

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293199

研究課題名(和文) FUS遺伝子変異によるALS運動ニューロンRNA病態の解明

研究課題名(英文) Elucidating the RNA pathomechanism in FUS-FALS iPS induced motor neurons

研究代表者

青木 正志 (Aoki, Masashi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70302148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は成人発症で3～5年で呼吸不全で死に至る過酷な神経変性疾患である。家族性ALS家系の集積により11家系のfused in sarcoma(FUS)遺伝子変異を同定しMuscle Nerve誌に報告した。そのうち、1家系2例のFUS変異ALS(FUS-ALS)罹患者より本学倫理委員会で承認された手順に則り同意を得て、皮膚から初代培養線維芽細胞を得、iPS細胞樹立に成功した。神経分化後の比較によって対照細胞と疾患感受性の確認を行い、その成果をStemCell Reports誌に報告した。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease resulting in the selective death of motor neurons. ALS symptoms are associated with muscle weakness and paralysis and approximately 80% of ALS patients die within 5 years after the onset of these symptoms. We generated induced pluripotent stem cells (iPSC) from familial ALS (FALS) patients with a missense mutation in the fused-in sarcoma (FUS) gene carrying the heterozygous FUS H517D mutation. These cell-derived motor neurons mimicked several neurodegenerative phenotypes including mis-localization of FUS into cytosolic and stress granules under stress conditions, and cellular vulnerability (Ichiyangi et al. Stem Cell Reports 2016).

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は致死性の疾患であり治療法開発が希求されている。選択的・系統的運動ニューロン変性により全身の骨格筋萎縮と筋力低下を生じ、発症後 3~5 年で呼吸筋麻痺にいたる。ALS 症例の多くは孤発性であるが、約 10% は家族性である。孤発性 ALS は多様な発症経過と臨床症候を示し不均一で、その原因は未解明である。一見孤発性とされる ALS 患者にも数% 程度に家族性 ALS 原因遺伝子の変異が見出されている。さらに幾つかの家族性 ALS 原因遺伝子産物は孤発性 ALS の運動ニューロン内に異常蓄積している。したがって家族性 - 孤発性 ALS 間に共通病態の存在が強く示唆され、家族性 ALS 原因遺伝子産物は広く ALS 病態共通の発症機構にせまる鍵となるばかりか、重要な治療標的となり得る。代表研究者らは一貫して上記アプローチによる ALS 研究を継続してきた。1993 年に初の家族性 ALS (ALS1) 原因遺伝子として北米で銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子が発見された当初より、新たな SOD1 遺伝子変異を本邦でも発見し (Nat Genet, 1993)、変異 SOD1 導入マウス (J Neuropathol Exp Neurol 2007) のみならずラットの ALS モデル動物を世界に先駆けて確立した (J Neurosci 2001)。この動物モデルを用いて肝細胞増殖因子 (HGF) の髄腔内持続投与を新規治療法として開発し (J Neuropathol Exp Neurol 2007)、HGF 臨床応用は第 I 相治験を実施中である (橋渡し研究の実践)。

近年、家族性 ALS および一部の孤発例に FUS 遺伝子変異が新しく発見された (Vance ら、

Science 2009)。申請者らは自験 104 家系のうち 10% に、いち早く複数の異なる変異 FUS 関連家族性 ALS (FUS-ALS, ALS6) 家系を同定、5 剖検例を含む 1 大家系の詳細な臨床・病理学的解析結果を報告した (J Neuropathol Exp Neurol 2012, J Hum Genet, 2010)。欧米・本邦に共通する重要な R521C 変異をもつ本家系からは、病理学的に細胞質内 FUS 陽性封入体が罹病期間に比例し広範に分布することがわかっている。一方、孤発性 ALS の多くに共通する顕著な病理学的特徴は家族性 ALS (ALS10) の原因遺伝子 TARDBP がコードする TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) 蛋白質の細胞質内異常蓄積と封入体形成である。FUS、TDP-43 はどちらも類似構造をもつ DNA/RNA 結合蛋白質であり、通常細胞質よりも核優位に局在して転写、RNA 輸送、スプライシング、翻訳などの制御に関わる。このような構造・機能的類似性に加え、ともに ALS 運動ニューロンでは細胞質に異常蓄積し封入体を形成する共通項をもつ (Deng ら, Ann Neurol 2010)。さらに最近、FUS および TDP-43 の機能喪失による RNA 代謝異常が報告されており (Lagier-Tourenne ら, Nat Neurosci 2012)、変異 FUS による運動ニューロン変性機構の解明は、RNA 代謝異常という広く ALS の共通病態の解明につながる可能性がある。これまで ALS 細胞・動物モデルは家族性 ALS 関連する変異遺伝子導入が主流であった。しかし、FUS や TARDBP のように発生や生理機能維持に必須で厳密な発現調節を受けている場合、単なる遺伝子導入モデルでは野生型遺伝子であっても発現量の増減により神経毒性が生じてしまったり、臓器・細胞あるいは時期特異的に導入遺伝子を発現しないと

