

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08297

研究課題名(和文) TDP-43プロテインパチーにおける神経変性機序に関する研究

研究課題名(英文) Elucidation of the pathomechanism of neurodegeneration induced by TDP-43

研究代表者

橋本 唯史 (Hashimoto, Tadafumi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授

研究者番号：30334337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TDP-43による神経変性機序発現機序を解明するため、TDP-43を発現するTDP-43 tg flyにおいて網羅的遺伝子探索を行い、TDP-43 tg flyではオートファジーの亢進がその複眼変性に関与すること、また、ほ乳類細胞においてTDP-43がULK1 mRNAと結合して、その発現を制御し、オートファジー活性を制御することを見出した。

また候補遺伝子の探索から、CRESTの過剰発現が神経変性を引き起こす、Profilin 1の変異はTDP-43を細胞質に移行させることにより、神経変性を増悪化する、FUSの自己重合はその毒性発揮に重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathomechanism of TDP-43, we carried out RNA-seq analysis and found that Atg1 and several autophagic genes were upregulated in the brain of TDP-43 transgenic (tg) fly. Knockdown of Atg1 rescued the retinal degeneration of TDP-43 tg fly, suggesting that autophagic pathway is involved in the pathogenesis of TDP-43. Moreover, we found that TDP-43 specifically interacted with ULK1 mRNA in Neuro-2a cells and that knockdown of TDP-43 reduced the expression level of ULK1 protein, suggesting that TDP-43 regulates autophagic pathway via regulating the expression of ULK1.

By the analysis of the ALS-related genes, we found that overexpression of CREST induced neurodegeneration in the retina of tg fly, that familial ALS-linked mutations in Profilin1 cause the neurodegeneration through the sequestration of TDP-43 into cytoplasm, and that self-assembly of FUS via its lox-complexity domain contributes neurodegeneration induced by FUS.

研究分野：神経生化学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉変性症 TDP-43 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration, FTL) は前頭葉や側頭葉の神経細胞が進行性に変性脱落し、性格変化や認知症を引き起こす疾患である。FTL 患者脳では神経細胞内にユビキチン陽性封入体が出現することが知られていたが、2006 年その主成分として TDP-43 が同定された (Neumann, *Science*, 2006; Arai, *BBRC*, 2006)。TDP-43 は脊髄前角の運動ニューロンが進行性に変性脱落することにより重篤な筋力低下を引き起こす筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) の運動ニューロン内ユビキチン陽性封入体の成分であることもわかり、神経細胞内に TDP-43 蓄積を伴うという共通性のある疾患群を総称して、TDP-43 プロテオパチーという疾患概念が提唱された。さらに常染色体優性遺伝形式を取る家族性 ALS (fALS) の一部において TDP-43 をコードする遺伝子に点突然変異が発見され (Sreedharan, *Science*, 2008)、TDP-43 が神経変性を引き起こす機序に注目が集まった。

TDP-43 は 2 つの RNA 認識モチーフと、nuclear localization signal (NLS)、nuclear export signal (NES) を有し、RNA processing に関わる蛋白質である。これまでに運動ニューロン特異的に TDP-43 を欠損したマウスが進行性の運動障害、筋力低下、運動ニューロン死を引き起こした (Wu, *J Biol Chem*, 2012)、また TDP-43 は主に核内に局在して機能すると考えられているが、TDP-43 プロテオパチー患者神経細胞では、細胞質内に TDP-43 陽性封入体を形成すること、などの知見から、TDP-43 プロテオパチーでは、何らかの TDP-43 の機能障害ないし欠損が神経細胞変性を引き起こす可能性が考えられた。

近年、fALS の病因遺伝子として FUS/TLS (Kwiatkowski, *Science*, 2009; Vance, *Science*, 2009) や hnRNP A2B1、hnRNP A1 (Kim, *Nature*, 2013) など RNA processing に関与する遺伝子群に変異が相次いで見いだされ、FTL や ALS は RNA processing 障害によって引き起こされる「RNA 病」である可能性が提唱されるに至った (Ling, *Neuron*, 2013)。しかし、どのような RNA の processing 障害が、いかなる機序によって神経変性を引き起こすかは全く不明であった。

