

氏名	やまもと いたる 山本 格
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学位記番号	博 甲 第 9 3 2 号
学位授与の日付	令和元年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	Studies on suppressive effect of cancer-related genes on pathogenesis of FTLD/ALS by using <i>Drosophila</i> models (ショウジョウバエモデルを用いた癌関連遺伝子の FTLD/ALS 発症抑制効果に関する研究)
審査委員	(主査)教授 山口政光 教授 伊藤雅信 准教授 吉田英樹

論文内容の要旨

前頭側頭葉型変性症 (FTLD) は、大脳の前頭葉及び側頭葉ニューロンの変性により、人格変化、行動異常、言語障害、認知機能障害、及び運動障害が生じる神経変性疾患である。一方筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位・下位運動ニューロンの選択的変性により、筋萎縮、筋力低下、及び嚥下障害が生じる神経変性疾患である。両疾患ともに、発症機序の全容は未解明であり、有効な治療法も確立されていない。近年、疫学的な研究から FTLD/ALS と癌の発生リスクに関するデータが集積されつつある。

本申請論文は、FTLD/ALS 及び癌の横断的な新規治療戦略、及び新規治療標的を見出すため、FTLD/ALS の症状を再現したモデルショウジョウバエを用いて行なった研究について、英文で記載されている。本申請論文は、第 1 章「序論」、第 2 章「NPM-hMLF1 融合タンパク質はヒト *FUS* 遺伝子を発現するショウジョウバエ FTLD モデルの示す異常を抑圧する」、第 3 章「ショウジョウバエ *MST* である *Hippo* は、ショウジョウバエ *FUS* である *Caz* のノックダウンにより誘導される運動神経変性の新規修飾遺伝子である」と第 4 章「結論および展望」から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景が述べられている。ALS と FTLD は異なる疾患であるが、一方で臨床症状が合併することが報告されており、変性を受け残存した神経細胞内にタンパク質封入体が形成されることなど、組織病理学的にも共通の基盤を有するため、同一スペクトラムとして考えられている。Fused in sarcoma (FUS) は、FTLD/ALS においても、封入体の構成タンパク質の一つとして同定された DNA/RNA 結合タンパク質である。FUS-ALS/FTLD の症状を再現したモデルとして様々なモデル動物が報告され、FUS の生理機能の喪失、及び凝集体形成に伴う機能獲得の両方が FTLD/ALS の発症に必要であるとされている。一方 *nucleophosmin-human myeloid leukemia factor 1* (*NPM-hMLF1*) は、骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病患者で同定された転座関連遺伝子である。NPM は、核と細胞質をシャトルする多機能性タンパク質として知られ、本来は細胞質に存在する hMLF1 が NPM-hMLF1 融合タンパク質を形成すると細胞内局在が変化することが、白血病発症に関わるのではないかとされている。一方、Hippo 経路は癌抑制経路として知られており、ヒトとショウジョウバエでよく保存されている。近年様々な癌の増殖に関与するシグナル伝達経路が FTLD/ALS の病態においても中心的な役割を果たしていることが明らかに

なっている。これらの学術的背景のもとに、申請者は FTLD/ALS の症状を再現したモデルショウジョウバエを用いた研究を開始したと記されている。

第 2 章では、*NPM-hMLF1* 遺伝子の共発現による FTLD/ALS 発症抑制効果について述べている。*NPM-hMLF1* 遺伝子の共発現は、複眼原基特異的なヒト *FUS* 遺伝子発現が誘導する複眼形態異常を抑圧した。さらに *NPM-hMLF1* 遺伝子の共発現は、運動神経特異的なヒト *FUS* 遺伝子発現が引き起こす *pharate adult lethal* 表現型を抑圧した。また申請者は、ヒト *FUS* 遺伝子の過剰発現はプロテアソーム依存的に *FUS* 及び内在性のショウジョウバエ *FUS* である *Cabeza (Caz)* の発現レベルを負に制御する機構を見出した。*NPM-hMLF1* 遺伝子の共発現は、この機構の亢進によって引き起こされる病態を抑制することを明らかにした。加えて、*NPM-hMLF1* は、核内で分子シャペロンとして機能し、*FUS* 凝集体の形成を阻害することも明らかにした。これらの結果に基づき申請者は、*NPM-hMLF1* は FTLD/ALS の病態を直接修飾することで発症を抑制すると結論している。また、*NPM-hMLF1* 発現による FTLD/ALS の新規治療戦略の可能性も示唆している。

第 3 章では、癌抑制経路である Hippo 経路の中心因子である mammalian Ste20-like (MST) の発現制御による FTLD/ALS 発症抑制効果について述べている。複眼原基特異的な *Caz* 遺伝子ノックダウン系統が示す複眼形態異常は、MST のショウジョウバエホモログである *hippo (hpo)* 遺伝子の突然変異系統との交配により抑圧された。また、神経特異的な *Caz* 遺伝子ノックダウン系統が示す運動機能障害、及び神経筋接合部のシナプス形態異常も *hpo* 遺伝子の突然変異系統との交配により抑圧された。また、申請者は *Caz* 遺伝子ノックダウン系統では、*hpo* 遺伝子の発現レベルが上昇していることから、*Caz* 遺伝子は *hpo* 遺伝子を負に制御していることを明らかにしている。また、*hpo* 遺伝子の突然変異系統との交配によりオートファジー機能が阻害され、*Caz* の核内発現レベルが増加することを見出している。これらの結果から、申請者は MST が FTLD/ALS の病態形成に重要な役割を果たしていることを示唆し、また MST は癌だけでなく FTLD/ALS の新規治療標的としても有望であると述べている。

