

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05091

研究課題名(和文) 前頭側頭型認知症に関連した異常RNAの分解経路の同定およびその破綻について

研究課題名(英文) Identification of a metabolic pathway for aberrant RNA in frontotemporal dementia and its disruption

研究代表者

森 康治 (Mori, Kohji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40775318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：C9orf72遺伝子のイントロン領域に存在するGGGGCCリピートの数百リピートにもおよび異常延長は、常染色体優性遺伝形式でFTDや運動ニューロン病を引き起こす病原性遺伝子変異である。変異保持者の細胞ではリピート領域を含むRNAの蓄積がみられ、このリピートRNAは開始コドン非依存性翻訳を受け、細胞障害性を有するジペプチドリピータンパク(DPR)へと翻訳される。本研究では、リピートRNAの分解に直接関与する因子を明らかにし、その上で病態分子であるDPRが本因子の活性を阻害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

本研究の成果により、C9orf72変異における異常リピートRNAの代謝経路の一端が明らかとなった。本成果を応用することでRNA代謝異常を標的とした新規治療法の開発にもつながる可能性がある。また将来的にはC9orf72-FTD/ALSのみならず脊髄小脳変性症やハンチントン病など他のリピート病の病態解明にも寄与する可能性がある。研究成果は、学会発表や論文の出版を通じて学术界で知見を共有するとともに、一般社会に還元される。

研究成果の概要(英文)：An intronic GGGGCC (G4C2) repeat expansion in C9orf72 gene was identified as a leading genetic cause of frontotemporal lobar degeneration (FTLD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The hexanucleotide DNA repeat is bidirectionally transcribed into repeat RNA accumulating within RNA foci. We revealed the repeat RNA is even translated into five distinct proteins called dipeptide-repeat protein (DPR)s in the absence of the canonical translation initiation codon (AUG). Since the identification of DPR, cytotoxic properties of DPR has been extensively shown in multiple disease models. In the current study, we identified a factor directly involved in the metabolism of the repeat RNA. Moreover, pathogenic DPR inhibits the enzymatic activity of the factor.

研究分野：精神神経科学、神経変性疾患、分子生物学

キーワード：C9orf72 RAN翻訳 DPR RNA代謝 核小体

## 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 (frontotemporal dementia : FTD) は、前頭側頭葉変性症 (FTLD) やピック病とも呼ばれる。FTD は前頭葉および側頭葉を中心に不可逆的な神経細胞死を生じる神経変性疾患である。臨床的には、認知症のなかでも精神科医が診断や治療にあたることが多く、働きざかりの 65 歳以前に多く発症し、前頭葉障害により、暴言、暴力、万引きや痴漢行為を呈するといった脱抑制的な行動障害、側頭葉の障害による失語症を呈する。長期的には自発性、活動性、意欲の低下を来し、死に至る。FTD の一部は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの運動ニューロン病 (MND) を合併する。神経病理学的にも両疾患は多くの共通点を有する。

分子遺伝学的研究の進展により家族性 FTD や ALS 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。家族発症例の研究は疾患メカニズムの理解に重要な役割を果たす。なかでも C9orf72 遺伝子のイントロン領域に存在する GGGGCC リピートの数百リピートにもおよぶ異常延長は、単なる疾患リスク因子ではなく、常染色体優性遺伝形式で高い浸透率で FTD や MND を引き起こす病原性遺伝子変異である。よって、C9orf72 リピート異常延長変異は FTD や MND の分子病態を解析するのに好適なモデル疾患であると言える。変異保持者の細胞ではリピート領域を含む RNA の蓄積がみられ、このリピート RNA は開始コドン非依存性翻訳を受け、細胞障害性を有するジペプチドリピートタンパク (DPR) へと翻訳される。

