

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430054

研究課題名(和文) 神経難病ALS/FTD責任遺伝子C9orf72の機能解明に関する研究

研究課題名(英文) Molecular network analysis of ALS/FTD-responsible gene C9orf72

研究代表者

佐藤 準一 (Sato, Jun-ichi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30274591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)と前頭側頭型認知症(FTD)に共通する遺伝子変異としてC9orf72(C9)第1イントロンのGGGGCCリピート異常伸長が同定されたが、神経細胞死の発症機序は明らかでない。本研究ではC9変異を持つALS(C9ALS)の公共データを再解析して病態に関連している分子ネットワークを調べた。C9ALS iPSC由来運動ニューロンでは細胞外基質(ECM)遺伝子群の発現低下を認め、C9ALS頸髄運動ニューロンではアクチン細胞骨格制御遺伝子群の発現異常が見られた。C9リピート異常伸長はECMや細胞骨格のホメオスタシスの破綻を来して、神経細胞死を誘導している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expanded GGGGCC repeats located in the first intron of the C9orf72 (C9) gene represent the most common genetic abnormality of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). To date, the molecular mechanism underlying neurodegeneration in C9ALS remains unknown. We studied molecular network of genes and proteins involved in C9ALS pathology from public datasets. We found that C9 repeat RNA-binding proteins play a key role in posttranscriptional RNA processing. Gene expression of extracellular matrix proteins (ECM) is reduced in C9ALS iPSC-derived motor neurons. Genes involved in the regulation of actin cytoskeletons are aberrantly expressed in C9ALS cervical motor neurons. We also identified NNA1 and Smcr8 as novel interactors of C9, linking C9 to autophagy regulation. These results suggest that C9 repeat expansions, which deregulate posttranscriptional RNA processing, disturb the homeostasis of ECM and cytoskeletal dynamics, leading to neurodegeneration in C9ALS.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：C9orf72 ALS FTD 結合タンパク質 標的遺伝子 分子ネットワーク Smcr8 NNA1

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は、中高年期に運動ニューロンが変性脱落を来し、筋萎縮や嚥下障害・呼吸障害が急速に進行して死に至る難病である。前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia; FTD) は、中高年期に前頭葉と側頭葉を中心とする神経細胞変性脱落と脳萎縮を来し、認知機能障害・人格変化・行動異常を呈する原因不明の難病である。認知症疾患の中では、アルツハイマー病の次に頻度が高い。ALS と FTD はしばしば合併し、共通する遺伝子変異として C9orf72 (以下 C9 と省略) 遺伝子 intron 1 の GGGGCC リピートの異常伸長 (数百-千リピート) が同定された。その結果、両者は臨床病理遺伝学的に共通の発症機構に基づく疾患単位 C9ALS/FTD として確立された。欧米では遺伝性 ALS の中で C9ALS の頻度が最も高い。C9 遺伝子は、哺乳類を通じて良く保存されており、ヒト C9 タンパク質はマウス C9 と 98% のアミノ酸配列相同性を呈するが、機能ドメインは明らかではない。C9 ノックアウトマウスでは運動ニューロンの変性を示さず、C9 の生理学的機能すなわち中枢神経系組織発現分布、細胞内局在、発現制御機構、結合タンパク質、標的遺伝子は十分に明らかにされていない。また ALS/FTD 発症機構における C9 の病理学的役割 (loss-of-function or gain-of-function) は解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者は過去 20 年間以上、網羅的遺伝子発現解析と分子ネットワーク解析の手法を用いて、神経難病発症機構の基礎的研究に従事して来た。研究代表者らはアルツハイマー病の老人斑を構成する変性神経突起における C9 の集積を国内外で初めて見出した (Sato et al. *Alzheimers Res Ther* 4: e33, 2012)。これらの経験と実績に立脚し、「C9ALS/FTD の神経細胞では、C9 遺伝子変異により惹起された標的遺伝子群の発現異常および結合タンパク質群ネットワークの破綻により、細胞死が誘導される」という独自の作業仮説を考案した。この仮説を検証するために、初めに運動ニューロン細胞を用いて、C9 発現抑制系および過剰発現系を樹立して、C9 の生理学的機能を調べ、次に C9ALS のオミックスデータを解析して、C9 の ALS/FTD 発症機構における役割を解明した。

