

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790977
 研究課題名（和文）孤発性筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 に関する神経細胞死カスケードの解析
 研究課題名（英文）Analysis of cascade of neuronal cell death for TDP-43 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis
 研究代表者
 山下 雄也（YAMASHITA TAKENARI）
 東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員
 研究者番号：20431843

研究成果の概要（和文）：孤発性筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスである RNA 編集酵素 ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスで ADAR2 免疫染色性のない脊髄運動ニューロンにおいて TDP-43 の局在異常が観察された。この局在異常の分子変化は、ADAR2 活性低下・GluA2RNA 編集異常によるカルシウム流入に伴う Calpain の活性化により TDP-43 が切断されておきる。またこれらの Calpain 依存性 TDP-43 フラグメントは全長 TDP-43 より凝集能を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found that ADAR2-negative motor neurons in the spinal cord showed TDP-43 pathology in conditional ADAR2 knockout (AR2) mice, a mechanistic ALS model in which the ADAR2 gene is targeted in cholinergic neurons including motor neurons. Calpain, a Ca²⁺-dependent serine protease, was activated in motor neurons devoid of ADAR2 activity express abnormally Ca²⁺-permeable AMPA receptors that contain Q/R site-unedited GluA2. Moreover, calpain specifically cleaved TDP-43 into aggregation-prone fragments in the lysates of cultured cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：TDP-43、ADAR2、AMPA 受容体、GluA2、RNA 編集、筋萎縮性側索硬化症、神経細胞死、Calpain

1. 研究開始当初の背景

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の脊髄運動ニューロンにおいてグルタミン酸受容体である AMPA 受容体 GluA2 サブユニットの Q/R 部位の RNA 編集が低下し、この分子変化が ALS 運動ニューロン死に関係していること

がわかってきた。この GluA2 Q/R 部位の RNA 編集は adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) という RNA 編集酵素によって特異的に触媒されることが知られ、更に孤発性 ALS 脊髄前角組織では ADAR2 mRNA の発現量が低下していることがわかった。これらのことか

らこの部位の RNA 編集が低下することが運動ニューロン死を導くのではないかと考え、この仮説を証明するために、我々は脊髄運動ニューロン選択的に ADAR2 をノックアウトした ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス (AR2 マウス) を作成し、この仮説を証明した。

一方、mRNA のスプライシングに関与することで知られていた TDP-43 (TAR DNA binding protein-43) というタンパク質が 2006 年に ALS 患者神経細胞内に蓄積していることが報告された。さらに、この TDP-43 の遺伝子変異をもつ家族性 ALS 家系ならびに孤発性 ALS が複数家系において、複数の変異が報告された。このことから TDP-43 は ALS における神経細胞死を引き起こす原因タンパク質である可能性が濃厚となった。しかしながら TDP-43 の毒性についての報告は、培養細胞系において Progranulin 変異による Caspase-3 を介したプロセッシングによりできた TDP-43 の 25kDa 断片で凝集体形成があることと細胞死アッセイである LDH 活性を上昇させることが報告されているだけである。また変異効果は TDP-43-25kDa 断片の cDNA に変異遺伝子を導入し、培養細胞に過剰発現させたもので凝集体形成が優位に増加することが報告され、凝集体形成に関して一定の変異効果があることがわかってきた。しかしながらこの変異効果がどのようなメカニズムで毒性を発揮するのかについて、またどのようなカスケードにより神経細胞死を引き起こすかは不明なままである。

孤発性 ALS で起きている ADAR2 活性低下と TDP-43 の変化との間に分子連関があるのではないかと考え、その検討を行った。その結果、免疫組織化学の検討から孤発性 ALS の剖検脊髄において半分以上の運動ニューロンが ADAR2 陰性で、その運動ニューロンでは、

リン酸化 TDP-43 陽性の封入体があった。そして健常者の剖検脊髄においては全ての運動ニューロンで ADAR2 陽性、リン酸化 TDP-43 が陰性であることを見出した。このことより ADAR2 活性低下と TDP-43 の変化との間に分子連関があることがわかったがそのカスケードについては不明なままであった。そのため本研究では、ADAR2 活性低下と TDP-43 の変化の上流を突き止め、神経細胞死カスケードとの関わりについて調べた。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) で起こっている TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) の変化が孤発性 ALS で報告されている RNA 編集異常の上流の変化であるか下流の変化であるのかを突き止め、TDP-43 の変化により生じる神経細胞死カスケードを解明するとともに、さらに孤発性 ALS の神経細胞死カスケードの関りを見出し、治療法の開発に役立てる。

