

2013 年 6 月 6 日
新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター

筋萎縮性側索硬化症の新たな病態メカニズムの発見

ポイント

- ・ 代表的な神経難病である筋萎縮性側索硬化症の病態生理の一つを解明
- ・ 小児の運動神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症との共通性
- ・ RNA 代謝に関連した病態生理からの将来的な治療法への期待

要旨

新潟大学脳研究所(高橋均所長)は、神経難病の一つである筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis、以下 ALS)^{*1}における運動神経細胞死に核内小体^{*2}である GEM^{*3}小体の減少と機能性 RNA の一種である snRNA^{*4}の発現低下が関与することを明らかにしました。これは新潟大学脳研究所 神経内科学分野 石原智彦助教、分子神経疾患資源解析学分野 小野寺理教授らの研究グループによる成果です。

ALS はいまだに病態機序が解明されておらず、根本的な治療法の確立されていない代表的な運動神経変性疾患です。近年の研究からその運動神経細胞死には TDP-43^{*5}という蛋白質の機能喪失が関連することが確実視されていますが、その具体的な病態機序はなお明らかになっていません。

研究グループは小児の運動神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症(SMA)^{*6}で明らかになっている、GEM 小体および snRNA の減少に注目しました。TDP-43 蛋白質の量を低下させた培養細胞および ALS 患者組織を対象として、免疫染色法^{*7}で GEM の減少を、逆転写定量 PCR^{*8}で snRNA の低下がみられることをそれぞれ明らかにしました。snRNA は mRNA^{*9}のスプライシング^{*10}に関与する機能的 RNA であり、ALS の病態生理にスプライシング異常が重要であることが想定されます。今回の成果は、ALS 発症の仕組みの解明につながるとともに、将来的な治療法の開発にも結びつくことが期待できます。また 2 つの運動神経変性疾患に共通するメカニズムが存在することを示した点からも重要な発見といえます。

本研究成果は、英国の科学雑誌『*Human Molecular Genetics*』に掲載されるに先立ちオンライン版(6月4日付け:日本時間6月6日)に掲載されます。

背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は代表的な運動神経変性疾患であり、成人発症で進行性に全身の運動神経が障害され最終的には呼吸不全を来します。いまだに病気の進行をとめる有効な治療法が開発されていない神経難病の一つです。ALS の運動神経細胞死を説明する有力な仮説の一つに「TDP-43 という蛋白質の機能喪失により細胞死がおこされる」というものがあります。TDP-43 は細胞内の「核」という場所に通常は存在していますが、ALS 患者の運動神経細胞では核から TDP-43 が消失し、細胞質内で封入体という塊を形成しているからです。また本研究グループを含む複数の施設より TDP-43 遺伝子の異常が ALS を引き起こす事が報告されています。

しかし TDP-43 の機能喪失が、どのように神経細胞死に関わるのかについては、様々な説が提唱されていますが、いまだ決定的なものはありません。本研究では小児の運動神経変性疾患である、脊髄性

筋萎縮症(SMA)で明らかになっている、GEM小体とsnRNAの低下に注目し、ALSにおいてもTDP-43の機能低下を介して同様の異常が存在することを明らかにすることを目指しました。

研究手法と成果

研究グループは、TDP-43とGEM小体が細胞の核内でしばしば隣り合って存在すること(図1)に注目しました。このような場合、TDP-43がGEM小体の形成に関与していることが予想されます。これを確認するためにRNA干渉^{*11}でTDP-43蛋白質を低下させた培養細胞を作成し、免疫染色を行い核内のGEM小体の数を観測しました。するとTDP-43が低下した細胞では明らかにGEM小体が低下することがわかりました。さらにALS患者由来の脊髄運動神経細胞でも同様の検討を行ったところ、対照群と比較してGEM小体数の明らかな低下を認めました。

