

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06225

研究課題名(和文) TDP-43異常を伴うALS病態モデルの確立

研究課題名(英文) Modeling ALS with TDP-43 proteinopathy

研究代表者

須貝 章弘 (Sugai, Akihiro)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70758903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロンの細胞質内には、核蛋白であるTDP-43が異常蓄積する。TDP-43は自己発現量制御機構をもち、これは核内TDP-43量に応じた自己RNAのプロセッシングによっている。我々は、ALSでは転写の冗長性を基盤とするこの制御機構に乱れがあり、TDP-43 mRNAの発現が亢進に傾いていることを見出した。この知見に基づき、この制御機構の中心をなす選択的スプライシングをアンチセンスオリゴにより攪乱させ、内在性TDP-43 mRNAの発現が亢進したALS病態モデルを、マウス脊髄およびヒトiPS細胞由来ニューロンにおいて構築した。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of TDP-43 in the cytoplasm of motor neurons is a pathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). TDP-43 regulates its own mRNA expression. We recently elucidated that a redundant transcription followed by alternative splicing of the pre-mRNA is a critical process for the auto-regulation and that TDP-43 mRNA is increased in ALS motor neurons. Based on this finding, we disturbed the alternative splicing and developed a model with increased intrinsic TDP-43 in mice spinal cords and in human iPS-cell derived neurons.

研究分野：神経内科

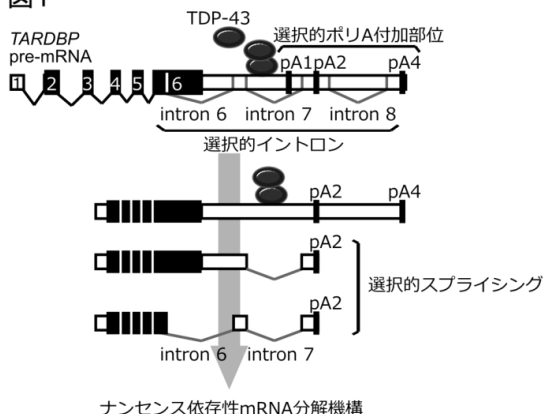
キーワード：ALS TDP-43 アンチセンスオリゴ 自己制御機構 マウスモデル iPS細胞モデル

## 1. 研究開始当初の背景

分子・細胞レベルでみられる生体の恒常性を維持する機構に反し、神経変性疾患では特定の蛋白質が蓄積する。致死的な神経変性疾患である ALS では、選択的に侵される運動神経細胞内に TDP-43 の蓄積を認め、病態との密接な関連が指摘されている。TDP-43 は RNA 結合蛋白質のひとつであり、その発現量の変化は細胞機能に広範な影響を及ぼし得るが、実際には自己蛋白量調節機構によりその発現量が厳密に制御され、その恒常性が維持されている (Polymenidou, *et al.* Nature neuroscience 2011)。TDP-43 の蓄積はこの恒常性維持機構の破綻を意味しており、ALS 病態の解明のためには、TDP-43 の自己蛋白量調節機構、さらにはその破綻による影響を明らかにする必要がある (Onodera, Sugai, *et al.* Neurology and Clinical Neuroscience 2013)。

これまでに我々は、ヒト培養細胞を使い TDP-43 の自己蛋白量調節機構の詳細を明らかにした (Koyama A, Sugai A, *et al.* Nucleic Acids Res. 2016)。TDP-43 は *TARDBP* 遺伝子によりコードされるが、その最終エクソンであるエクソン 6 内には 3 つの選択的イントロンと 3 つの選択的ポリ A 付加部位が存在する (図 1)。*TARDBP* mRNA の多くは、最も近位のポリ A 付加部位 (pA1) を使用し、選択的イントロンがスプライシングされないまま細胞質に移行し翻訳される。TDP-43 は *TARDBP* pre-mRNA の 3'UTR である 2 番目の選択的イントロン内 (intron 7) に結合する。これにより、近位のポリ A 付加部位の使用が抑制され、続いて、選択的イントロンのスプライシングが連続的に起こり、この mRNA はナンセンス依存性 mRNA 分解機構により分解される。TDP-43 の蓄積には、この調節機構の破綻が関与している可能性があり、実際、ALS 運動神経細胞内では *TARDBP* mRNA の発現が亢進していることを我々は見出している (Koyama A, Sugai A, *et al.* Nucleic Acids Res. 2016)。しかし、この調節機構の破綻 (*TARDBP* mRNA 発現亢進) と TDP-43 の蓄積を主体とする ALS 病態との因果関係は明らかではない。

