

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
戦略的国際科学技術協力推進事業(イスラエル)
(英語) International Collaborative Research Program
Strategic International Research Cooperative Program (SICP)

研究開発課題名： (日本語) RNA プロセッシング異常を標的とした筋萎縮性側索硬化症(ALS) のバイオマーカーの開発
(英語) RNA-based novel approaches for discovery of ALS biomarker

研究開発担当者 (日本語) 医学系研究科 客員研究員 郭 伸
所属 役職 氏名： (英語) Medical Science Graduate Program, The University of Tokyo, Visiting
Scientist Shin Kwak

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

ALS は成人発症の致死性運動ニューロン疾患で、有効な治療法はおろか、診療に役立つバイオマーカーは開発されていない。本研究は、大多数の孤発性 ALS 患者運動ニューロンに疾患特異的に生じている adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の発現低下による分子異常を体液中 RNA により検出することで、ALS のバイオマーカーを開発することを目的としている。ADAR2 の発現低下は運動ニューロン死や ALS に特異的な TDP-43 病理の原因となり、ALS の運動ニューロンでは ADAR2 の発現低下と TDP-43 病理は常に共存する、病因に深く関わる分子異常である。そのために、運動ニューロンに発現し、かつ ADAR2 により触媒される RNA 編集部位を有する RNA を網羅的に検索し、その中から体液中に分泌されるものを抽出することでバイオマーカー候補 RNA を検索する。

ADAR2 依存性の RNA 編集部位を網羅的に探索するために、ADAR2 ノックアウト (ADAR2^{flox/flox}/VChAT-Cre, AR2) マウスを用いて、一頭あたり 2,000 個以上の単一脊髄運動ニューロンをレーザーマイクロディセクターで切り出し、その組織から抽出した RNA につき RNAseq を行った。ADAR2 ノックアウトマウスと野生型マウスそれぞれ 3 匹から得られた RNAseq の結果から、200 万カ

所以上と言われる RNA 編集 (アデノシン・イノシン置換) 部位につき、野生型で 10%以上の RNA 編集率が有り、しかも ADAR2 ノックアウトマウスで有意に低下している部位を網羅的に抽出し、この条件に合う RNA 編集部位を持つ候補 RNA を同定した。それらにつき、マウスと相同のヒト RNA における RNA 編集部位を検索し、ゲノム配列が異なるもの、運動ニューロンでの発現のないものを除いた候補 RNA を得た。

その RNA 編集部位が ADAR2 依存性かどうかを明らかにするために、ヒト由来培養細胞を用いて、ADAR2 非活性系(ADAR2 siRNA、および CRISPR/Cas9 を用いた変異 ADAR2 導入細胞系)、活性系 (ADAR2 導入細胞系) を確立した。これら培養細胞系を用いて、各候補 RNA 編集部位につき、ヒト由来 RNA においても ADAR2 により編集されることを確認した。

候補 RNA の細胞外への分泌性の有無を、2 種類のヒト由来培養細胞 (HeLa 細胞、SH-SY5Y 細胞) を用いて、培養上清を用いて検討した。その結果、分泌 RNA の中にはエクソゾームに含まれるもの、含まれないものが存在すること、細胞種により同じ RNA の組織中発現量と分泌量が異なることを明らかにした。その結果、分泌されるバイオマーカー候補として 10 カ所以上の ADAR2 依存性 RNA 編集部位を同定した。組織中の RNA 編集部位は ADAR2 活性依存性に編集率の違いが見られ、培養上清中の RNA ではこれら編集部位の編集率が必ずしも ADAR2 活性依存性でないものがあった。これら候補 RNA がヒト血清およびウマ脳脊髄液に存在することを確認した。

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disease affecting middle-aged individuals in their motor functions and leading them to eventual death by respiratory muscle weakness within a few years of onset. More than 90% of ALS occurs in a sporadic fashion, and the cause is largely unknown and there are no reliable biomarkers for the disease. Recently deficient RNA editing resulting from down-regulation of RNA editing enzyme called adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) occurs in the majority of patients with sporadic ALS in a disease-specific manner. Notably, this molecular abnormality is a cause of death of motor neurons and TDP-43 pathology, the neuropathological hallmark of ALS, and loss of ADAR2 occurs specifically in the motor neurons of ALS patients that exhibit TDP-43 pathology. These lines of evidence indicate that ADAR2 down-regulation is closely relevant to the pathogenesis of sporadic ALS. Because demonstration of ADAR2 down-regulation in the motor neurons in peripherally accessible organs is a suitable ALS biomarker, we aim to develop a clinically useful biomarker for sporadic ALS by demonstrating down-regulation of ADAR2 in the patients' body fluids.

