

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430055

研究課題名(和文) 脊髄性筋萎縮症SMAと筋萎縮性側索硬化症ALSに共通するRNA代謝異常

研究課題名(英文) Common defects of RNA metabolism in motor neuron diseases SMA and ALS

研究代表者

築地 仁美 (Tsuiji, Hitomi)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：40455358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：運動ニューロン変性疾患である筋萎縮性側索硬化症ALSと脊髄性筋萎縮症SMAは、RNA代謝に重要な分子群の異常が原因で発症する。しかし両疾患に共通したRNA代謝異常は不明であった。我々は、ALS関連蛋白質TDP-43とFUSが、SMA原因蛋白質でありスプライシング反応を担うU snRNPsの成熟に必須であるSMNと結合し、SMNの濃縮する核内構造体Gemに局在することを見いだした。更に、ALS患者脊髄運動ニューロンではGemが減少し、核内にU snRNPsが異常に蓄積しスプライソソーム異常となっていることを見いだした。以上よりSMAのみならずALS病態でもスプライソソーム異常があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Two motor neuron diseases, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal muscular atrophy (SMA), are caused by distinct genes involved in RNA metabolism, TDP-43 and FUS, and SMN, respectively. However, whether there is a shared defective mechanism in RNA metabolism common to these two diseases remains unclear. Here, we show that TDP-43 and FUS localize in nuclear Gems through an association with SMN, and that all three proteins function in spliceosome maintenance. We also show that in ALS, Gems are lost, U snRNA levels are up-regulated and spliceosomal U snRNPs abnormally and extensively accumulate in motor neuron nuclei. This aberrant accumulation of U snRNAs in ALS motor neurons indicates both ALS and SMA motor neurons have defects in the spliceosome. These findings indicate that a profound loss of spliceosome integrity is a critical mechanism common to neurodegeneration in ALS and SMA, and may explain cell-type specific vulnerability of motor neurons.

研究分野：病態神経科学、分子生物学

キーワード：運動ニューロン ALS SMA スプライソソーム TDP-43 FUS SMN スプライシング

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 spinal muscular atrophy (SMA)は、*survival of motor neuron 1 (SMN1)* 遺伝子の欠損により SMN 蛋白質量が減少し、脊髄前角の下位運動ニューロンが選択的に脱落する運動ニューロン疾患である。*SMN2* 遺伝子も SMN をコードするが、不安定な splicing variant が多く産生されるため、全長の機能的 SMN 蛋白質は少量しか産生されず、SMA 患者では全身における SMN 蛋白質量の減少が認められる。劣性遺伝であり保因者は欧米で約 100 人に一人、日本では欧米より少ないと考えられている。特に I 型は重篤な小児発症疾患であり、早急な治療法開発が求められている。しかし欧米と比較し日本における SMA 研究および治療開発は立ち後れているのが現状である。

一方、**筋萎縮性側索硬化症** amyotrophic lateral sclerosis (ALS)は、成人発症の運動神経変性疾患であり、上位および下位運動ニューロンが選択的に脱落し、全身の骨格筋麻痺が起こり、発症後 1-5 年で呼吸筋の麻痺により死に至る。日本における罹患者は人に及ぶが、有効な治療薬は無く、発症後認知機能が正常に保たれた状態で確実に死に至ることから、患者の精神的負担は多大なものであり、早急な病態解明が望まれている。2006 年、ほぼすべての ALS 患者病巣の運動神経細胞においてみられる細胞質内の異常凝集体の主要構成成分が、RNA 結合蛋白質の TDP-43 であることが同定され、ALS 研究に旋風を巻き起こした。更に家族性 ALS で *TDP-43* の変異が同定された。2009 年には TDP-43 と類似構造を持つ RNA 結合蛋白質 FUS/TLS の変異が家族性 ALS で同定され、細胞質での凝集体にも FUS/TLS が含まれることが示され、TDP-43 と FUS/TLS が ALS の原因遺伝子であり直接の危険因子であることが判明した。両分子が RNA 結合蛋白質であることから、ALS は RNA 代謝の異常により発症する可能性が考え

られ、TDP-43 と FUS/TLS による ALS 発症メカニズムの解析は全世界で精力的に進められてきたが、未だ決定的な発症機構はわかっていない。

2. 研究の目的

SMN, TDP-43, FUS に共通の分子機能の探索、および SMA, ALS に共通の RNA 代謝異常を探索することにより、両運動神経変性疾患に共通する運動神経細胞死のメカニズムを探り、両疾患治療への手がかりを探る。

3. 研究の方法

- (1) SMN, TDP-43, FUS の結合様式の探索
- (2) SMN, TDP-43, FUS の共局在の探索
- (3) SMN, TDP-43, FUS が共通して制御する RNA の探索
- (4) ヒト剖検検体での検討

4. 研究成果

筋萎縮性側索硬化症において変性した運動ニューロンの細胞質へ異常に蓄積する TDP-43 や FUS/TLS が、若年性運動神経変性疾患 SMA の原因蛋白質 SMN と結合し、SMN が濃縮する核内構造体である Gem に共に局在すること、TDP-43 と FUS/TLS が Gem 構成に重要であることを発見した。Gem はスプライソソームの成熟の場であることから、ALS 患者におけるスプライソソーム異常が予想された。実際に、ALS 患者運動ニューロンでは Gem が消失すること、核内に異常にスプライソソーム構成成分である U snRNPs が蓄積し凝集していることを見出した。また TDP-43 のノックダウンや異常蓄積によりスプライソソームの RNA 構成成分である U snRNA の発現異常が起こることを、細胞および ALS 疾患患者脊髄組織にて示した。SMN の機能欠損や SMA 患者でも U snRNA 異常が報告されている。よって ALS と SMA の両運動神経疾患に共通の RNA プロセッシング異常としてスプライソソーム異常を見出した。ALS 治療の新規ターゲットとしてスプライソソーム機能回復が考えられる。