図 1



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、TDP-43 の自己蛋白量調節機構の破綻により、*TARDBP* mRNA 発現が亢進するかを、マウス個体とヒト神経細胞で確認し、この状態が ALS 病態モデルとして妥当であるかを検証することである。具体的には、各項目において以下のような研究目的を立てた。

- (1) ALS 脊髄組織で確認している *TARDBP* mRNA の選択的スプライシングが減弱している状態を特異的に模倣する方法を確立する。
- (2) これにより *TARDBP* mRNA の発現亢進がみられるかを、マウスの脊髄と大脳で確認する。
- (3) このモデルにおける内在性 *TARDBP* mRNA の発現亢進状態が、神経細胞死につながるかを検証する。
- (4) ALS 罹患組織でみられるような TDP-43 蛋白の断片化の有無を検証する。
- (5) TDP-43 の局在異常を含む ALS の病理学的な異常が模倣できているかを検証する。

以上により、ALS 治療薬開発のための基盤となる TDP-43 異常を伴う ALS 病態モデルを作成することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) TDP-43 量調節機構に重要な選択的スプライシングを配列特異的に効率よく阻害するアンチセンス核酸の配列を見出す。これにはマウス培養細胞とヒト培養細胞を用いる。

(2) 選定したアンチセンス核酸をマウスの腹腔内に投与する。マウス脊髄または大脳におけるアンチセンス核酸投与による選択的スプライシングの減弱効果を確認する。

(3) アンチセンス核酸を投与したマウスの中枢神経系における *TARDBP* mRNA、TDP-43 蛋白の生化学的および病理学的な解析を行う。

(4) ヒト iPS 細胞由来ニューロンに 1) で選定した選択的スプライシングを効率よく減弱させるヒト用のアンチセンス核酸を投与し、その効果を確認する。ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける TDP-43 の局在変化を細胞免疫染色により解析する。

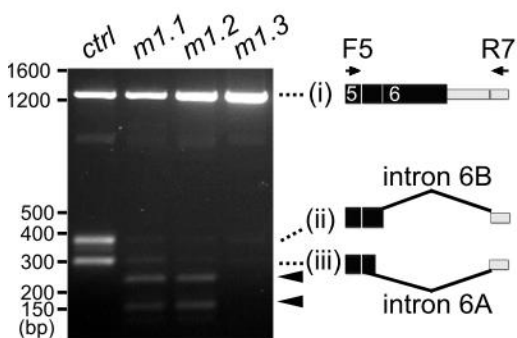
## 4. 研究成果

(1) 選択的スプライシングを制御するアンチセンス核酸の選定

*TDP-43* の自己蛋白量調節機構に重要な役割を担う *TARDBP* mRNA の選択的スプライシングを特異的に阻害するアンチセンス核

酸のスクリーニングを行った。その結果、マウス培養細胞、ヒト培養細胞のそれぞれにおいて、モルフォリノアンチセンス核酸により、効率よくスプライシングを阻害することに成功した(図 2: ヒト培養細胞)。

図 2. アンチセンス核酸のスプライシング阻害効果



*Tardbp* mRNA の選択的スプライシングを配列特異的に阻害したマウス培養細胞では、*Tardbp* mRNA の発現亢進と、TDP-43 蛋白の増加を認めた。

