創薬に向けた筋萎縮性側策硬化症の分子病態の解明と新規治療ターゲットの同定

サブタイトル：筋萎縮性側策硬化症の分子病態の解明と新規治療ターゲット

英文タイトル：Molecular pathogenesis of Amyotrophic lateral sclerosis for therapy

慶應義塾大学神経内科

伊東大介

＜背景＞

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は進行性に上位・下位運動ニューロンが障害される致死的難治性疾患であるが、現在まで根本治療は確立していない。近年原因遺伝子が次々と同定され、ALS および共に疾患スペクトラムを形成する前頭側頭葉変性症（Frontotemporal lober degeneration: FTLD）の疾患関連遺伝子はタンパク質品質管理機構と RNA 代謝の２つの系に収束しつつある[1-3]。しかし 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)[4,5]。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 1) 異常伸長による C9orf72 の発現低下(haplo insufficiency)[4]、2)異常伸長反復配列 RNA への核内 RNA 結合蛋白異常集積（RNA toxicity）[6,7]、3) 異常伸長反復配列からの non ATG 翻訳による DRP (dipeptiderepeat protein)(poly glycine-alanine (GA), poly glycine-proline (GP), poly glycine-arginine (GR)および poly

proline-alanin(PA), poly proline-arginine(PR))の合成・蓄積による細胞毒性[8,9]があげられる。 これまで、1)と 2)に関しては、モデル動物や iPS 細胞による検討が報告されているが、DRP よる細胞毒性や分子病態への関与は依然不明である。 我々は DRP そのものの細胞毒性を解析するため、GGGGCC の繰り返し配列を避けて対応コドンから DRP100 リピートをコードする cDNA をそれぞれ合成した。 GGGGCC の繰り返し配列がないため RNA toxicity が無視でき、それぞれの DRP の特性を抽出できることとなる。この cDNA を用い ALS の病態首座とされる蛋白質品質と RNA 品質管理機構を中心に分子病態を解析した。

＜結果＞

(1)DRP と封入体形成

DRP をエンコードする cDNA を Neuro2a 細胞に発現させたところ、poly-GA は高分子の凝集塊を形成し、細胞質と核の両方に封入体を形成した。ALS/FTLD の一般的な病理学的特徴に変性神経組織における TDP-43 陽性封入体の存在が挙げられるが、C9ALS/FTD の患者脳ではこれとは別に TDP-43 陰性、ユビキチン/p62 陽性の封入体として DRP が沈着していることが報告されている[10,11]。Poly-GA は Neuro2a 細胞及びマウス大脳皮質神経細胞、また子宮内電気穿孔法によりプラスミドを発現させたマウス大脳皮質において、c9ALS/FTD に特異的な封入体に類似したユビキチン陽性の封入体を単独で形成することが判明した（Figure 1-3）。この封入体形成が poly-GA のリピート数に依存するか否か、リピート数バリアントの cDNA を合成し調べたところ、100 リピートと比べ 46 リピート以下で

は有意な封入体の減少を認めた。Poly-PR も高分子の凝集塊を形成し細胞質に封入体を形成したが、ユビキチンおよび p62 は陰性であった。

一方 293T 細胞において poly-GR および poly-PR は細胞質に封入体を形成し、また核小体に強い集積を示した。この封入体はユビキチン/p62 陰性であったが、ALS/FTLD の重要な関連タンパク質である TDP-43 陽性であり、他にも種々の RNA 顆粒構成タンパクと共局在を示した。このことからアルギニンに富んだ塩基性 DRP は、TDP-43 を含む RNA 代謝に関わるタンパク質の局在を変化させ、その機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。また２種の DRP を共発現させ局在を観察したところ、poly-GA の封入体は他の DRP と共局在しなかったのに対し、poly-GR および poly-PR は他の DRP を引き込んで封入体を形成しており、c9ALS/FTD のユビキチン陽性封入体の種となっている可能性が示された。

(2)DRP とタンパク分解機構

DRP が細胞内でどのように分解され、除去されるかを調べるため、Neuro2a 細胞をオートファジー阻害剤である 3-Methyladenine(3-MA)またはユビキチン・プロテアソーム系の阻害剤である MG132 処理して DRP の量を定量したところ、poly-GA は主にオートファジーによって分解され、poly-GP、-GR、-PR はオートファジーとユビキチン・プロテアソーム系の両方で分解されることが明らかとなった。野生型マウス繊維芽細胞では poly-GA の封入体形成は見られなかったが、オートファジーが欠損した *ATG5*(-/-)繊維芽細胞では有意に封入体形成が増加した。

次に DRP が細胞のタンパク質品質管理機構にどのような影響を与えるか調べるために、Neuro2a 細胞にユビキチン・プロテアソーム系の速い分解基質であるレポータータンパク質（ユビキチン 76V-GFP）と DRP を共発現させ、レポータータンパク質量を定量したところ、poly-GA、-GP、-GR でレポーターの有意な蓄積が観察され、これらの DRP はユビキチン・プロテアソーム系を障害していることが示唆された（Figure 4）。ALS/FTLD 関連蛋白である TDP-43 はオートファジーおよびユビキチン・プロテアソーム系のどちらの基質でもあるが、DRP と共発現させ定量したところ、やはり poly-GA、-GP、-GR 存在下では TDP-43 が蓄積することが明らかになった。

