

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670417

研究課題名(和文) C9FTD/ALSと孤発性ALSを繋ぐ病態機序の解明

研究課題名(英文) Identification of splicing factors that bind to expanded GGGGCC repeat and TDP-43 mRNA

研究代表者

小野寺 理 (Onodera, Osamu)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20303167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性ALSと同様のTDP-43病理を示す疾患であるC9FTD/ALSの遺伝子が同定された。見いだされた原因遺伝子は非翻訳領域のGGGGCC配列の増大であった。このような非翻訳領域のリピート病の病態機序は、スプライシングの乱れで説明されている。そこで、C9FTD/ALSに於けるTDP-43のスプライシングを検討した。その結果、GGGGCC配列に結合する複数のRNA結合タンパクを同定した。しかし、それがTDP-43の自己調節には大きな影響を与えていないと結論した。TDP-43病理像との関係は、TDP-43を介さない他の系を介したものである可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Expansion of a GGGGCC (G4C2) repeat in the first intron of C9ORF72 is the most common cause of familial frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis (FTLD/ALS). TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), encoded by TARDBP, is a major component of neuronal cytoplasmic inclusions, which are observed in affected neurons in patients with ALS. TDP-43 pathology is also observed in patients with the G4C2 repeat expansion. We have hypothesized that the repeat expansion might cause dysregulation of the alternative splicing of TDP-43 mRNA. We generated (G4C2)<sub>9</sub> repeats as a normal control or (G4C2)<sub>82</sub> repeats expression vectors and identified binding proteins. We transfected these RBPs siRNA into HEK293T cells and analyzed the TDP-43 alternative splicing. We performed in-situ hybridization and immunofluorescent double staining analysis using HEK293T cells. We found two G4C2 binding RBPs. However, we could not observe these proteins co-localized with (G4C2)<sub>82</sub> repeats foci.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症

## 1. 研究開始当初の背景

2006 年秋 TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) と ALS との関連が報告され、ALS の病態研究のブレークスルーとなった。申請者は家族性 ALS (FALS) にて、TDP-43 遺伝子変異を見いだした。時期を同じくして複数のグループから TDP-43 変異を伴う ALS が報告され ALS での TDP-43 の重要性は確立された。ALS の新規原因遺伝子として RNA 代謝に関わる TDP-43 や FUS が同定された。このことから、ALS の病態に RNA 代謝が関与する可能性が論じられている。しかし、その分子病態機序は不明である。一方、孤発性 ALS (SALS) と同様の TDP-43 病態を示す疾患である C9FTD/ALS (Frontotemporal Dementia and/or ALS) の遺伝子が同定された。本疾患は、創始者効果が指摘され、アジア系人種での存在は不明であった。我々は本疾患が本邦でも認められることを明らかにした。本症は病理学的にも SALS に類似し、TDP-43 変異による ALS10 と同様に、SALS と同一の病理像を示す遺伝性 TDP-43 proteinopathy であり、SALS の病態との関連が推察されていた。

見いだされた原因遺伝子は非翻訳領域の GGGGCC 配列の増大であった。欧州の FALS で最多で、かつ孤発性 ALS においても 10% 前後認められることが報告された。このような非翻訳領域のリPEAT 病の病態機序は、筋緊張性ジストロフィー症、脆弱 X 症候群にて明らかにされており、スプライシング因子が増大した繰り返し配列部に結合することにより、スプライシングの乱れが起こることで説明されている。このようなリPEAT 病の病態機序は、筋緊張性ジストロフィー症、脆弱 X 症候群にて明らかにされており、スプライシング因子のリPEAT 部への結合により、その量的減少を来し、特定の遺伝子にスプライシングの乱れを引き起こすと説明されている。当然 C9FTD/ALS でも同様の病態が想定される。GGGGCC 配列の増大による TDP-43 病態の存在は、C9FTD/ALS と SALS の間にスプライシング因子を介した関係が存在することを推察させる。一方、我々は TDP-43 が多様なスプライシング体を持つことを明らかとしてきた。

## 2. 研究の目的

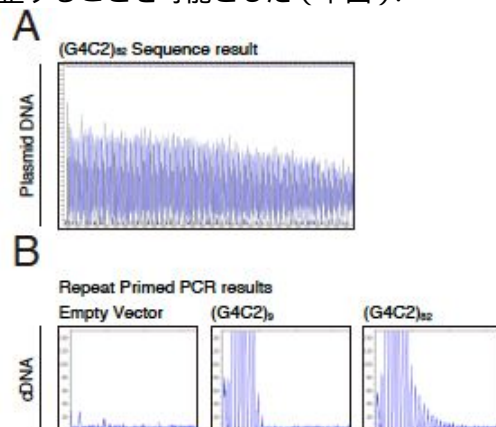
C9FTDALS では、スプライシング因子を介し TDP-43 のスプライシングに影響を及ぼし TDP-43 病態を呈すると推察した。本研究申請では、この増大配列に結合するスプライシング因子を同定し、その減少が TDP-43 に与える影響を明らかにし、SALS における TDP-43 の蓄積機序 スプライシングの乱れの原因の手がかりを探り、両者の病態機序を繋げることを目的とする。