3. 研究の方法

野生型 TDP-43、TDP-43 siRNA、あるいは様々な TDP-43 変異体を培養細胞に遺伝子導入し、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率、ADAR2 mRNA の発現量、GluA2 pre-mRNA の発現量、酵素対基質量比の変化を測定した。

様々な週齢の ADAR2 コンディショナルノックアウトマウス

(ADAR2^{flox/flox}/VChT-Cre.Fast; AR2)、ヘテロ接合体 AR2 マウス

(ADAR2^{flox/+}/VChT-Cre.Fast; AR2H)、AR2/GluR-B^{R/R} (AR2res) マウス、野生型マウスを還流固定し、蔗糖浸潤した脊髄の凍結切片を作成し、抗 TDP-43 抗体 (Protein-Tech Group, Inc.)、抗 ADAR2 抗体 (RED1, Exalpha Biologicals, Watertown, MA) 抗 Calpain 抗体 (abcam) を用いて、免疫組織化学を行った。核染色を TO-PRO-3 で行い、局在を観察

した。ADAR2 と TDP-43 の生化学的解析及び局在変化についてはヒト凍結組織、マウス組織、培養細胞を用いて Western blotting および免疫組織化学により解析を行った。

4. 研究成果

TDP-43 の変化が ADAR2 活性低下、RNA 編集異常の上流の可能性について調べた。2 系統の培養細胞を用い、野生型 TDP-43、TDP-43 siRNA、あるいは様々な TDP-43 変異体を導入し、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集率、ADAR2 mRNA の発現量、GluA2 pre-mRNA の発現量、酵素対基質量比の変化を検討したが、ADAR2 活性に有意な変化はみられなかった。

次に TDP-43 の変化が ADAR2 活性低下、RNA 編集異常の下流の可能性について調べた。野生型マウスでは全ての大径前角細胞の核が TDP-43 陽性であったが、AR2、AR2H マウスでは脊髄前角領域において、核の TDP-43 免疫活性が陰性及び低下している運動ニューロンが観察された。TDP-43 と ADAR2 との二重染色では、全ての ADAR2 陽性細胞は核が TDP-43 陽性であったが、AR2 マウスの ADAR2 陰性細胞の核は TDP-43 にも陰性であった。

AR2 マウス脊髄を ADAR2 と TDP-43 の二重染色により経時的に観察すると、ADAR2 と TDP-43 免疫活性は共在するか、共に欠損しているかのいずれかであり、ADAR2 陽性/TDP-43 陰性、ADAR2 陰性/TDP-43 陽性細胞はほとんどみられなかった。

AR2H マウスを観察すると、核の ADAR2 の染色性が減少した運動ニューロンにおいて TDP-43 の局在異常が観察され、核・細胞質両者とも TDP-43 陰性の細胞や、細胞質に抗 TDP-43 抗体陽性の凝集体をもつ細胞が観察された。

AR2 マウス脊髄のウエスタンブロット解析では、TDP-43 の発現量が減少し、カルシウム

依存性のプロテアーゼ calpain と caspase-3 が活性化していた。培養細胞を用いて、これらのプロテアーゼによる TDP-43 の切断を検討したところ 0.5 units の calpain 処理で TDP-43 の切断が認められたのに対し、caspase-3 では 3 units でも切断が認められなかった。さらに複数のプロテアーゼ阻害剤を用い、TDP-43 が calpain により特異的に切断されることを確認した。

上記の変化を *in vivo* でレスキューできるかどうかを確認するために AR2res (GluA2 遺伝子の Q/R 部位を編集型 (R) にした遺伝子改変マウスと AR2 マウスの交配により ADAR2 活性なしに編集型 GluA2 を発現する) マウスを用いて上記と同様の実験を行った。AR2 で観察された TDP-43 の切断、局在異常、細胞死が AR2res マウスの ADAR2 を欠損した運動ニューロンでは全く観察されなかった。

次に calpain による TDP-43 の切断部位を MALDI-TOF Mass 解析のフラグメント断片から同定した。Calpain 依存性の N 端フラグメントは、全長 TDP-43 より有意に高い凝集能を有したが、C 端フラグメントは凝集能の変化を認めなかった。

