

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06705

研究課題名（和文）リボソーム機能異常に着目したALS/FTLDの新規発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the ALS/FTLD pathomechanism mediated by the dysfunction of ribosome biogenesis

研究代表者

鈴木 宏昌（Suzuki, Hiroaki）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10424178

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：C9orf72遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭葉変性症の発症メカニズムを解析した。C9orf72遺伝子変異から産生されるジペプチドリヒートタンパク質Poly-PRに着目し、Poly-PRが誘導する神経細胞死メカニズムを解析した結果、Poly-PRはリボソーム生合成、パラスペックル核内構造体、RNA編集を阻害することによって神経細胞死を誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALS/FTLDの発症メカニズムを両疾患において最も高頻度に認められるC9orf72遺伝子変異に着目し解析した。本研究の遂行により、複数の神経細胞死メカニズムが明らかになり、本研究の成果は両疾患の理解を深めると共に、新たな創薬ターゲットの同定に結びつくものであり、超高齢化社会を迎え、両疾患の根本的治療薬が望まれる我が国において、医学的社会的意義のある成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：I investigated the pathomechanism underlying C9orf72-linked amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. In the current study, I found that poly-PR, a dipeptide repeat protein derived from C9orf72 mutation, causes neuronal cell death by inhibiting the ribosome biogenesis, paraspeckles, and RNA editing.

研究分野：神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉変性症 C9orf72遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) および前頭側頭葉変性症 FTLD (Frontotemporal lobar degeneration) は、難治性の神経変性疾患であり、多くは加齢に伴い発症するため、高齢化社会を迎える我が国において、発症メカニズムの解明とそれに基づく根治薬の開発が急務となっている。これら両疾患は、運動機能障害を示す ALS と認知機能障害を示す FTLD を同時に発症する患者が存在することや、原因遺伝子および細胞内封入体の構成成分の一部が共通していることが明らかになっている。以上より、両疾患は、発症メカニズムとして共通した分子基盤を有する可能性が示唆されている。

両疾患は、ほとんどが孤発性に発症するが、一部で家族性に発症する家系が見つかり、これを契機に現在では複数の ALS/FTLD 原因遺伝子が同定されている。しかしながら、それら原因遺伝子産物は必ずしも共通した機能を有しておらず、ALS/FTLD 発症には、複数の異なる発症要因または複合的なメカニズムが関与すると考えられている。

一方で両疾患には、特定の神経細胞のみが侵されるといった変性部位特異性があることや、細胞内封入体の構成成分に他の疾患にはない共通性が認められるなど、明らかに他の神経疾患とは区別される特徴を有する。このため両疾患には発症に至らしめるコア発症メカニズムが存在すると考える。

このような考えのもと、研究代表者はコア発症メカニズム解明のため、両疾患の原因遺伝子である C9orf72 に着目した研究を開始した。C9orf72 遺伝子変異は、ALS と FTLD の両疾患において最も高頻度に認められており、さらに家族性のみならず、通常は遺伝子変異を伴わない孤発性においても認められている。以上より、C9orf72 遺伝子変異による ALS/FTLD の発症メカニズムの解明は、両疾患のコア発症メカニズムを解明できる可能性を有している。

C9orf72 遺伝子変異は、C9orf72 遺伝子の非翻訳領域において GGGGCC の 6 塩基配列が異常に伸長しており、これにより (1) C9orf72 タンパク質の発現が減少する、(2) GGGGCC 反復配列を含む RNA 凝集体が形成される、(3) ATG 非依存性に GGGGCC 異常伸長から 2 つのアミノ酸が繰り返す 5 種類のジペプチドリピート DPR (Dipeptide repeat) が産生されることが報告されている。本研究では、DPR に着目し、その神経変性メカニズムの解明と新たな創薬ターゲットの同定を試みた。

## 2. 研究の目的

C9orf72 遺伝子変異による両疾患の発症メカニズム解明に取り組む過程において、研究代表者は *in vitro* の解析から DPR のうち、プロリン(P)-アルギニン(R)からなる PR リピートが神経細胞死を誘導すること、さらに神経細胞死誘導にはリボソーム生合成の低下が関与することを見出した。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明であり、これを明らかにすることは、両疾患の発症メカニズム解明と治療薬開発に重要な成果を与えると考えられた。そこで本研究では、PR リピートによるリボソーム生合成低下と細胞死誘導メカニズムを明らかにすることを目的として研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

運動神経細胞株 NSC-34 細胞および初代培養大脳皮質神経細胞を用い、それらの神経細胞に組換えアデノウイルスベクターを用いて、100 リピートを有する PR リピート (Poly-PR) を発現させ、Poly-PR が神経細胞に与える影響を検討した。特に、Poly-PR の結合タンパク質を GST プルダウンアッセイおよび質量分析により同定し、Poly-PR が Poly-PR 結合タンパク質の機能にどのような影響を与え、それらが神経毒性に関与しているのか、細胞死アッセイ、細胞生存アッセイ、ウェスタンブロッティング、定量的リアルタイム PCR 解析等を行うことにより評価した。

## 4. 研究成果

Poly-PR の神経細胞死誘導メカニズムとして、以下(1)~(3)の3つの知見が得られた。

(1) Poly-PR は、リボソーム生合成を低下させることにより神経細胞死を誘導する。

当初の本研究の目的である Poly-PR とリボソーム生合成の関連について検討した結果、以下のことが明らかになった。

- ① Poly-PR はリボソーム RNA の発現レベルを低下させる。
- ② リボソーム生合成の促進は Poly-PR による神経細胞死を部分的に抑制する。
- ③ Poly-PR は核小体において複数の DEAD-box RNA ヘリカーゼに結合する。
- ④ DEAD-box RNA ヘリカーゼの機能抑制は、リボソーム生合成の低下と細胞死を誘導する。

以上の結果より、Poly-PR は核小体においてリボソーム生合成を正に制御している DEAD-box RNA ヘリカーゼに結合し、その機能を抑制することによってリボソーム RNA の発現レベルを低

下させ、このことが Poly-PR による神経細胞死誘導に関与している可能性が示唆された。

(2) Poly-PR は、核内構造体であるパラスペックルの機能を阻害することにより神経細胞死を導く。

Poly-PR 結合タンパク質の同定作業において、核内構造体であるパラスペックルを構成するパラスペックルタンパク質が複数同定された。この結果に基づき、Poly-PR とパラスペックルの機能的関連性を詳細に解析した結果、以下の知見が得られた。

- ① Poly-PR は、パラスペックル形成の必須分子である Nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (NEAT1) non-coding RNA に結合し、その発現レベルを上昇させる。
- ② NEAT1 non-coding RNA の発現上昇は神経細胞死を誘導する。
- ③ Poly-PR は、複数のパラスペックルタンパク質に結合し、それらの機能を阻害する。

パラスペックルの生理的機能は十分明らかになっていないが、様々な RNA 代謝に関与することが明らかになっている。上記結果より、Poly-PR は NEAT1 non-coding RNA やパラスペックル構成タンパク質に結合し、パラスペックルの形成を促進し、その生理的機能に異常をもたらすことによって神経細胞死を誘導する可能性が示唆された。

(3) Poly-PR は、RNA 編集酵素 ADAR の機能を阻害する。

Poly-PR の神経細胞死誘導メカニズムの解析過程において、Poly-PR が RNA 編集酵素として知られる Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) に結合することが明らかになった。Poly-PR が ADAR の機能にどのような影響を与えるのか詳細な解析を行った結果、以下のことが明らかになった。

- ① Poly-PR は核小体において、RNA 依存的に ADAR1 および ADAR2 に結合する。
- ② Poly-PR は ADAR1 および ADAR2 の RNA 編集活性を抑制する。
- ③ Poly-PR は、ADAR1 が有するアポトーシス抑制機能を阻害する。
- ④ ADARs の発現低下は神経細胞死を誘導する。

以上の結果から、Poly-PR は ADARs の機能を阻害することによって神経細胞死を誘導する可能性が示唆された。

以上の結果を総合すると、Poly-PR は核内において、RNA 代謝に関与する様々な RNA 結合タンパク質あるいは RNA 自身に結合し、それらの機能を阻害することによって神経細胞死を誘導し、このことが C9orf72 遺伝子変異が導く ALS/FTLD の発症に関与する可能性が示唆された。今後は、本研究で得られた知見を *in vivo* で検証するとともに、本研究によって明らかになった ALS/FTLD の新たな創薬標的分子に焦点を当て、ALS/FTLD の治療薬開発を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Hiroaki, Shibagaki Yoshio, Hattori Seisuke, Matsuoka Masaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 C9-ALS/FTD-linked proline-arginine dipeptide repeat protein associates with paraspeckle components and increases paraspeckle formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-019-1983-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Suzuki, Yoshio Shibagaki, Seisuke Hattori, Masaaki Matsuoka	4. 巻 9
2. 論文標題 The proline-arginine repeat protein linked to C9-ALS/FTD causes neuronal toxicity by inhibiting the DEAD-box RNA helicase-mediated ribosome biogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-018-1028-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Suzuki Hiroaki, Matsuoka Masaaki
2. 発表標題 C9-ALS/FTD-linked proline-arginine dipeptide repeat protein inhibits adenosine deaminase acting on RNA
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki Hiroaki, Matsuoka Masaaki
2. 発表標題 C9-ALS/FTD-linked proline-arginine dipeptide repeat protein causes neuronal cell death by associating with paraspeckle components
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suzuki Hiroaki、Matsuoka Masaaki
2. 発表標題 C9-ALS/FTD-linked proline-arginine dipeptide repeat protein causes neurotoxicity by disrupting paraspeckle integrity
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Suzuki, Masaaki Matsuoka
2. 発表標題 The proline-arginine repeat protein linked to C9ORF72-ALS/FTD inhibits RNA helicase-mediated ribosome biogenesis and causes neuronal cell death
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018, SfN's 48th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Suzuki, Masaaki Matsuoka
2. 発表標題 C9ORF72-linked proline-arginine dipeptide repeat protein inhibits RNA helicase-mediated ribosome biogenesis and causes neurotoxicity
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------