

認知症原因蛋白のミトコンドリア内異常多量体形成による細胞死機構の解明とこれを標的とした治療薬開発

代表研究者 東京医科大学薬理学分野 講師 草苺 伸也

【抄録】

認知症の中でも若年発症例を多く含む前頭側頭型認知症は、根本的治療法が確立されておらず、その発症機構の解明が喫緊の課題である。本研究では、家族性前頭側頭型認知症に関連するミトコンドリア局在タンパク質の変異に着目し、神経細胞死誘導機構の解明を目的とした。培養細胞を用いた解析により、疾患関連変異体は異常な多量体化および凝集体形成を示し、その程度が細胞死誘導能と相関することを明らかにした。さらに、凝集体形成に伴いミトコンドリアストレスが惹起され、特定分子との結合を介して細胞毒性を発現する可能性が示唆された。また、ミトコンドリア機能に作用する化合物のスクリーニングにより、凝集体形成および細胞死を抑制する認知症治療薬の候補化合物を複数同定した。本研究成果は、異常凝集体を基盤とする新たな発症メカニズムを提示するとともに、FTD 治療薬開発への一助になるものと考えられる。

1. 研究の目的

1-1 神経細胞の死滅などによって判断力や記憶力が低下する認知症において、最大の発症要因は加齢である。わが国では、世界でも類を見ない速度で高齢化が進行しており、それに伴って認知症患者数が増加している。2022年時点における認知症患者数は443万人、軽度の認知障害（Mild Cognitive Impairment : MCI）を有する高齢者数は559万人と推計されている。すなわち、1000万人を超える高齢者が認知症またはその予備軍であり、この数は2040年には1200万人に達する見込みである。このように、認知症患者の増加は大きな社会問題となっている一方、その発症メカニズムにはいまだ不明な点が多く残されており、根本的治療法および治療薬の確立には至っていない。したがって、発症機序の解明とこれに基づく治療薬の確立は喫緊の課題である。

1-2 前頭側頭型認知症（Frontotemporal dementia : FTD）は前頭および側頭葉の萎縮・変性の特徴とする認知症のひとつであり、認知機能障害に加え、顕著な人格変化や行動異常などを引き起こす。特に、65歳未満の若年層での発症割合が高いことが特徴であり、その一部は家族性に発症する。これまでに、FTD患者家系を対象とした研究により、発症に関わる複数の原因遺伝子が同定されているが、未だ発症メカニズムに未解明な点が多く、根本的な治療法や治療薬は確立されていない。

2014年に新たなFTD原因遺伝子として同定されたCHCHD10（C10）は、ミトコンドリアに局在し、クリステ形成やATPの産生など様々なミトコンドリアの機能制御に関与することが報告されている（1-3）。これまでに、FTD発症に関わる複数のC10遺伝子変異が同定されており（4）、これらの変異に伴う分子機能低下によるミトコンドリア機能異常がFTD発症に関わると考えられてきた。一方、C10遺伝子破壊マウスではFTD様症状が認められないことが報告されており（5）、従来の発症仮説とは異なるメカニズムの存在が示唆されている。近年、FTD関連C10変異体を発現するノックインマウスやトランスジェニックマウスにおいて、ミトコンドリア機能異常に起因すると考えられる運動障害や心筋症が認められることが報告され（6、7）、C10が遺伝子変異によって新たな細胞毒性を獲得する可能性が指摘されている。しかしながら、これらの変異がどのような分子機構を介して神経細胞死に至るのかについては、依然として明らかになっていない。

1-3 研究代表者は、C10遺伝子変異による神経細胞死メカニズムの解明に取り組む中で、培養細胞においてC10変異体の過剰発現による細胞死の誘導に世界に先駆けて成功している。このC10による細胞死誘導では、これまで報告されているC10遺伝子変異によるミトコンドリアクリステの形成異常やミトコンドリア

膜電位の低下など、これまで C10 遺伝子変異 FTD 患者サンプルで報告されているミトコンドリア異常が再現されている。したがって、独自に確立したこの系は、C10 遺伝子変異による神経細胞死メカニズムの解明に有用な解析ツールである。さらに詳細な解析の結果、C10 遺伝子変異に伴い、ミトコンドリア内で異常な多量体が形成・蓄積されることが細胞死誘導に関わる可能性を見出している。

