

Title	筋萎縮性側索硬化症におけるLIN28の細胞生存寄与に関する研究
Sub Title	Investigation of cellular toxicity induced by LIN28 in amyotrophic lateral sclerosis
Author	西本, 祥仁(Nishimoto, Yoshinori)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	はじめにヒト胚性幹細胞(ES細胞)由来運動神経細胞を用いた各種筋萎縮性側索硬化症(ALS)関連因子の導入実験系を確立した。成人ヒト脊髄組織において、仮説としていたLIN28の発現は認められなかったが、マグネトフェクション技術を応用した結果、ヒト運動神経細胞においてALS病態に関連の深いTDP-43の26k-Da C末アイソフォームおよび変異型TDP-43が直接的な細胞毒性作用を有することが証明された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2011～2012 課題番号：23791002 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23791002seika

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.

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791002

研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症における LIN28 の細胞生存寄与に関する研究

研究課題名（英文） Investigation of cellular toxicity induced by LIN28 in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

西本 祥仁 (NISHIMOTO YOSHINORI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30398622

研究成果の概要（和文）：はじめにヒト胚性幹細胞(ES 細胞)由来運動神経細胞を用いた各種筋萎縮性側索硬化症(ALS)関連因子の導入実験系を確立した。成人ヒト脊髄組織において、仮説としていた LIN28 の発現は認められなかったが、マグネトフェクション技術を応用した結果、ヒト運動神経細胞において ALS 病態に関連の深い TDP-43 の 26k-Da C 末アイソフォームおよび変異型 TDP-43 が直接的な細胞毒性作用を有することが証明された。

研究成果の概要（英文）：We established the procedures of transfection into human motor neurons derived from embryonic stem (ES) cells, of which magnetofection was proved most useful. Taking advantage of this procedure, 26k-Da C terminal isoform and mutant forms of TDP-43, that is one of the ALS-associated factors, were shown to have cellular toxicity in human ES cell-derived motor neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 (ALS), TDP-43, 胚性幹細胞 (ES 細胞), 運動神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

ALS は周知の通り、意識を清明に保ったまま数年内に上位、下位運動神経細胞が変性死を引き起こす、世界的に見ても治療法の開発が一刻も早く求められている疾患の一つである。2004 年には孤発性 ALS の脊髄運動神経細胞内における RNA 編集異常が同定され (Kawahara et al, Nature, 2004), 2006 年には ALS の患者の病理で観察される細胞質封入体のユビキチン化タンパクとして TDP-43 が同定された (Arai et al, Biochem Biophys Res Commun, 2006, Neumann et al, Science, 2006). さらに遺伝子検索の手法の発展とともに多くの原因遺伝子が同定され、その中にはこの TDP-43 の他にも FUS/TLS など多くの RNA 結合タンパクが含まれている。TDP-43 を

基軸としたさまざまな研究の背景、とりわけ TDP-43 をノックダウンした細胞を用いた microRNA population 検索の結果から (Buratti et al, FEBS J, 2010), ALS においては TDP-43 蓄積に伴う let-7b の上昇とそれに伴い制御される LIN28 の発現低下が推測された。

一方で、ヒト ES 細胞、iPS 細胞の樹立と各種神経系細胞への分化誘導技術がこの数年で飛躍的に進歩し、運動神経細胞への分化誘導も可能となった。そして、TDP-43 遺伝子に変異を有する家族性 ALS の iPS 細胞から分化させた運動神経細胞に関する各種検討も報告された (Egawa et al, Sci Transl Med, 2012)。しかし、正常運動神経細胞への各種病態因子の導入により細胞死が誘導される

か否か、についての検討はまだなされておらず、病因となる候補因子が gain of toxic function を呈するものであるかどうかは不明のままであった。

2. 研究の目的

ヒト正常脊髄組織の LIN28 発現レベルおよび ALS 脊髄組織の LIN28 発現レベルを比較検討し、ALS で LIN28 が低下している可能性について検索することを最初の目的とした。さらに LIN28 の寄与の可能性が少ない場合には、ヒト ES 細胞由来の運動神経細胞を実際に用いて、ベクター導入するための至適条件を検討した上で、LIN28 よりも ALS の病態において重要性が高いと考えられる各種 TDP-43 アイソフォーム、変異体の細胞毒性を比較検討することを目的とした。また ALS 病態に関連する現象として知られている RNA 編集異常と関連して、RNA 編集酵素 ADAR2 のより効率的なノックダウン系を確立することによって RNA 編集異常と TDP-43 の 26k-Da C 末断片生成の関連性についても検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 倫理委員会において承認されたヒト全脊髄より抽出液を得て、LIN28 タンパクの発現レベルをウェスタンブロットにより同定した。

(2) ヒト ES 細胞由来運動神経細胞への遺伝子導入に際し、各種プロモーター、培養液条件を変えてマグネトフェクションを行い、至適遺伝子導入条件を検索した。さらにその条件において、C 末に V5 タグを付加した TDP-43 全長、35-kDa アイソフォーム、26-kDa アイソフォーム、A315T 変異体、A382T 変異体を導入し、ethidium homodimer-1 (EthD-1) と V5 免疫細胞染色による共染色により運動神経細胞死への寄与を比較検討した。

