

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09331

研究課題名(和文)新規リピート関連非ATG翻訳関連分子の同定によるALS/FTLD病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanisms of ALS/FTLD by identifying molecules related to repeat-associated non-ATG translation

研究代表者

上山 盛夫 (Ueyama, Morio)

大阪大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：20386593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：難治性の神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)と前頭側頭葉変性症(FTLD)のうち、最も頻度が高いC9ORF72遺伝子変異を起因とするC9ALS/FTLDの発症においては、リピート関連非ATG(RAN)翻訳により生成されるタンパク質の毒性の関連が示唆されている。この毒性をRAN翻訳の制御により低減させることは新規治療法となることが考えられる。そこで本研究ではRAN翻訳が起こることを確認したC9ALS/FTLDのシロウジョウバエモデルを用いて、遺伝学的解析によりRAN翻訳抑制因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根治療法が未だにない筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭葉変性症に対して、リピート関連非ATG(RAN)翻訳により産生されるタンパク質の毒性を減少させ、発症を抑制することができる因子を発見した。この抑制因子を利用することで新たな治療法開発が進捗すると考えられる。同時にこれまで一般的に考えられていた開始コドンATGに依存する翻訳ではない、RAN翻訳のメカニズムの一端を明らかにする研究でもある。

研究成果の概要(英文)：Among the intractable neurodegenerative diseases, amyotrophic lateral sclerosis(ALS) and frontotemporal lobar degeneration(FTLD), the mutation of C9ORF72 gene is the most common mutation in ALS/FTLD(C9ALS/FTLD). The toxicity of proteins produced by repeat-associated non-ATG(RAN) translation is thought to be associated with pathogenesis of C9ALS/FTLD. Decreasing this toxicity by regulating RAN translation leads to one of the novel therapy. We identified suppressive modifier(s) of RAN translation by genetic analysis using Drosophila model for ALS/FTLD related to mutation of C9ORF72 gene.

研究分野：神経分子病態

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉変性症 リピート関連非ATG翻訳 異常伸長リピート RNAリピート病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)と前頭側頭葉変性症(FTLD)は神経細胞の変性・脱落を伴う神経変性疾患である。近年、ALS/FTLD患者から *C9ORF72* 遺伝子非翻訳領域に GGGGCC リピートの異常伸長が発見され、家族性および孤発性 ALS/FTLD 患者に最も高頻度な発症原因であることが明らかになった(C9ALS/FTLD)(DeJesus-Hernandez et al. *Neuron*, 2011、Renton et al. *Neuron*, 2011)。驚くべきことに、この異常伸長リピート由来の RNA は、脊髄小脳変性症 8 型(SCA8: 異常伸長 CAG リピート)など他の RNA リピート病と同様に、リピート関連非 ATG(RAN)翻訳により凝集性を持つジペプチドリピート(DPR)蛋白質に翻訳され、患者脳の神経細胞に蓄積していることが報告された(Mori et al. *Science*, 2013、Ash et al. *Neuron*, 2013)。さらに、ショウジョウバエ個体や培養細胞で DPR 蛋白質の神経毒性が示され(Mizielinska et al. *Science*, 2014、Zhang et al. *Acta Neuropathol*, 2014)、DPR 蛋白質が神経変性を引き起こすことが明らかにされた。これらのことから RAN 翻訳による DPR 蛋白質が ALS/FTLD 病態に影響しており、RAN 翻訳のマシナリーを含むメカニズム解明が ALS/FTLD の病態解明につながると考えられるが、RAN 翻訳メカニズムは未解明である。一方、C9ALS/FTLD を含む、大部分の家族性および孤発性 ALS/FTLD 患者の神経細胞に TDP-43 が凝集・蓄積しており、RAN 翻訳による DPR 蛋白質が TDP-43 の凝集・蓄積を引き起こすメカニズムを明らかにすることは、ALS/FTLD の共通発症のメカニズム解明につながる。

ショウジョウバエは、公共のストックセンターに多様な系統が維持されており、*in vivo*でのゲノムワイドな遺伝学的スクリーニングが可能である。実際、これまでに申請者を含む多くのグループで、神経変性疾患の関連遺伝子のスクリーニングに利用されてきた(Bilen and Bonini *Annu Rev Genet*, 2005、Marsh and Thompson *Neuron*, 2006)。申請者は GGGGCC リピート RNA を発現する C9ALS/FTLD モデルショウジョウバエを樹立し、神経変性および神経症状を呈することを明らかにした。さらに、このモデルでは RAN 翻訳による DPR 蛋白質の発現・蓄積を再現している。一方、C9ALS/FTLD 患者から樹立された iPS 細胞由来神経細胞モデルなどでは DPR 蛋白質の発現・蓄積の再現が未確定であり、現時点では C9ALS/FTLD モデルショウジョウバエはゲノムワイドな遺伝学的スクリーニングにより新規 RAN 翻訳マシナリーを同定可能な唯一のモデルである。