3. 研究の方法

(1) C9 発現抑制系・過剰発現系マウス運動ニューロン細胞株の樹立：マウス運動ニューロン細胞 NSC34 に FlagC9, FlagGFP, C9 siRNA,

scramble RNA を導入して安定細胞株を樹立した。

(2) C9ALS オミックスデータの解析：(a) C9 リピート RNA 結合タンパク質プロテオーム (Nature 2014;507:195) (Brain 2014;137:2040), (b) C9ALS iPSC 由来運動ニューロントランスクリプトーム (Sci Transl Med 2013;5:208ra149), (c) C9ALS 運動ニューロントランスクリプトーム (Neuropathol Appl Neurobiol 2014;40:670) のデータを再解析し、バイオインフォマティクス解析ツール KEGG, IPA を用いて、分子ネットワークを明らかにした。また遺伝子発現データベース COXPRESdb (coxpresdb.jp) を用いて、C9 共発現遺伝子 (結合タンパク質候補) を同定し、その発現分布を解析した。
(3) FlagC9 高発現 NSC34 細胞を用いて免疫沈降法と質量分析 (PMF 解析) により C9 結合タンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) C9 の生理学的機能の解析：C9 siRNA 細胞と scramble RNA 細胞から RNA を抽出し、Mouse 1.0 ST array で遺伝子発現プロファイルを比較した結果、C9 siRNA 細胞で神経突起伸長制御因子 Fez1 の発現低下を認めた。ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH に MG-132 を投与すると C9 の発現が顕著に上昇した。C9 が神経突起伸長制御に関与し、プロテオソーム阻害剤により発現が上昇することがわかった。

(2) 新規 C9 結合タンパク質 NNA1 の同定：COXPRESdb を用いて、C9 共発現遺伝子として nervous system nuclear protein induced by axotomy protein 1 (NNA1; AGTPBP1) を見出した。HEK293 細胞で免疫沈降法により HA-NNA1 と Flag-C9 の結合を確認した。mCherry-NNA1 と EGFP-C9 は主として細胞質で共局在を認めた。NNA1 と C9 は剖検脳前頭葉と海馬で主として神経細胞で発現を認め、qPCR では NNA1 と C9 の mRNA 発現量は正の相関を示した。NNA1 は軸索損傷時に運動ニューロンで発現誘導され、carboxypeptidase をコードし、ペプチドのアミノ酸分解を介して、オートファジー制御に関与していることがわかっている。NNA1 は C9orf72 の正常機能を調節し、神経細胞生存維持に働いている可能性が示唆された (Kitano et al. *Journal of Central Nervous System Disease* 7: 15-26, 2015)。

(3) 新規 C9 結合タンパク質 Smcr8 の同定：FlagC9 高発現 NSC34 細胞を用いて、抗 Flag 抗体による免疫沈降法で C9 結合タンパク質を濃縮した。泳動分離後に MALDI-TOFMS による質量分析でタンパク質を同定した。その結果、C9 結合タンパク質として DENN タンパク質ファミリーに属するオートファジー

－ 制御因子 Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 8 (Smcr8)を同定した。その後他のグループから C9-Smcr8-Wdr41 の複合体形成が報告され、本研究の結果が追認された。この複合体の機能を解析するために、C9orf72, Smcr8, Wdr41 ノックダウンがオートファジーに及ぼす効果を調べた。その結果、3 者はそれぞれが互いに協調・対立しながら複雑なオートファジー制御ネットワークを形成していることがわかった(論文投稿準備中)。

