慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ALS病態誘導人工遺伝子によるALSモデルの確立と病態解明
Sub Title	Establishment of ALS model by artificial RNA-binding proteins related to ALS proteinopathies
Author	伊東, 大介(Itō, Daisuke)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、ALSを引き起こす原因遺伝子の特徴を持つアミノ酸配列を人工的に設計し、そのcDNAをマウスのROSA26遺伝子座へ導入することにより、人工ALSモデルマウスを作成、その分子機構を解析することを目的とした. 期間内にALS病態誘導人工遺伝子ノックインマウスラインを獲得できた。現在、計画繁殖を行っている. 一方、すでに我々が確立しているALSモデルマウス (核移行シグナル欠損FUS(△NLS-FUS) トランスジェニック) の解析から、脳脊髄で、多岐にわたるスプライシングの変化が初期より認められるとともに、シナプス可塑性に必要なSemaphorin 3Gの発現亢進していることを見出した. The aim of this study was to generate a novel ALS model, knocked-in mouse of artificially designing cDNA harboring with the characteristics of the ALS causative genes causing ALS and introducing into the ROSA26 locus to examined their cytotoxicity in vivo. We were able to obtain a line of ALS artificial gene knock-in mice. Currently, we are planning to breed them. On the other hand, from the analysis of our established ALS model mouse (△NLS-FUS transgenic), we found that a wide variety of splicing changes were observed in the brain and spinal cord and also that semaphorin 3G, which is required for synaptic plasticity, was upregulated in this mouse.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2018 ~ 2020 課題番号 : 18K07534 研究分野 : 神経内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K07534seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月 １８ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０７５３４

研究課題名（和文）ALS病態誘導人工遺伝子によるALSモデルの確立と病態解明

研究課題名（英文）Establishment of ALS model by artificial RNA-binding proteins related to ALS proteinopathies.

研究代表者
伊東　大介（ITO, Daisuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：８０２８６４５０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ALSを引き起こす原因遺伝子の特徴を持つアミノ酸配列を人工的に設計し、そのcDNAをマウスのROSA26遺伝子座へ導入することにより、人工ALSモデルマウスを作成、その分子機構を解析することを目的とした.
期間内にALS病態誘導人工遺伝子ノックインマウスラインを獲得できた。現在、計画繁殖を行っている．一方、すでに我々が確立しているALSモデルマウス（核移行シグナル欠損FUS(△NLS-FUS）トランスジェニック）の解析から、脳脊髄で、多岐にわたるスプライシングの変化が初期より認められるとともに、シナプス可塑性に必要なSemaphorin 3Gの発現亢進していることを見出した.

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究により、ALS病態誘導人工遺伝子が神経変性のトリガーとなることをin vivoで証明するとともに、運動ニューロンの選択的変性の分子機構をin vivoレベルで解析が可能となり、新規治療戦略の確立、薬剤の評価への利用が期待できる.
また、△NLS-FUSトランスジェニックマウスより見出されたSemaphorin 3Gは、バイオマーカーへの応用や治療ターゲットにつながることが期待される.

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to generate a novel ALS model, knocked-in mouse of artificially designing cDNA harboring with the characteristics of the ALS causative genes causing ALS and introducing into the ROSA26 locus to examined their cytotoxicity in vivo.
We were able to obtain a line of ALS artificial gene knock-in mice. Currently, we are planning to breed them. On the other hand, from the analysis of our established ALS model mouse (△NLS-FUS transgenic), we found that a wide variety of splicing changes were observed in the brain and spinal cord and also that semaphorin 3G, which is required for synaptic plasticity, was upregulated in this mouse.