GEM小体の機能としてsnRNAの成熟、安定に関与することが知られており、GEM小体の低下している細胞ではsnRNAの低下が予想されます。これを裏付けるために、定量的逆転写PCR法でsnRNAの定量を行いました。まず培養細胞での実験においてTDP-43の低下がsnRNA低下を引き起こすこと、細胞の種類によってその効果が異なることを確認しました。さらにALS患者由来の脊髄および大脳皮質運動野においてもsnRNAの低下があることを認めました。ALSで障害されない小脳や腎臓などの臓器ではこの低下は認めませんでした。snRNAは複数の種類がありますが、ALS障害組織においてはU12 snRNAが主に低下していました。他施設から報告されているSMAの先行研究でもU12 snRNAの低下が報告されています。我々の研究結果からは運動神経変性疾患であるALSとSMAに共通するメカニズムとして、U12 snRNA低下を介したスプライシング異常があることが想定されました。

今後の期待

ALS、SMAを含めた運動神経変性疾患は難治性の進行性疾患であり、病態生理の解明と治療法の確立が望まれます。今回の成果から運動神経変性疾患の共通の病態生理としてのU12 snRNAの低下とスプライシング異常が想定され、より具体的な運動神経細胞死の仕組みの解明につながることが期待できます。また先行するSMAの治療研究をALSに応用することも期待できます。また2つの運動神経変性疾患に共通するメカニズムが存在することを示した点からも重要な発見といえます。

原論文情報

Tomohiko Ishihara、Yuko Ariizumi、Atsushi Shiga、Taisuke Kato、Chun-Feng Tan、Tatsuya Sato、Yukari Miki、Mariko Yokoo、Takeshi Fujino、Akihide Koyama、Akio Yokoseki、Masatoyo Nishizawa、Akiyoshi Kakita、Hitoshi Takahashi、Osamu Onodera
“Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis” *Human Molecular Genetics*, 2013 doi: 10.1093/hmg/ddt262

発表者 お問い合わせ先

新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

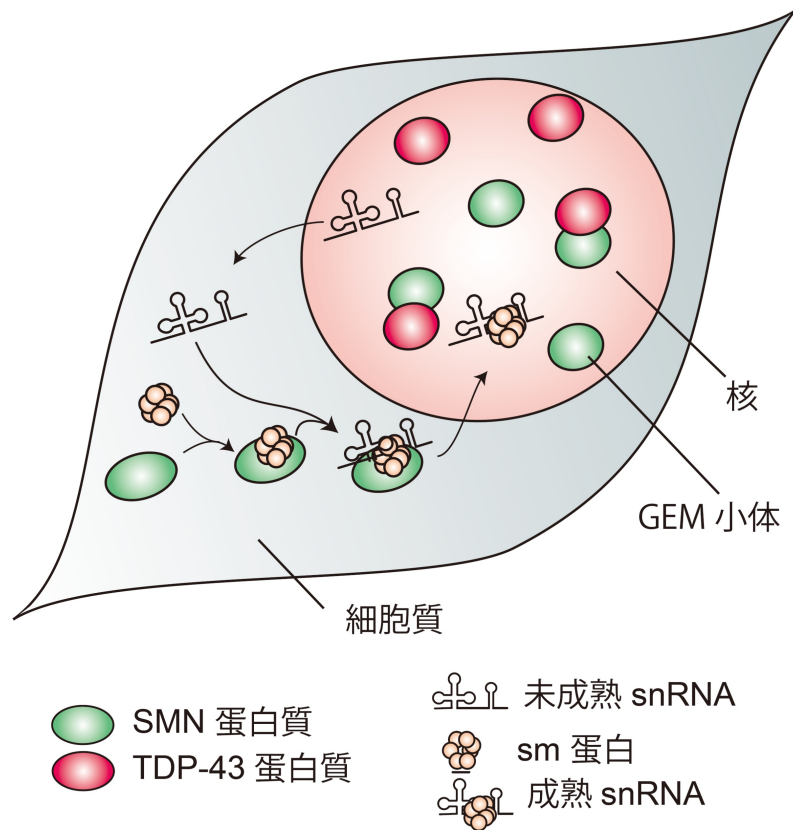
分子神経疾患資源解析学分野

チームリーダー 小野寺 理 (おのでら おさむ)

研究員 石原 智彦 (いしはら とむひこ)