胎生致死に陥ってしまったりするため、ALS 病態の再現には限界がある。また、選択的運動ニューロン神経変性を主徴とする ALS においては細胞内病態が細胞種ごとに異なる可能性が高く、もっとも脆弱な運動ニューロンのみならず、ALS 病態形成において積極的な役割をもつグリア細胞 (Yamanaka ら, NatNeurosci 2008) をも検索し、細胞種特異的な RNA 病態を解明する必要があるものの未解明である。これらを背景に本研究は人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) 技術を用いることで上記問題点を克服し得る患者由来・疾患感受性ヒト ALS 細胞モデルを擁し、細胞種特異的な RNA 病態解明を行うために計画された。

2. 研究の目的

本研究は 1) 患者由来の変異 FUS 関連疾患感受性ヒト ALS 細胞モデルの細胞生物学的解明, 2) その細胞種特異的な RNA 病態解明と新規病態関連分子同定およびヒト剖検脳・脊髄組織での確認を目的とする。

3. 研究の方法

開発の基盤研究を推進するため、本研究では以下を計画した。初年度に、1) 患者組織由来の変異 FUS-ALS 疾患特異的な iPS 細胞の樹立と品質管理、2) 運動ニューロンおよびアストログリアへの分化誘導と疾患感受性の確認を行い、次年度以降 3) 変異 FUS-ALS 疾患感受性ヒト細胞モデルにおけるトランスクリプトーム解析、4) 変異 TDP-43-ALS 疾患感受性ヒト細胞モデルとの比較解析を行う。

iPS 細胞樹立のため患者組織を得る。申請者らの施設では ALS 専門外来を開設し積極的に ALS の診療・研究を継続しており 10 家系の遺伝子変異同定済の FUS-ALS 家系がある。iPS 細胞樹立については所属施設の倫理委員会にて承認を得ている (第 2010・306 号)。通常は生検皮膚組織より初代培養線維芽細胞を樹立し、OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, shP53 等をエピソーマルベクターによって遺伝子導入して iPS 細胞を樹立する。すでに FUS-ALS 患者の iPS 細胞樹立に成功しており、家系内の複数以上の罹患者に由来する iPS 細胞も樹立する。また、侵襲性の少ない末梢血のリンパ芽球からの iPS 細胞樹立を試みる等、より効果的・効率的 iPS 細胞樹立法を検討しつつ研究を加速する。

樹立した複数の iPS 細胞株において、外来遺伝子ゲノム挿入部位の確認、未分化マーカーの発現、多分化能を確認する。その結果、各患者由来ヒト iPS 細胞ごとに良質なクローンを数クローンずつ選択する。それらについて、マイクロアレイによる比較ゲノムハイブリダーゼーション (aCGH) や一塩基多型 (SNP) を用いたゲノム異常の有無、染色体解析、そして由来患者と同一の家族性 ALS 遺伝子変異の確認を行う。

樹立した iPS 細胞株から胚様体を介し神経幹細胞へ、ついで運動ニューロン、アストログリアへとそれぞれ分化誘導する。運動ニューロン特異的な HB9、あるいはアストログリア特異的な GFAP のエンハンサー/プロモーター制御下に蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を組み込むことで分化誘導した細胞と正常対照由来細胞との比較解析を行う。単純培養もしくは運動ニューロン・ア