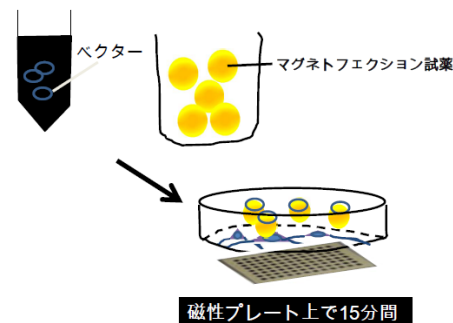
(3) 複数作成した候補の中から shRNA による安定した ADAR2 ノックダウンの系を *in vitro* で確立し、全長 TDP-43 タンパクに対する 26-kDa C 末断片の生成効率の変化を HeLa 細胞を用いて、ウェスタンブロットによって検討した。また逆に ADAR2 を過剰発現した系においても 26-kDa C 末断片の生成効率を比較検討した。

(4) 細胞毒性を示さず、細胞保護に働いていると考えられるヒト 35k-Da C 末アイソフォームの生成機序解明のために、TDP-43 エクソン 1-エクソン 2-エクソン 3 のスプライシングアイソフォームを PCR および Bioanalyzer により検討し、各種バリエーションをシーケンス解析した。そして、新たな TDP-43 エクソン 2 のスプライシングパターンに影響する因子を検討するために、複数のヒト由来試料を用いて単塩基多型 (SNPs) についてシーケンス解析を行った。

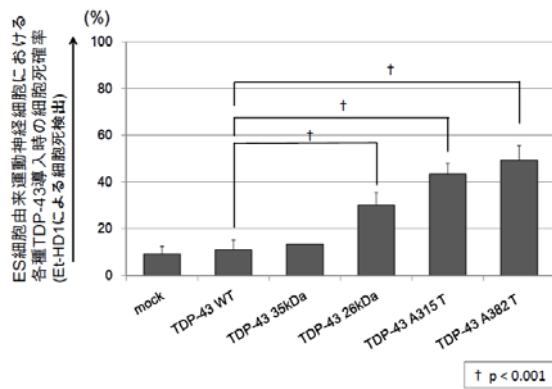
4. 研究成果

(1) LIN28 のヒト正常脊髄組織における発現が認められず、ヒト ES 細胞由来運動神経細胞を用いた系において、より ALS 病態に重要性があると考えられる TDP-43 の各種アイソフォームに注目していく方針とした。

(2) まず、California Stem Cell の Dr. Hans Keirstead のグループと協力して、ヒト ES 細胞由来運動神経細胞の安定した培養系を用いた各種プロモーター、血清および組成の異なる各種培地を組み合わせる至適遺伝子導入条件の検索を行った。その結果、CMV プロモーターあるいは CAG_{SS} プロモーターを用いて、マグネトフェクション技術(下図)を応用することにより、分化成熟運動神経細胞への効率的な遺伝子導入が可能となった。



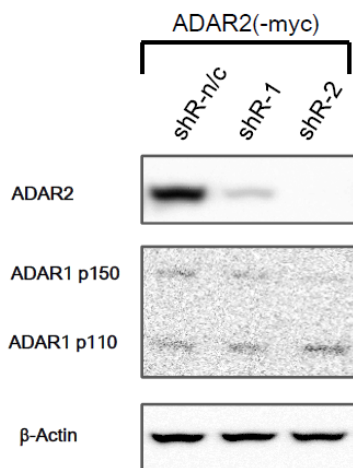
次に、これまでまだ直接的な gain of toxic function が示されてこなかった TDP-43 の各種アイソフォームおよび変異体を外来的にこの ES 細胞由来運動神経細胞に導入した結果、26k-Da アイソフォームおよび p. A315T, p. A382T 変異体のいずれの導入時においても、mock および WT TDP-43 導入時に比較して有意に細胞毒性を有することが示された (次ページ図)。



一方で 26k-Da と共に代表的な TDP-43 の アイソフォームである 35k-Da C 末断片は mock および WT TDP-43 導入時に比較して有意な毒性を有さなかった。

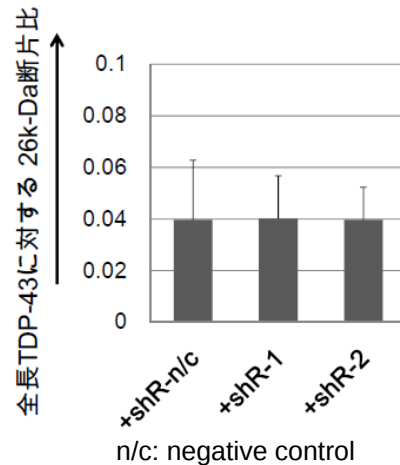
以上の結果を *Neurology and Clinical Neuroscience* 1(1):24-31, 2013 にすでに報告した。本成果は、内在性変異 TDP-43 を有する疾患 iPS 細胞由来運動神経細胞で報告された細胞表現型とは異なる観点から、今後の病態解明に大きく寄与し得るものであると考えられた。