We started by sequencing RNA from conditional ADAR2 knockout (ADAR2^{flx/flx}/VChAT-Cre, AR2) and wild-type mice (n=3 in each group) in order to define the ADAR2 targets that are relevant for the screen. We dissected more than 2,000 spinal motor neurons from each mouse using laser microdissector, and deeply sequenced the samples. Then, the extents of RNA editing at each adenosine-to-inosine position were compared between the AR2 mice and the wild-type mice to detect ADAR2-mediated RNA editing events in the genes expressed in the motor neurons. The editing sites were evaluated for the feasibility of biomarkers

and we selected the editing sites where the editing efficiency was more than 10% in the wild-type mice and significantly lower in the AR2 mice compared to wild-type mice.

Next we surveyed the candidate editing positions in the human RNAs. Some positions were excluded due to species difference of nucleotide sequence. ADAR2-dependency of the RNA editing positions in the mouse-analogous human RNAs was confirmed in human-derived cultured cells in which ADAR2 was over-expressed or knocked down. In addition, presence of these candidate RNAs in the culture medium of the human-derived cultured cells. Among them, we obtained a dozen of editing sites that were RNA edited in an ADAR2-dependent manner. We demonstrated the candidate RNAs in the animal serum and cerebrospinal fluids.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 4 件)

1. Aizawa H, Hideyama T, Yamashita T, Kimura T, Suzuki N, Aoki M, Kwak S. Deficient RNA-editing enzyme ADAR2 in an amyotrophic lateral sclerosis patient with a FUSP525L mutation. *J Clin Neurosci*. 2016, 32, 128-129.
2. Akamatsu M, Yamashita T, Hirose N, Teramoto S, Kwak S. The AMPA receptor antagonist perampanel robustly rescues amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathology in sporadic ALS model mice. *Sci Reports*. 2016, 7, 28649.
3. 山下雄也, 郭 伸. 神経疾患と RNA 編集異常—孤発性 ALS の分子病態モデルマウスを用いた ALS の治療法開発. *生化学*. 2016, 88, 5, 600-608.
4. Yamashita T, Akamatsu M, Kwak S. Altered intracellular milieu of ADAR2-deficient motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Genes*. 2016, 8, 2, 60.
5. Yamashita T, Aizawa H, Teramoto S, Akamatsu M, Kwak S. Calpain-dependent disruption of nucleo-cytoplasmic transport in ALS motor neurons. *Sci Reports*. 2017. 7, :39994.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Robust beneficial effects of a non-competitive AMPLA receptor antagonist in an ALS mouse model, 口頭発表, Megumi Akamatsu, Takenari Yamashita, Sayaka Teramoto, Shin Kwak, The 27th International Symposium on ALS/MND, 2016/12/8, 国外.
2. A selective non-competitive AMPA receptor antagonist as a potential drug for sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) -rescue of motor dysfunctions and loss of motor neurons with TDP-43 pathology in ALS model mice, ポスター発表, Megumi Akamatsu, Takenari Yamashita, Takashi Hosaka, Naoki Hirose, Sayaka Teramoto, Shin Kwak. Society for Neuroscience 2016/11/13, 国外.
3. 筋萎縮性側索硬化症の分子標的治療, 口頭発表, 郭 伸, 山下 雄也, 赤松 恵, 寺本 さやか, 【第 34 回日本神経治療学会】特別プログラム「シンポジウム 3」, 2016.11/3, 国内.
4. ALS の分子標的治療, 口頭発表, 郭 伸, 【第 22 回日本遺伝子細胞治療学術集会】シンポジウム

「Neurological and Muscle Disease」, 2016/7/30, 国内.

6. Development of specific therapy for sporadic ALS, 口頭, Shin Kwak, 【3rd World Centenarians Initiative】 International Symposium on Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2016/2/19, 国内.
7. A role for inefficient RNA editing in the amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathogenesis, 口頭, Shin Kwak, 第 58 回日本神経化学会大会 ISN (International Society for Neurochemistry)/JSN (Japanese Society for Neurochemistry) Joint Symposium "Epigenetics in neurological and psychiatric diseases, 2015/9/13, 国内.
8. Mechanism-based gene therapy for sporadic ALS, 口頭, 郭 伸, 山下雄也, 寺本さやか, 第 56 回日本神経学会学術大会, Hot Topics 18 “Gene Therapy for Neurological disorders, 2015/5/22, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし

(4) 特許出願
なし