

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03602

研究課題名(和文) 前頭側頭型認知症における「RNA代謝リレー障害」仮説の実証

研究課題名(英文) Verification of the 'RNA metabolic relay disorder' hypothesis in Frontotemporal Dementia.

研究代表者

森 康治 (Mori, Kohji)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40775318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：C9orf72リピート伸長変異は家族性前頭側頭葉変性症(前頭側頭型認知症)および筋萎縮性側索硬化症の主要な原因遺伝子変異である。我々はこれまで病原性GGGGCCリピートRNA結合タンパク質であるhnRNPA3がリピートRNAの代謝を促進することを見出してきたが、そのメカニズムは不明であった。本研究では近位ビオチン化法と質量分析を組み合わせることによりhnRNPA3の近隣に位置する物質を網羅的に同定し、GGGGCCリピートRNA代謝に関与する有望な新規因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C9orf72変異型の前頭側頭葉変性症・筋萎縮性側索硬化症では、細胞内に病原性GGGGCCリピートRNAが蓄積されている。GGGGCCリピートRNAの分解を促進することができれば、新たな治療法の開発につながる。本研究はまだまだ不明な点が多い、GGGGCCリピートRNAの代謝経路の一端を明らかにしたものである。本研究の成果を応用し、RNA分解の観点からC9orf72変異型の前頭側頭葉変性症・筋萎縮性側索硬化症の新たな治療法の開発につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：The C9orf72 repeat expansion mutation is a major causative genetic mutation in familial frontotemporal lobar degeneration (frontotemporal dementia) and amyotrophic lateral sclerosis. We have previously found that the pathogenic GGGGCC repeat RNA-binding protein hnRNPA3 promotes repeat RNA metabolism, but the mechanism is unknown. In this study, we used a combination of proximal biotinylation and mass spectrometry to comprehensively delineate the neighbourhood of hnRNPA3 and identify a promising novel factor involved in GGGGCC repeat RNA metabolism.

研究分野：精神医学

キーワード：前頭側頭葉変性症 RNA代謝 近接ビオチン化法 C9orf72

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前頭側頭型認知症 (FTD) は前頭側頭葉変性症 (FTLD) とも呼ばれる。働きざかりの 65 歳以前に好発し、失語症や脱抑制的な行動障害を呈する。近年ようやく症候学的分類や蓄積タンパクに基づく病理分類が確立してきたが、その分子病態はいまだ十分には解明されておらず、疾患修飾薬は存在しない。また筋萎縮性側索硬化症に代表される運動ニューロン病 (MND) をしばしば合併する。FTD の約半数には異常なリン酸化を受けた TDP-43 が、およそ 1 割には FUS が蓄積する。TDP-43 も FUS も核に局在して RNA と結合する ribonucleoprotein (RNP, リボ核タンパク質) である。分子遺伝学の進歩により家族性 FTD を引き起こす原因としていくつかの遺伝子変異が同定されてきたが、なかでも *C9orf72* 遺伝子イントロン上の 6 塩基 (GGGGCC) の数百リピートにもおよぶ異常延長は、FTD の原因遺伝子変異として世界で最も頻度が高い。臨床フェノタイプは FTD のみならず MND で発症する例、FTD と MND を合併する例もある。ここでは *C9orf72* FTD/MND と総称する。*C9orf72* FTD/MND では TDP-43 の蓄積をみる。また当該変異保持者やその血縁者は、FTD 症状が前景に出ていない病初期に高頻度に Psychosis を呈する。

我々は非翻訳領域に位置するこの *C9orf72* GGGGCC リピートが、異常な翻訳である RAN 翻訳を受けること、さらに TDP-43 以外に、「ジペプチドの繰り返しモチーフを持ち、既存のデータベースには存在しない異常タンパク質=Dipeptide repeat protein (DPR)」が患者脳に多量に蓄積していることを発見した (Mori K 他 Science 2013, Mori K 他 Acta Neuropathologica 2013)。*C9orf72* FTD/MND 患者の脳には TDP-43 凝集体よりも遥かに多くの DPR 凝集体が存在する。開始コドン (ATG) から始まる通常の翻訳にくらべて RAN 翻訳の翻訳効率は低いいため、DPR の発現には多くのリピート RNA が必要であると考えられる。リピート RNA の蓄積の原因としては、「産生の増加」と「分解の低下」の 2 通りが想定されるが、リピート配列がグアニン 4 重鎖構造と呼ばれる特異な高次構造をとり、転写を阻害することから、リピート RNA の産生はむしろ低下している。よって「*C9orf72* FTD/MND ではリピート RNA を含む RNA の分解効率が低下し、リピート RNA が蓄積している」と考えられる。