(3) 研究代表者が以前報告した siRNA を用いた ADAR2 のノックダウンの系 (*Nishimoto et al, Neurosci Res* 61(2):201-206, 2008) を基礎として、より効率的かつウイルス使用による恒常的ノックダウン系への応用を可能とするため、導入細胞内で GFP を同時発現する shRNA ベクターを作成し、これを確立した (下図)。

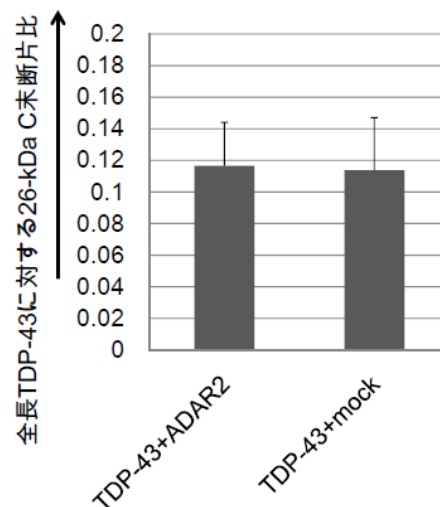


さらに ADAR2 のノックダウン時に、上記実験で毒性の示された 26k-Da C 末断片の生成効率に差が生じるか否かを検討した結果、ADAR2 活性の低下が TDP-43 の 26k-Da

C 末断片の生成には影響を及ぼさないことが示唆された (下図)。



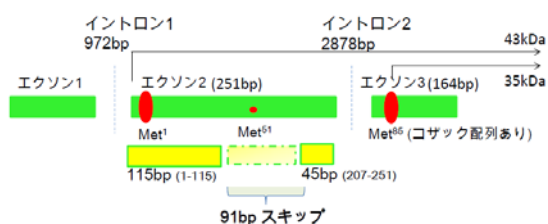
一方、TDP-43 とともに ADAR2 を過剰発現させた HeLa 細胞の系においても 26k-Da C 末断片の生成に変化がなかったことから (下図)、HeLa 細胞を用いた *in vitro* の系では、RNA 編集酵素である ADAR2 の活性変化は TDP-43 26k-Da C 末断片の生成に対して直接的な影響を及ぼさないと考えられた。



(4) 次に ES 細胞由来運動神経細胞を用いた毒性試験により毒性を示さなかった 35k-Da C 末アイソフォームの生成機序を検索する目的で、まずはヒト培養細胞 (HeLa 細胞, HEK293T 細胞) の発現する mRNA を抽出して、エクソン 1-エクソン 2-エクソン 3 のスプライシングバリエーションの検索を行った。その結果、エクソン 2 上の 51 位メチオニンコード領域を含む 91 塩基がスキップされたこれまでに報告をみないプロセッシング様式のバ

リアントフォームが存在していることを確認した(下図)。

TDP-43 エクソン 2 上における 91bp スキップ



本バリエーションのスキップ領域はエクソン 2 の 5' 端および 3' 端とは一致しないエクソン 2 上の中央にあった。さらにこのエクソン 2 のスプライシングとの関連が予測される領域の SNPs を検討したところ、SNPs が集中して存在していることが確認された。現在、このバリエーションフォームの生成機序についてもさらに検討を進めている。

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 1 件)

① Yoshinori Nishimoto, Hirotaka J. Okano, Takao Imai, Aleksandra J. Poole, Norihiro Suzuki, Hans S. Keirstead, Hideyuki Okano. Cellular toxicity induced by the 26-kDa fragment and amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated mutant forms of TDP-43 in human embryonic stem cell-derived motor neurons. *Neurology and Clinical Neuroscience* 査読あり, 1(1):24-31, 2013 (doi:10.1111/ncn3.2)

[学会発表] (計 3 件)

① 西本祥仁, 鈴木則宏, 岡野栄之「孤発性 ALS の運動神経細胞において特異的に出現する核内構造体の同定」第 54 回 日本神経学会学術大会 (東京国際フォーラム), 2013 年 5 月 31 日

② Yoshinori Nishimoto, Hirotaka James Okano, Takao Imai and Hideyuki Okano. 'Investigation into cellular toxicity induced by TDP-43 expression in human ES cell-derived motor neurons' poster presentation, The 4th symposium on Brain and Mind Research in the Asia-Pacific (BMAP 2012), (Keio University, Mita, Tokyo), 2012 年 8 月 29-31 日

③ 西本祥仁, 岡野ジェームス洋尚, 今井貴雄, 鈴木則宏, 岡野栄之「ヒト胚性幹細胞由来運動神経細胞での TDP-43 発現による細胞毒性の検討」第 53 回 日本神経学会学術大会 (東京国際フォーラム), 2012 年 5 月 25 日

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 祥仁 (NISHIMOTO YOSHINORI)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 30398622