第 4 章では、上記第 2 章、及び第 3 章の包括的な考察を行った上で、FTLD/ALS 原因遺伝子と癌関連遺伝子の関連性について明らかにした本研究の意義についても改めて論じられている。

論文審査の結果の要旨

前頭側頭葉型変性症 (FTLD) は大脳の前頭葉及び側頭葉のニューロンが変性し、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に変性する神経変性疾患である。両疾患ともに、変性を受け残存した神経細胞内にタンパク質封入体が形成されるが、疾患発症機序の全容は未解明であり、有効な治療法も確立されていない。FTLD と ALS は臨床症状が合併することがあり、組織病理学的にも共通の基盤を持つため、同一スペクトラムとして考えられている。Fused in sarcoma (FUS) は、FTLD/ALS において、封入体の構成タンパク質の一つとして同定された DNA/RNA 結合タンパク質である。FUS の生理機能の喪失、及び凝集体形成に伴う機能獲得の両方が FTLD/ALS の発症に必要であるとされている。近年、疫学的研究から FTLD/ALS と癌の発生リスクに関するデータが集積されつつある。また、様々な癌の増殖に関与するシグナル伝達経路が FTLD/ALS の病態においても中心的な役割を果たしていることが明らかになってきた。そこで申請者は、FTLD/ALS 及び癌の横断的な新規治療戦略、及び新規治療標的を見出すことを目的として、FTLD/ALS モデルショウジョウバエを用いて、これまで報告の無い癌関連遺

伝子による病態修飾作用についての研究を開始した。

まず申請者は骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病原因遺伝子 *NPM-hMLF1* 遺伝子の共発現による FTLD/ALS 発症抑制効果について検討した。*NPM-hMLF1* 遺伝子の共発現は、複眼原基特異的なヒト *FUS* 遺伝子発現が誘導する複眼形態異常を抑圧した。また運動神経特異的なヒト *FUS* 遺伝子発現が引き起こす *pharate adult lethal* 表現型も抑圧した。詳細な研究により申請者は、ヒト *FUS* 遺伝子の過剰発現がプロテアソーム依存的に *FUS* 及びショウジョウバエ *FUS* ホモログである *Caz* の発現レベルを負に制御する仕組みを明らかにした。加えて *NPM-hMLF1* は、核内で分子シャペロンとして機能し、*FUS* 凝集体の形成を阻害することも明らかにした。これらの結果から、*NPM-hMLF1* は FTLD/ALS の病態を直接修飾することで発症を抑制すると結論した。これらの知見は、*NPM-hMLF1* 発現による FTLD/ALS の新規治療戦略開拓の可能性を提起するものとして評価できる。

また申請者は、癌抑制経路である Hippo 経路の構成因子 *MST* の発現制御による FTLD/ALS 発症抑制効果についても検討した。複眼原基特異的な *Caz* 遺伝子ノックダウン系統が示す複眼形態異常は、*MST* のショウジョウバエホモログである *hpo* 遺伝子の突然変異系統との交配により抑圧された。また神経特異的な *Caz* 遺伝子ノックダウン系統が示す運動機能障害及び神経筋接合部のシナプス形態異常も *hpo* 遺伝子突然変異系統との交配により抑圧されることを明らかにした。さらに *Caz* 遺伝子ノックダウン系統では、*hpo* 遺伝子の発現レベルが上昇していることから、*Caz* 遺伝子は *hpo* 遺伝子を負に制御していることを示した。また *hpo* 遺伝子の突然変異系統との交配によりオートファジー機能が阻害されて、*Caz* の核内レベルが増加することも見出した。これらの結果はヒト *MST* が、FTLD/ALS の病態形成に重要な役割を持つことを示唆しており、*MST* が癌だけでなく FTLD/ALS の新規治療標的としても有望であることを示唆するものとして高く評価できる。

これらの研究は、申請者が筆頭著者のものを含む、査読制度のある国際科学雑誌に掲載済みの下記の論文 2 編を基礎としている。

- 1) Itaru Yamamoto, Yumiko Azuma, Yukie Kushimura, Hideki Yoshida, Ikuko Mizuta, Toshiki Mizuno, Morio Ueyama, Yoshitaka Nagai, Takahiko Tokuda & Masamitsu Yamaguchi, *NPM-hMLF1* fusion protein suppresses defects of a *Drosophila* FTLD model expressing the human *FUS* gene. SCIENTIFIC REPORTS VOL.8, Article number: 11291 (2018), DOI:10.1038/s41598-018-29716-9
- 2) Yumiko Azuma, Takahiko Tokuda, Yukie Kushimura, Itaru Yamamoto, Ikuko Mizuta, Toshiki Mizuno, Masanori Nakagawa, Morio Ueyama, Yoshitaka Nagai, Yasushi Iwasaki, Mari Yoshida, Duoqia Pan, Hideki Yoshida, Masamitsu Yamaguchi, *Hippo, Drosophila MST*, is a novel modifier of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz, Drosophila FUS*. Experimental Cell Research VOL.371. pp.311-321 (2018)

また参考論文として、査読制度のある下記の国際雑誌 1 編にも掲載されている。

- 3) Itaru Yamamoto, Yumiko Azuma, Masamitsu Yamaguchi. Cancer-related genes and ALS. Frontiers In Bioscience, Landmark, VOL.24. pp.1242-1259 (2019)