研究分野：神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症　前頭側頭型認知症　TDP-43　FUS

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

（１）研究開始当初の背景

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の神経変性疾患である．2006 年，RNA 結合蛋白である TDP-43，2009 年に Fused in sarcoma （FUS)と ALS 疾患概念に変革を与える画期的な原因遺伝子が同定された．その後，分子遺伝学の発展に伴い ALS と若年性認知症である前頭側頭型認知症(frontotemporal dementia; FTD)の原因遺伝子が次々に同定され，両疾患が一つの疾患スペクトルを形成していることが明らかとなりその分子基盤の理解が急速に進んでいる． しかし，ALS/FTD は依然難治性であり，治療薬開発には分子病態の早期解明が強くのぞまれている．これまで同定された ALS/FTD を引き起こす原因遺伝子 6 つ TDP-43，FUS，TAF15，ESWR1，hnRNPA1，hnRNPA2 は，生化学的，細胞生物学的に共通性が見られる．すなわち 1) RNA recognizing motif (RRM) を持つ RNA 結合蛋白である．2) prion-like domain （PrLD) を持ち凝集性が高い． この PrLD はアミノ酸配列において 2 つの特徴があり glycine/serine-tyrosine glycine/serine (G/S-Y-G/S)の繰り返し配列があり，さらに glutamine (Q)に富む． 3) ストレス顆粒の構成分子である． 4) 患者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．これらの特徴は，ALS/FTD の分子病態を理解するにあたり極めて重要と考えられる．従来は，それぞれの遺伝子に複数ある ALS 変異を導入した cDNA を用いて研究されてきたが，その毒性は一定せず，再現性が乏しくは非効率的であり，新たな実験資材が求められていた．一方，約 100 年以上前に行われた化学物質投与などにより人工的に癌を発生させた人工癌の成功は，癌発症メカニズムの理解に大いに貢献し，現在の人工癌幹細胞研究へと発展している．人工的に疾患モデルを作成することはその病態を簡素化させ，実験条件の操作が容易となり強力な実験資材となる．本研究では，上記 4 つの特徴を持つアミノ酸配列を人工的に設計し，その cDNA を培養細胞，マウスに導入することにより，人工 ALS/FTD モデルを作成，その分子機構を解析する．本研究では，導入遺伝子のすべての機能が人工的かつ操作可能であり ALS 発症の必要・十分条件を明らかにすることが期待できる．

我々は，本申請研究に先行して上記 4 つの特徴を持つ 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． cDNA 作成に当たり以下の条件によりアミノ酸配列を設計した．1) 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．2) 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．3) Nuclear exit signal を配置し，細胞質への局在を誘導した．4) 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既に得ている．

① ALS 病態誘導人工遺伝子は細胞質封入体を形成する． 人工遺伝子を 293T 細胞に導入し，観察したところ． SYGQ-NES-GFP では，p62 陽性細胞質封入体の形成が確認できた（図 2）．封入体は，ALS/FTD の病理学指標である TDP-43 を取り込んでおり ALS/FTD の病理学的特徴である封入体を再現していると考えられた．

② ALS 病態誘導人工遺伝子は SG の構成分子となる． SG は，mRNA の翻訳制御，安定化，編集など RNA の品質管理機構を担うと考えられている．ALS/FTD 関連遺伝子 TDP-43，FUS などは，いずれも SG の構成分子である． Hela 細胞にヒ素にて SG（Hur 陽性）を誘導すると，

SYG/SYGQ-NES-GFP ともに SG に明確に共局在した．

③　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． 疾患特異的 iPS 細胞の研究より ALS/FTD 患者由来分化誘導神経細胞では，突起伸展障害が共通の表現型として報告されている．本人工遺伝子の突起伸展に関して検討するため，Neuro2a 細胞に遺伝子導入しレチノイン酸にて分化誘導を行った．細胞体の長軸の 2 倍以上の神経突起を持つ細胞の割合は，SYG/SYGQ-NES-GFP ともに有意に低下していた．これは，他の ALS/FTD 原因遺伝子の変異株より顕著な効果であった．従って，SYG/SYGQ-NES-GFP ともに神経系細胞の突起伸展の抑制作用を示すことが明らかとなった．

④　ALS 病態誘導人工遺伝子の凝集性． ALS/FTD 死後脳組織の生化学的検討で，RNA 結合蛋白の凝集性が観察されている．神経細胞株 Neuro2a 細胞に SYG/SYGQ-NES-GFP を導入しブロットをおこなった（．両蛋白は強い凝集性をしめしていた．以上より，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，SG への移行，細胞毒性，凝集を備えており 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．

（2）研究の目的

ALS　における重要な特徴とし，多くの ALS 関連遺伝子がユビキタス発現を示すのに，運動ニューロンに選択的変性がみられることにある．ALS 病態誘導人工遺伝子による運動ニューロンにおける選択的障害を解析するため遺伝子改変マウス樹立をめざす.本マウスが樹立した場合，生化学的，組織学的検査を行いその神経変性過程を検討する．特に，脊髄前角，末梢神経の変性は詳細に行う．行動解析としては生存曲線を比較するとともに，footprint，Rota-rod treadmill，hanging wire test を評価して運動能力，活動性を定量的に解析する．本研究により，ALS 病態誘導人工遺伝子が神経変性のトリガーとなることを *in vivo* で証明するとともに，運動ニューロンの選択的変性の分子機構を *in vivo* レベルで解析が可能となり，新規治療戦略の確立，薬剤の評価への利用が期待できる．**ALS 病態誘導人工遺伝子が神経変性のトリガーとなることを *in vivo* で証明するとともに運動神経の選択的変性、神経炎症の分子機構を *in vivo* レベルで解析が可能となる．**