我々は以前 GGGGCC リピート RNA に選択的に結合するタンパク質を RNA pull down 法により精製、同定した (Mori K 他 Acta Neuropathologica 2013)。多数の RNA 結合タンパク質が GGGGCC リピート RNA 結合タンパク質として同定されたが、中でも hnRNPA3 は *C9orf72* FTD/MND モデル細胞で GGGGCC リピート RNA の発現レベルや DPR タンパク質の発現レベルを有意に抑制した (Mori K 他 EMBO Reports 2016)。しかしそのメカニズムは不明のままである。

2. 研究の目的

hnRNPA3 は何らかの機序により GGGGCC リピート RNA の分解を促進することが想定されたが、hnRNPA3 自体はその構造上 RNA 分解活性を持たない。GGGGCC リピート RNA の分解促進は *C9orf72* FTD/ALS における病原性 RNA 毒性と DPR 毒性の両者を軽減する点で有効な新規治療方法となりうるが、hnRNPA3 は、どのようなメカニズムで GGGGCC リピート RNA を分解しているのだろうか。

本研究では、GGGGCC リピート RNA 結合タンパク質として我々が同定した hnRNPA3 が、*C9orf72* 変異型 FTD/MND における病原性 GGGGCC リピート RNA を分解へと導くリレー分子である可能性を検証した。すなわち hnRNPA3 など天然変性領域を持つ RNP に結合したリピート RNA が、タンパク質間あるいはタンパク質-RNA 間の相互作用を介して RNA 分解の実行機構へと受け渡されている

る可能性を考えた。本研究ではこうした機序を「RNA代謝リレー」と名付け、その詳細なメカニズムを検証した。

3. 研究の方法

近位(接)ピオチン化法は生きた細胞内で特定分子の極近傍に存在する分子を極短時間で選択的にピオチン化する方法である。近位ピオチン化処理を実施した後、細胞を可溶化し、ピオチンと選択的かつ強固に結合するアビジンでコートした磁気ビーズを用いることで、ピオチン標識された分子を高純度に精製することができる。さらにこれらを質量分析に供することによりピオチン標識されたタンパク質を同定することが可能である。上述したようにGGGGCCリピートRNA結合タンパク質であるhnRNPA3とGGGGCCリピートRNAとの結合がリピートRNAの不安定化に関わることから、本研究ではhnRNPA3のカルボキシ末端に存在する低複雑性ドメインにアスコルビン酸ペルオキシダーゼ2(APEX2)とよばれる遺伝子改変酵素を融合したhnRNPA3-APEX2を培養細胞に発現させ、hnRNPA3介在性のGGGGCCリピート分解関連因子の同定を試みた。APEX2は近位ピオチン化法にしばしば用いられる遺伝子改変酵素の一つで、過酸化水素とピオチンフェノールの存在下において、極近傍に存在する物質をピオチン標識する。

4. 研究成果

本研究ではまず人工遺伝子合成によりAPEX2をコードするDNA配列を合成し、それを同じく人工遺伝子合成したhnRNPA3のカルボキシ末端に存在する低複雑性ドメインに融合し、hnRNPA3-APEX2プラスミドを作出した。これを培養細胞に発現させ、hnRNPA3の近隣に位置する物質を網羅的にピオチン化し、さらにピオチン標識されたタンパク質をSDS-PAGEに供した上、銀染色して可視化し、それをさらにLC-Mass/Massによる質量分析法により網羅的に同定した。そして同定したGGGGCCリピート分解関連因子について、これらの因子がhnRNPA3によるGGGGCCリピートRNA代謝に関与している可能性について2次的なスクリーニングを行い、最も有望な因子を同定した。当該因子をノックダウンすると*in situ* hybridizationにおいて、GGGGCCリピートRNAの凝集体であるRNA fociが増加し、逆に当該因子を過剰発現するとRNA fociは減少した。さらにC9orf72リピート変異保持者由来の繊維芽細胞で当該因子をノックダウンしても同様にRNA fociが増加した。すなわち今回同定した因子は「RNA代謝リレー」の一翼を担う可能性が示唆された。成果の一部については、日本神経化学会や日本認知症学会、ADPD2023学会で報告した。現在、論文投稿準備中である。

Ryota Uozumi, Kohji Mori, Shiho Gotoh, Tesshin Miyamoto, Shizuko Kondo, Tomoko Yamashita, Shoshin Akamine, Yuya Kawabe, Manabu Ikeda Proximity labelling proteomics identified a novel molecule in the C9orf72 repeat RNA degradation pathway in FTLD/ALS AD/PD2023, March 28-April 11, 2023, Gothenburg, Sweden