2. 研究の目的

- (1) RAN 翻訳のメカニズム解明に向けた関連分子を同定する。
- (2) TDP-43 の蓄積・凝集への RAN 翻訳産物である DPR 蛋白質の影響を検討する。
- (3) RAN 翻訳の見られる他の RNA リピート病との共通発症病態を検討する。

3. 研究の方法

- (1) C9ALS/FTLD モデルショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングによる RAN 翻訳マシナリーの同定

独自に樹立した C9ALS/FTLD モデルショウジョウバエは羽化率の低下、進行性運動機能障害および寿命短縮を呈する。また、複眼は光受容神経細胞や色素細胞の脱落が生じ、複眼変性を呈する。この複眼変性の表現型を指標に、遺伝学的な手法により ATG 依存性翻訳や mRNA 品質管理に関わる遺伝子など RAN マシナリーとして関与が予測される遺伝子について相互作用があるかどうかを検討した。さらに複眼変性に変化が見られた遺伝子については、DPR 蛋白質を認識する抗体を用いた免疫組織染色で発現量の変化を検証した。

- (2) TDP-43 発現 ALS/FTLD モデルショウジョウバエを用いた、遺伝学的および生化学的解析による TDP-43 の凝集・蓄積に対する DPR 蛋白質の影響の検討

当研究室で樹立した複眼変性を呈する TDP-43 発現 ALS/FTLD モデルショウジョウバエに、遺伝学的手法により DPR 蛋白質を発現させ、複眼変性に対する効果を検討しようとした。

(3) 各種 RNA リピート病モデルを用いた異常伸長リピート RNA と RANT マシナリーとの遺伝学的相互作用解析による RNA リピート病の共通発症病態解明

上記(1)で同定した RANT マシナリー遺伝子について、複眼変性を呈する脊髄小脳変性症 31 型 (TGGAA リピート)、筋強直性ジストロフィー 1 型 (CAG リピート)、および脆弱 X 関連振戦・失調症候群 (CGG リピート) モデルショウジョウバエを用いて、複眼変性の表現型の変化を指標に遺伝学的相互作用解析を行った。

4 . 研究成果

(1) C9ALS/FTLD モデルショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングによる RAN 翻訳マシナリーの同定

C9ALS/FTLD モデルショウジョウバエの複眼変性を回復させる 3 遺伝子を見出した。このうち 1 遺伝子については DPR 蛋白質の発現の変化を複眼の元となる複眼成虫原基において検討したところ、3 つの DPR 蛋白質全てが低下していた。この結果は、この遺伝子が RAN 翻訳を抑制することを示しており、RAN 翻訳マシナリーであることが分かった。

(2) TDP-43 発現 ALS/FTLD モデルショウジョウバエを用いた、遺伝学および生化学的解析による TDP-43 の凝集・蓄積に対する DPR 蛋白質の影響の検討

TDP-43 発現 ALS/FTLD モデルショウジョウバエに、遺伝学的手法により DPR 蛋白質を発現させようとしたところ、発生初期の致死となり、TDP-43 発現による複眼変性に対する DPR の効果を検討することができなかった。

(3) 各種 RNA リピート病モデルを用いた異常伸長リピート RNA と RANT マシナリーとの遺伝学的相互作用解析による RNA リピート病の共通発症病態解明

RAN 翻訳マシナリーとして同定された 1 つの遺伝子について、他のリピート病における RAN 翻訳マシナリーであるかどうかを検討したところ、脊髄小脳変性症 31 型モデルショウジョウバエの複眼変性は改善させたが、筋強直性ジストロフィー 1 型および脆弱 X 関連振戦・失調症候群モデルショウジョウバエの複眼変性には効果を示さなかった。これらの結果は、リピート病共通の RAN 翻訳マシナリーが存在し、共通の発症病態があることを示している。また、各リピート病に特異的な RAN 翻訳マシナリーも存在することを示している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

上山盛夫、永井義隆、*C9orf72* 関連筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭型認知症における病態メカニズム、医学のあゆみ、査読無、Vol.267、Nos.11,12、2018、817-822.
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=aa7ayuma/2018/026711/004&name=0817-0822j&UserID=133.1.59.28>.