## 3. 研究の方法

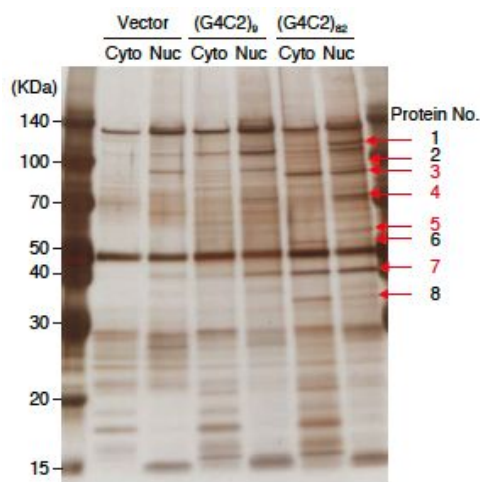
C9FTD/ALS 患者 DNA を鋳型として、PCR 法により GGGGCC クローンをもつ断片のクローニングを作成した。得られたクローンから発現した RNA に対して結合する蛋白質を SDS-PAGE にて分離・展開した後に LC-MS/MS による分析を行い 結合蛋白質を同定した。さらに配列から結合が強く疑われる因子については、生成した RNA を用いた pull-down assay にてその結合の有無を検討した。さらに、同定されたスプライシング因子について、その欠乏下で TDP-43 のスプライシングが変化するかを検討した。スプライシングは、TDP-43 のエクソン 6 のスプライシングを *in vitro* で検討しうるミニジーンコンストラクも用いた。またスプライシング因子は siRNA 法にて減少させた。

## 4. 研究成果

まず、我々は、GGGGCC 繰り返し配列を有するクローンを作製し正常域を超えた 100 リPEAT 以上の繰り返し配列をもつ断片のクローニングに成功し、現時点で最も長い同領域のクローン化 DNA を得た。さらに、本リPEAT を大腸菌にて安定して大量に調整することを可能とした (下図)。

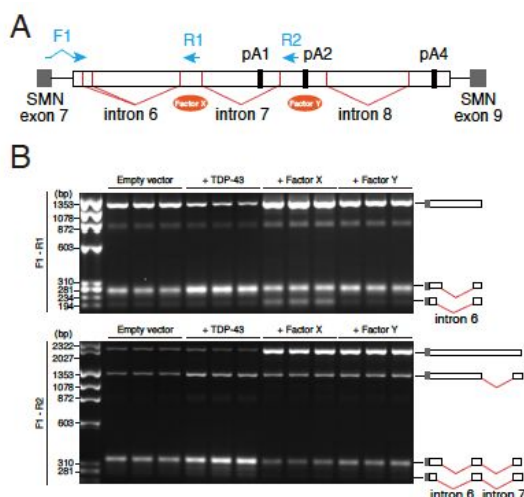


得られたクローンから、得られた蛋白質を SDS-PAGE にて分離・展開した後、LC-MS/MS による分析を行い、結合蛋白質を複数同定した(下図)。一方、既報から



GGGGCC 配列に結合すると考えられたいくつかのスプライシング因子である、SR 蛋白、hnRNP 蛋白の発現ベクターを作成した。

次にこれらの RNA 結合タンパク質が TDP-43 の量調節にどのように影響するかを、GGGGCC を発現するプラスミドを HEK293T 細胞に導入して、内在性 TDP-43 mRNA にて検討した。しかし、明らかな影響を認めなかった。さらに、同定された RNA 結合蛋白の強制発現、siRNA による発現抑制実験でも、明らかな変化を認めることは出来なかった(下図)。これらの結果から、GGGGCC の増大配列特異的に結合する RNA 結合蛋白の同定には成功したが、それが TDP-43 の自己調節には大きな影響を与えていないと結論した。TDP-43 病理像との関係は、TDP-43 を介さない他の系を介したものである可能性が考えられた。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] すべて査読有り (計 12 件)

