

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659438

研究課題名(和文) ALSにおけるRNA結合蛋白質/RNA蓄積による毒性獲得仮説の*in vivo*検証研究課題名(英文) A gain of toxic function hypothesis via accumulated RNA-binding protein and repeat RNA in the pathogenesis of ALS and its validation *in vivo*

研究代表者

永井 義隆 (Nagai, Yoshitaka)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第四部・室長

研究者番号：60335354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)においてRNAの異常蓄積がRNA結合蛋白質の凝集・蓄積を引き起こして神経毒性を獲得するという仮説に基づき、1)異常伸長GGGGCCリピートを発現し、ALS病態を再現する新規ALSモデルショウジョウバエの樹立に成功した。2)さらに上記新規ショウジョウバエとRNA結合蛋白質を発現するショウジョウバエを用いた遺伝学的解析から、異常伸長GGGGCCリピート毒性に影響を与えるRNA結合蛋白質を同定した。本研究の結果から、異常RNAの蓄積による神経変性にはRNA結合蛋白質が関与してALS発症に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Based on the hypothesis that abnormal accumulation of RNA would trigger aggregation and accumulation of the RNA-binding proteins, eventually leading to neurodegeneration in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), 1) we established novel ALS model flies expressing expanded GGGGCC repeat RNA, which mimic neurological phenotypes and pathology of human ALS patients. 2) Furthermore, using this newly-established ALS models flies, we have successfully identified some RNA-binding proteins that can modify the toxicity of expanded GGGGCC repeat RNA *in vivo*. We therefore conclude that RNA-binding proteins are involved in neurotoxicity of abnormal RNA accumulation, which can contribute to the pathomechanism of ALS.

研究分野：神経内科学、神経科学、分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：遺伝子 神経科学 蛋白質 脳神経疾患 RNA ALS リピートRNA RNA結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など多くの神経変性疾患において、蛋白質のミスフォールディング・凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが考えられるようになった。このうちハンチントン病、様々な脊髄小脳失調症などのいわゆるポリグルタミン (PolyQ) 病では、原因遺伝子翻訳領域内のグルタミン (Q) をコードする CAG リピート配列の異常伸長 (>40) により異常伸長 PolyQ 鎖を持つ蛋白質が翻訳され、この異常蛋白質が凝集・蓄積して神経変性を引き起こす。

一方、非翻訳領域内のリピート配列の異常伸長によっても、脆弱 X 随伴振戦 / 失調症候群 (CGG リピート)、脊髄小脳失調症 8 型 (CTG)、10 型 (ATTCT)、12 型 (CAG)、31 型 (TGGAA)、36 型 (GGCCTG)、ハンチントン病類縁疾患 2 型 (CTG) などの神経変性疾患が引き起こされることが徐々に明らかにされてきた。これらの疾患では、異常伸長リピートを持つ RNA の蓄積により神経神経変性を引き起こすと考えられている。しかし、上述の異常蛋白質の凝集・蓄積と異常 RNA の蓄積との両者による神経変性メカニズムの関連性については全く未解明である。

ALS においては、近年、RNA 結合蛋白質である TDP-43 や FUS の遺伝子変異が同定され、これらの蛋白質の凝集・蓄積とそれに伴う核内からの消失により ALS が発症すると考えられるようになり、RNA 代謝の重要性が示唆された。

一方 2011 年に、TDP-43 の凝集・蓄積を伴う家族性 ALS 家系や孤発性 ALS において C9ORF72 遺伝子非翻訳領域内の GGGGCC リピート配列の異常伸長が発見され、異常伸長 GGGGCC リピートを持つ RNA が患者脊髄運動ニューロンに蓄積していることが明らかにされた (DeJesus-Hernandez et al, Neuron 2011, Renton et al, Neuron 2011)。

以上のことから申請者は、ALS の発症メカニズムとして、遺伝子異常あるいは RNA ストレスなどによる RNA の異常蓄積が RNA 結合蛋白質の凝集・蓄積を引き起こして神経毒性を獲得するという仮説に基づき、以下の研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では RNA の異常蓄積が RNA 結合蛋白質の凝集・蓄積を引き起こして神経毒性を獲得し、ALS 発症に寄与することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 異常伸長 GGGGCC リピート発現 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析
GGGGCC リピート配列は PCR による増幅が非常に困難であるため、合成 GGGGCC リ

ピート DNA を連結することで様々な鎖長の GGGGCC リピートを作製した。続いて、野生型 (9 リピート) もしくは異常伸長型 (50、100 リピート) GGGGCC リピートを GAL4/UAS システム制御下に発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製した。

神経系特異的な elav-GAL4 ドライバーあるいは複眼特異的な gmr-GAL4 ドライバーとの交配により、GGGGCC リピート RNA を発現させた。ショウジョウバエの運動障害は climbing assay にて評価した。複眼変性は実顕微鏡観察にて評価した。RNA の発現は、RT-PCR および 3 齢幼虫の複眼原基の RNA FISH にて確認した。

