

Title	ALS/FTLDの治療ターゲット同定を目指した分子病態の解明
Sub Title	Establishment of treatment target for ALS/FTLD
Author	伊東, 大介(Ito, Daisuke)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>1)家族性ALSに関与する2つの異なる分子UBQLN2, OPTNが共に蛋白分解に関わるendosomal vesicleに関与しており, endosomeとautophagyをつなぐ機能を持ち, late-endosomeとは独立したendosomeの新規の蛋白品質管理機構を形成していることを確認した。2)GGGGCC異常伸長反復配列からのnon ATG翻訳によるDRP(dipeptidyl peptidase protein)の中で塩基性の強いpoly-PRをHela細胞に導入するとgemini of coiled bodyが有意に減少させ, ALSの病態を反映しているものと考えられた。</p> <p>1) Two different molecules involved in familial ALS, UBQLN 2 and OPTN are both involved in endosomal vesicles involved in proteolysis, have the function of connecting endosome and autophagy, and formed a novel protein quality control mechanism in endosome. 2) In DRP (dipeptidyl peptidase protein) by non-AUG (RAN) translation from abnormal elongation GGGGCC repetitive sequence, expression of poly-PR, which is strongly basic, significantly reduces gemini of coiled bodies and Cajal bodies into Hela cells and suggested that it reflects the pathology of ALS.</p>
Notes	<p>研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2015～2017 課題番号：15K09323 研究分野：神経内科</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K09323seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09323

研究課題名(和文) ALS/FTLDの治療ターゲット同定を目指した分子病態の解明

研究課題名(英文) Establishment of treatment target for ALS / FTLD

研究代表者

伊東 大介 (Ito, Daisuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80286450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1) 家族性ALSに関する2つの異なる分子UBQLN2、OPTNが共に蛋白分解に関わる endosomal vesicleに關与しており、endosomeとautophagyをつなぐ機能を持ち、late-endosomeとは独立した endosomeの新規の蛋白品質管理機構を形成していることを確認した。2) GGGGCC異常伸長反復配列からのnon ATG 翻訳によるDRP (dipeptidyl repeat protein)の中で塩基性の強いpoly-PRをHela細胞に導入するとgemini of coiled bodyが有意に減少させ、ALSの病態を反映しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：1) Two different molecules involved in familial ALS, UBQLN 2 and OPTN are both involved in endosomal vesicles involved in proteolysis, have the function of connecting endosome and autophagy, and formed a novel protein quality control mechanism in endosome. 2) In DRP (dipeptidyl repeat protein) by non-AUG (RAN) translation from abnormal elongation GGGGCC repetitive sequence, expression of poly-PR, which is strongly basic, significantly reduces gemini of coiled bodies and Cajal bodies into HeLa cells and suggested that it reflects the pathology of ALS.

研究分野：神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉変性症 optineurin ubiquilin2

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は進行性に上位、下位の運動ニューロンが障害を受け、数年のうちに呼吸不全に陥る難治性疾患である。しかしその疾患概念の確立から 140 年間を経た現在まで根本治療は確立していない。一方、近年原因遺伝子が次々と同定されたことにより、ALS と前頭側頭葉変性症 [fronto-temporal lobar degeneration (FTLD)] が共通の分子生物学的基盤をもつ疾患スペクトラムであることが示されつつある。その中で、病理学的アプローチから蓄積蛋白として同定された TDP-43 と染色体 16 番に連鎖する ALS6 の原因遺伝子として同定された FUS/TLS は、いずれも RNA 結合蛋白で ALS 以外にも FTLD でも封入体を形成することから共通の病態メカニズムの存在が想定されていた。我々は、TDP-43 では開始コドンのシフトにより核移行シグナルのない新規のアイソフォーム (p35iso) が存在することを見出した (Nishimoto et al. JBC, 2010)。この p35 iso は培養細胞に発現させることにより、RNA の代謝や品質管理に關与するストレス顆粒 (stress granule: SG) が誘導されることを示した。一方、FUS においても ALS 関連変異は核移行シグナルに集積し、核輸送が著明に障害されており、変異型 FUS の発現により TDP-43 の p35iso と同様に高率に SG を形成することを明らかにした (Ito et al. Ann Neurol. 2011)。さらに、ALS の遺伝子リスクである ataxin2 も、TDP-43、FUS の局在異常を増強しやはり SG の形成に關与することをしめした (Nihei et al. JBC, 2012)。このことから TDP-43、FUS と ataxin2 は RNA 結合蛋白という共通性だけでなく、3 つの ALS 関連分子が共同して細胞質への RNA 結合蛋白の異常局在、SG 形成を介し変性カスケードのトリガーとなり、RNA 品質管理機構の破たん、そして神経変性を引き起こすとの説を提唱している (Ito et al. Neurology, 2011)。一方、