1. Onodera O, Ishihara T, Shiga A, Ariizumi Y, Yokoseki A, Nishizawa M. Minor splicing pathway is not minor any more: implications for the pathogenesis of motor neuron diseases. *Neuropathology*. 2014 Feb;34(1):99-107.
2. Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M, Tanaka A, Ito C, Toshimori K, Ogawa N, Terashima T, Maegawa H, Yanagisawa D, Tooyama I, Tada M, Onodera O, Hayasaka K. A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet*. 2014 Sep 4;95(3):294-300.
3. Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014 Oct;40(6):783-8.
4. Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S, Camu W, Neitzel B, Onodera O, van Rheenen W, Pinto S, Weber M, Smith B, Proven M, Talbot K, Keagle P, Chesi A, Ratti A, van der Zee J, Alstermark H, Birve A, Calini D, Nordin A, Tradowsky DC, Just W, Daoud H, Angerbauer S, DeJesus-Hernandez M, Konno T, Lloyd-Jani A, de Carvalho M, Mouzat K, Landers JE, Veldink JH, Silani V, Gitler AD, Shaw CE, Rouleau GA, van den Berg LH, Van Broeckhoven C, Rademakers R, Andersen PM, Kubisch C. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. *J Med Genet*. 2014 Jun;51(6):419-24.
5. Kimura T, Jiang H, Konno T, Seto M, Iwanaga K, Tsujihata M, Satoh A, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology*. 2014 Aug;34(4):392-7.

6. Fu YJ, Aida I, Tada M, Tada M, Toyoshima Y, Takeda S, Nakajima T, Naito H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Progressive myoclonus epilepsy: extraneuronal brown pigment deposition and system neurodegeneration in the brains of Japanese patients with novel SCARB2 mutations. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014 Aug;40(5):551-63.
  7. Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, Yokoseki A, Arakawa K, Sekine Y, Shimohata T, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Onodera O, Takahashi H. Sporadic ALS with compound heterozygous mutations in the SQSTM1 gene. *Acta Neuropathol*. 2013 Sep;126(3):453-9.
  8. Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, Kato T, Tan CF, Sato T, Miki Y, Yokoo M, Fujino T, Koyama A, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2013 Oct 15;22(20)
  9. Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Apr;84(4):398-401.
- [学会発表](計9件)
1. T.Ishihara, S.Toyoda, A.Koyama, R.Nakamura, G. Tohnai, N.Atсутa, G.Sobue, M.Nishizawa, O. Onodera. The SMN gene copy number states in Japanese ALS patients. 10th Brain Research Conference: RNA Metabolism in Neurological Disease 15-16 October 2015 Chicago.
  2. Siga A, Onodera O. Detection of CRISPR/Cas9 induced-rare genome editing events by droplet-digital PCR. 10th Brain Research Conference: RNA Metabolism in Neurological Disease 15-16 October 2015 Chicago.
  3. Gaku Ito, Akihide Koyama, Atsushi Shiga, Sachiko Hirokawa, Yasuko Toyoshima, Akiyoshi Kakita, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Depletion of TDP-43 induces mitochondrial fragmentation. *Neuroscience* 2015 October 17-21 Chicago.
  4. Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Overexpression of intrinsic TDP-43 by disruption of the autoregulation in vivo. *EMBO | EMBL Symposia Mechanisms of Neurodegeneration EMBL Heidelberg, Germany* Sunday 14 June - Wednesday 17 June 2015.
  5. Ito G, Koyama A, Shiga A, Hirokawa S, Toyoshima Y, Kakita A, Nishizawa M, Onodera O. Depletion of TDP-43 induces mitochondrial fragmentation. *ALS MND 2015 26th International Symposium on ALS/MND* 11 - 13 December 2015 / U.S.A, Orlando, FL
  6. Osamu Onodera, Masatoyo Nishizawa, Hitoshi Takahashi. Update in amyotrophic lateral sclerosis XVII International congress of Neuropathology September 14 ,2014. Rio de Janeiro.
  7. Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Akihide Koyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera : Endogenous TDP-43 over-expression model with disrupted auto-regulation : 10th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. October 12-15, 2014 Hilton San Diego Resort & Spa, San Diego, California.
  8. Atsushi Shiga, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Digital-droplet PCR system facilitates to clone the genome-edited iPS cells. Tri-Conference. February 19-20, 2015. San Francisco.
  9. Akihide Koyama, Akihiro Sugai, Takuya Konno, Atsushi Shiga, Tomohiko Ishihara, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera . Identification of splicing factors that bind to expanded GGGGCC repeat and TDP-43 mRNA . *Neuroscience* 2015. July 28-31. 2015. Kobe.
- 6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
小野寺 理 (ONODERA Osamu)  
新潟大学, 脳研究所, 教授  
研究者番号 : 20303167