

女性ホルモンによる抗酸化ストレス機構の解明と更年期の認知症発症予防への臨床応用

東京都健康長寿医療センター 老化機構研究チーム システム加齢医学 佐藤 薫

要約

世界的に認知症患者数は年々増加し、その早期診断方法の確立や治療法の開発が急務とされる。認知症のおよそ7割はアルツハイマー病（Alzheimer's disease, AD）であるが、依然難治性である。また、女性の有病率が高く、女性の健康上の大きな課題となっている。近年、ストレスに対するRNA代謝の異常が、ADの病態生理に重要であることが示唆されている。ストレス下では、ストレス顆粒と呼ばれるRNA-タンパク質構造体が形成され、AD患者の脳でも、その構成因子の顕著な蓄積が報告されている。本研究では、ヒト女性由来神経細胞におけるそれらRNAを明らかにするため、モデル細胞SH-SY5Yを用い、ストレス顆粒の中核因子G3BPファミリータンパク質（G3BP1、G3BP2）が結合するRNAをEnhanced crosslinking and immunoprecipitation（eCLIP）-seq法を用いて網羅的に同定した。さらに、細胞分画法を用いてストレス顆粒を単離し、顆粒に含まれるRNAについても網羅的に解析し、ストレス顆粒へ局在するRNAの多くがG3BPファミリータンパク質によって直接制御されることを明らかにした。これらのRNAには、AD患者の主要な脳神経病理である老人斑や神経原線維変化の病因因子Amyloid-beta precursor protein（APP）やMicrotubule associated protein tau（MAPT）を含むAD病理に関連する遺伝子転写産物もみられた。ストレス下において、G3BPファミリータンパク質結合を介して、ストレス顆粒がAD病態生理に関わる遺伝子をRNAレベルで直接制御していることが強く示唆された。

緒言

世界の認知症患者の数は年々増加し、現在ではおよそ5,000万人に上り、認知症患者の増加はフレイル（加齢による心身の活力の低下）や介護などの社会的な問題を引き起こしている。特に、日本では超高齢化社会で平均寿命が伸び、高齢者人口の増加に伴い認知症を発症する人の数が増えている。特に、アルツハイマー型認知症（アルツハイマー病、AD）は認知症のおよそ7割を占め、その発症メカニズムの解明や早期診断方法の確立、治療法の開発が進められている。また、女性の有病率が高く、原因として、閉経による女性ホルモンであるエストロゲンの低下が強く示唆され（GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators, 2022）¹、更年期以降の女性の健康上の大きな課題となっている。また、エストロゲンは抗酸化作用を有し、酸化ストレスから神経細胞を保護することが知られているが、その作用機序の多くは不明のままである。近年、酸化ストレス、低酸素、感染、熱ショックといったストレスに対するRNA代謝の異常が、神経変性疾患、特に、アルツハイマー型認知症や前頭側頭型認知症の病態生理に重要な役

割を果たしていることが示唆されている（Wang et al., 2022）²。

ストレス条件下では、ストレスに応答し、100nmから200nmほどの「ストレス顆粒」と呼ばれる細胞質凝集体が生じる（Wolozin and Ivanov, 2019）³。ストレス顆粒は、近年注目される液-液相分離現象（Liquid-liquid phase separation, LLPS）によって形成される非膜性のオルガネラとされる。ストレス顆粒には、翻訳開始時に翻訳を停止したmRNAとmRNA翻訳装置（リボ核タンパク質）から構成される。ストレス顆粒が細胞質に生じると、mRNAの一過的な翻訳抑制が生じ、細胞のRNA代謝を抑えることで、ストレス下での異常なタンパク質の蓄積を防いだり、シグナル伝達経路を調節したりし、細胞損傷を回避する役割があると考えられている。

また、近年では、ADだけでなく、運動ニューロンが障害される筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患、また癌においても、それぞれの疾患関連タンパク質がストレス顆粒に局在することや、脳や神経細胞において、持続的な異常なストレス顆粒の形成が認められることが明らかになり（Peña-

Bautista et al., 2020⁴; Asadi et al., 2021)⁵、ストレス顆粒は神経変性疾患や癌の治療や創薬の標的として注目されつつあり、ストレス顆粒に局在する疾患関連タンパク質を除去する、新たな作用機序を持つ治療薬の研究開発が活発に行われている。

ストレス顆粒を構成するRNA結合タンパク質である「G3BP」は、ストレス顆粒形成における最も中核的な因子であるが、神経変性疾患など病気に伴う細胞内での標的RNA分子や局在変化の分子作用機序については十分には解明されていない。また、G3BPには、G3BP1およびG3BP2があり、ストレス顆粒形成においては機能的に相同であるとされるが、その役割分担は不明である。