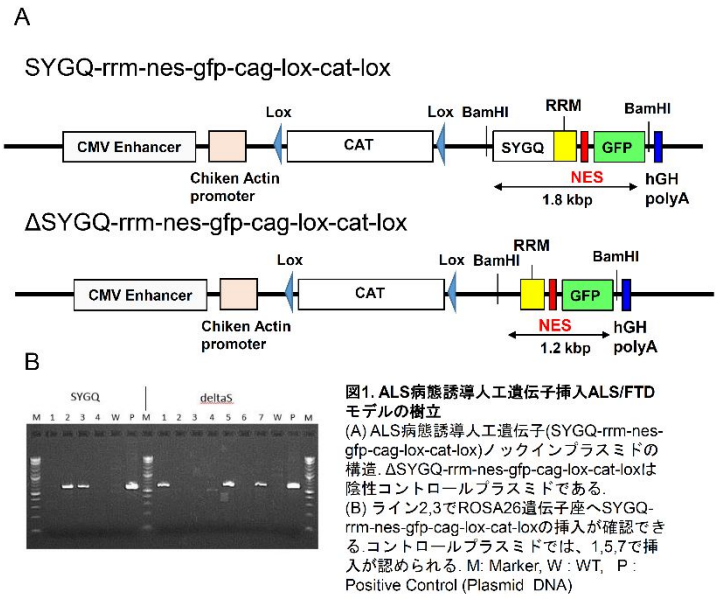

図1. ALS病態誘導人工遺伝子挿入ALS/FTDモデルの樹立
(A) ALS病態誘導人工遺伝子(SYGQ-rrm-nes-gfp-cag-lox-cat-lox)ノックインプラスミドの構造. ΔSYGQ-rrm-nes-gfp-cag-lox-cat-loxは陰性コントロールプラスミドである.
(B) ライン2,3でROSA26遺伝子座へSYGQ-rrm-nes-gfp-cag-lox-cat-loxの挿入が確認できる.コントロールプラスミドでは、1,5,7で挿入が認められる. M: Marker, W : WT, P : Positive Control (Plasmid DNA)

（3）研究の方法

Cre/loxP システムを利用した誘導発現をもつ ALS 病態誘導人工遺伝子遺伝子改変用ベクターを ROSA26 遺伝子座へのノックインベクターとして作製した(図 1A)．生理的レベルの発現プロモーターをもつ ROSA26 遺伝子座へのシングルコピー挿入により外来遺伝の安定的ユビキタス発現が可能となる．

一方、すでに我々が確立している ALS モデル遺伝子改変マウス（△NLS-FUS の tg マウス）の解析も進めた(Shiihashi G,. Brain. 2016;139(9):2380-94)． ALS の病態に関連した分子標的を同定する目的で、本マウスより、前頭葉、海馬、脊髄の RNA　seq.を行い変動する

遺伝子を網羅的に解析した．

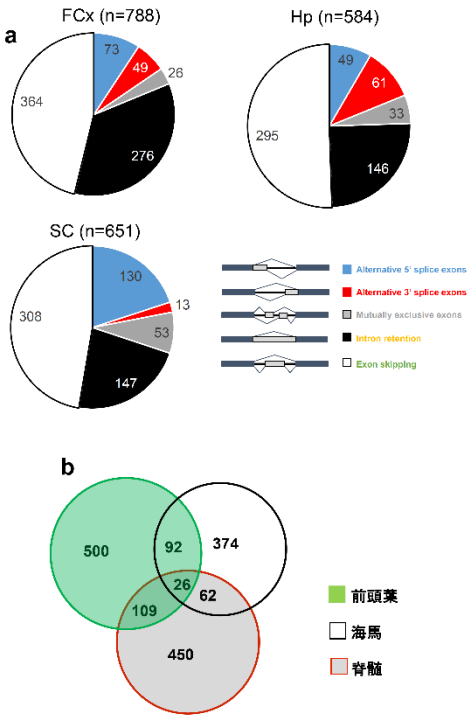

図2. ΔNLF-FUS tgマウスにおけるスプライシングの変化
(A)tgマウスの各組織で有意に変化したalternative splicingの合計を、野生型マウスと比較して円グラフで示した。B)ΔNLF-FUS tgマウスの3つの組織で変化した遺伝子の重複を示すベン図。

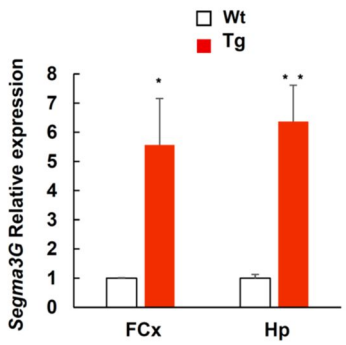

図3. 野生型およびtgマウスの脳におけるqRT-PCRの結果。
野生型マウス（n=4）と比較したtg系統（n=4）の前頭葉（FCx）および海馬(Hp)におけるSema3gのqRT-PCR解析。遺伝子発現はGAPDHで正規化して定量化した。*: P < 0.02. **: P < 0.005.