魚住亮太, 森康治, 後藤志帆, 宮本哲慎, 近藤志都子, 山下智子, 河邊有哉, 池田学 C9orf72-FTLD/ALSにおけるGGGGCCリピートRNA分解促進因子の同定 第41回日本認知症学会/第37回日本老年精神医学会 合同開催, 2022.11.25-27, 東京

Ryota Uozumi, Kohji Mori, Shiho Gotoh, Tesshin Miyamoto, Shizuko Kondo, Tomoko Yamashita, Yuya Kawabe, Manabu Ikeda Proximity labelling proteomics identified a molecule which promotes degradation of FTLD/ALS causing C9orf72 repeat RNA (近接依存性標識法によるC9orf72リピートRNA分解促進因子の同定) 第45回日本神経科学大会/第65回日本神経化学会大会/第32回日本神経回路学会大会 2022.6.30-7.3 沖縄

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mori Kohji, Gotoh Shiho, Yamashita Tomoko, Uozumi Ryota, Kawabe Yuya, Tagami Shinji, Kamp Frits, Nuscher Brigitte, Edbauer Dieter, Haass Christian, Nagai Yoshitaka, Ikeda Manabu	4. 巻 297
2. 論文標題 The porphyrin TMPyP4 inhibits elongation during the noncanonical translation of the FTL/ALS-associated GGGGCC repeat in the C9orf72 gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101120 ~ 101120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101120	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 該当する
1. 著者名 Marutani N, Akamine S, Kanayama D, Gotoh S, Yanagida K, Maruyama R, Mori K, Miyamoto T, Adachi H, Sakagami Y, Yoshiyama K, Hotta M, Nagase A, Kozawa J, Maeda N, Otsuki M, Matsuoka T, Iwahashi H, Shimomura I, Murayama N, Watanabe H, Ikeda M, Mizuta I, Kudo T	4. 巻 -
2. 論文標題 Plasma NfL is associated with mild cognitive decline in patients with diabetes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Psychogeriatrics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/psyg.12819	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 森 康治	4. 巻 60
2. 論文標題 日本神経化学会優秀賞・奨励賞受賞者研究紹介 C9orf72リピート伸長変異による前頭側頭葉変性症の分子病態	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 神経化学 Bulletin of Japanese Society for Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 66-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 森 康治	4. 巻 35
2. 論文標題 C9orf72リピート伸長変異に伴う前頭側頭葉変性症の病態	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dementia Japan	6. 最初と最後の頁 304-312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 魚住 亮太, 森 康治	4. 巻 53
2. 論文標題 神経変性疾患における非典型的な翻訳現象 (RAN翻訳)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 9-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawabe Yuya, Mori Kohji, Yamashita Tomoko, Gotoh Shiho, Ikeda Manabu	4. 巻 39
2. 論文標題 The RNA exosome complex degrades expanded hexanucleotide repeat RNA in C9orf72 FTLN / ALS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019102700	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 Akamine Shoshin, Marutani Noriko, Kanayama Daisuke, Gotoh Shiho, Maruyama Riki, Yanagida Kanta, Sakagami Yukako, Mori Kohji, Adachi Hiroyoshi, Kozawa Junji, Maeda Norikazu, Otsuki Michio, Matsuoka Takaaki, Iwahashi Hiromi, Shimomura Iichiro, Ikeda Manabu, Kudo Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Renal function is associated with blood neurofilament light chain level in older adults	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76990-7	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 森 康治, 佐藤 俊介, 宮脇 英子, 池田 学	4. 巻 72
2. 論文標題 特集 前頭側頭葉変性症の今日的な理解 前頭側頭葉変性症への対応と支援	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 623 ~ 632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416201572	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森 康治	4. 巻 31
2. 論文標題 前頭側頭葉変性症の分子基盤	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本生物学的精神医学会誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森 康治	4. 巻 38
2. 論文標題 RAN翻訳とC9orf72-FTLD/ALS病態	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2159-2164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Mori, K
2. 発表標題 Molecular mechasnim of FTLD and beyond