### 2. 研究の目的

DPR タンパクは患者脳に大量に蓄積しているが、DPR タンパクは申請者が見出したように開始コドン非依存性の非定型的な機構で翻訳されるため、その産生効率は低い。そのため DPR タンパクの発現には大量のリピート RNA が必要である。よってリピート RNA の蓄積を回避する手段を明らかにすれば、C9orf72 関連 FTLD/ALS の新たな治療法となる可能性がある。実際に患者の脳においても RNA foci と呼ばれる RNA の凝集体としてリピート RNA の蓄積がみられる。

リピート RNA の蓄積の原因として、

- 1) リピート RNA の産生が増加している場合
- 2) リピート RNA の分解活性が低下している場合

の 2 通りが想定される。C9orf72 のリピート延長変異では GGGGCC リピート配列が G-quadruplex と呼ばれる特異な高次構造をとって転写を阻害すると報告されており、1) の RNA 産生増加は考えにくい。よって申請者は、2) の「C9orf72 リピート延長変異例の病態ではリピート RNA の分解効率が低下している」との仮説のもとに検証をすすめた。

本研究では、申請者が確立した GGGGCC リピートを発現する新規細胞モデルを用いて、特に DPR タンパクの源となる異常リピート RNA の蓄積機序を明らかにすることを目的とした。これにより、いまだ未解明の部分の多い FTD の分子病態の解明を試みるとともに、新たな治療標的分子を探索する。

### 3. 研究の方法

本研究課題は平成 28 年度のスタートアップ研究を発展的に引き継いだものである。申請者が確立した C9orf72 のリピート延長変異の新規細胞モデルを用いて、特に異常 RNA の分解システムに着目し、リピート RNA や申請者らの見出した DPR タンパクによる神経変性メカニズムを解析していった。

ジペプチドリピートタンパク (DPR) はリピート関連非 ATG (RAN) 翻訳によりリピート RNA から産生される。まず DPR 発現レベルを指標とした siRNA による予備的なスクリーニングによって得られたリピート RNA 分解酵素の候補因子について、当該分子の siRNA 耐性に改変した野生型分子を作成し、バリデーション実験 (レスキュー実験) を行った。逆に当該分子の外的発現によりリピート RNA の蓄積低下および DPR タンパク産生の低下がみられた。siRNA による候補因子類縁分子とのダブルノックダウンによっても DPR タンパクの蓄積レベルが一段と増加することを見出した。

次に候補因子が単独で実際にリピート RNA 分解活性を有するのかについて、蛍光標識済みの人工リピート RNA とリコンビナントタンパクの混合実験を実施し、本酵素のリピート RNA 分解活性を *in vitro* 実験系においても実証した。コントロール実験としてリピート RNA は当該酵素の非存在下や当該酵素の補因子の非存在下では分解されず、また同因子の 3' exoribonuclease 活性を反映して、基質であるリピート RNA の 3' 側をブロックするとリピート RNA は分解されなくなった。

またリピート RNA 発現細胞において、同因子が実際にリピート RNA 分解に関与しているかどうかを検証するため、リピート発現細胞に転写阻害剤であるアクチノマイシン D を処理して、リ

ピート RNA の発現レベルの時間経過を観察したところ、当該因子ノックダウン細胞ではリピート RNA の分解が遅延していた。

さらに C9orf72 変異患者由来細胞に対し、当該分子の siRNA によるノックダウンを実施したところ、患者の細胞に含まれる内因性の GGGGCC リピート RNA が蓄積し、RNA foci が増加した。このことから患者の細胞においても、当該 RNA 分解系がリピート RNA の代謝分解に関与していることが示唆された。

これらの結果は、当該因子が、病原性リピート RNA の分解、代謝に実際に関与している可能性を示唆している。

次に、病態分子である DPR と当該因子との間に物理的相互作用があることを免疫共沈法により明らかにした。さらに DPR 発現細胞では、当該因子の内因性基質である核小体小分子 RNA 前駆体の発現レベルが増加しており、DPR が当該因子の活性を阻害していることが示唆された。そして当該因子活性阻害を反映して、このときリピート RNA の発現レベルも増加していた。