(3) DRP による細胞毒性

DRP による細胞毒性を定量するため、Neuro2a 細胞に DRP を発現させ、活性化カスパーゼ 3 陽性細胞の割合を調べたところ、poly-GR 陽性細胞は有意な細胞死が観察された。またユビキチン・プロテアソーム系の障害による細胞毒性を定量するために MG132 処理をして同様の解析を行ったところ、poly-GA、-GP、-GR では未処理よりも細胞死の頻度が有意に増加した。これらの結果から、poly-GR は未知の機序によって高い細胞毒性を有することが考えられるが、poly-GA、-GP とともにユビキチン・プロテアソーム系の障害を通じて細胞毒性を発揮する可能性が示唆された。

(4) poly-PR による細胞毒性の解析

次に塩基性の強い poly-PR に注目して細胞毒性を詳細に検討を進めた。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 [12]**。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**（Figure 5）。

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、表 1 に示すごとく、**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、さらに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。**

(5) C9orf72 塩基反復配列異常伸長のモデル動物の確立

in vivo での解析を展開するため DRP cDNA を、Thy-1 プロモーターカセットの下流に導入し DRP トランスジェニックマウの作成を行っている. 本年は上記の結果より poly-PR-GFP のトランスジェニックマウス確立を試みた。本マウスは、DRP の蓄積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、新規治療戦略の確立、バイオマーカー、薬剤の評価に強力な役割を担うと期待できる. poly-PR トランスジェニックマウスの 1 ライン（#PR-6）で、運動神経変性を示す Abnormal limb reflex の出現を確認しているが、12 週の時点でその他大きな運動障害は認めていない. 今後は、生化学的（TDP-43、

不溶分画、細胞質分画)、組織学的検査を行いその神経変性過程を検討する．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．

＜結論＞

本研究により、C9orf72 遺伝子変異より生じる DRP はタンパク質品質管理機構を障害し、TDP-43 の凝集を引き起こして神経を変性させるという病態機序が示唆された。また塩基性 DRP である poly-GR および poly-PR は RNA 結合タンパク質と共局在し、RNA 代謝に干渉している可能性も同時に示唆された（Figure 6)。C9orf72 遺伝子変異による病態仮説には未知の点が多いが、現在 ALS/FTLD の病態機序として考えられているタンパク質品質管理機構および RNA 品質管理機構の両方に、DRP を介して影響を及ぼしていると考えられる。今後も ALS/FTLD の原因遺伝子として最も頻度が高い c9ALS/FTD の病態機序の解明を進めることで、根治療法の確立に近づけることが期待される。

＜今後の展望＞

急速な高齢社会の進行により認知症を含む神経変性疾患の医療費の高騰はとどまるところを知らず、わが国の医療財政を圧迫している． 神経変性疾患における医療、介護はわが国おいて最も大きな課題の一つといえる． その中の一つ ALS は進行性に運動神経が障害をしめし、数年のうちに呼吸不全に陥る致死性の疾患で、もっとも悲惨な疾患の一つとして認

知されている．しかし、疾患の診断法、重症度を反映するバイオマーカーも確立しておらず、本疾患の患者、介護者の不安、絶望感は計り知れない． 一方、近年原因遺伝子が次々と同定されたことにより、ALS と若年性認知症の代表である FTD が共通の分子基盤をもつ疾患スペクトラムであることが明らかとなった．さらに、神経変性疾患は病因蛋白の異常蓄積と伝播といった共通の病態メカニズムをもつことがわかり、ALS/FTD の病態メカニズムの理解は、他の神経変性疾患、アルツハイマー病やパーキンソン病の理解へと展開が可能である．

特記すべきことは、同定されたほとんどの ALS 関連遺伝子は TDP-43 を首座とする RNA 品質管理機構と OPNL と p62 を中心とした蛋白品質管理機構に集約されている点である。本我々は、2 つの経路はクロストークし相互関連する病態経路を構成しているものと仮説している（Figure 7）．プロジェクトの次の目標として、二つのパスウェイのクロストークを明らかとする． とくに、OPNL、UBQLN2、C9orf72 反復配列異常伸長は、この 2 経路を結び付ける重要な分子と考えており、in vitro にのみならず、in vivo へと解析対象を展開させ、これら神経変性カスケードの解明と新規治療ターゲットを見出すことをめざしたい．

文献

1. Ito D, Suzuki N. Conjoint pathologic cascades mediated by ALS/FTLD-U linked RNA-binding proteins TDP-43 and FUS. *Neurology* 2011; **77**(17): 1636-43.

2. Lagier-Tourenne C, Cleveland DW. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* 2009; **136**(6): 1001-4.

3. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 2013; **79**(3): 416-38.

4. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; **72**(2): 245-56.

5. Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; **72**(2): 257-68.

6. Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, et al. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature* 2015; **525**(7567): 56-61.

7. Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, et al. GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature* 2015; **525**(7567): 129-33.

8. Yamakawa M, Ito D, Honda T, et al. Characterization of the dipeptide repeat protein in the molecular pathogenesis of c9FTD/ALS. *Hum Mol Genet* 2015; **24**(6):

1630-45.

9. Kaus A, Sareen D. ALS Patient Stem Cells for Unveiling Disease Signatures of Motoneuron Susceptibility: Perspectives on the Deadly Mitochondria, ER Stress and Calcium Triad. *Front Cell Neurosci* 2015; **9**: 448.

10. Gomez-Deza J, Lee YB, Troakes C, et al. Dipeptide repeat protein inclusions are rare in the spinal cord and almost absent from motor neurons in C9ORF72 mutant amyotrophic lateral sclerosis and are unlikely to cause their degeneration. *Acta Neuropathol Commun* 2015; **3**: 38.

11. Mackenzie IR, Arzberger T, Kremmer E, et al. Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol* 2013; **126**(6): 859-79.

12. Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, et al. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2013; **22**(20): 4136-47.