(4)C9ALS オミックスデータの分子ネットワーク解析: C9 リピート RNA 結合タンパク質には RNA recognition motif (RRM), prion-like domain (PrLD)が集積し、post-transcriptional RNA processing, protein synthesis パスウェイと関連していた。C9ALS iPSC 由来運動ニューロンでは、extracellular matrix(ECM) remodeling 遺伝子群の発現が低下していた。C9ALS 運動ニューロンでは、RNA processing, protein synthesis, actin cytoskeleton の遺伝子群の発現異常を認めた。C9 リピート異常伸長は post-transcriptional RNA processing の異常を惹起し、ECM や細胞骨格のホメオスタシスの破綻を来たして神経変性を誘導している可能性が示唆された(Satoh et al. Journal of Central Nervous System Disease 6: 69-78, 2014)。

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 36 件)

1. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Accumulation of a repulsive axonal guidance molecule RGMA in amyloid plaques: a possible hallmark of regenerative failure in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 査読有 39(2): 109-120, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2012.01281.x
2. Satoh J, Tabunoki H. Molecular network of ChIP-Seq-based vitamin D receptor target genes. *Multiple Sclerosis* 査読有 19(8): 1035-1045, 2013. DOI: 10.1177/1352458512471873
3. Satoh J, Tabunoki H. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. *Gene Regulation and Systems Biology* 査読有 7: 41-56, 2013. DOI: 10.4137/GRSB.S11433
4. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Ubiquilin-1 immunoreactivity is concentrated on Hirano bodies and dystrophic neurites in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 査読有 39(7): 817-830, 2013. DOI: 10.1111/nan.12036
5. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K. Reactive astrocytes express the potassium channel Kir4.1 in active multiple sclerosis lesions. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 査読有 4(1): 19-28, 2013. DOI: 10.1111/cen3.12011
6. Satoh J. Molecular network of ChIP-Seq-based NF-kappaB p65 target genes involves diverse immune functions relevant to the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 査読有 3(1): 94-106, 2014. DOI: 10.1016/j.msard.2013.04.005
7. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K. A survey of TREM2 antibodies reveals neuronal but not microglial staining in formalin-fixed paraffin-embedded postmortem Alzheimer's brain tissues. *Alzheimer's Research and Therapy* 査読有 5(5): e30, 2013. DOI: 10.1186/alzrt184
8. Tabunoki H, Ono H, Ode H, Ishikawa K, Kawana N, Banno Y, Shimada T, Nakamura Y, Yamamoto K, Satoh J, Bono H. Identification of key uric acid synthesis pathway in a unique mutant silkworm *Bombyx mori* model of Parkinson's disease. *PLoS One* 査読有 8(7): e69130, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0069130
9. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. Molecular network of ChIP-Seq-based EBNA1-target cellular genes supports biological implications of EBV persistence in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 査読有 4(2): 181-192, 2013. DOI: 10.1111/cen3.12035
10. Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K, Satoh J. Reactive astrocytes and perivascular macrophages express NLRP3 inflammasome in active demyelinating lesions of multiple sclerosis and necrotic lesions of neuromyelitis optica and cerebral infarction. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 査読有 4(3): 296-304, 2013. DOI: 10.1111/cen3.12068
11. Satoh J. A possible role of microgliopathy in the pathogenesis of Nasu-Hakola disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 査読有 4(Suppl. 1): 17-26, 2013. DOI: 10.1111/cen3.12046
12. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. Pathway