近年新たな原因遺伝子 optineurin (OPNL)、ubiquilin (UBQLN)2、C9orf72 非翻訳領域 6 塩基反復配列の異常伸長が次々と同定されたが、その分子メカニズムは不明である。本研究では、新規 ALS/FTLD 原因遺伝子による神経変性分子機構の解明と新規の治療ターゲットの同定を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、近年同定された原因遺伝子 optineurin、ubiquilin2、C9orf72 6 塩基反復配列変異に注目し、発現細胞系を用い蛋白質品質と RNA 品質管理機構のクロストークを中心に分子病態を解析する。さらに、C9orf72 反復配列異常より翻訳される dipeptide-repeat protein (DRP) はトランスジェニック (Tg) マウス作製により in vivo レベルに解析を展開し、ALS/FTLD モデルマウスの樹立と新規治療ターゲットの確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) OPNL+/UBQLN2+ vesicle の細胞生物学的意義を見出すため、培養細胞系を用いて解析する。特に、endosome における新規の蛋白質品質管理機構の存在を明らかにするとともに ALS/FTLD の分子病態との関連を見出す。さらに、我々がすでに提唱しているもう一つの ALS/FTLD 病態メカニズムである RNA 品質管理機構の障害とのクロストークを明らかにするため、TDP-43 と FUS との相互作用を培養細胞にて検討する。

(2) 2011 年に報告された C9orf72 遺伝子非翻訳領域 6 塩基反復配列異常伸長は、C9orf72 タンパクの生理機能が未知でありながら ALS/FTLD の最も頻度の高い遺伝子変異であることが示され、その分子病態は大きな注目を集めている (c9ALS/FTD)。この遺伝子変異による運動ニューロン障害には 3 つの病態メカニズムが想定されている。即ち 異常伸長による C9orf72 の発現低下 (haploinsufficiency)、異常伸長反復配列 RNA への核内 RNA 結合蛋白異常集積 (RNA toxicity)、

異常伸長反復配列からの non ATG 翻訳による DRP (dipeptidyl peptidase protein)(poly glycine-alanine (GA), poly glycine-proline (GP), poly glycine-arginine (GR) および poly proline-alanine (PA), poly proline-arginine(PR)) の合成・蓄積による細胞毒性があげられる。C9orf72 6 塩基反復配列異常伸長の分子病態を明らかにするため、GGGGCC の繰り返し配列をさけて対応コドンから DRP (poly-GA, GP, GR) cDNA を合成し、DRP の生化学的、細胞生物学的特徴を培養細胞で解析する。この cDNA は、繰り返し配列がないため RNA toxicity を無視でき、DRP 自体の毒性を抽出できる。さらに、in vivo へと解析を展開させるため Thy-1 プロモーターによる DRP-tg マウスを作製しモデル動物の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) 我々は家族性 ALS に関与する 2 つの異なる分子 UBQLN2、OPTN が共に蛋白分解に関わる endosomal vesicle に関与しており、endosome と autophagy をつなぐ機能を持ち、late-endosome とは独立した endosome の新規の蛋白品質管理機構を形成していることを確認した。UBQLN2、OPTN それぞれの変異が、同一の endosomal vesicle の形成に障害をおよぼすことは、ALS の病態分子カスケードへの関与の可能性を示すとともに、OPTN と UBQLN2 が ALS の新規病態スペクトルをなしていることを示唆している。