#### 4 . 研究成果

上記したように本研究ではリピート発現細胞、変異保持者由来の繊維芽細胞、in vitro RNA 分解系を用いて、まず当該因子がリピート RNA の分解に直接関与することを明らかにした。続いて DPR が当該因子に及ぼす影響について検討したところ、DPR は当該因子と結合し、その内因性基質を蓄積させた。すなわち DPR が当該因子の活性を阻害することが明らかとなった。実際に DPR 発現細胞では共発現させた C9orf72 リピート RNA の発現レベルが増加していた。これらの結果から DPR による当該因子活性の阻害が C9orf72 変異 FTLD/ALS におけるリピート RNA 蓄積の機序となっている可能性が示唆された。

これらの成果をまとめた英文論文をすでに投稿しており、現在最終改定中である。これらの研究成果の一部はすでにいくつかの学会等で報告しており、また関連した論文がすでに出版されている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsunaga Hidenori, Fukumori Akio, Mori Kohji, Honda Tomoyuki, Uema Takeshi, Tomonaga Keizo	4. 巻 71
2. 論文標題 Two Neuropsychiatric Cases Seropositive for Bornavirus Improved by Ribavirin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 338 ~ 342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI:10.7883/yoken.JJID.2017.585	査読の有無 有
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 van Well EM, Bader V, Patra M, Sanchez-Vicente A, Meschede J, Furthmann N, Schnack C, Blusch A, Longworth J, Petrasch-Parwez E, Mori K, Arzberger T,..., Winklhofer KF	4. 巻 38
2. 論文標題 A protein quality control pathway regulated by linear ubiquitination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e100730 ~ e100730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2018100730	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 Davidson YS, Flood L, Robinson AC, Nihei Y, Mori K, Rollinson S, Richardson A, Benson BC, Jones M, Snowden JS, Pickering-Brown S, Haass C, Lashley T, Mann DMA	4. 巻 5
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI 10.1186/s40478-017-0437-5	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 該当する
1. 著者名 河邊 有哉, 森 康治	4. 巻 7
2. 論文標題 前頭側頭葉変性症と主な遺伝子変異	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 認知症の最新医療	6. 最初と最後の頁 81-85
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 池田 学, 森 康治	4. 巻 21
2. 論文標題 前頭側頭型認知症への薬物療法的アプローチは	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床精神医学	6. 最初と最後の頁 29-33
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 Nihei Yoshihiro, Mori Kohji, Werner Georg, Arzberger Thomas, Zhou Qihui, Khosravi Barham, Japtok Julia, Hermann Andreas, Sommacal Andreas, Weber Markus, Kamp Frits, Nuscher Brigitte, Edbauer Dieter, Haass Christian	4. 巻 139
2. 論文標題 Poly-glycine-alanine exacerbates C9orf72 repeat expansion-mediated DNA damage via sequestration of phosphorylated ATM and loss of nuclear hnRNPA3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica	6. 最初と最後の頁 99 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00401-019-02082-0	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 佐藤 俊介, 森 康治, 池田 学	4. 巻 30
2. 論文標題 前頭側頭葉変性症の概念・分類の変遷	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 老年精神医学雑誌	6. 最初と最後の頁 1073-1079
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 後藤 志帆, 森 康治	4. 巻 30
2. 論文標題 前頭側頭葉変性症に関与する遺伝子	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 老年精神医学雑誌	6. 最初と最後の頁 1244-1252
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 複数の医療施設を経由し、スムーズに福祉施設入所につなげられた前頭側頭型認知症の一例	4. 巻 34
2. 論文標題 佐竹 祐人、森 康治、佐藤 俊介、繁信 和恵、森 悦朗、池田 学	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 精神科治療学	6. 最初と最後の頁 691-697
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 有
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18件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Kohji Mori
2. 発表標題 A modifier of the unconventional aggregate pathologies in C9orf72-FTLD/ALS