ストログリア共培養下で、a) 細胞形態、b) 細胞骨格、c) 突起伸展・シナプス形成率、d) 細胞内異常蛋白凝集が正常細胞とどう異なるかを明らかにする。免疫細胞化学・ウェスタンブロット法を用いて細胞内の FUS・TDP-43 の発現分布や断片化など翻訳後修飾の有無、核 - 細胞質輸送関連蛋白 (transportin1, 2)、ストレス顆粒形成についても比較検証する。なお、通常の培養で比較困難な場合には、ヒト ALS や ALS モデル動物ですでに報告されている各種ストレス (酸化ストレス, ミトコンドリアストレス, グルタミン酸毒性, 蛋白分解系阻害) を薬剤添加によって引き起こし上記を明らかにする。有意な所見が得られた場合、上記と同様の手法で樹立・分化誘導した TDP-43-ALS 由来細胞との比較検討を加える。正常対照としては京都大学で樹立され無償提供されている正常ヒト iPS 細胞を用いる。

RNA 病態解明のため in vivo RNA- 蛋白質相互作用検出法 (HITS-CLIP 法) などを用いて細胞内で変異 FUS と相互作用する標的 RNA とその結合領域を同定する。分化誘導した運動ニューロンおよびアストログリアに UV 照射し、FUS や TDP-43 といった蛋白質の局在と異常凝集をもとに生化学的に分画して、HITS-CLIP 法を用いて解析する。また、FUS 遺伝子変異をもつ運動ニューロン、アストログリアから mRNA や non-coding RNA、とくに microRNA を抽出してマイクロアレイ、エクソンアレイ、さらに次世代シーケンサーによる mRNA seq を用いてトランスクリプトーム解析を行う。正常対照由来細胞と比較し発現に有意差のある遺伝子やパスウェイをバイオインフォマティクス解析によって見出

し、新規病態関連分子の同定をめざす。有力な病態関連分子候補が明らかとなった場合には、申請者らの施設で保管中の FUS-ALS 患者剖検脳・脊髄組織における発現解析をもって確認し、さらなる in vitro、あるいは ALS モデル動物をもちいた in vivo での機能解析へと発展させる。

4 . 研究成果

これまで、家族性 ALS 家系の集積により 13 家系の FUS 遺伝子変異を同定し、その臨床的特徴に関して Muscle Nerve 誌に報告した。そのうち、1 家系 2 例の FUS 関連 ALS (FUS-ALS) 罹患者より本学倫理委員会で承認された手順に則り同意を得て、皮膚生検を行った。これより初代培養線維芽細胞を樹立し、連携研究者の施設にて iPS 細胞樹立に成功した。樹立した FUS-ALS 疾患特異的 iPS 細胞株の品質管理を行うため、外来遺伝子ゲノム挿入部位の確認、未分化マーカーの発現、多分化能の確認を実施、良質なクローンを選択した。また、由来した罹患者と同一の FUS 遺伝子変異確認も行った。運動ニューロン分化後に RNAsequence などの解析を行ない、StemCell Reports 誌に報告した。

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 2 件)

1. Akiyama T, Warita H, Kato M, Nishiyama A, Izumi R, Ikeda C, Kamada M, Suzuki N, Aoki M. Genotype-phenotype correlation in familial ALS with FUS/TLS mutations in Japan. Muscle Nerve.

2016 Jan 28. doi: 10.1002/mus.25061.

2. Ichiyangi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuiji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H. Establishment of in vitro FUS-associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model using Human induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Reports 2016 2016 Mar 16. pii: S2213-6711(16)00062-X. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.02.011.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学神経内科

<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

青木 正志 (Aoki, MASASHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 70302148

(2)研究分担者

加藤 昌昭 (Kato, MASAOKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 50622479

鈴木 直輝 (Naoki, SUZUKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 70451599

割田 仁 (Hitoshi, WARITA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 30400245

(3)連携研究者

岡野 栄之 (Hideyuki, OKANO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 60160694