I. Yamamoto, Y. Azuma, Y. Kushimura, H. Yoshida, I. Mizuta, T. Mizuno, M. Ueyama, Y. Nagai, T. Tokuda, M. Yamaguchi, NPM-hMLF1 fusion protein suppresses defects of a *Drosophila* FTL model expressing the human *FUS* gene, Sci. Rep., 査読有、8、2018、11291. DOI: 10.1038/s41598-018-29716-9.

T. Ishiguro, N. Sato, M. Ueyama, N. Fujikake, C. Sellier, A. Kanegami, E. Tokuda, B. Zamiri, T. Gall-Duncan, M. Mirceta, Y. Furukawa, T. Yokota, K. Wada, J. P. Taylor, C. E.

Pearson, N. Charlet-Berguerand, H. Mizusawa, Y. Nagai, K. Ishikawa, Regulatory role of RNA chaperone TDP-43 for RNA misfolding and repeat-associated translation in SCA31、Neuron、査読有、Vol.94、No.1、2017、108-124. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.02.046.

[学会発表](計 15 件)

M. Ueyama, T. Ishiguro, T. F. Gendron, T. Konno, A. Koyama, K. Ishikawa, K. Wada, O. Onodera, L. Petrucelli, Y. Nagai, Dissection of the pathogenic roles of expanded repeat RNA and dipeptide repeat proteins in C9-ALS/FTD model fly、5th RNA Metabolism in Neurological Disease Conference、2018 年。

上山盛夫、石黒太郎、T. F. Gendron、今野卓哉、小山哲秀、望月秀樹、和田圭司、石川欣也、小野寺理、L. Petrucelli、永井義隆、ショウジョウバエモデルによる C9-ALS/FTD の病態解明、第 37 回日本認知症学会学術集会、2018 年。

M. Ueyama, T. Ishiguro, T. Konno, A. Koyama, K. Wada, K. Ishikawa, O. Onodera, Y. Nagai, Repeat associated non-ATG translation and its regulation in *C9orf72*-associated amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia model fly、第 58 回日本神経学会学術大会・第 23 回世界神経学会議、2017 年。

上山盛夫、ショウジョウバエを用いた筋萎縮性側索硬化症/前頭側頭型認知症の病態形成メカニズムの解明、日本遺伝学会第 89 回大会、2017 年。

M. Ueyama, T. Ishiguro, T. F. Gendron, N. Fujikake, T. Konno, A. Koyama, O. Onodera, K. Ishikawa, K. Wada, L. Petrucelli, Y. Nagai, Toxicity of dipeptide repeat proteins in C9 ALS/FTD model fly、4th RNA Metabolism in Neurological Disease Conference, 11th Brain Research Conference、2016 年。

M. Ueyama, T. Ishiguro, N. Fujikake, T. Konno, A. Koyama, O. Onodera, K. Wada, Y. Nagai, Repeat associated non-ATG translation in *Drosophila* C9ALS/FTD model、第 57 回日本神経学会学術大会、2016 年。

M. Ueyama, T. Ishiguro, N. Fujikake, T. Konno, A. Koyama, O. Onodera, K. Ishikawa, K. Wada, Y. Nagai, Establishment of a novel animal model of ALS and FTD expressing GGGGCC repeat RNA in *Drosophila*、3rd RNA Metabolism in Neurological Disease Conference, 10th Brain Research Conference、2015 年。

M. Ueyama, T. Ishiguro, N. Fujikake, T. Konno, A. Koyama, O. Onodera, K. Ishikawa, K. Wada, Y. Nagai, Establishment of a novel animal model of ALS and FTD expressing GGGGCC repeat RNA in *Drosophila*、第 38 回日本神経科学大会、2015 年。

[図書](計 1 件)

M. Ueyama, Y. Nagai, Springer Nature Singapore Pte Ltd., dvances in Experimental Medicine and Biology "Drosophila Models for Human Diseases" "Chapter 5 Repeat Expansion Disease Models"、2018 年、63-78.

[産業財産権]

出願状況(計 3 件)

名称：脊髄小脳変性症 3 1 型抑制剤

発明者：中谷和彦、柴田知範、永井義隆、上山盛夫

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2018-73666

出願年： 2018 年

国内外の別： 国内

名称：筋萎縮性側索硬化症又は前頭側頭型認知症の予防又は治療剤

発明者：永井義隆、上山盛夫

権利者： 同上

種類： 特許

番号：特願 2017-096111

出願年： 2017 年

国内外の別： 国内

名称： TDP-43 プロテインパッチー治療用組成物

発明者：長野清一、荒木敏之、上山盛夫、永井義隆

権利者： 同上

種類： 特許

番号：特願 2016-087320

出願年： 2016 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。