- analysis of ChIP-Seq-based NRF1 target genes suggests a logical hypothesis of their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Gene Regulation and Systems Biology* 査読有 7: 139-152, 2013. DOI: 10.4137/GRSB.S13204
13. [Satoh J](#), Kawana N, Yamamoto Y. ChIP-Seq data mining: Remarkable differences in NRSF/REST target genes between human ESC and ESC-derived neurons. *Bioinformatics and Biology Insights* 査読有 7: 357-368, 2013. DOI: 10.4137/BBIS13279
 14. Choi SS, Lee HJ, Lim I, [Satoh J](#), Kim SU. Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS One* 査読有 9(4): e92325, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0092325
 15. [Satoh J](#), Kino Y, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K. TMEM106B expression is reduced in Alzheimer's disease brains. *Alzheimer's Research and Therapy* 査読有 6(2): e17, 2014. DOI: 10.1186/alzrt247
 16. [Satoh J](#), Motohashi N, Kino Y, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 査読有 9: e68, 2014. DOI: 10.1186/1750-1172-9-68
 17. Kawana N, Yamamoto Y, Kino Y, [Satoh J](#). Molecular network of NLRP3 inflammasome activation-responsive genes in a human monocyte cell line. *Austin Journal of Clinical Immunology* 査読有 1(4): e1071, 2014.
 18. Ohtani R, Shibuya K, [Satoh J](#), Kuwabara S. A piece of X-ray revealed Nasu-Hakola disease. *Internal Medicine* 査読有 53(20): 2407, 2014. DOI: 10.2169/internalmedicine.53.3157
 19. [Satoh J](#), Yamamoto Y, Kitano S, Takitani M, Asahina N, Kino Y. Molecular network analysis suggests a logical hypothesis for the pathological role of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. *Journal of Central Nervous System Disease* 査読有 6: 69-78, 2014. DOI: 10.4137/JCNSD.S18103
 20. [Satoh J](#), Kino Y, Yamamoto Y, Kawana N, Ishida T, Saito Y, Arima K. PLD3 is accumulated on neuritic plaques in Alzheimer's disease brains. *Alzheimer's Research and Therapy* 査読有 6: e70, 2014. DOI: 10.1186/s13195-014-0070-5
 21. [Satoh J](#), Asahina N, Kitano S, Kino Y. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based PU.1/Spi1 target genes in microglia. *Gene Regulation and Systems Biology* 査読有 8: 127-139, 2014. DOI: 10.4137/GRSB.S19711
 22. [Satoh J](#), Yamamoto Y, Asahina N, Kitano S, Kino Y. RNA-Seq data mining: Downregulation of NeuroD6 serves as a possible biomarker for Alzheimer's disease brains. *Disease Markers* 査読有 2014: ID123156, 2014. DOI: 10.1155/2014/123165
 23. [Satoh J](#), Asahina N, Kitano S, Kino Y. Bioinformatics data mining approach indicates the expression of ChIP-Seq-based HIF-1alpha target genes in periplaque lesions of multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 査読有 6(2): 159-169, 2015. DOI: 10.1111/cen3.12195
 24. Nojima Y, Ito K, Ono H, Nakazato T, Bono H, Yokoyama T, Sato R, Suetsugu Y, Nakamura Y, Yamamoto K, [Satoh J](#), Tabunoki H, Fugo H. Superoxide dismutases, SOD1 and SOD2, play a distinct role in the fat body during pupation in silkworm *Bombyx mori*. *PLoS One* 査読有 10(2): e0116007, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0116007
 25. [Satoh J](#), Asahina N, Kitano S, Kino Y. Legumain is expressed on macrophages in active demyelinating lesions of multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 査読有 6(3): 304-305, 2015. DOI: 10.1111/cen3.12208
 26. [Satoh J](#), Kino Y, Niida S. MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data. *Biomarker Insights* 査読有 10: 21-31, 2015. DOI: 10.4137/BMI.S25132
 27. [Satoh J](#), Asahina N, Kitano S, Kino Y. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based Olig2 target genes in motor neuron progenitor cells suggests the possible involvement of Olig2 in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Central Nervous System Disease* 査読有 7: 1-14, 2015. DOI: 10.4137/JCNSD.S23210
 28. Kitano S, Kino Y, Yamamoto Y, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y, Arima K, [Satoh J](#). Bioinformatics data mining approach suggests coexpression of AGTPBP1 with an ALS-linked gene C9orf72. *Journal of*