## (2) マウス中枢神経系におけるアンチセンス核酸の効果

*In-vivo* 用に修飾したモルフォリノアンチセンス核酸を成体マウスの髄腔内に腰椎穿刺により緩徐に投与した。軽度のモルフォリノアンチセンス核酸による毒性がみられたが、マウス脊髄において目的の選択的スプライシングの効率的な阻害結果を得た。その効果は少なくとも 5 週間は持続した。

新生児マウスの側脳室に *in-vitro* 用のモルフォリノアンチセンス核酸を投与すると毒性がみられず、大脳および脊髄においても、目的の選択的スプライシング阻害効果を確認できた。

## (3) マウス脊髄の生化学的・病理学的解析

アンチセンス核酸を投与したマウス脊髄組織を生化学的に解析すると、ALS の罹患組織でみられるような TDP-43 の断片化を認めた。さらにアポトーシス前駆蛋白である BIM の発現亢進を認め、一定面積以上の脊髄運動ニューロン数はアンチセンス核酸投与 5 週間後に減少していた。運動ニューロン細胞質への TDP-43 の蓄積は、この期間中には観察されなかった。

## (4) ヒト iPS 細胞由来ニューロンの検討

培養細胞で選定したヒト疾患モデル用のアンチセンス核酸をヒト iPS 細胞由来ニューロンに導入した。その結果、目的の選択的スプライシングを培養細胞と同様に阻害することに成功した。この効果は少なくとも 2 週間は持続した。このニューロンでも *TARDBP* mRNA の発現亢進が確認された。

このとき、細胞免疫染色により、TDP-43 の細胞内局在を解析すると、ある一定数のニューロンにおいて、TDP-43 の核内局在が減弱し、細胞質への染色性が増していた。

## (5) 成果の位置づけと今後の展望

既存の外來性 TDP-43 の過剰発現細胞や動物モデルが明らかにした重要な点のひとつは、TDP-43 の過剰は野生型であっても凝集体形成、神経細胞脱落をもたらすことである。一方、TDP-43 は自己蛋白量調節機構を有することから、これらのモデルでみられる TDP-43 の極端な過剰発現が、たとえ罹患組織であったとしても生体内で起こり得るのか、という問題が生じている。

本研究の特色は、遺伝子改変を行わずに、アンチセンス核酸を用いて配列特異的に TDP-43 の自己蛋白量調節機構に関わる選択的スプライシングの効率を減弱させ、内在性 TDP-43 の過剰発現を誘導することに成功した点にある。さらに、これにより ALS 病態の一部が模倣できていることを確認した。

本手法により、同一の遺伝学的背景および同一株の iPS 由来の神経細胞を対象にした均一な疾患モデルを簡便かつ大量に作製することが可能であり、これは ALS の治療薬探索のための基盤となり得る。

## 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 1 件)

- 1) Koyama A, Sugai A (co-first author), Kato T (co-first author), Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(12):5820-5836. doi: 10.1093/nar/gkw49 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- 1) A trade-off theory for TDP-43 proteinopathy; a 'robust yet fragile' nature of the autoregulation. Sugai A, et al. 11th Brain Research Conference. November 10 - 11, 2016. San Diego, USA

- 2) Overexpression of intrinsic TDP-43 by disruption of the autoregulation in vivo. Sugai A, et al. EMBL Symposium Mechanisms of Neurodegeneration. Jun 14-17, 2015. Heidelberg, Germany
- 3) Fragility of TDP-43 autoregulation facilitates ALS pathology: an *in silico* study. Sugai A, et al. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016 年 5 月 18-21 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市)
- 4) Endogenous TDP-43 overexpression model with disrupted autoregulation. Sugai A, et al. 第 56 回日本神経学会学術大会. 2015 年 5 月 20-23 日、朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須貝 章弘 (SUGAI Akihiro)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70758903