(2) 我々は、DRP の中で塩基性の強い poly-PR に注目して細胞毒性を詳細に検討した。ALS 患者剖検脳では、Gemini of coiled body や Cajal body が減少していることが病理所見より報告されている。poly-PR を Hela 細胞に導入すると有意に Gemini of coiled body や Cajal body が減少しており、ALS の病態を反映しているものと考えられた。さらに、poly-PR により遺伝子発現の網羅的解析を行うため、poly-PR-GFP を Hela 細胞に導入し FACS にて回し、RNA-sequence T (Illumina

HiSeq 2500 platform)を行い変動する遺伝子を解析した。DAVID bioinformatics (<https://david.ncifcrf.gov/>)による Gene ontology 解析では、nucleosome に関連する遺伝子群、Heat shock に関する遺伝子群のそれぞれ上昇と低下が認められた。今後は、神経変性に関連する遺伝子の絞り込みを行い、治療ターゲットに繋がる遺伝子の同定をすすめたい。

(3) Thy1 プロモーター下で塩基性の強い poly-GR トランスジェニック(Tg)マウス作製ラインの樹立を達成した。現在 BL/6 との backcross を行っている。15 週齢の時点では体重減少、行動異常、運動障害、歩行障害などの表現型は認められていない。

(4) ALS 原因 RNA 結合蛋白には、以下の共通性を持つ。すなわち RNA 結合ドメインをもつ。プリオン様ドメインを持ち凝集性が高い。このドメインのアミノ酸配列は glycine/serine-tyrosine glycine/serine (G/S-Y-G/S)の繰り返し配列と glutamine(Q) が富むことが特徴である。ストレス顆粒 (Stress granule: SG)の構成分子である。死後脳で細胞質への局在異常を起こし封入体を形成する。新たな研究マテリアルを求めて、上記細胞生物学的特徴を持つ ALS 病態誘導人工 cDNA を合成し、哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。すなわち cDNA 作製に当たり以下の条件によりアミノ酸配列を設計した。G/S-Y-G/S の 67 リピートをコードする cDNA (SYG-NES-GFP)を塩基の繰り返し配列を極力避けた。また、G/S-Y-G/S のリピートに加えもう一つの特徴である glutamine (Q) に富む cDNA (SYGQ-NES-GFP)(50 リピート)も合成した。

RNA 結合部位は、特異的な RNA 結合を極力減らすため、植物 Citrus sinensis cultivar Pera poly(A)-binding protein 1 由来 RNA recognition motif をもちいた。Nuclear exit signal を配置し、細胞質への局在を誘導した。

タグとして GFP を C 末端に配置した。本

ALS 病態誘導人工遺伝子を培養細胞に導入してその細胞学的特徴を解析し以下の研究結果を得た。

ALS 病態誘導人工遺伝子は細胞質封入体を形成する。

ALS 病態誘導人工遺伝子はストレス顆粒の構成分子となる。

ALS 病態誘導人工遺伝子による神経系細胞 Neuro2a 細胞の突起伸展作用の抑制と細胞死誘導

ALS 病態誘導人工遺伝子の凝集性

プリオン様ドメインを含む人工 RNA 結合タンパク質の発現後による GEM の減少
人工遺伝子を培養細胞に導入することによって、細胞質に封入体形成、ストレス顆粒への移行、細胞毒性、凝集、GEM 減少を備えており ALS 関連分子の生化学的、細胞学的特性を再現できたと考えられる。今後は、ALS 病態誘導人工遺伝子モデル動物の確立を目指す。

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 13 件)

(1) Ito D, Hatano M, Suzuki N. RNA-binding proteins and the ALS/FTD pathological cascade. *Sci Transl Med*. 9:eaa5436 (2017). 査読有