本研究では、C10 の多量体形成と神経細胞死との関連を解析するとともに、FTD 治療薬として応用可能な化合物の探索を行った。

2. 研究方法と経過

2-1 C10 多量体形成能と細胞死誘導能との関係解明

FTD 発症に関与するとされる C10 変異体の発現プラスミドを作製し、各変異体の多量体形成能について解析を行った。まず、作製した変異体発現プラスミドを培養細胞にトランスフェクションし、各変異体が Triton X-100 にどの程度可溶化されるかを評価した。次に、Triton X-100 に対して可溶性が低く、多量体形成の可能性が高いと考えられた変異体を選別し、これらを発現するアデノウイルスベクターを構築した。構築したアデノウイルスベクターには、プロモーターと C10 変異体遺伝子の間に、loxP 配列で挟まれた poly(A) シグナルを含むスタッファー領域が組み込まれており、Cre リコンビナーゼの作用により C10 変異体の発現を誘導可能な設計となっている。これらのアデノウイルスベクターを用いて C10 変異体を過剰発現させ、各変異体における多量体形成能および細胞死誘導能を評価した。

2-2 C10 細胞死メカニズムの解明

C10 変異体の一部では、多量体形成に伴いミトコンドリアストレスが誘導されることが報告されている (6-8)。そこで、各変異体の過剰発現細胞におけるミトコンドリアストレスマーカーの発現を qPCR などを用いて解析した。

さらに、多量体形成を示す C10 変異体に特異的に結合する分子の探索を行った。まず、C10 変異体を過剰発現させた細胞ライセートを抗 C10 抗体により免疫沈降した後、SDS-PAGE を実施した。得られたアクリルアミドゲルを CBB 染色し、C10 変異体サンプルで特異的に検出されたバンドを切り出し、質量分析を行い、含有タンパク質の同定を行った。

同定された結合分子については、C10 変異

体との共沈の再現性を改めて検証するとともに、多量体形成能の高かった各 C10 変異体に対する結合能についても比較検討した。

2-3 FTD 治療薬に応用可能な化合物のスクリーニング

C10 はミトコンドリアに局在する分子であり、ミトコンドリア機能の制御に関与することが示唆されている。そこで、ミトコンドリアに作用する化合物により、C10 によって誘導される細胞死を抑制できる可能性があると考えた。本研究では、ミトコンドリア作用薬物を 100 種選定し、これらの化合物処理によって C10 依存的細胞死が抑制されるかどうか検討した。

3. 研究の成果

3-1 C10 凝集体形成能と細胞死誘導能との関係

これまでに報告されている FTD 発症に関与する各 C10 変異体の多量体形成能について検討した。まず、FTD 発症に関与する C10 変異体の Triton X-100 に対する可溶性を解析したところ、野生型 (WT) C10 と比較して、Triton X-100 不溶性画分の割合が増加する変異体が複数認められた。さらに、Triton X-100 不溶性画分の割合が増加していた変異体では、WT と比べて二量体や三量体を含む多量体の形成が亢進していた。また、これらの多量体は Triton X-100 不溶性画分において増加していたことから、C10 変異体が異常な凝集体を形成する可能性が示唆された。

次に、多量体形成の亢進が認められた C10 変異体について細胞死誘導能を解析したところ、いずれの変異体も細胞死誘導能を有しており、その強度は多量体形成能と相関する傾向が認められた。

以上の結果から、C10 は遺伝子変異に伴って異常凝集体を形成することで、細胞毒性を獲得する可能性が考えられた。

3-2 C10 細胞死メカニズム

多量体を形成する変異体について、ミトコンドリアストレスマーカーの発現を解析したところ、各変異体を過剰発現させた細胞において、ミトコンドリアストレスマーカーの発現誘導が認められた。一方、C10 の多量体形成を阻害した変異体では、過剰発現による細胞死が抑制されていたが、この変異体を発現する細胞では、ミトコンドリアストレスマーカーの発現誘導は認められなかった。以上の結果から、FTD の