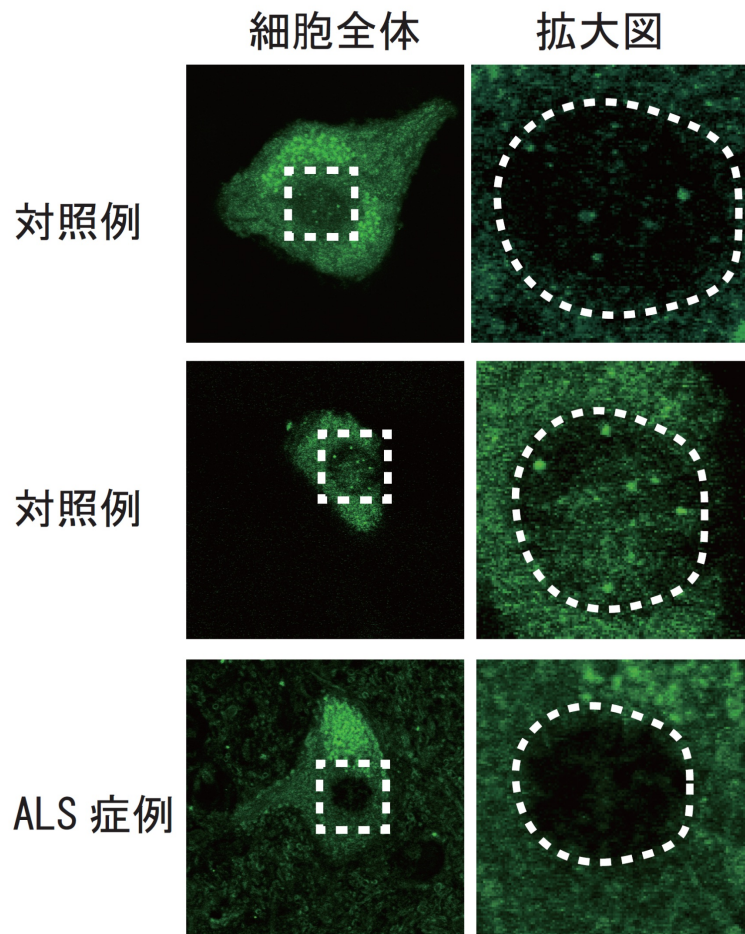
Tel:025-228-0684 / Fax:025-228-0682

図 1



一般的な細胞の模式図を示す。細胞は核（大きなピンクの円）と細胞質とに大きく分けられる。TDP-43 蛋白（赤）は通常は核内に存在する。SMN 蛋白質（緑）は細胞質と核内とを移動し、核内では GEM 小体を構成する。SMN 蛋白および GEM 小体の主要な機能の一つに snRNA の成熟と安定化がある。TDP-43 と SMN はしばしば隣り合って存在する。なお図中では簡略化しているが、SMN 蛋白は本来は複数種類の蛋白質と結合して、複合体を形成している。

図 2



脊髄運動神経の免疫染色像を示す。SMN 蛋白質が緑で示されている。左側の図に細胞の全体像を示す。破線で囲まれた領域を右側に拡大図として示す。拡大図内の曲破線で示された領域が核にあたる。GEM 小体は核内の緑色の顆粒として見られる。対照例では核内に複数の GEM 小体を認めるが、ALS 症例では GEM 小体が見られない。

補足説明

1. 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis :ALS)

成人発症の代表的な運動神経変性疾患。上位（大脳）、下位（脊髄）運動神経が障害され、四肢筋力低下、嚥下障害や呼吸障害を来す。進行を確実に抑制する治療はいまだに確立されていない。大半のALSは孤発性、つまり遺伝性を認めないが、10%程度は遺伝性を有することが知られている。近年、遺伝性ALSの原因遺伝子として、TARDBP (TDP-43)、FUS、C9orf72などが相次いで報告されている。これらの遺伝子から作られる蛋白質は、RNA代謝に関わる事が知られている。

2. 核内小体

真核細胞の核内に存在する構造物の一つ。構成する蛋白質やRNAによって、カハール小体、PML小体、GEM小体などに分類される。核内でのRNA代謝などの機能を有する。

3. GEM小体

SMN蛋白質を主要構成成分とする核内小体の一つ。後述するsnRNAの成熟、安定に関与する。TDP-43蛋白質としばしば共局在することが知られている。GEM小体の低下はsnRNAの減少を引き起こす。