2. 研究の目的

これまでに TDP-43 の神経変性機序を解明するため、GAL4-UAS システムを用いショウジョウバエ視神経細胞特異的にヒト TDP-43 を過剰発現するトランスジェニックモデル (tg fly) を作出した。そして TDP-43 tg fly 複眼では進行性の神経脱落が生じるが、RNA 認識モチーフを欠損した TDP-43 Δ RRM tg fly では変性が全く見られないことから、TDP-43 の神経毒性に RNA との相互作用が必須であることを見いだした (Ihara, *Hum Mol Genet*, 2013)。この結果は TDP-43 が何らかの RNA processing

障害により神経変性を引き起こすことを示唆するものである。そこで本研究では TDP-43 の下流で神経変性に関与する遺伝子群の網羅的な探索を行い、TDP-43 プロテオパチー神経変性機序の全容を解明することとした。

3. 研究の方法

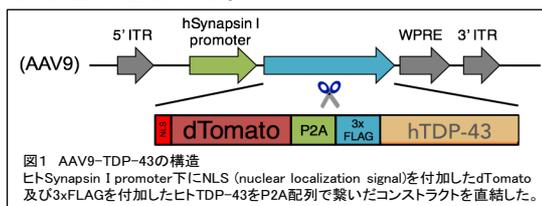
本研究では TDP-43 プロテオパチーにおける神経細胞変性機序を解明するため、次の 3 つのストラテジーで研究を進める。

- ① TDP-43 tg fly を用い、網羅的スクリーニングにより、TDP-43 tg fly 特異的に発現変動する遺伝子を同定し、TDP-43 と相互作用してその毒性に関与する遺伝子を探索する。
- ② TDP-43 プロテオパチーを引き起こす既報の遺伝子変異が TDP-43 の毒性発揮にどのように関与するか検討する。
- ③ アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた新たな TDP-43 プロテオパチーモデルを作出し、TDP-43 の神経変性機序を探索する。

4. 研究成果

① アデノ随伴ウイルスを用いた新規 TDP-43 プロテオパチーモデルマウスの作出

本研究において、TDP-43 による神経変性を評価するため、アデノ随伴ウイルスセロタイプ 9 (AAV9) 発現系を利用して、ヒト TDP-43 を全神経細胞に発現するマウスを作出した。ヒト Synapsin I プロモーター下に蛍光タンパク質 dTomato とヒト TDP-43 を自己開裂配列 P2A で繋いだ融合タンパク質 cDNA を導入した (AAV9-TDP-43、図 1)。本コンストラクトでは、AAV9-TDP-43 感染神経細胞において、P2A が自己開裂することにより、dTomato と TDP-43 を等量ずつ独立したポリペプチドとして発現すると予想される。



AAV9-FUS を出生後 1 日の C57BL/6J マウスの側頭静脈より注入し、1 ヶ月後免疫組織化学的に観察したところ、TDP-43 が海馬や新皮質の神経細胞、脊髄前角の運動ニューロンなどに発現していることが分かった。そこで、AAV9-FUS 及びコントロールとして AAV9-TurboRFP を感染させたマウスを 1, 3, 6 ヶ月齢において rotarod テストを行ったところ、1, 3 ヶ月齢では差は見られなかったが、6 ヶ月齢ではコントロールと比べ有意にスコアが低下した。しかし、Nissle 染色を行った所、6 ヶ月齢において脊髄運動ニューロン数の有意な低下は認められなかった。これらの結果から、AAV9-TDP-43 実験系は TDP-43 依存的に協調運動機能低下を示す新たな TDP-43 プロテオパチーモデルと考えられた。