本研究では、本研究では、女性由来の神経細胞を用いて、ストレス顆粒およびコアタンパク質であるG3BP1/2に着目し、Enhanced cross-linking immunoprecipitation-sequencing (eCLIP-seq) によるG3BP1/2タンパク質のヒト神経細胞における結合RNA分子の包括的同定、生化学的手法を用いたストレス顆粒の単離と含有RNAの網羅的同定 (Stress granule (SG) RNA-seq) を行い (図1)、それらRNAの構造的な特徴やAD病理との関連を解析した。

方法

- ① 細胞培養および酸化ストレス処理
実験材料として、ヒト女性由来神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いた。酸化ストレス剤として、亜ヒ酸ナトリウムを用いた。SH-SY5Y細胞を亜ヒ酸ナトリウム処理後、各実験に用いた。
- ② Enhanced cross-linking immunoprecipitation-sequencing (eCLIP-seq)
SH-SY5Y細胞に紫外線を照射し、タンパク質とRNAを架橋させたのちに、免疫沈降法を用いて、タンパク質-RNA複合体を回収し、RNA精製後、イルミナ次世代シーケンサーを用いて解析した。
- ③ ストレス顆粒RNAの単離と次世代シーケンサー解析
SH-SY5Y細胞から、複数回の異なる遠心条件で、ストレス顆粒を分離し、そこに含まれるRNA分子を精製したのち、イルミナ次世代シーケンサーを用いて解析した。
- ④ 本研究 (ヒト細胞、ヒト遺伝情報などを用いた研究) は東京都健康長寿医療センターの倫

理委員会の承認 (審査番号: R21-059)のもと行われた。

結果

ヒト女性由来神経細胞におけるG3BP1およびG3BP2結合RNAの網羅的同定

まず、ヒト女性由来神経細胞におけるG3BP1およびG3BP2のRNA結合能を調べるため、CLIP法によるタンパク質結合RNAの検出を行った。その結果、SH-SY5Y細胞に紫外線照射した細胞を用いたCLIP実験において、G3BP1およびG3BP2に結合するRNAが検出され、いずれのタンパク質もRNA結合能を示した。続いて、それら結合RNA分子を同定するため、eCLIP-seqを行った。それぞれ得られた配列をヒトゲノム (GRCh38) へマッピングし、G3BP1およびG3BP2の結合部位を見出した。それらの結合ピーク領域を調べた結果、タンパク質コード遺伝子 (mRNA) 領域や長鎖ノンコーディングRNA (Long-non-coding RNA, lncRNA) などに由来し、G3BP1およびG3BP2が直接結合によって標的とするRNA分子を明らかにした (図2)。

次に、亜ヒ酸ナトリウムを添加し、SH-SY5Y細胞に酸化ストレスを与えた条件下におけるG3BP1およびG3BP2の結合RNA部位を調べた結果、mRNA領域やlncRNAなどに由来しており、G3BP1とG3BP2のストレス条件下におけるRNA結合分子を網羅的に明らかにした。

ストレス顆粒RNA (SG RNA) の網羅的同定

G3BPタンパク質の結合RNAとストレス顆粒へ局在するRNAの関係を明らかにするために、SH-SY5Y細胞から、ストレス顆粒を生化学的に単離し、RNA-seqを行った。インプット (Total RNA) およびストレス顆粒RNA (SG RNA) を比較し、Total RNAに比べ、SG RNAへより多いRNA分子をストレス顆粒に集積するSG-enriched RNAを明らかにした。一方、SG RNA量が少ないRNA分子をSG-depleted RNAについても明らかにした (図2)。また、SG-enriched RNAはmRNAやlncRNAなどに由来することを明らかにした。それらSG-enriched RNAには、G3BPタンパク質の結合ピークをもつものも見いだされ、G3BPタンパク質の直接結合によって制御されるSGへ集積するRNA分子を明らかにした。

