HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The study on mechanism of neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis regarding U6 snRNA expression change. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	矢原, 真郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13164号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69917
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Masao_Yahara_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士(生命科学)　氏 名　矢 原　真 郎

学 位 論 文 題 名

The study on mechanism of neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis regarding U6 snRNA expression change.
(U6 snRNA の発現量変動に着目した筋委縮性側索硬化症における
神経細胞死機構に関する研究)

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は脳や脊髄の運動ニューロンが神経細胞死を起こす難治性の神経変性疾患であり，10 万人に 2-5 人発病し，多くは 3-5 年のうちに死に至る．そのため，早急なる ALS のメカニズム解明と治療法確立が求められている．これまでに，ALS の原因因子として 20 を超える遺伝子が同定され，その中に RNA スプライシングに関与する機能を持つものが複数存在することから，ALS で起こる神経細胞死に対して RNA スプライシングの関与が注目されている．Transactivation response RNA/DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) は，通常，約 9 割の TDP-43 は核内に局在しており，RNA スプライシングをはじめ，転写制御，マイクロ RNA プロセッシングなど多様な機能を担っている RNA 結合性タンパク質である．ALS 患者の運動ニューロン内において，この TDP-43 は細胞質に移行し，核内から消失するため，核内で果たしていた TDP-43 機能の喪失が ALS における神経細胞死の原因の一部であると考えられている．しかしながら，TDP-43 機能の喪失から神経細胞死に至るメカニズムは未知な部分が多い．これまでに，RNA スプライシングを行うスプライセオソームの主要なコンポーネントである核内低分子 RNA（snRNA）の発現量が変化するという報告があるにも関わらず，その発現量プロファイルは報告によって異なり，snRNA の発現量変化が神経細胞死に関与しているのか，依然，未知のままである．そこで，本研究では，TDP-43 機能の喪失に伴う神経細胞死のメカニズムを明らかにすることを目的とし，TDP-43 ノックダウン細胞を用いた snRNA 発現量解析を行った後，そこで確認された snRNA 発現量変化に神経細胞死や RNA スプライシングなどに対する生理的意義があるのか追究した．

第 2 章では，ALS 患者の脊髄中で発現量減少が報告されている U6 snRNA に着目し，TDP-43 ノックダウン細胞内における U6 snRNA の発現量解析を行った．まず，TDP-43 ノックダウンアッセイ系を確立するために，神経モデル細胞である神経芽細胞種 Neuro2A に対し siRNA を導入し，TDP-43 発現量を調べた．この結果，siRNA 導入 72 時間後に TDP-43 発現量が 2%まで減少する系を構築することができた．この系を用いて，siRNA 導入 72 時間後の U6 snRNA 発現量を逆転写定量的 PCR で解析したところ，TDP-43 ノックダウン細胞内において U6 snRNA の発現量は約 50%まで減少していた．尿素による変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Urea-PAGE)を用いて検証したところ，逆転写定量的 PCR 同様，U6 snRNA が減少することに加えて，U6 snRNA 同様にスプライセオソームのコンポーネントである U1，U2，U4 snRNA には大きな発現量変動が見られないこともわかった．さらに，細胞破砕液中の TDP-43 を免疫沈降で回収したところ，回収した TDP-43 に U6 snRNA が結合していることがわかった．したがって，ALS 患者の脊髄内同様，TDP-43 の機能を低下させた場合に，U6 snRNA の発現量は低下することが明らかになった．ならびに，TDP-43 は U6 snRNA に直接的に作用することで，U6 snRNA の安定性を維持しているのではないかと推測される．

第 3 章では，この TDP-43 ノックダウン細胞内における U6 snRNA 発現量減少の神経細胞

死への寄与について調べた．TDP-43 ノックダウン細胞に対し，Propidium Iodide（PI）を用いて死細胞染色を行ったところ，すでに TDP-43 発現量減少が始まっている siRNA 導入 72 時間後には細胞生存率の減少は確認されなかったが，siRNA 導入 120 時間後に至ると細胞生存率が有意に低下した．この TDP-43 ノックダウン細胞に対し，外来性の U6 snRNA を導入することで siRNA 導入 72 時間後の U6 snRNA 発現量を回復させたところ，siRNA 導入 120 時間後における細胞生存率が TDP-43 をノックダウンしない場合と比較してほぼ同レベルまで回復した．次に，U6 snRNA 発現量減少自体が細胞死の原因となっていることを示すために，Neuro2A 細胞に U6 snRNA のノックダウンを行ない死細胞染色で観察したところ，ノックダウン開始後 72 時間において細胞生存率の有意な低下が見られた．これらのことから，U6 snRNA 発現量の恒常性が維持されることは細胞生存に極めて重要であり，TDP-43 ノックダウンに伴う U6 snRNA の発現量減少は TDP-43 ノックダウンすることで起こる細胞死に関与していることが明らかになった．

さらに，TDP-43 ノックダウン細胞内における U6 snRNA 発現量減少の RNA スプライシングに対する影響を調べることで，U6 snRNA から細胞死に至るメカニズム解明を試みた．TDP-43 機能の喪失に伴い多くの遺伝子の RNA スプライシング状態に異常が起こること，並びに，U6 snRNA 減少によりスプライシング効率が低下すると考えられていることから，TDP-43 ノックダウン細胞内における U6 snRNA の発現量減少は，RNA スプライシング異常に寄与する可能性がある．そこで，TDP-43 ノックダウン細胞の U6 snRNA 発現量を回復させ，TDP-43 機能の喪失に伴い RNA スプライシング異常が報告されている遺伝子について，RNA スプライシングの状態を観察した．この結果，Dnajc5 および Sortilin 1 遺伝子の RNA スプライシング異常が回復することがわかった．したがって，TDP-43 ノックダウン細胞内における U6 snRNA の発現量減少は，Dnajc5 および Sortilin 1 の RNA スプライシング状態に関与していることが明らかになった．Dnajc5 および Sortilin 1 は神経保護や細胞死に関わるため，TDP-43 ノックダウン細胞における U6 snRNA 発現量減少は，これら遺伝子の RNA スプライシング状態に異常をきたし，細胞死に寄与し得ると考えられる．しかし，TDP-43 ノックダウン細胞内 U6 snRNA 発現量回復による RNA スプライシング異常の回復率は限定的で，U6 snRNA 発現量回復による細胞生存率回復効果のすべてを説明できるものではなかった．RNA スプライシングが高い回復率を示す遺伝子は，細胞死の直接的な原因となることが予想されるため，これらを同定していくことが今後の課題であると考えられる．

以上より，神経モデル細胞において TDP-43 機能の喪失は U6 snRNA の発現量を減少させ，U6 snRNA 発現量減少はスプライシング異常ならびにその他の経路を介して細胞死に寄与するということがわかった．この成果は，これまで不明であった TDP-43 機能を喪失した時に起こる snRNA の発現量変化に生理的意義があることを示した初めての知見であると共に，ALS の原因究明，ならびに治療戦略において重要な成果となることが期待される．