発症に関与する変異体の一部は、ミトコンドリア内に異常凝集体を形成し、ミトコンドリアストレスを惹起することで細胞死を誘導する可能性が示唆された。

さらに、多量体形成した C10 に特異的に結合する分子の探索を行った結果、複数の分子が同定された。これらの結合分子は、多量体形成を阻害した C10 変異体では結合が著しく低下しており、また、C10 の多量体形成能に比例して結合強度が増加する傾向が認められた。したがって、多量体化した C10 は、これらの分子を介して細胞死を誘導する可能性が考えられた。

3-3 FTD 治療薬に応用可能な化合物のスクリーニング

C10 変異を有する FTD 患者由来細胞において、ミトコンドリア・クリステの形成異常が報告されており (1)、ミトコンドリア機能が低下していると考えられている。このことから、ミトコンドリア機能を活性化することで細胞死が抑制される可能性が想定される。そこでまず、ミトコンドリアに作用する約 1,000 種の化合物の中から、ミトコンドリア機能を向上させると考えられる化合物を 100 種選別した。

次に、研究代表者が独自に確立した C10 による細胞死誘導系を用い、選別した 100 種の化合物について、C10 依存的細胞死に対する抑制効果を検討した。その結果、C10 による細胞死に対して抑制作用を示す複数の化合物が同定された。興味深いことにこれらの化合物では、C10 の多量体形成が抑制されたことから、C10 の異常凝集体形成が細胞死誘導に深く関係しているものと考えられる。

4. 今後の課題

本研究により、C10 変異体が多量体化および異常凝集体形成を介してミトコンドリアストレスを誘導し、細胞死を引き起こす可能性が示唆された。また、C10 依存的細胞死を抑制する化合物が複数同定され、C10 の多量体形成抑制が細胞保護効果に関与する可能性も明らかとなった。一方で、以下の点については今後さらなる検討が必要である。

4-1 C10 異常凝集体によるミトコンドリア障害機構の詳細説明

本研究では、C10 多量体形成とミトコンドリアストレス誘導との関連が示されたが、C10 異常凝集体がミトコンドリア内のどの機能(呼吸鎖活性、膜電位、クリステ構造形成、タンパク質輸送系など)に直接的な影響を及ぼすのかは未解明である。今後は、ミトコンドリア機能解

析を通じて、C10 凝集体による障害の分子機構を明らかにする。

4-2 C10 多量体特異的結合分子の機能解析

多量体形成した C10 に特異的に結合する分子が複数同定されたが、これらの分子が細胞死誘導において果たす役割は明らかではない。今後は、これら結合分子のノックダウンや過剰発現解析を行い、C10 凝集体依存的細胞死における機能的意義を検証することが重要である。

4-3 同定化合物の作用機序および特異性の検証

C10 細胞死を抑制する化合物が同定されたが、これらの化合物が直接 C10 多量体形成を阻害するのか、あるいはミトコンドリア機能改善を介した二次的効果であるのかは不明である。今後は、化合物の作用標的および作用機序を明らかにするとともに、他の凝集性タンパク質に対する影響の有無を検証する。

4-4 疾患モデルへの展開

本研究は主として培養細胞系を用いて行われたため、今後は FTD 患者由来 iPS 細胞や動物モデルを用いた解析を通じて、本研究で得られた知見の疾患関連性および治療応用可能性を検証する

5. 研究成果の公表方法

所属する日本薬理学会や日本神経化学会などでの学会活動を通じて、研究成果を発表する。さらに、研究成果は査読付き学術誌に論文として投稿・発表する予定である。論文発表の際には、応募者が所属する大学によるプレスリリースや新聞などの報道機関を通じて、社会・国民へ広く研究成果を発信する。また、研究室の公式ホームページや応募者が管理する個人のリサーチマップ等も積極的に活用し、研究成果の公表に努める予定である。

参考文献

1. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, Berg-Alonso L, Kageyama Y, Serre V, Moore DG, Verschueren A, Rouzier C, Le Ber I, Augé G, Cochaud C, Lespinasse F, N'Guyen K, de Septenville A, Brice A, Yu-Wai-Man P, Sesaki H, Pouget J, Paquis-Flucklinger V (2014) A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral

- sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain* 137: 2329-2345.
2. Pfanner N1, van der Laan M, Amati P, Capaldi RA, Caudy AA, Chacinska A, Darshi M, Deckers M, Hoppins S, Icho T, Jakobs S, Ji J, Kozjak-Pavlovic V, Meisinger C, Odgren PR, Park SK, Rehling P, Reichert AS, Sheikh MS, Taylor SS, Tsuchida N, van der Blik AM, van der Klei IJ, Weissman JS, Westermann B, Zha J, Neupert W, Nunnari J (2014) Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol* 204: 1083-1086.
 3. Genin EC, Plutino M, Bannwarth S, Villa E, Cisneros-Barroso E, Roy M, Ortega-Vila B, Fragaki K, Lespinasse F, Pinero-Martos E, Augé G, Moore D, Burté F, Lacas-Gervais S, Kageyama Y, Itoh K, Yu-Wai-Man P, Sesaki H, Ricci JE, Vives-Bauza C, Paquis-Flucklinger V (2015) CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol Med* 14; 8: 58-72.
 4. Chaussenot A, Le Ber I, Ait-El-Mkadem S, Camuzat A, de Septenville A, Bannwarth S, Genin EC, Serre V, Augé G; French research network on FTD and FTD-ALS., Brice A, Pouget J, Paquis-Flucklinger V (2014) Screening of CHCHD10 in a French cohort confirms the involvement of this gene in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging* 35: 2884.e1-4.
 5. Burstein SR, Valsecchi F, Kawamata H, Bourens M, Zeng R, Zuberi A, Milner TA, Cloonan SM, Lutz C, Barrientos A, Manfredi G (2018). In vitro and in vivo studies of the ALS-FTLD protein CHCHD10 reveal novel mitochondrial topology and protein interactions. *Hum Mol Genet* 27(1):160-177.
 6. Anderson CJ, Bredvik K, Burstein SR, Davis C, Meadows SM, Dash J, Case L, Milner TA, Kawamata H, Zuberi A, Piersigilli A, Lutz C, Manfredi G. (2019) ALS/FTD mutant CHCHD10 mice reveal a tissue-specific toxic gain-of-function and mitochondrial stress response. *Acta Neuropathol* 138(1):103-121.
 7. Shamma MK, Huang X, Wu BP, Fessler E, Song IY, Randolph NP, Li Y, Bleck CK, Springer DA, Fratter C, Barbosa IA, Powers AF, Quirós PM, Lopez-Otin C, Jae LT, Poulton J, Narendra DP (2022) OMA1 mediates local and global stress responses against protein misfolding in CHCHD10 mitochondrial myopathy. *J Clin Invest* 132(14): e157504.
 8. Sayles NM, Southwell N, McAvoy K, Kim K, Pesini A, Anderson CJ, Quinzii C, Cloonan S, Kawamata H, Manfredi G. (2022) Mutant CHCHD10 causes an extensive metabolic rewiring that precedes OXPHOS dysfunction in a murine model of mitochondrial cardiomyopathy. *Cell Rep* 8; 38 (10):110475

以上

Elucidation of the cell death mechanism induced by abnormal mitochondrial oligomerization of dementia-associated protein

Primary Researcher: Shinya Kusakari
Assistant Professor, Tokyo Medical University

Frontotemporal dementia, which encompasses many cases of early-onset dementia, lacks established fundamental treatments, making the understanding of its pathogenesis an urgent priority. This study focused on mutations in mitochondrial-localized proteins associated with familial frontotemporal dementia, aiming to clarify the mechanisms that trigger neuronal cell death. Analysis using cultured cells showed that disease-associated variants display abnormal multimerization and aggregate formation, with the extent of these phenomena correlating with their ability to induce cell death. Furthermore, it was suggested that aggregate formation causes mitochondrial stress, potentially leading to cytotoxicity through interactions with specific molecules. Additionally, screening for compounds that influence mitochondrial function identified several candidates that inhibit aggregate formation and cell death. These findings suggest a new disease mechanism based on abnormal aggregates and are expected to aid in the development of FTD therapeutics.