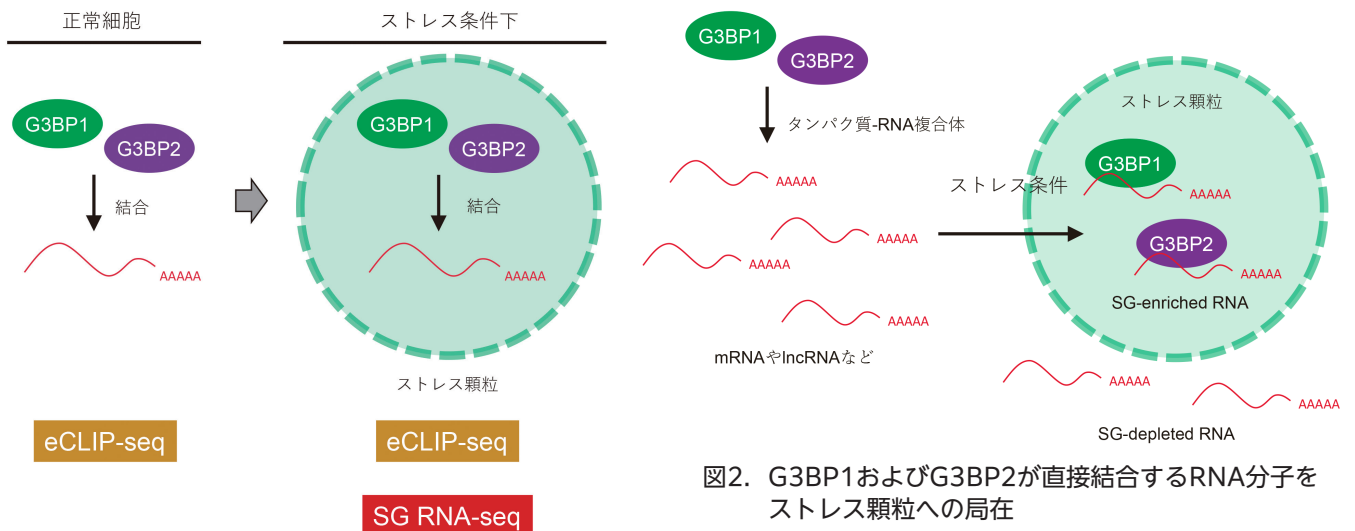


図2. G3BP1およびG3BP2が直接結合するRNA分子をストレス顆粒への局在

図1. eCLIP-seqおよびストレス顆粒 (SG)RNA-seqによるストレス顆粒RNAの同定

考察

本研究で、ヒト女性由来神経細胞におけるeCLIP-seq、ストレス顆粒RNA-seqを行い、ストレス顆粒へ集積するRNAを網羅的に明らかにした。今後、本研究で明らかにしたヒト神経細胞においてストレス顆粒に集積しやすいRNA分子のAD脳におけるタンパク質レベルへ寄与するメカニズム、および、神経細胞内代謝制御メカニズムを明らかにし、ストレスがAD発症を引き起こす仕組みの解明を進めていく。さらに、今回得られた結果を基に、エストロゲンによるストレス顆粒RNAの制御と抗酸化ストレス作用の分子作用機序の解明や、ヒト脳病理組織を活用してそれら同定したRNA分子のアルツハイマー病における役割を探り、エストロゲンおよび制御RNA分子を標的とした認知症治療への応用を検討していきたい。

謝辞

本研究遂行にあたり、ご支援賜りました公益財団法人神澤医学研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health*. 7,

e105-e125. doi: 10.1016/S2468-2667(21)00249-8.

2. Wang, J., Gan, Y., Cao, J., Dong, X., Ouyang, W. (2022). Pathophysiology of stress granules: An emerging link to diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* 49, 44. 10.3892/ijmm.2022.5099.
3. Wolozin, B., Ivanov, P. (2019). Stress granules and neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 649–666. 10.1038/s41583-019-0222-5.
4. Peña-Bautista, C., Casas-Fernández, E., Vento, M., Baquero, M., Cháfer-Pericás, C. (2020). Stress and neurodegeneration. *Clin Chim Acta.* 503, 163–168. doi: 10.1016/j.cca.2020.01.019.
5. Asadi, M. R., Sadat Moslehian, M., Sabaie, H., Jalaie, A., Ghafouri-Fard, S., Taheri, M., Rezazadeh, M. (2021). Stress Granules and Neurodegenerative Disorders: A Scoping Review. *Front Aging Neurosci.* 13, 650740. doi: 10.3389/fnagi.2021.650740.

Abstract

The global population of people with dementia is steadily increasing, requiring the prompt development of early diagnostic tools and effective treatment strategies. Approximately 70% of dementia cases are Alzheimer's disease (AD), which remains an intractable challenge. Of particular concern is the high prevalence of AD in women. Recent evidence suggests that stress-induced aberrant RNA metabolism is associated with AD pathophysiology. Under stress, stress granules (SGs), which are RNA-protein structures, are formed. Importantly, a significant accumulation of their protein components has been observed in the brains of AD patients. In this study, to elucidate the RNAs regulated by SGs in human female neurons, we performed enhanced cross-linking and immunoprecipitation sequencing (eCLIP-seq) using SH-SY5Y cells, and identified RNAs bound by G3BP family proteins (G3BP1, G3BP2), which are the core components of SGs. We extensively analyzed RNAs enriched to SGs and found that many of them were directly regulated by both G3BP proteins. In addition, gene transcripts associated with AD pathophysiology, including amyloid-beta precursor protein (APP) and microtubule-associated protein tau (MAPT), were found in SG-RNAs, suggesting that SGs directly regulate AD-associated genes at the RNA level through direct binding of G3BP proteins under stress.