②ショウジョウバエ複眼において、TDP-43 はオートファジー経路を介して神経変性を発揮する。

TDP-43 による神経変性発現機序を解明するため、進行性の複眼変性を呈する TDP-43 tg fly において特異的に発現変動する遺伝子の網羅的探索を行った。その結果、*Atg1* や *Atg5*、*Atg7*、*Atg8*、*Atg13* などのオートファジー関連遺伝子が TDP-43 tg fly 特異的に上昇していることが分かった。そこで、特に上昇が高かった *Atg1* に注目して検討を進めたところ、*Atg1 mRNA* の発現上昇は、TDP-43 tg fly では認められるが、RNA 結合領域を欠いた Δ RRM TDP-43 tg fly では上昇しないことが分かった (図 2 A)。TDP-43 tg fly を GFP-*Atg8a* fly を交配し、オートファジーマーカーである *Atg8a* の PE 化を生化学的に解析した。その結果、TDP-43 tg fly で *Atg8a* の PE 化が上昇していることが分かり、TDP-43 tg fly においてオートファジーが亢進している可能性が示唆された (図 2 B)。さらに、*Atg1* が TDP-43 tg fly の複眼変性に関与するか検討するため、TDP-43 tg fly において *Atg1* をノックダウンしたところ、複眼変性の程度が著しく軽減し、複眼の厚みが回復した (図 2 C)。一方コントロールである FUS tg fly において *Atg1* をノックダウンしてもその複眼変性は回復しなかった (図 2 D)。

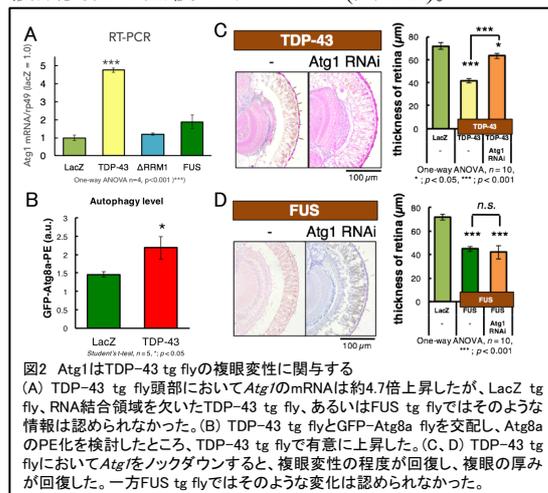


図2 *Atg1*はTDP-43 tg flyの複眼変性に関与する
(A) TDP-43 tg fly頭部において*Atg1*のmRNAは約4.7倍上昇したが、LacZ tg fly、RNA結合領域を欠いたTDP-43 tg fly、あるいはFUS tg flyではそのような情報は認められなかった。(B) TDP-43 tg flyとGFP-*Atg8a* flyを交配し、*Atg8a*のPE化を検討したところ、TDP-43 tg flyで有意に上昇した。(C、D) TDP-43 tg flyにおいて*Atg1*をノックダウンすると、複眼変性の程度が回復し、複眼の厚みが回復した。一方FUS tg flyではそのような変化は認められなかった。

さらに、オートファジー経路が TDP-43 tg fly の複眼変性に関与するか検討するため、*Atg3*、*Atg6*、*Atg13* の各遺伝子についてノックダウン実験を行った。その結果いずれの遺伝子のノックダウンも TDP-43 tg fly の複眼変性を軽減することが分かった。これらの結果から、TDP-43 tg fly における複眼変性はオートファジー経路の異常な亢進が関与している可能性が考えられた。

③TDP-43はほ乳類細胞においてULK1 mRNAと相互作用してオートファジーを制御する。

TDP-43 が *Atg1* ほ乳類ホモログ ULK1 の mRNA と相互作用するか検討を行った。マウス神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞にヒト TDP-43 を発現させ、RNA 免疫沈降実験を行ったところ、TDP-43 と *ULK1 mRNA* が結合することが分かった。一方 RNA 結合配列を画いた Δ RRM TDP-43 を発現させても、*ULK1 mRNA* の沈降