- Central Nervous System Disease 査読有 7: 15-26, 2015. DOI: 10.4137/JCNSD.S24317
29. Satoh J, Kino Y, Motohashi N, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. Immunohistochemical characterization of CD33 expression on microglia in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology 査読有* 35(6): 529-537, 2015. DOI: 10.1111/neup
 30. Satoh J, Kino Y. Expression profiles of RNA-Seq-based grey matter-specific genes versus white matter-specific genes in grey matter lesions of multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology 査読有* 6(3): 289-298, 2015. DOI: 10.1111/cen3.12218
 31. Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology 査読有* 36(1): 39-49, 2016. DOI: 10.1111/neup
 32. Satoh J, Takitani M, Miyoshi J, Kino Y. RNA-Seq data mining approach identifies opalin as a reliable marker for myelinating oligodendrocytes. *Clinical and Experimental Neuroimmunology 査読有* 7(1): 66-68, 2016. DOI: 10.1111/cen3.12240
 33. Satoh J, Takitani M, Miyoshi J, Kino Y. RNA-Seq data analysis identifies the comprehensive profile of *in vivo* interferon-beta-stimulated genes (ISGs) in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology 査読有* 7(1): 39-51, 2016. DOI: 10.1111/cen3.12268
 34. Satoh J, Tosaki Y, Sakai K, Yanaizu M, Kino Y. P2Y₁₂ expression on microglia in the human brain. *Clinical and Experimental Neuroimmunology 査読有* 7(4): 366-368, 2016. DOI: 10.1111/cen3.12320
 35. Satoh J, Yanaizu M, Tosaki Y, Sakai K, Kino Y. Targeted sequencing approach to identify genetic mutations in Nasu-Hakola disease. *Intractable & Rare Diseases Research 査読有* 5(4): 269-274, 2016. DOI: 10.5582/irdr.2016.01064
 36. Satoh J, Kino Y, Yanaizu M, Tosaki Y, Sakai K, Ishida T, Saito Y. Expression of gp91phox and p22phox, catalytic subunits of NADPH oxidase, on microglia in Nasu-Hakola disease brains. *Intractable & Rare Diseases Research 査読有* 5(4): 275-279, 2016. DOI: 10.5582/irdr.2016.01086

{学会発表}(計 4 件)

1. Satoh J, Tabunoki H. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. The 10th International Workshop on Advanced Genomics. The Genome Renaissance. Tokyo, Japan, 2013.5.21.
2. Satoh J, Kino Y: Molecular network of ChIP-Seq-based EBNA1-target cellular genes supports biological implications of EBV persistence in multiple sclerosis. 66th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Philadelphia, USA, 2014. 5.1.
3. Satoh J, Kino Y. Molecular network analysis suggests a crucial role of C9orf72 in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. 67th Annual Meeting of American Academy of Neurology. P2.165. Washington, D.C, 2015. 4.21.
4. Satoh J, Kino Y. Grey matter lesion signature of multiple sclerosis. The Inaugural Asia-Pacific School of Neuroimmunology Meeting. P-1. Tokyo, 2015. 8.30.

{図書}(計 1 件)

1. Satoh J. Gene expression profiling and pathway analysis for identification of molecular targets in MS. In *Multiple Sclerosis Immunology - A Foundation for Current and Future Treatments*, ed by Gran B and Yamamura T. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 229-256, 2013.

{その他}

ホームページ

<http://www.my-pharm.ac.jp/~satoj/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 準一 (SATOH, Jun-ichi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 30274591

(2) 連携研究者

有馬 邦正 (ARIMA, Kunimasa)

国立病院機構小諸高原病院・院長

研究者番号 : 20250227