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4件)

Ichyanagi 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** 12;6(4):496-510. (2016) 査読有

DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.02.011

Gitler AD* and Tsuiji H* (corresponding author). There has been an awakening: Emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS. **Brain Res** 15;1647:19-29. (2016) 査読有

DOI: 10.1016/j.brainres.2016.04.004

Tsuiji H* (corresponding author), Iguchi Y., Furuya A., Kataoka A., Hatsuta H., Atsuta N., Tanaka F., Hashizume Y., Akatsu H., Murayama S., Sobue G., Yamanaka K.* Spliceosome integrity is defective in motor neuron disease ALS and SMA. **EMBO Molecular Medicine**, 5(2):221-34. (2013) 査読有

DOI: 10.1002/emmm.201202303

築地仁美、山中宏二、「ALS と脊髄内環境変化」「Spinal cord environment in ALS」、**Medical Science Digest**、2013年、Vol 39(5) 査読有

[学会発表](計15件)

[国際学会]

Tsuiji H., Inoue I., Furuya A., Takeuchi M., Yamakage Y., Hattori M.,

Yamanaka K. Interneuron degeneration in TDP-43 transgenic mice displaying impaired memory, **11th Brain Research Conference** (2016年11月10日-11月11日, Paradise Point, San Diego, CA)

Tsuiji H., Inoue I., Furuya A., Takeuchi M., Yamakage Y., Hattori M., Yamanaka K. Interneuron degeneration in TDP-43 transgenic mice displaying impaired memory **The 21st Annual Meeting of the RNA Society**, (2016年6月28日-7月2日, Kyoto, Japan)

Tsuiji H., Inoue I., Kataoka A., Furuya A., Hattori M., Yamanaka K., Interneuron degeneration in TDP-43 transgenic mice displaying impaired memory, **10th Brain Research Conference, RNA Metabolism in Neurological Disease**(2015年10月15-16日, The Westin Chicago River North, Chicago, U.S.A.)

Tsuiji H., Inoue I., Kataoka A., Furuya A., Yamanaka K., Cell-type specific gene expression changes in TDP-43 transgenic mice displaying memory defect. **The19th Annual Meeting of the RNA Society** (2014年6月3日-8日/ケベック、カナダ) (英語)

Tsuiji H., Inoue I., Kataoka A., Furuya A., Yamanaka K., Cell-type specific gene expression changes in TDP-43 transgenic mice displaying memory defect. **RNA Biology in Neurological diseases** (2013年11月/San Diego, USA) (英語)

Tsuiji H., Iguchi Y., Furuya A., Murayama S., Sobue G., Yamanaka K., Spliceosome integrity is defective in motor neuron disease ALS and SMA. **RNA 2013 The 18th Annual Meeting of the RNA Society** (2013年6月/Davos, Switzerland) (英語)

[国内]

竹内真理、山中宏二、築地仁美、服部光治、前頭側頭葉変性症モデルマウスの脳の組織学的な解析日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部(2015/11/1、名古屋)

近藤佑多、古屋亜佐子、内匠透、山中宏二、築地仁美、服部光治、筋萎縮性側索硬化症 ALS を引き起こす変異型 FUS/TLS の解析(2015/7/4、第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会、名古屋)

築地仁美、井上郁代、古屋亜佐子、山中宏二：神経変性疾患モデルである TDP-43 トランスジェニックマウスにおける TDP-43 標的遺伝子の同定、**第 36 回日本分子生物学会年会**(2013 年 12 月/神戸)
Tsuiji H., Iguchi Y., Furuya A., Kataoka A., Hatsuta H., Atsuta N., Tanaka F., Hashizume Y., Akatsu H., Murayama S., Sobue G., Yamanaka K., Spliceosome integrity is defective in motor neuron disease ALS and SMA., **第 36 回日本神経科学大会**(2013 年 6 月/京都) (**座長及び口頭発表**)

[招待講演]

築地仁美、筋萎縮性側索硬化症の発症機構解明と治療薬開発へ向けて、**第 47 回藤田学園医学会・研究最前線セミナー**(2015 年 10 月 1 日/豊明市)

築地仁美：筋萎縮性側索硬化症におけるスプライソソーム異常、**日本薬学会第 135 年会シンポジウム**(2015 年 3 月 26 日/神戸)

Tsuiji H.: Abnormal RNA metabolism in motor neuron disease ALS, **第 37 回日本神経科学大会シンポジウム**(2014 年 9 月 11 日/横浜)(英語)

Tsuiji H.: Defects in RNA Metabolism in Neurodegenerative Diseases, **Stanford University**(2013 年 11 月 5 日/CA, USA)(英語)

Tsuiji H. and Yamanaka K., Spliceosome Integrity is a Common Target for Motor

Neuron Disease. **第 35 回日本神経科学大会** シンポジウム:RNA 結合蛋白質と病態(2012 年 9 月/名古屋)(英語)

[図書](計 1 件)

Tsuiji, H., Yamanaka K., Animal Models in Neurodegenerative Disorders. In: Verma A, Singh, A, editors. **Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation**, Elsevier, p39-56. (2014)

[その他]

ホームページ:

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/bsk/indexj1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築地 仁美(TSUIJI, Hitomi)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 40455358

(2) 研究分担者

内匠 透(TAKUMI, Toru)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・
チームリーダー

研究者番号: 00222092

(3) 連携研究者

山中 宏二(YAMANAKA, Koji)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号: 80446533