は認められなかった。そこで、TDP-43 が *ULK1 mRNA* と結合して、そのタンパク質発現量を制御するか検討を行った。Neuro 2a 細胞においてマウス TDP-43 の siRNA を投与して、TDP-43 及び ULK1 の発現をイムブロットング法により解析した。その結果、TDP-43 のノックダウンにより ULK1 量が特異的に現象することが分かった (図 3 A、B)。ULK1 はオートファジー誘導調節複合体を構成する。そこで、TDP-43 のノックダウンによりオートファジーレベルを検討したところ、TDP-43 のノックダウンにより PE 化 LC3 量が低下することが分かった (図 3 C、D)。さらに Lysosome 阻害剤の Bafilomycin A1 投与下においても同様の現象が観察され、この現象はヒト TDP-43 の過剰発現でレスキューされるが、RNA 結合領域を欠いた Δ RRM TDP-43 の過剰発現では出来なかったことから、TDP-43 は ULK1 mRNA との結合を介してオートファジーを制御しうることを明らかにした。

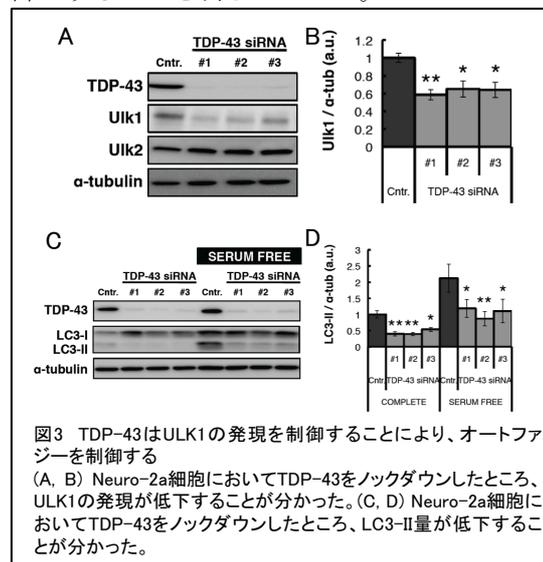


図3 TDP-43はULK1の発現を制御することにより、オートファジーを制御する
(A、B) Neuro-2a細胞においてTDP-43をノックダウンしたところ、ULK1の発現が低下することが分かった。(C、D) Neuro-2a細胞においてTDP-43をノックダウンしたところ、LC3-II量が低下することが分かった。

さらに、ULK1 ノックアウトマウスに AAV9-TDP-43 を発現させたところ、有意に生存率が低下し、さらに rotarod テストにより、協調運動機能が有意に低下することが分かった。この結果から ULK1 が TDP-43 による神経変性に防衛的に働いている可能性が示唆された。

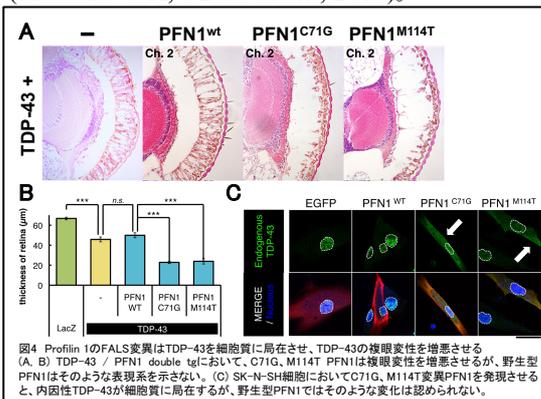
④CREST の過剰発現はショウジョウバエの複眼変性を引き起こす。

Calcium-responsive transactivator (CREST) は中枢神経系の発生に重要な因子である。2013年エキソームシーケンシング解析より、ALS の病因遺伝子として CREST に変異が同定された (Chesi, *Nat Neurosci*, 2013)。そこで野生型、及び ALS 変異である I123M あるいは Q388X 変異型ヒト CREST を視神経細胞に過剰発現する tg fly を作出して解析した。その結果、野生型、及び変異型 CREST tg fly はいずれもシビアな複眼変性を呈することを見出した。(Kukharsky MS, *et al*, *Mol Neurodegen*, 2013)。本研究は、英国 Cardiff University の Shelkvnikova 先生との共同研究で行った。