(2) 異常 RNA 発現モデルと RNA 結合蛋白質発現モデルとの遺伝学的な相互作用解析

上記の異常伸長 GGGGCC リピートを発現するショウジョウバエと TDP-43、FUS などの RNA 結合蛋白質を発現するショウジョウバエとの遺伝学的交配を行い、複眼変性に及ぼす影響を実顕微鏡観察にて評価した。

4. 研究成果

(1) 異常伸長 GGGGCC リピート発現 ALS モデルショウジョウバエの樹立と病態解析

GGGGCC リピートを含む RNA を神経系に発現させたところ、異常伸長型の 50、100 リピートではいずれも発生段階でも致死性を示し、成虫まで発生した個体でも著明な寿命短縮を来した (寿命中央値 50 リピート: 7 日、100 リピート: 11 日 vs 9 リピート: 61 日、野生型: 50-60 日)。また、行動解析では重度の運動障害を呈した。次に複眼で GGGGCC リピート RNA を発現させたところ、50、100 リピートではいずれも重度の複眼変性を生じることが明らかとなった。一方、野生型の 9 リピートの発現ではこれらの表現型は生じなかった。

さらにこれらのショウジョウバエについて RNA FISH 解析を行ったところ、異常伸長 GGGGCC リピート RNA が細胞内に蓄積していることが明らかとなった。

以上の結果から、異常伸長 GGGGCC リピート RNA の *in vivo* における神経毒性が明らかとなり、ALS 病態を再現する新規モデルショウジョウバエの樹立に成功した。

(2) 異常 RNA 発現モデルと RNA 結合蛋白質発現モデルとの遺伝学的な相互作用解析

上記の異常伸長 GGGGCC 発現 ALS モデルショウジョウバエと TDP-43、FUS など RNA 結合蛋白質を発現するショウジョウバエとを交配させた結果、複眼変性に影響を与える RNA 結合蛋白質を同定した。

以上の結果から、本研究で樹立した異常伸長 GGGGCC リピート発現ショウジョウバエは新規 ALS モデルとして有用であり、さら

に異常 RNA の蓄積による神経変性に RNA 結合蛋白質が関与して ALS 発症に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

(以下、1-8 は査読有、9-12 は査読無)

- 1) Takeuchi T., Popiel H.A., Futaki S., Wada K., *Nagai Y. Peptide-based therapeutic approaches for treatment of the polyglutamine diseases. *Curr. Med. Chem.* (in press) DOI: 10.2174/0929867321666140217124038
- 2) Azuma Y., Tokuda T., Shimamura M., Kyotani A., Sasayama H., Yoshida T., Mizuta I., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Ueyama M., Nagai Y., Yamaguchi M. (2014) Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*. *Hum. Mol. Genet.* 23(13): 3467-3480 (2014) DOI: 10.1093/hmg/ddu055
- 3) Togashi K., Wakatsuki S., Furuno A., Tokunaga S., Nagai Y., Araki T. Na⁺/H⁺ exchangers induce autophagy in neurons and inhibit polyglutamine-induced aggregate formation *PLoS One* 8(11): e81313 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0081313
- 4) Popiel H.A., Takeuchi T., Burke J.R., Strittmatter W.J., Toda T., Wada K., *Nagai Y. Inhibition of protein misfolding/aggregation using polyglutamine binding peptide QBP1 as a therapy for the polyglutamine diseases. *Neurotherapeutics* 10(3): 440-446 (2013) DOI: 10.1007/s13311-013-0184-7
- 5) Higashi S., Kabuta T., Nagai Y., Tsuchiya Y., Akiyama H., Wada K. TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. *J. Neurochem.* 126(2): 288-300 (2013) DOI: 10.1111/jnc.12194
- 6) Popiel H.A., Takeuchi T., Fujita H., Yamamoto K., Ito C., Yamane H., Muramatsu S., Toda T., Wada K., *Nagai Y. Hsp40 exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. *PLoS One* 7(11): e51069 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0051069
- 7) Suzuki M., Nagai Y., Wada K., Koike T. Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 429(1-2): 18-23 (2012) DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.107
- 8) Sasayama H., Shimamura M., Tokuda T.,

Azuma Y., Yoshida T., Mizuno T., Nakagawa M., Fujikake N., Nagai Y., Yamaguchi M. Knockdown of the *Drosophila* Fused in Sarcoma (FUS) homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches. *PLoS One.* 7(6): e39483 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0039483

- 9) 永井義隆, 藤掛伸宏. コンフォメーション病としての神経変性疾患. *ファルマシア* 49 (9): 849-853 (2013)
- 10) 畑中悠佑, 和田圭司, 永井義隆. 認知症におけるシナプス病態. *Dementia Japan* 27 (2): 128-135 (2013)
- 11) 永井義隆. 神経変性疾患病態研究のキーワード. *臨床神経学* 52 (11): 874-876 (2012)
- 12) 藤掛伸宏, 長野清一, 永井義隆. ショウジョウバエなど小動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル. *神経内科* 76 (3): 266-274 (2012)