(2) Mitsuhashi K, Ito D, Mashima K, Oyama M, Takahashi S, Suzuki N. De novo design of RNA-binding proteins with a prion-like domain related to ALS/FTD proteinopathies. *Sci Rep*. 2017;7(1):16871. 査読有

(3) Wake T, Tabuchi H, Funaki K, Ito D, Yamagata B, Yoshizaki T, Kameyama M, Nakahara T, Murakami K, Jinzaki M, Mimura M. The psychological impact of disclosing amyloid status to Japanese elderly: A preliminary study on asymptomatic patients with subjective cognitive decline. *Int Psychogeriatr*. 2017:1-5. 査読有

(4) Shiihashia G, Daisuke Ito D, Arai I,

Kobayashi Y, Hayashi K, Otsuka S, Nakajima K, Yuzaki M, Itohara S, Suzuki N. Dendritic homeostasis disruption in a novel frontotemporal dementia mouse model expressing cytoplasmic fused in sarcoma. *EBioMedicine*. 24:102-115 (2017). 査読有

(5) Farg MA, Konopka A, Ying Soo K, Ito D, Atkin JD. The DNA damage response (DDR) is induced by the C9orf72 repeat expansion in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Hum Mol Genet*. 6(15):2882-2896 (2017). 査読有

(6) Mashima K, Ito D, Kameyama M, Osada T, Tabuchi H, Nihei Y, Yoshizaki T, Noguchi E, Tanigawa M, Iizuka T, Date Y, Ogata Y, Nakahara T, Iwabuchi Y, Jinzaki M, Murakami K, Suzuki N. Extremely low prevalence of amyloid PET positivity in Parkinson's disease without dementia. *European Neurology*. 77(5-6):231-237 (2017). 査読有

(7) Furukawa K, Tomita N, Uematsu D, Okahara K, Shimada H, Ikeda M, Matsui T, Kozaki K, Fujii M, Ogawa T, Umegaki H, Urakami K, Nomura M, Kobayashi N, Nakanishi A, Washimi Y, Yonezawa H, Takahashi S, Kubota M, Wakutani Y, Ito D, Takahiro Sasaki, Matsubara E, Une K, Ishiki A, Yahagi Y, Shoji M, Sato H, Terayama Y, Kuzuya M, Araki N, Kodama M, Yamaguchi T, Arai H, A Randomized, Double-blind Placebo-controlled Multicenter Trial of Yokukansan for Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. *Geriatrics & Gerontology International*. 17(2):211-218 (2017).

(8) Shiihashi G, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Ebine T, Suzuki N. Mislocated FUS is sufficient for gain-of-toxic-function amyotrophic lateral sclerosis phenotypes in mice. *Brain*. 139(9):2380-2394 (2016). 査読有

(9) Yagi T, Ito D. TFG-Related Neurologic Disorders: New Insights Into Relationships Between Endoplasmic Reticulum and

Neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 75(4): 299-305 (2016). 査読有

(10) Yagi T, Ito D, Sugiyama D, Iwasawa S, Tabuchi H, Konishi M, Araki M, Saitoh N, Nihei Y, Mimura M, and Suzuki N. Diagnostic accuracy of neuropsychological tests for classification of dementia. *Neurology Asia*. 21(1):47-54 (2016). 査読有

(11) Osaka M, Ito D, Suzuki N. Disturbance of proteasomal and autophagic protein degradation pathways by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in ubiquilin 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 472(2):324-331(2016). 査読有

(12) Yamakawa M, Ito D, Honda T, Kubo KI, Noda M, Nakajima K, Suzuki N. Characterization of the dipeptide repeat protein in the molecular pathogenesis of c9FTD/ALS. *Hum Mol Genet*. 24(6):1630-1645(2015).