（4）研究成果

1）ノックインマウスはゲノム編集を用いて確立し(図 1B)、現在計画繁殖を予定している．Cre-LoxP システムを利用して(B6.Cg-Tg(CAG-Cre)CZ-MO20sb)と交配により外来遺伝の安定的ユビキタス発現での解析が可能となる．今後、樹立したマウスは、生化学的、組織学的検査を行いその神経変性過程を検討する． **本遺伝子はすべてのドメインが人工的に設計されているため強制発現による不要な生理機能を極力少なくすることができ，病態発現に必要なドメインを明確化させることが可能である．本研究により ALS 関連遺伝子による神経変性発現における十分条件を明らかにするとともに，ALS 病態解析の効率化を図ることが期待できる．**

2）ALS モデル遺伝子改変マウス（△NLS-FUS の tg マウス）の解析において、前頭葉、海馬、脊髄の網羅的トランスクリプトーム解析により、多彩なスプライシング異常(図 2)とシナップスの可塑性に関与する分泌蛋白 Sema3g の発現亢進を見出した(図３）(Ito et al．Sci，Rep．2020)．ALS と FTD の両表現型を示すモデルマウスは極めて貴重であり、本マウスにより RNA 品質管理異常が本疾患の病態の中核をなすことを見出し、ALS/FTD の病態解明や新規治療薬開発の進展に寄与できた．Semaphorin 3G は、バイオマーカーへの応用や治療ターゲットにつながる可能性が期待される．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Ito D, Taguchi R, Deguchi M, Ogasawara H, Inoue E.	４．巻 10(1)
２．論文標題 Extensive splicing changes in an ALS/FTD transgenic mouse model overexpressing cytoplasmic fused in sarcoma.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Sci Rep	６．最初と最後の頁 4857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61676-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Iwabuchi Y, Nakahara T, Kameyama M, Yamada Y, Hashimoto M, Ogata Y, Matsusaka Y, Katagiri M, Itoh K, Osada T, Ito D, Tabuchi H, Jinzaki M.	４．巻 32
２．論文標題 Quantitative evaluation of the tracer distribution in Dopamine Transporter SPECT for objective interpretation.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Ann Nucl Med.	６．最初と最後の頁 363-371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12149-018-1256-x. Epub 2018 Apr 13.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Funaki K, Nakajima S, Noda Y, Wake T, Ito D, Yamagata B, Yoshizaki T, Kameyama M, Nakahara T, Murakami K, Jinzaki M, Mimura M, Tabuchi H.	４．巻 19(4)
２．論文標題 Can we predict amyloid deposition by objective cognition and regional cerebral blood flow in patients with subjective cognitive decline?"	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Psychogeriatrics	６．最初と最後の頁 325-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/psyg.12397.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Iwabuchi Y, Nakahara T, Kameyama M, Yamada Y, Hashimoto M, Matsusaka Y, Osada T, Ito D, Tabuchi H, Jinzaki M.	４．巻 9
２．論文標題 Impact of a Combination of Quantitative Indices representing Uptake Intensity, Shape, and Asymmetry in DAT SPECT using Machine Learning: Comparison of different Volume-of-Interest Settings.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 EJNMMI Research	６．最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13550-019-0477-x	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　3件）

1．発表者名 Ito D, Mitsuhashi K, Suzuki N.
2．発表標題 De novo design of a cytoplasmic rna-binding protein with a prion-like domain related to als/ftd proteinopathies.
3．学会等名 5th RNA Metabolism in Neurological Disease Conference.（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Mimura M, Tabuchi H, Ito D.
2．発表標題 Tau-PET IMAGING OF ALZHEIMER AND NON-ALZHEIMER DEMENTIA USING 18F-PI 2620.
3．学会等名 . Alzheimer's & Parkinson's Diseases Congress.（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Wake T, Tabuchi H, Funaki K, Ito D, Yamagata B, Yoshizaki T, Kameyama M, Nakahara T, Murakami K, Jinzaki M, Mimura M
2．発表標題 Disclosure of amyloid status for risk of Alzheimer’s disease to cognitively normal persons with subjective cognitive decline
3．学会等名 Alzheimer's Association International Conference（国際学会）
4．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関