[学会発表](計 35 件)

(招待講演 9 件)

- 1) Nagai Y. Oligomerization of TDP-43 is triggered by imbalance of microtubule-dependent transport, leading to neurodegeneration *Int Symp "New frontier of molecular neuropathology 2014"* (March 16-17, 2014, Tokyo, Japan)
- 2) Nagai Y. Disruption of microtubule-dependent transport triggers accumulation and oligomerization of TDP-43 in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in ALS. *Niigata Neurosci Res Meeting* (Jun 3, 2013, Niigata, Japan)
- 3) Nagai Y. Toxic protein conformational transition and amyloid fibril formation in the polyglutamine diseases. *Int Symp on Amyloidosis* (Jan 24, 2013, Tokyo, Japan)
- 4) Nagai Y. Molecular targeted therapy against the toxic protein conformation and aggregation for the polyglutamine neurodegenerative disorders. *Max Planck Institute & NCNP Joint Symp* (Oct 3-6, 2012, Munich, Germany)
- 5) Nagai Y., et al. Non-cell autonomous therapeutic effects of Hsp40 on polyglutamine disease models via its exosome-mediated secretion. *2nd Int Conf of Neural Cell Culture* (Jun 16, 2012, Tokyo)
- 6) 永井義隆. Hsp40 はエクソソーム分泌により細胞非自律的なポリグルタミン病の治療効果を発揮する. **第32回日本認知症学会学術集会** (H25.11.8-10, 長野)
- 7) 永井義隆. 蛋白質ミスフォールディング・凝集を標的とした神経変性疾患の治療戦略. **第13回日本蛋白質科学会** (H25.6.12-14, 鳥取)

- 8) 永井義隆 . 微小管依存的輸送の障害により TDP-43 の細胞質蓄積が促進され、ALS モデルショウジョウバエの神経変性を増悪する . **第35回 日本神経科学会** (H24.9.18-21、名古屋)
- 9) 永井義隆 . 神経変性疾患病態研究のキーワード . **第53回 日本神経学会学術大会** (H24.5.22-25、東京)
- (一般発表 26 件)
- 10) Suzuki M., et al. High-nutrient diet aggravates protein misfolding-related neurodegeneration in *Drosophila*. **Int Symp "New frontier of molecular neuropathology 2014"** (March 16-17, 2014, Tokyo, Japan)
- 11) Fujikake et al. Impairment of microtubule-dependent transport of TDP-43 triggers its aggregation, leading to neurodegeneration in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies. **43rd SFN Meeting** (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA)
- 12) Ishiguro T., et al. Expanded UGGAA repeat RNA associated with SCA31 causes neurodegeneration in *Drosophila*. **43rd SFN Meeting** (Nov 9-13, 2013, San Diego, CA)
- 13) Nagai Y., et al. Dietary restriction improves proteostasis and suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in *Drosophila*. **7th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders** (Jun 23-28, 2013, Waterville Valley, NH)
- 14) Popiel H.A., et al. Identification of a polyglutamine oligomerization inhibitor with high brain permeability and safety, which exerts therapeutic effects on multiple mouse models of the polyQ diseases. **7th Gordon Res Conf on CAG Triplet Repeat Disorders** (Jun 23-28, 2013, Waterville Valley, NH)
- 15) Fujikake N., et al. Aggregation of TDP-43 is triggered by insufficiency of microtubule-dependent transport in the cytoplasm, leading to neurodegeneration in *Drosophila*. **11th Int Conf on Alzheimer's & Parkinson's Dis** (Mar 6-10, 2013, Florence, Italy)
- 16) Hatanaka Y., et al. Increased dendritic spine dynamics is an early feature in a SCA1 model mouse. **2012 CSH Asia meeting: Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders** (Nov 5-9, 2012, Suzhou, China)
- 17) Suzuki M., et al. Aggravation of neurodegeneration by high-nutrient diet in *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. **Keystone Symp on Aging and Diseases of Aging** (Oct 22-27, 2012, Tokyo, Japan)
- 18) Takeuchi T., et al. Exosome-mediated cell-to-cell transmission of heat shock proteins contributes to the maintenance of protein homeostasis. **EMBO Symp on Quality Control** (Sept 19-22, 2012,

Heidelberg, Germany)
その他 17 件

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 永井義隆 . ポリグルタミン鎖の伸長による SCA . <アクチュアル 脳・神経疾患の臨床 > 「小脳と運動失調」(西澤正豊編、中山書店) 172-181 (2013)
- 2) 永井義隆、和田圭司 . ハンチントン病 . **稀少疾患・難病の診断/治療技術と製品開発** (技術情報協会) 973-979 (2012)

〔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

(1) 研究代表者

永井 義隆 (NAGAI, Yoshitaka)

(独) 国立精神・神経医療研究センター・
神経研究所疾病研究第四部・室長

研究者番号 : 60335354