ALS 患者の剖検脳・脊髄組織で、calpain 依存性 TDP-43 断片および calpain の活性化が観察された。

さらに 2 種の ALS 関連変異 TDP-43 (A315T, M337V) は calpain による切断を受けやすくなることを示した。

以上の結果より ALS の TDP-43 病理形成にはカルシウム依存性プロテアーゼ calpain による TDP-43 の断片化が関与していることがわかった。

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 5 件)

- (1) Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saido TC, and Kwak S: A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat Commun*, 3:1307 (2012) DOI; 10.1038/ncomms2303. 査読有.
- (2) Hideyama T, Teramoto S, Hachiga K, Yamashita T, Kwak S: Co-occurrence of TDP-43 mislocalization with reduced RNA editing enzyme, ADAR2, in aged mouse motor neurons: implications for age-related acceleration of ALS. *PLoS One*, 7(8):e43469 (2012) DOI; 10.1371/journal.pone.0043469. 査読有.
- (3) Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H and Kwak S: Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS motor neurons. *Neurobiol. Dis.* 45(3):1121-8 (2012) DOI; 10.1016/j.nbd.2011.12.033. 査読有.
- (4) Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Hideyama T, Kimura D, Suzuki T and Kwak S: RNA editing of the Q/R site of GluA2 in different cultured cell lines that constitutively express different levels of RNA editing enzyme ADAR2. *Neurosci Res.* 73(1): 42-8(2012) DOI;10.1016/j.neures.2012.02.002. 査読有.
- (5) Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S and Kwak S: The abnormal processing of TDP-43 is not an upstream event of reduced ADAR2 activity in ALS motor neurons. *Neurosci Res.* 73(2) 153-60 (2012)

DOI;10.1016/j.neures.2012.02.015. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① Kwak S, Hideyama T, Yamashita T: 「RNA editing and ALS」 6th International symposium on nanomedicine. Shimane, Matsue, Nov 29-Dec 1, 2012.
- ② Hideyama, T., Yamashita, T., Aizawa, H. and Kwak, S. Downregulation of RNA editing enzyme ADAR2 and sporadic ALS. The 22nd International Symposium on MND/ALS, 2011.11.30 -12.2, Sydney, Australia.
- ③ Yamashita, T., Hideyama, T., Hachiga, K., Teramoto, S. and Kwak, S. Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. 41st Annual Meeting Society for Neuroscience, 2011.11.12-16, Washington DC, USA.
- ④ Yamashita, T., Hideyama, T., Hachiga, K., Teramoto, S. and Kwak, S. Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. 6th Brain Research conference "RNA binding proteins in neurological disease, 2011.11.10-11, Washington DC, USA.
- ⑤ 山下雄也、日出山拓人、八賀康祐、寺本さやか、郭伸. ALS 運動ニューロンにおけるRNA編集異常とTDP-43 の病理. Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. 第34回神経科学大会、2011.9.14-17、横浜.
- ⑥ 山下雄也、寺本さやか、日出山拓人、郭伸. ADAR2 賦活物質のin vitro スクリーニングシステムの開発: 孤発性ALS 治療薬の探索. 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2011.8.21-23、神戸.

- ⑦ Hideyama, T., Yamashita, T., Aizawa, H. and Kwak, S. Inefficient RNA editing of GluA2 with ADAR2 downregulation and sporadic ALS. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 2011. 7. 14-19, Firenze, Italy.
- ⑧ 澤田潤、相澤仁志、片山隆行、長谷部直幸、山下雄也、郭 伸. AMPA 受容体サブユニットGluR2 のQ/R 部位RNA 編集率に及ぼす各種薬剤の効果. 第52 回日本神経学会総会 2011. 5. 18-20、名古屋.
- ⑨ 日出山拓人、山下雄也、相澤仁志、柿田明美、高橋均、辻省次、鈴木岳史、Seeburg PH, Higuchi M, 高橋良輔、三澤日出巳、郭 伸. 孤発性ALS におけるRNA 編集異常のメカニズムと運動ニューロン死. 第52 回日本神経学会総会、2011. 5. 18-20、名古屋.

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/teamkwak/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 雄也 (YAMASHITA TAKENARI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：20431843