⑤FALS に連鎖する Profilin1 の点突然変異は TDP-43 の細胞質局在を促すことにより、その神経変性を増悪させる。

Profilin 1 は Actin の脱重合を制御する因子である。2012 年家族性 ALS の病因遺伝子として *Profilin 1* 遺伝子に点突然変異が見出され (Wu, *Nature*, 2012)、さらに剖検脳の解析から、Profilin 1 E117G 変異を保持する ALS 患者の脊髄前角運動ニューロンでは TDP-43 陽性封入体の出現が報告されたことから、Profilin 1 の変異は TDP-43 蓄積を誘導して ALS を引き起こす可能性が考えられたが、その機序は不明であった。そこで本研究では、野生型及び家族性 ALS に連鎖する C71G、M114T 変異を持つヒト Profilin 1 を視神経細胞に過剰発現する *tg fly* を作出した。その結果野生型、C71G、M114T Profilin 1 *tg fly* は複眼変性を呈しなかったが、TDP-43 *tg fly* と交配すると、C71G 及び M114T Profilin 1 を発現する二重 *tg fly* では有意に複眼変性が増悪することが分かった (図 4 A、B)。

さらに、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞に野生型、及び変異型 Profilin 1 を発現させたところ、内因性の TDP-43 の局在が C71G、M114T 変異により細胞質に移行することが分かった (図 4C)。そこで、核局在シグナルに変異を加えることで細胞質に局在する TDP-43 を過剰発現する NLSmt TDP-43 *tg fly* において解析したところ、Profilin 1 の家族性 ALS 変異効果はキャンセルされた。これらの結果から、Profilin 1 の家族性 ALS 変異は TDP-43 を細胞質に局在させることにより、その毒性を増悪化し、ALS を引き起こす可能性が示唆された (Matsukawa K, *J Biol Chem*, 2016)。



⑥FUS の LC 領域を介した自己重合は神経変性発揮に関与する。

FUS は TDP-43 と同様に DNA/RNA 認識配列を持ち、また FUS は家族性 ALS の病因遺伝子である (Kwiatkowski, *Science*, 2009; Vance, *Science*, 2009)。さらに家族性 ALS 患者脊髄前角運動ニューロン及び一部の FTLD 患者中枢神経細胞において、FUS は細胞質封入体を形成することが分かり、TDP-43-opathy に対し、FUS 蓄積を伴う疾患を総称した FUS-opathy と呼ばれる疾患概念が提唱された。そこで本研究では、FUS による神経変性発揮機構を明ら

かにすることで、TDP-43-opathy、FUS-opathy に共通した発症機序、及びそれぞれ疾患グループ特異的な発症機序を解明することとした。

FUS による神経変性機序を明らかにするため、野生型、及び家族性 ALS 変異型ヒト FUS を視神経細胞に過剰発現する *tg fly* を作出して検討した。その結果、野生型 FUS *tg fly* は空胞変性や複眼の菲薄化などの複眼変性を呈することが分かり、さらに家族性 ALS 変異である P525L はその変性を著しく増悪させることが分かった。そこで、FUS の毒性に RNA processing 異常が関わるか検討するため、FUS の RNA 認識配列を欠損した FUS Δ RRM *tg fly* を作出して検討したところ、興味深いことに、 Δ RRM 変異は野生型 FUS *tg fly* の複眼変性は軽減するが、P525L 変異型 FUS の毒性は軽減しないことが分かった。野生型 FUS は主に核内に、P525L 変異型 FUS は主に細胞質に局在することから、細胞質での FUS による毒性発揮に RNA processing 異常は関与しない可能性が考えられた。

FUS のアミノ末端には low-complexity ドメインと呼ばれる、偏った数種類のアミノ酸が繰り返すタンパク質ドメインがあり、FUS を自己重合させることにより、FUS の hydrogel 形成や amyloid 線維形成に関与する可能性が示唆されている (Murray, *Cell*, 2017; Hughes, *Science*, 2018)。FUS の LC ドメイン同士の自己重合を阻害する allS 変異 (Kato, *Cell*, 2012) を導入した allS FUS *tg fly* を作出して検討したところ、allS 変異は野生型 FUS *tg fly*、P525L 変異 *tg fly* いずれもの複眼変性を減弱させることが分かった。これらの結果から、FUS は LC 領域を介した自己重合により神経変性を発揮する可能性が示唆された (Matsumoto T, *Hum Mol Genet*, 2018)。