3. 学会等名 International Psychogeriatric Association regional meeting 2021, Sep 18, 2021, Kyoto (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 康治、後藤志帆、山下智子、魚住亮太、河邊有哉、田上真次、Dieter Edbauer, Christian Haass, 永井義隆、池田学
2. 発表標題 C9orf72リピートRNA結合物質によるRAN翻訳阻害のメカニズム
3. 学会等名 第40回日本認知症学会, 2021.11.26-28、東京
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 志帆、森康治、山下智子、近江翼、河邊有哉、宮本哲愼、魚住亮太、近藤志都子、永井義隆、池田学
2. 発表標題 C9orf72 FTLD/ALSの新規RAN翻訳調整メカニズム
3. 学会等名 第40回日本認知症学会, 2021.11.26-28、東京
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本 哲愼、森康治、近藤志都子、魚住亮太、後藤志帆、山下智子、佐竹祐人、佐藤俊介、鐘本英輝、吉山顕次、山本美都子、赤嶺祥真、工藤喬、森原剛史、池田学
2. 発表標題 精神科認知症コホートにおける神経核内封入体病NOTCH2NL3遺伝子リピート長の解析
3. 学会等名 第40回日本認知症学会, 2021.11.26-28、東京
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 魚住亮太、森康治、山下智子、後藤志帆、宮本哲愼、池田学
2. 発表標題 C9orf72リピートRNA分解促進因子hnRNP A3に相互作用する分子の網羅的同定
3. 学会等名 第40回日本認知症学会, 2021.11.26-28、東京
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohji Mori
2. 発表標題 シンポジウム 古くて新しい神経病理学と神経化学の融合: C9orf72リピート伸長変異に関連したFTLD/ALSの分子病態 Molecular disease mechanism of frontotemporal lobar degeneration/amyotrophic lateral sclerosis due to C9orf72 repeat expansion mutation
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会 2021.9.30-10.1, 奈良、オンライン(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohji Mori
2. 発表標題 優秀賞受賞者講演: C9orf72リピート伸長変異による前頭側頭葉変性症の分子病態
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会 2021.9.30-10.1, 奈良、オンライン (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shiho Gotoh, Kohji Mori, Tomoko Yamashita, Yuya Kawabe, Tsubasa Omi, Tesshin Miyamoto, Ryota Uozumi, Shizuko Kondo, Manabu Ikeda
2. 発表標題 A novel modulator of RAN translation in C9orf72 FTL/ALS
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会, 一般演題 (口頭), 奈良・オンライン 2021.9.30
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryota Uozumi, Kohji Mori, Tomoko Yamashita, Shiho Gotoh, Tesshin Miyamoto, Manabu Ikeda
2. 発表標題 Identification of molecules interacting with hnRNPA3, a factor promoting C9orf72 repeat RNA degradation in FTL/ALS.
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会, 一般演題 (口頭), 奈良・オンライン 2021.9.30
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 康治、河邊 有哉、山下 智子、後藤 志帆、魚住 亮太、宮本 哲愼、池田 学
2. 発表標題 C9orf72変異FTLD/ALSにおけるRNA代謝障害
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会 合同大会, 口頭, 2021.7.16
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 康治, 河邊 有哉, 後藤 志帆, 山下 智子, 池田 学
2. 発表標題 C9orf72リピート延長変異FTLD/ALSにおけるRNA代謝障害
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiho Gotoh, Kohji Mori, Yuya Kawabe, Tsubasa Omi, Tomoko Yamashita, Manabu Ikeda
2. 発表標題 Modulating repeat translation in a cellular model of C9orf72 FTLD/ALS
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河邊 有哉, 森 康治, 山下 智子, 後藤 志帆, 池田 学
2. 発表標題 C9orf72関連FTLD/ALSにおける異常リピートRNAの蓄積機序
3. 学会等名 第39回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤 志帆, 森 康治, 河邊 有哉, 近江 翼, 山下 智子, 池田 学
2. 発表標題 C9orf72遺伝子関連FTLD/ALSにおけるRAN翻訳の調整機構の解明
3. 学会等名 第39回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 康治
2. 発表標題 (シンポジウム5 前頭側頭型認知症とその関連疾患の最先端) C9orf72変異をともなう前頭側頭型認知症の病態
3. 学会等名 第39回 日本認知症学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 康治
2. 発表標題 C9orf72リピート延長変異FTLDにおける分子細胞病態
3. 学会等名 第35回日本老年精神医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森 康治, 後藤 志帆	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医薬社	5. 総ページ数 10
3. 書名 Annual Review 神経2021 変性疾患: GGGGCCリピートと神経変性(ALS, FTD)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>神経変性疾患を引き起こす異常伸長リピートRNAが分解される仕組みが明らかに https://www.med.osaka-u.ac.jp/activities/results/2020year/mori-20200827 RNA quality control system goes awry in FTLD https://resou.osaka-u.ac.jp/en/research/2020/20200827_1</p>
--

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
---------	---------