3. 学会等名 The 19th International Congress of Neuropathology (ICN2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori K, Nihei Y, Kawabe Y, Zhou Q, Yamashita T, Arzberger T, Edbauer D, Ikeda M, Haass C
2. 発表標題 ENDOGENOUS AND EXOGENOUS MODULATIONS OF DPR EXPRESSION FROM C9ORF72 REPEAT EXPANSION
3. 学会等名 11th International Conference on Frontotemporal Dementias (ICFTD2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuya Kawabe, Kohji Mori, Tomoko Yamashita, Manabu Ikeda
2. 発表標題 A degradation pathway for the FTL D causing C9orf72 repeat RNA
3. 学会等名 11th International Conference on Frontotemporal Dementias (ICFTD2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河邊 有哉 森 康治、山下 智子、池田 学
2. 発表標題 前頭側頭葉変性症に関連した異常RNAの分解機序の検討
3. 学会等名 第37回 日本認知症学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 康治
2. 発表標題 Unconventional aggregate pathologies and their modifier in C9orf72-FTLD/ALS
3. 学会等名 京都大学iPS細胞研究所 セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 康治
2. 発表標題 C9orf72リピート変異による前頭側頭葉変性症の分子病態
3. 学会等名 第1回 NPRF (Neurology and Psychiatry Research Forum) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori K, Nihei Y, Kawabe Y, Zhou Q, Kamp F, Arzberger T, Edbauer D, Ikeda M, Haass C
2. 発表標題 Endogenous and exogenous modulations of C9orf72 dipeptide-repeat (DPR) protein expression
3. 学会等名 The 17th Eibsee meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nihei Y, Mori K, Werner G, Arzberger T, Zhou Q, Hermann A, German Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration, Barvarian Brain Banking Alliance, Kamp F, Nuscher B, Edbauer D, Haass C
2. 発表標題 hnRNP A3 binds to sense and antisense C9orf72 repeat RNA
3. 学会等名 The 17th Eibsee meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kawabe Y, Mori K, Ikeda M
2. 発表標題 A molecular disease modifier of C9orf72 related FTLD/ALS
3. 学会等名 12th Asian Society Against Dementia (ASAD) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 康治
2. 発表標題 前頭側頭型認知症の分子病態 -C9orf72遺伝子変異の解析から-
3. 学会等名 第36回 日本認知症学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 康治
2. 発表標題 医学生として、大学院生として、留学生として、PIとして、そして精神科医として
3. 学会等名 第60回日本神経化学会大会 第10回神経化学の若手研究者育成セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 康治, 二瓶 義廣, Thomas Arzberger, Qihui Zhou, 河邊 有哉, 池田 学, Dieter Edbauer, Christian Haass
2. 発表標題 C9orf72 リピート変異に関連したFTLD/ALSにおける病態修飾因子
3. 学会等名 第32回 日本老年精神医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 康治
2. 発表標題 前頭側頭葉変性症の分子基盤
3. 学会等名 第41回 日本生物学的精神医学会 (招待講演)
4. 発表年 2019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 NEURO2019, Niigata
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 康治
2. 発表標題 C9orf72リピート延長変異による前頭側頭葉変性症の分子基盤
3. 学会等名 第3回 和光-精神神経懇話会 筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 (WPI-IIIS) (招待講演)
4. 発表年 2019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 リボソーム結合因子によるリピート関連ATG非依存性 (RAN) 翻訳の調節
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会 東京
4. 発表年 2019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に関連したFTLD/ALSにおいてRNA exosome複合体はGGGGCCリピートRNAを分解する
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 康治, 河邊 有哉, 山下 智子, 後藤 志帆, 池田 学
2. 発表標題 C9orf72変異型FTDにおける病原性リピートRNA代謝障害のメカニズム
3. 学会等名 第3回 先進医薬研究報告会 東京
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森 康治, 池田 学	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 392
3. 書名 神経変性疾患ハンドブック：神経難病へのエキスパートアプローチ 水澤英洋 (編)	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----