4. snRNA (small nuclear RNA)

蛋白質の設計図とならずに機能する機能性RNAの一種。機能性RNAには転移RNA、リボソームRNAなどが含まれる。snRNAは200塩基前後の小型のRNAである。後述のmRNAのスプライシング反応において中心的な働きをする。細胞内では特異的な蛋白質と結合しており、その複合体はsmall nuclear ribonucleoproteinと呼ばれる。U1、U2、U4、U5、U6、U11、U12、U4atac、U6atacの9種類のsnRNAが存在する。スプライシングに際してはそのうち5種類のsnRNAが一組となって反応を行う。組み合わせによってmajor spliceosome (U1、U2、U4、U5、U6 snRNA)とminor spliceosome (U11、U12、U4atac、U5、U6atac snRNA)に分類される。U5 snRNAは両方の系に共通である、

5. TDP-43

不均一核内リボ核酸蛋白の一つで核内にびまん性に存在し、一部は核内小体を形成する。ALS患者組織での残存運動神経細胞ではTDP-43の核からの消失と細胞質内の封入体形成が認められる。またTDP-43の遺伝子異常が孤発性/家族性ALSを引き起こす事が、本研究グループを含めて複数の施設から報告されている。これらのことからTDP-43の機能異常がALSの発症に関与することが強く推察されている

6. 脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy :SMA)

小児発症の代表的な運動神経変性疾患。脊髄の下位運動神経が選択的に障害される。ALSとは異なり。SMN遺伝子異常を原因とする劣性遺伝性疾患である。遺伝的にSMN蛋白の発現量が減少することにより引き起こされる。SMN蛋白は核内小体のGEM小体の主要構成成分であり、SMAの運動神経細胞ではGEM小体とsnRNAが低下する。

7. 免疫染色法

細胞や組織の蛋白質を検出するために広く用いられる手法。対象とする特定の蛋白質のみに反応する抗体(一次抗体)を用意し、細胞や組織標本に反応させる。さらに一次抗体を認識する抗体(二次抗体)を蛍光色素などで標識して、一次抗体と反応させ、その蛍光を顕微鏡などで検出する。これにより、組織の中でどの細胞が対象とする蛋白質を発現しているか、あるいは細胞の中のどこに蛋白質が局在しているかを知ることができる。

8. 逆転写定量PCR

逆転写反応とポリメラーゼ連鎖反応(PCR)とを組み合わせた遺伝子発現の定量法。RNAは不安定なため、そのままでは定量的な評価が困難である。まず逆転写酵素を使用してRNAから相補的なDNAを作成する。そのDNAを鋳型としてPCR反応を行い、増幅を経時的に測定することで、細胞や組織

内の RNA の発現量を定量することができる。

9. mRNA (messenger RNA)

蛋白質の設計図となる塩基情報と構造を持った RNA をさす。DNA から転写された mRNA 前駆体は実際に蛋白質に翻訳される領域を含むエクソンと蛋白質に翻訳されないイントロンからなる。後述するスプライシング反応によりイントロンが除去され、mRNA が作成される。mRNA はさらに cap 構造や、polyA 鎖が付加されることにより、翻訳活性や安定性が向上する。

10. スプライシング

mRNA 前駆体にあるイントロンを除去し、前後のエクソンを結合する反応。snRNA がスプライシング反応において中心的な役割を果たす。スプライシングが終了した成熟 mRNA を設計図として蛋白質が翻訳される。ひとつの mRNA 前駆体において異なる場所でスプライシングが起こり、複数の成熟 mRNA が生産されることがある。これは選択的スプライシングと呼ばれ、限られた遺伝情報から複数の蛋白質を合成する機構として重要である。逆にスプライシングの異常は、本来作られるべき蛋白質の量的な減少や機能低下、あるいは異常な機能をもった蛋白質の合成の原因となる。

11. RNA 干渉

遺伝子の発現を抑制する手法の一つ。細胞内に人工的に合成した短い二本鎖 RNA を導入することにより、対応する塩基配列をもった mRNA が分解される。この方法により塩基配列が判明している特定の遺伝子の発現を選択的に抑制することができる。