039

Yamashita T, Teramoto S, Kwak S: Phosphorylated TDP-43 becomes resistant to cleavage by calpain: a regulatory role for phosphorylation in TDP-43 pathology of ALS/FTLD. *Neurosci Res*, 査読有, 107, 2016, 63-69,

DOI:10.1016/j.neures.2015.12.006

Sasaki S, Yamashita T, Kwak S: Autophagy in spinal motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice: an implication for a role of calcium in increased autophagy flux in ALS. *Neurosci Lett*, 査読有, 598, 2015, 79-84

Sasaki S, Yamashita T, Hideyama T, Kwak S: Unique nuclear vacuoles in motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. *Brain Res*, 査読有, 1550, 2014, 536-546, DOI:10.1016/j.brainres.2014.01.006

Yamashita T, Kwak S: The molecular link between inefficient GluA2 Q/R site-RNA editing and TDP-43 pathology in motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res*, 査読有, 1584, 2014, 28-38,

DOI:10.1016/j.brainres.2013.12.011

山下雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズム, *Dementia Japan*, 査読無, 28, 2014, 307-318

Yamashita T, Chai H, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S, Kwak S: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med*, 査読有, 5, 2013, 1710-1719, DOI:10.1002/emmm.201302935.

Sasaki S, Yamashita T, Hideyama T, Kwak S: Unique nuclear vacuoles in motor neurons of conditional

ADAR2-knockout mice. *Brain Res*, 査読有, 1550, 2014, 36-46, DOI:10.1016/j.brainres.2014.01.006.

〔学会発表〕(計 19 件)

Akamatus M, Yamashita T, Teramoto S, Kwak S, The AMPA receptor antagonist perampanel robustly rescues amyotrophic lateral sclerosis pathology in ALS model mice, 10th FENS Forum of Neuroscience, 2016.7.5, Bella Center, Copenhagen, (Denmark)

Akamatsu M, Yamashita T, Teramoto S, Kwak S: ROBUST BENEFICIAL EFFECTS OF A NON-COMPETITIVE AMPA RECEPTOR ANTAGONIST IN AN ALS MOUSE MODEL. The 27th International Symposium on ALS/MND(国際学会), 2016.12.8, Dublin (Ireland, )

郭 伸, Development of specific therapy for sporadic ALS. 3rd World Centenarians Initiative International Symposium on Amyotrophic Lateral Sclerosis (招待講演), 2016.2.19, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

郭 伸: A role for inefficient RNA editing in the amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathogenesis. 第 58 回日本神経化学会大会 ISN (International Society for Neurochemistry)/JSN (Japanese Society for Neurochemistry) Joint Symposium "Epigenetics in neurological and psychiatric diseases (招待講演), 2015.9.13, 大宮ソニックスシティ(埼玉県・さいたま市)

山下雄也, 廣瀬直己, 赤松恵, 寺本さやか, 蔡慧令, 郭 伸: AMPA 受容体アンタゴニストであるランパネルを用いた ALS 治療法の開発. 第 38 回日本神経科学大会 ワークショップ 研究ポスター「伝わる」デザイン, 2015.7.29, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

郭 伸, 山下雄也, 寺本さやか: Mechanism-based gene therapy for sporadic ALS. 第 56 回日本神経学会学術大会 Hot Topics 18 "Gene Therapy for Neurological disorders, 2015.5.22, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

相澤仁志, 加藤陽久, 郭 伸: ALS の ALSFRS-R スコアの経時的変化とアクティグラフによる運動量の検討. 第 56 回

日本神経学会学術大会(ポスター), 2015,5,22, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

郭 伸: 分子病態モデルマウスを用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療法開発. 第56回日本神経学会学術大会ランチョンセミナー33「ALS研究と緩和ケアの最前線」(招待講演), 2015,5,22, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

郭 伸: 孤発性ALSの分子病態解析に基づいた治療法の開発. 京都大学iPS細胞研究所セミナー, 2015.1.23, 京都大学, (京都市・京都府)

Kwak S: ADAR2-downregulation, a pathogenesis of ALS and a target for therapy. RNA editing-from genomic prediction to function, 2014.12.7-10, Ein Gedi (Israel)

Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Muramatsu S, Kwak S: Gene therapy for sporadic ALS using an intravenous injection of AAV vector. The 25th International Symposium on MND/ALS, 2014.12.6, Brussels (Belgium)

Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S-I, Kwak S: Mechanism-based gene therapy for ALS using sporadic ALS model mice. The 45th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2014.11.18, Washington DC(USA)

郭 伸: AAV-ADAR2によるALSの遺伝子治療. シンポジウム「AAVベクターを応用した神経・精神疾患の病態解明」第36回日本生物学的精神医学会第57回日本神経化学学会大会, 2014.10.1, 奈良県文化会館(奈良県・奈良市)

郭 伸: ALS治療への展望. 第12回神経難病とケアを考える会(招待講演), 2014.6.28, エーザイホール, (東京都・文京区)

Kwak S, Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Muramatsu S-I: Development of a gene therapy for sporadic ALS by normalizing ADAR2 activity in the motor neurons using a vascular type AAV vector. The 24th Meeting of the European Neurological Society, 2014.5.31-6.3, Istanbul(Turkey)

山下雄也, 郭 伸: TDP-43病理形成メカニズムにおけるTDP-43のカルパイン

依存性断片化の意義. シンポジウム「TDP43の新展開」第55回日本神経学会学術大会, 2014.5.22, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Kwak S: A step for mechanism-based ALS therapy. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014". CREST-新学術共催国際シンポジウム(招待講演), 2014.3.16.17. 東京医科歯科大(東京都・文京区)

Kwak S: Calpain cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. Biology of Calpains in Health and Disease. Science Research Conferences FASEB(招待講演), 2013.7.21-26, Saxtons River (Vermont, USA)

Kwak S, Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S: Molecular mechanism generating TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) motor neurones. The 23rd Meeting of the European Neurological Society, 2013.6.8-11, Balcerona(Spain)

#### 〔図書〕(計 3件)

郭 伸, 市村出版, 「ヒトの動きの神経科学シリーズ第3巻: 筋力発揮の脳・神経科学 その基礎から臨床まで」筋萎縮性側索硬化症(ALS)とその治療, 2017, 188頁, p168-185

山下雄也, 郭 伸, 医歯薬出版, 医学の歩み 247, 2013, 140頁, p412-440

郭 伸, 中山書店, シリーズ<アクチュアル脳・神経疾患の臨床>, 2013, 370頁, p204-213

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郭 伸 (KWAK, SHIN)  
東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・  
客員研究員  
研究者番号：40160981

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )