

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461294

研究課題名(和文)新規運動ニューロン病遺伝子TFG解析と治療法開発

研究課題名(英文)Analysis of TFG gene and development of treatment for motor neuron diseases

研究代表者

瓦井 俊孝 (KAWARAI, Toshitaka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：50614137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：TFG変異による近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチーの疾患特異的iPS細胞モデルにおいてproteasomeの異常が生じていることを明らかにした。さらに、疾患マウスモデル(Transgenic mouse, Tg)において、マウスモデルにおいて神経細胞内にTFG, Optineurin, TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) 陽性凝集体を再現させることができた。治療の試みとして、phenylbutyrateがautophagyを活性化させて神経細胞内凝集体を減らし、症状も改善する作用があるか、TFG Tg miceを使って研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：We performed biological characterization of neural cells derived from hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P) patient induced pluripotent stem cells (iPSCs), and revealed proteasome dysfunction when the iPSCs carrying the clinical mutation, Pro285Leu, in tropomyosin-receptor kinase fused gene (TFG). We also analyzed the animal model for HMSN-P, transgenic mice over expressing human mutant TFG, and demonstrated replication of intraneuronal aggregations, including TFG, optineurin, and TAR DNA binding protein 43 (TDP-43). The model mice are undergoing therapeutic trial using phenylbutyrate, which has been demonstrated to be clinically and pathologically effective to decrease Tau aggregation in transgenic mice via activation of autophagy.

研究分野：臨床神経科学

キーワード：運動ニューロン病 TFG

1. 研究開始当初の背景

我々は 2012 年に四肢の近位部優位に症状が出現する遺伝性運動感覚性ニューロパチー (HMSN-P) の原因遺伝子を発見した (Ishiura H, et al. Am J Hum Genet. 2012)。この中で、TFG 変異 (Pro285Leu) により TFG 自身の凝集ならびに TFG の機能異常による細胞内蛋白輸送の異常を証明した。その後、別の TFG 変異 (Arg106Cys) により痙性対麻痺が発症することが報告された (Beetz C, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)。そして今回我々は新たに、**孤発例 ALS にてシーケンス解析を行ったところ、2 つのミスセンス変異 (Gln294His, Arg360Lys) を見出した** (Kawarai, et al. 論文未発表)。さらに培養細胞において ALS 関連蛋白の局在を調べたところ、TDP-43, FUS, OPTN の局在の変化を認めた (Kawarai T, et al. 論文未発表)。これまでの我々の知見により、TFG 変異により細胞内輸送障害などを通じて TFG の細胞質への凝集を特徴とする TFG pathology を来すこと、さらに TDP-43 代謝に TFG が関与していることが明らかとなった。疾患由来の TFG 変異がどのような機序で TDP-43 pathology を引き起こし、運動神経変性に至るのかを明らかにすることは、TFG-ALS のみならず、孤発性 ALS の発症機序を理解するうえで極めて重要である。孤発性 ALS で異常蓄積が見られる TDP-43 は RNA プロセッシングに関与しており、TDP-43 異常を介した RNA 代謝異常が ALS の病態において重要な役割を果たしていることが報告されている (Tsujii H, et al. EMBO Mol Med. 2013)。そこで、本研究課題では、**TFG-ALS のモデル動物、iPS 細胞の樹立を通じて、TFG 変異による細胞内輸送障害、RNA 代謝障害メカニズムを明らかにする**。さらに iPS 細胞におけるドラッグスクリーニングを行い、異常な RNA

代謝、ALS 関連タンパクの異常代謝を抑制し、正常化する薬を探索する。HMSN-P の原因遺伝子として TFG を発見し、ALS にまで広げて研究しているのは我々のみである。国内・国外で先駆けて研究していることで我々が優位な立場にある。

2. 研究の目的

本研究は、運動ニューロン病を引き起こす新規遺伝子 TRK-fused gene (TFG) の解明を糸口にして運動ニューロン病における分子標的療法の開発を目指す。TFG の変異遺伝子型により異なる運動ニューロン疾患が発症することが分かっている。TFG 機能解明を突破口に運動ニューロン死への新しいカスケードが解明できる可能性が高いと考えられる。iPS 細胞やモデルマウスを使って異常な分子メカニズムを明らかにし標的分子の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性運動感覚性ニューロパチー (HMSN-P) で発見された Pro285Leu 変異を持つ TFG トランスジェニックマウスの作製・臨床病理学的評価

(2) TFG 変異を持つ患者から作成された iPS 細胞ならびに TFG トランスジェニックマウスにおける RNA プロファイルの網羅的解析

(3) 異常な細胞内輸送・代謝・RNA プロファイリングを抑制し正常化する化学物質の検索

4. 研究成果

(1) 疾患特異的 iPS 細胞モデルにおいて proteasome の異常が生じていることを明らかになった

(2) マウスモデルにおいて神経細胞内に TFG, Optineurin, TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) 陽性凝集体を再現

させることができた

(3) 腰髄前角の萎縮・運動ニューロンの脱落、坐骨神経で有髄線維の減少がマウスモデルにおいて確認できた

(4) 40 週齢以降に体重減少・筋力低下出現、60 週齢前後で死亡する。行動量は 45 週齢以降に明らかとなり、筋力低下出現と乖離があることが判明した。行動量評価は治療介入のタイミングの決定、治療効果判定の指標になり得るが、筋力低下との乖離があることに注意しなければならないことが分かった

(5) TDP-43 pathology との関連を調べるために、モデルマウス大脳皮質、脳幹において microarray 解析を行ったところ、ALS 関連タンパクの fused in sarcoma(FUS) の発現低下、TDP-43 発現増加が認められた

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 1 件)

Murakami N, Imamura K, Izumi Y, Egawa N, Tsukita K, Enami T, Yamamoto T, Kawarai T, Kaji R, Inoue H. Proteasome impairment in neural cells derived from HMSN-P patient iPSCs. 査読有 Mol Brain 2017;10:7

〔学会発表〕(計 2 件)

Animal model of HMSN-P □ 頭 Ryoosuke Oki, Akie Tanabe, Toshitaka Kawarai, Nobuyuki Oka, Yuishin Izumi and Ryuji Kaji. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Kobe, Japan. May 18-21, 2016. 神戸コンベンションセンター Kobe city, Japan

Clinicopathological features of HMSN-P in the Kansai area of Japan. Toshitaka Kawarai, Koji Fujita, Yuishin Izumi, Mari Yoshida and Ryuji Kaji. The 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 18-21, 2016 神戸コンベンションセンター Kobe city, Japan.

〔図書〕(計 2 件)

瓦井俊孝、森垣龍馬、藤田浩司、和泉唯信、梶龍兒 近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチーの分子病態機序 神経内科(科学評論社)79(6): 総頁数 76, 751-756, 2013

藤田浩司、瓦井俊孝、和泉唯信、後藤 恵、梶龍兒 近位筋優位運動感覚ニューロパチーの臨床的特徴 神経内科(科学評論社)79(6): 総頁数 76, 732-737, 2013

瓦井俊孝、森垣龍馬、沖 良祐、和泉唯信、後藤 恵、梶 龍兒 ALS and TFG 神経内科(科学評論社) 82; 総頁数 33, 366-370. 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

瓦井俊孝 (KAWARAI, Toshitaka)

徳島大学大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号：50614137

(2)研究分担者

梶 龍兒 (KAJI, Ryuji)
徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：00214304

(3)連携研究者

井本逸勢 (IMOTOI, Issei)
徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：30258610

田嶋 敦 (TAJIMA, Atsushi)

金沢大学医学系・教授
研究者番号：10396864

(4)研究協力者

()