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 3 件)

① Taisei Matsumoto, Koji Matsukawa, Naruaki Watanabe, Yuya Kishino, Hayato Kunugi, Ryoko Ihara, Tomoko Wakabayashi, Tadafumi Hashimoto, and Takeshi Iwatsubo: Self-assembly of FUS through its low-complexity domain contributes to neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 27: 1353-1365, 2018 (査読有)

② Koji Matsukawa, Tadafumi Hashimoto, Taisei Matsumoto, Ryoko Ihara, Takahiro Chihara, Masayuki Miura, Tomoko Wakabayashi, and Takeshi Iwatsubo: Familial ALS-linked mutations in *Profilin 1* exacerbated TDP-43 induced degeneration in the retina of *Drosophila melanogaster* through an increase in the cytoplasmic localization of TDP-43. *J Biol Chem*,

291, 23464-23476, 2016 (査読有)

③ Michail S. Kukharsky, Annamaria Quintiero, Taisei Matsumoto, Koji Matsukawa, Haiyan An, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo, Vladimir L. Buchman, and Tatyana A. Shelkvnikova: Calcium-responsive transactivator (CREST) protein shares a set of structural and functional traits with other proteins associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegen* 10:20, 2015 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

① Casein kinase 1 δ/ϵ が FUS の神経毒性に与える影響に関する検討
岸野祐也、松川浩二、野中隆、松本大成、長谷川成人、橋本唯史、岩坪威
第36回日本認知症学会 2017年11月24-26日、石川県立音楽堂、金沢

② TDP-43 は Atg1/ULK1 のプロセッシング異常を介して神経変性を引き起こす
松川浩二、岸野祐也、若林朋子、橋本唯史、岩坪威
第35回日本認知症学会 2016年12月1-3日、東京国際フォーラム、東京

③ Tadafumi Hashimoto, Taisei Matsumoto, Koji Matsukawa, Naruaki Watanabe, Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo: Development of a novel cell-based model for oligomerization and intercellular transmission of FUS. *Neuroscience* 2016, 201.01, Nov 13th, 2016, San Diego

④ Tadafumi Hashimoto, Taisei Matsumoto, Koji Matsukawa, Naruaki Watanabe, Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo: Development of a novel cell-based model for oligomerization and intercellular transmission of FUS. *11th Brain Research Conference, 4th RNA Metabolism in Neurological Disease conference*, Nov 10-11, 2016, San Diego, USA

⑤ Tadafumi Hashimoto, Taisei Matsumoto, Koji Matsukawa, Naruaki Watanabe, Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo: Novel cellular and in vivo models for intercellular transmission of FUS. *Gordon Research Conferences, Neurobiology of brain disorders*, Aug 7-12, 2016, Girona, Spain

⑥ Koji Matsukawa, Ryoko Ihara, Taisei Matsumoto, Takahiro Chihara, Masayuki Miura, Tomoko Wakabayashi, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo: TDP-43 regulates expression of Ulk1/Atg1 and autophagy. *Neuroscience* 2015, Oct 18, 2015, Chicago, USA

⑦ Tadafumi Hashimoto, Taisei Matsumoto, Hayato Kunugi, Koji Matsukawa, Tomoko

Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo: Self-assembly of FUS is required for the degeneration of retinal photoreceptor neurons in transgenic *Drosophila melanogaster* overexpressing human FUS. *10th Brain Research Conference*, Oct 15-16, 2015, Chicago, USA

⑧ 家族性 ALS 病因タンパク質 FUS による神経変性機構の解明
松本大成、功刀隼人、松川浩二、若林朋子、橋本唯史、岩坪威 **第34回日本認知症学会**, 2015年10月3日、青森

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.neuropathology.m.u-](http://www.neuropathology.m.u-tokyo.ac.jp/news.html#MatsukawaJBC2016)

[tokyo.ac.jp/news.html#MatsukawaJBC2016](http://www.neuropathology.m.u-tokyo.ac.jp/news.html#MatsukawaJBC2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 唯史 (HASHIMOTO, Tadafumi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：30334337

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし