

令和元年9月9日現在

機関番号：34447

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05379

研究課題名(和文) 前頭側頭型認知症の異常蛋白沈着と神経変性機序の解明に関する研究

研究課題名(英文) Study of mechanism of neurodegeneration and abnormal protein deposition in FTL

研究代表者

武田 雅俊 (Takeda, Masatoshi)

大阪河崎リハビリテーション大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：00179649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：C9orf72非翻訳領域6塩基反復配列に由来するジペプチドと内因性アポトーシス阻害因子XIAPとの相互作用を検討した。XIAPと異常沈着蛋白(TDP-43全長分子、C端フラグメント、C9orf72由来ジペプチド(GA)<sub>n</sub>)との相互作用について*in vitro*ではXIAPと(GA)<sub>n</sub>との結合を示した。*in vivo*実験では明瞭な相互作用を示すことができなかったが、BMSC-CM添加により(-GA)<sub>n</sub>過剰発現培養細胞でのケモカイン発現抑制を示した。異常沈着蛋白とXIAPとの相互作用を証明するには至らなかったが、FTD病態にケモカインの関与を示唆し、各病型における変性機序の特徴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前頭側頭型認知症は65歳以下ではアルツハイマー病(AD)について頻度の高い変性性認知症であり、その診断治療法の開発が期待されている。前頭側頭型認知症(FTD)、進行性非流暢性失語症(PA)、意味性認知症(SD)に区分し、FTDの下位分類として、前頭葉変性型(FLD)、ピック病型、運動ニューロン型(MND)に分けることが多い。本研究では、AD研究で得られた仮説に基づいて、FTDにおける神経脱落機序への内因性アポトーシス阻害因子の作用を検討し、アポトーシス阻害因子の抑制だけでは説明できないことを示したが、FTDの病態と臨床症状は多彩であり、その分子論的な分類についても一定の貢献をなすことができた。

研究成果の概要(英文)：Dipeptides translated from amplified GGGGCC repeat of C9orf72 gene have been identified as the abnormally deposited protein in the brain of FTD. In this study, we investigated the possible interaction between dipeptide repeats translated from C9orf72 gene and intrinsic apoptosis inhibitor, XIAP, for the purpose of elucidating the molecular mechanism of neurodegeneration in FTD. Our results demonstrated the interaction between XIAP and TDP-43 full molecule, 35kDa C-terminal fragment of TDP-43, and poly GA dipeptide *in vitro* experiment. *In vivo* experiment, however, we could not obtain the data demonstrating the interaction between XIAP and poly GA peptide. Experiments with BMSC-CM showed the fact that BMSC-CM suppresses the expression of chemokines and cytokines, indicating the astroglial and microglial participation in the process of neurodegeneration in the brain of FTD. These biological data were utilized to classify and understand the molecular pathogenesis of actual FTD subjects.

研究分野：老年精神医学

キーワード：前頭側頭型認知症 アポトーシス阻害因子 タウ TDP-43 C9orf72 FUS XIAP バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、長年にわたりアルツハイマー病病理過程に関する遺伝細胞生物学的な研究に従事し、タウ蛋白のリン酸化機序、過剰リン酸化されたタウ蛋白と神経細胞脱落との関係を示す成果を報告してきた。一方、前頭側頭葉性変性症(FTLD)は65歳以下ではアルツハイマー病について頻度の高い変性性認知症であり、FTLDを大きく前頭側頭型認知症(FTD)、進行性非流暢性失語症(PA)、意味性認知症(SD)に区分し、FTDの下位分類として、前頭葉変性型(FLD)、ピック病型、運動ニューロン型(MND)に分けることが多い。本研究では、AD研究で得られた知見に基づいて、FTDにおける神経細胞脱落機序を解明できると考えた。FTD脳の神経細胞内に沈着する封入体の構成蛋白は、約半数の症例ではタウ(+)-ユビキチン(+)-封入体であり、タウ蛋白がユビキチン化されたものであることが明らかにされた。しかしながら、残りの約半数はタウ(-)-ユビキチン(+)-封入体であり、タウ陰性FTD(FTD-U)の構成蛋白の同定が進められ、2004年に valosin-containing protein (VCP)が、2005年に charged multi-vesicular body protein (CHMP2B)が、FTD-U形成に関与する遺伝子として同定されたが、これらの遺伝子変異により発症するFTDはごく少数であった。

その後もFTD発症に関与する遺伝子検索が続けられ、2006年に核内mRNA結合蛋白であるTDP-43(transactive response DNA binding protein with Mr 43kD)とFUS(RNA binding protein fused in sarcoma)がFTD-Uの主要な構成蛋白であることが見出された。そして、最後の主要構成蛋白を同定する研究が続けられてきたが、2013年にC9orf72(chromosome 9 open reading frame 72)の非翻訳領域のGGGGCC6塩基反復配列から翻訳発現されるジペプチドがFTD患者脳内に沈着していることが、代表研究者のグループの一人により同定され(Mori,2013)、ほぼ全てのFTDに沈着する封入体の構成蛋白が同定されたことになる。このような背景を踏まえて、FTD脳内における神経細胞の変性と脱落の機序を解明するために本研究を開始することになった。

## 2. 研究の目的

多くの認知症をきたす神経変性疾患には細胞内外の封入体や異常蛋白の沈着がみられるが、前述したようにアルツハイマー病やFTD脳内に出現する異常蛋白の構成蛋白についてはほぼ同定されたと考えてよい。またそのメカニズムについても、変性性認知症のリスク遺伝子の検討により少しずつ進展してきた。アルツハイマー病の原因遺伝子としてアミロイド前駆体蛋白、プレセニン-1、プレセニン-2の変異があり、強力なリスク遺伝子としてアポリポ蛋白E4がある。一方、FTD原因遺伝子として、FTDP-17においてはタウの変異が同定され、続いてプログラニュリン遺伝子変異が同定された。

FTDは50歳代、60歳代の若齢発症が多いが、アルツハイマー病以上に遺伝性発症がしられており、FTDの約40-50%は家族性とされている。この十年間にFTDの発症に関与する遺伝子が相次いで同定された。まず、家族性の前頭側頭型認知症の一亜型でパーキンソン病を呈し17番染色体上の遺伝子部位と強い連鎖を示す家系(FTDP-17)の解析から、1998年にタウ(MAPT)の変異が見出された(Hutton,1998)。これは、FTDを特徴づける抗タウ抗体陽性の封入体(FTD-tau)の形成にタウの変異が関与していることを示したものであり、アルツハイマー病におけるアミロイドカスケード仮説との関係で言うと、アミロイドの関与がなくても、神経原線維変化(NFT)や神経細胞変性が起こりうることを示した新しい知見であった。このような知見を踏まえて、本研究ではタウ由来の蛋白とFTDの異常沈着蛋白として同定されたC9orf72遺伝子非翻訳領域GGGGCC6塩基反復配列に由来するジペプチドとの相互作用により神経細胞が変性脱落する可能性を検討することを目的とした。

代表研究者は、これまでにN端メチオニン(Met)が外れたタウ蛋白の配列は、神経細胞の内因性アポトーシス阻害因子XIAPと相互作用することを証明しており、アルツハイマー病においては、Met(-)タウ(N末端のメチオニンが外れたタウ)がXIAPと結合し内因性アポトーシス阻害因子を不活性化することにより、神経細胞アポトーシスが進行すると仮説を提唱してきたからである。そこで、本研究ではTDP-43の全長分子と病態脳で発現しているC端フラグメント(35kDa)およびC9orf72遺伝子非翻訳領域GGGGCC6塩基反復配列に由来するジペプチドとMet(-)タウとのin vitro およびin vivoにおける相互作用を検討し、神経細胞アポトーシスへの影響を明らかにすることを第一の目的とした。また、FTDにおける神経細胞アポトーシスの亢進機序を明らかにすること、および、FTD症例を集積し臨床的特徴を詳細に検討すると共に、その脳機能画像との対比により神経細胞脱落の特徴を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)In vitro 相互作用 TDP-43全長および病態脳で発現しているTDP-43のC端フラグメント(35kDa)とC9orf72由来ジペプチドリピート蛋白((-Gly-Ala-)n)をexactシステム(BioRad)を用いて作成を試みたが、これらの蛋白自体に凝集性が高く抽出に困難があったため、最終的にコールドショック蛋白発現系に切り替えることにより作成し、作成されたりコンビナント蛋白とXIAPとのpull-downアッセイを行った。C9orf72由来のジペプチドリピート蛋白((-Gly-

Ala-)n 高発現 HEK293T 細胞株を作成し固定した後、リコンビナントの GST-Tag 付き XIAP をオーバーレイしてその共局在を検討した。

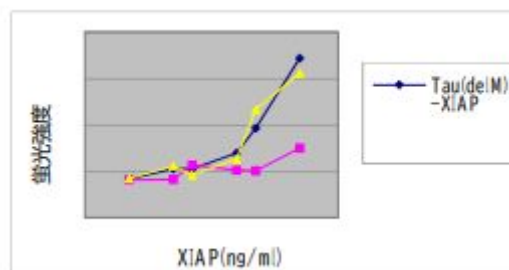
(2) In vivo 相互作用 Gly-Ala(GA)リピートタンパクと内因性 XIAP が培養細胞レベルで共局在することを検討するために、HeLa 細胞に内因性 C9orf72 リピートおよびその近傍領域をクローニングしたプラスミドを強制発現させ、non-AUG 依存性翻訳によって C 末端を FLAG-TAG で標識した Gly-Ala(GA)リピートタンパクを発現させ、抗 XIAP 抗体との免疫染色により検討した。

(3) FTD の神経細胞脱落に対するアストログリア関与の検討 脱髄や外傷などの損傷を受けた時に GFAP 強陽性の反応性アストロサイトからサイトカインやケモカインなどが分泌されミクログリアを誘引する炎症過程が、FTD における神経細胞脱落に関与している可能性を検討するために、これまで脊髄損傷モデルマウスに対して有効性を報告してきた骨髄間質細胞の培養上清 (BMSC-CM) を用いてこの反応性アストロサイトを抑制できるかどうかを DNA microarray により比較解析した。

(4) 臨床サンプルの収集と検討 FTD 患者 20 名の神経心理検査画像検査を行い、その病型を同定し、臨床的特徴を解析すると共に、脳機能画像データと DNA も含めた採血検体を収集した。

#### 4. 研究成果

(1) In vitro 相互作用 TDP-43 全長および病態脳で発現している C 端フラグメント (35kDa) と C9orf72 由来のジペプチドリピータンパク ((-Gly-Ala-)n を eXact システム (BioRad) および コールドショック蛋白発現システムを用いて作成した。そして、図に示すように XIAP による pull-down アッセイにより TDP-43C 端フラグメント(35kDa)と C9orf72 由来蛋白((-Gly-Ala-)n はどちらも XIAP と共沈することを示した。これは重要な結果であり、TDP-43C 端フラグメントおよび C9orf72 由来ジペプチドリピータンパクが内因性アポトーシス阻害因子 XIAP との相互作用を介して、神経細胞アポトーシスに関与している可能性を示唆している。この結合親和性について、表面プラズモン共鳴法により解析することにより、この相互作用と神経細胞変性過程との関係を解析することにより神経細胞の変性脱落機序の一端を知ることができる可能性がある。



(2) In vivo 相互作用 C9orf72 由来のジペプチドリピータンパクの凝集体は確認することができたものの、XIAP は瀰漫性に染色され、両者の特異的な結合を確認することはできなかった。このような結果は予想外のことであったが、凝集のあとに事後的には結合せず凝集ステップで結合する可能性が残されていると考えて、共発現系にて再度の検討を行った。共発現細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し、抗 FLAG 抗体および内因性 XIAP に対するモノクローナル抗体を用いた 2 重染色を行ったが、GA タンパクの凝集と内因性 XIAP の明らかな共凝集は認められず、明確な共局在を示す結果を得ることはできなかった。さらに、蛋白-蛋白間の光クロスリンクを誘導する変異アミノ酸である Para benzoyl L phenylalanine (Bpa) を用いて細胞内での相互作用を検討した。Bpa は数オングストロームの距離で近接したアミノ酸に対して、紫外線照射下でクロスリンクする性質を有していることを利用して、家族性 FTD 脳において異常沈着する蛋白の XIAP に対する結合特異性とその部位を確認するために、遺伝子コンストラクト上にアンバーコドン (特殊大腸菌内において Bpa アミノ酸をコードする) を組み込む技法を用いて、Bpa をタウ、TDP-43、C9orf72 由来のジペプチドリピータンパクのいくつかの部位に導入して紫外線照射下における XIAP との結合を検討した。タウの N 末端部位に Bpa を導入したものは XIAP とのクロスリンクが認められたものの、TDP-43 および C9orf72 由来のジペプチドリピータンパクについてはポジティブな結果を得ることができなかった。

(3) FTD の神経細胞脱落に対するアストログリア関与の検討 BMSC-CM で培養したアストロサイトでは、反応性アストロサイトのマーカーである GFAP や S100 の発現が約 60%に抑えられていた。また、障害を受けた脳内では反応性アストロサイトにおける GABA 産生酵素である MAOb が活性化されることが知られているが、BMSC-CM で培養したアストロサイトでは MAOb の発現が約半分に抑えられていた。さらに、炎症に関与するケモカイン CCL20 と CXCL10 の発現が約 30%に抑えられていた。一方で、抗炎症性サイトカインである IL-11 の発現は 1.7 倍増加していた。これらのことから、BMSC-CM は、アストロサイトの活性化を抑えることで炎症反応を抑制し、神経変性過程を抑制する可能性が示唆された。BMSC-CM 添加により (-GA-) 過剰発現培養細胞において、炎症性ケモカインの発現が抑制されていることを示唆する知見が得られた。

(4)臨床サンプルの収集と検討 FTD 脳内での神経変性機序を理解するための作業仮説として、脳内に異常沈着している蛋白と内因性アポトーシス阻害因子との相互作用を考え、一部の実験ではそれを支持する知見を得たが、証明するには至らなかった。しかしながら、FTD の神経細胞アポトーシスにアストログリアやマイクログリアが関与しており、FTD の病態に種々のサイトカインやケモカインが

| major molecular class | pathological subtype | associated genes | bvFTD | PNFA | SD  | parkinson | MND |
|-----------------------|----------------------|------------------|-------|------|-----|-----------|-----|
| FTLD-tau              | •PiD                 |                  | +     | +    | (+) |           |     |
| FTLD-tau              | •CBD                 |                  | +     | +    |     | +         | PLS |
| FTLD-tau              | •PSP                 |                  | +     | +    |     | +         | PLS |
| FTLD-TDP              |                      | •(TARDBP)        | (+)   |      |     | +         | ALS |
| FTLD-TDP              | •type A              | •GRN             | +     | +    |     | +         |     |
| FTLD-FUS              |                      | •(FUS)           | (+)   |      |     |           | ALS |

関与している可能性が示唆された。CCL20、CXCL10、IL-11 のような分子は神経細胞の変性脱落に少なからず関与している可能性があり、神経細胞アポトーシスだけでなく FTD の病態により異なる影響を及ぼしている可能性も考えられる。そのような考えに基づいて、分子生物学的な実験だけでなく、臨床症例の集積を行ない、症例を集積しその特徴を明らかにした。このサンプルを活用して臨床にフィードバックできるデータを加えることにより、前頭側頭型認知症のバイオマーカー、診断法、治療法の開発につなげたい。

## 5 . 主な発表論文等

- Ihl R, Bunevicius R, Frölich L, et al; WFSBP Task Force on Mental Disorders in Primary Care.; WFSBP Task Force on Dementia. World Federation of Societies of Biological Psychiatry guidelines for the pharmacological treatment of dementias in primary care. *Int J Psychiatry Clin Pract.* 2015 Mar;19(1):2-7. doi: 10.3109/13651501.2014.961931.
- Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, et al. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *Nat Commun.* 2016 Feb 3;7:10594. doi: 10.1038/ncomms10594.
- Mizuta N, Yanagida K, Takeda M, et al. Identification of small peptides in human cerebrospinal fluid upon amyloid degradation. *Neurodegenerative Dis* 2016/12/23 Epub DOI 10.1159/000452258
- Tagami S, Yanagida K, Takeda M, et al. Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of  $\gamma$ -Secretase .*Cell Rep.* 2017 Oct 3;21(1):259-273. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.032.
- N.Mizuta, M.Takeda, et al. Identification of small peptides in human cerebrospinal fluid upon amyloid- $\beta$  degradation. *Neurodegenerative Diseases* 17, 103-109, 2017
- Kazui H, Takahashi R, Tanaka T, et al. Neural Basis of Apathy in Patients with Amnesic Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis.* 2017;55(4):1403-1416.
- Davidson YS, Flood L, Robinson AC, Nihei Y, Mori K, et al. Heterogeneous ribonuclear protein A3 (hnRNP A3) is present in dipeptide repeat protein containing inclusions in Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neurone disease associated with expansions in C9orf72 gene *Acta Neuropathologica Communications* 2017 5:31
- Tagami S, Yanagida K, Takeda M, et al. Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of  $\gamma$ -Secretase. *Cell Rep.* 2017 Oct 3;21(1):259-273. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.032. PMID: 28978478
- Yamaguchi-Kabata Y, Morihara T, Takeda M, et al. Integrated analysis of human genetic association study and mouse transcriptome suggests LBH and SHF genes as novel susceptible genes for amyloid- $\beta$  accumulation in Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 2018 Jul 13. doi: 10.1007/s00439-018-1906-z. [Epub ahead of print] PMID: 30006735
- D.Tamada, T.Kitamura, M.Takahara, T.Tanaka, M.Takeda, et al. TSH ratio as a novel diagnostic method for Cushing's syndrome. *Endocrine J* 65, 841-848, 2018
- Kohji Mori1, Yoshihiro Nihei, et al. Reduced hnRNPA3 increases C9orf72 repeat RNA levels and dipeptide-repeat protein deposition *EMBO Reports*, Published online: July 26, 2018
- Kazui H, Yoshiyama K, Tanaka T. Differences of behavioral and psychological symptoms of dementia in disease severity in four major dementias. *PLOS ONE* August 18-,2018
- Kanemoto H, Kazui H, Tanaka T, Ikeda M. Apathy and right caudate perfusion in idiopathic normal pressure hydrocephalus: a case-control study. *Int J Geriatr Psychiatry* 34, 453-462, 2019
- Eva M van Well, Verian Bader, Kohji Mori, et al. A protein quality control pathway regulated by linear ubiquitination *The EMBO Journal* e100730; 2019

〔雑誌論文〕(計 83 件)

〔学会発表〕(計 31 件)

〔図書〕(計 6 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://www.kawasakigakuen.ac.jp/guide/feature/cognitivereserve.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：田中 稔久  
ローマ字氏名：Toshihisa Tanaka  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：10294068

研究分担者氏名：森 康治  
ローマ字氏名：Kohji Mori  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：40775318