(13) Osaka M, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Suzuki N. Evidence of a link between ubiquilin 2 and optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 24(6):1617-1629 (2015). 査読有
〔学会発表〕(計 13 件)

(1) Shiihashi G, Ito D, Arai I, Kobayashi Y, Hayashi K, Otsuka S, Nakajima K, Yuzaki M, Itohara S, Suzuki N. A novel ALS and FTD model mouse expressing cytoplasmic mutant FUS leads neurodegeneration via synaptic disruption. *Neuroscience 2017 Washington, DC*, 2017.11

(2) Shiihashi G, Ito D, Arai I, Kobayashi Y, Hayashi K, Otsuka S, Nakajima K, Yuzaki M, Itohara S, Suzuki N. A novel ALS/FTD model mouse expressing cytoplasmic mutant fus leads neurodegeneration via dendritic homeostasis disruption. (Best Research Paper) *The XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017)*, Kyoto, 2017. 09.

(3) Mitsuhashi K, Ito D, and Suzuki N. De novo design of a cytoplasmic RNA-binding protein

with a prion-like domain related to ALS/FTD proteinopathies. *The XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017)*, Kyoto, 2017. 09.

(4) Shiihashi G, Ito D, Hayashi Y, Itohara S, Hayashi K, Nakajima K, Otsuka S, Yuzaki M, Suzuki N. Novel FTD model mice expressed cytoplasmic FUS in a toxic gain of function manner. *The 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders*, Vienna, Austria, 2017. 03

(5) Shiihashi G, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Kobayashi Y, Itohara S, Suzuki N. Novel FTD model mice expressed cytoplasmic FUS in a toxic gain of function manner. (優秀演題候補ノミネート) 第 35 回日本認知症学会、東京、2016.12.

(6) Ito D. Cytotoxic properties of dipeptide repeat proteins generated by repeat-associated, nonATG (RAN) translation on c9ALSFT. Ito D, Shiihashi G, Yagi T, Nihei Y, Kobayashi Y, Itohara S, Suzuki N. Mislocated FUS is sufficient condition to lead ALS/FTD-phenotype in a dominant gain-of-function manner. *11th Brain Research Conference, RNA Metabolism in Neurological Disease*. San Diego, USA, 2016. 11

(7) Shiihashi G, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Ebine T, Suzuki N. Mislocated FUS is sufficient condition to lead ALS-phenotype in a dominant gain-of-function manner. 第 57 回日本神経学会学術大会、神戸、2016. 5.

(8) Mashima K, Ito D, Kameyam M, Osada T, Yoshizaki T, Noguchi E, Jinzaki M, Murakami K, Suzuki N. Extremely low prevalence of amyloid PET positivity in Parkinson ' s disease without dementia. (優秀演題候補ノミネート) 第 35 回日本認知症学会、東京、2015.12.

(9) 伊東大介. 認知症診療の現状と先制医療 (シンポジウム) 第 14 回更年期と加齢のヘルスケア学会学術集会 第 3 回日本サプリメント学会学術集会、東京、2015.10.

(10) Shiihashi G, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Ebine T, Suzuki N. Evidence that toxic gain of function is sufficient condition in FUS proteinopathy. (優秀演題候補ノミネート) 第 34 回日本認知症学会、盛岡、2015.10.

(11) 伊東大介. ALS 分子から病態パスウェイ 第 45 回新潟神経学夏期セミナー 新潟、2015. 7.

(12) アルツハイマー病の病態と治療. (シンポジウム) 第 52 回日本リハビリテーション医学会 新潟、2015. 5.

(13) 山川真以, 伊東大介, 本田岳夫, 久保健一郎, 野田万里子, 仲嶋一範, 鈴木則宏. Evidence of a link between TDP-43 and dipeptide repeat protein in c9FTD/ALS. (最優秀口演賞候補ノミネート) 第 56 回日本神経学会学術大会, 2015.

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 伊東大介. 認知症 専門医が教える最新事情 講談社 (2017) p208

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 「筋萎縮性側索硬化症、及び前頭側頭型認知症の病態誘導人工合成遺伝子、及びこれを用いた病態モデル」

発明者: 伊東大介

権利者: 慶應義塾

種類: 特許

出願番号: 特願 2016-194526

出願年月日: 2016 年 9 月 30 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keio-med.jp/neurology/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊東 大介 (ITO, Daisuke)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師

研究者番号: 80286450