

令和元年6月13日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09355

研究課題名(和文) TDP-43分子病変の時空間解析技術の創出と、そのFTLD早期診断への応用

研究課題名(英文) the early diagnosis of FTLD by new method of molecular ueroimaging

研究代表者

植木 美乃 (Ueki, Yoshino)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40467478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病を初めとする神経変性疾患患者の脳神経組織では、病態プロテアーゼの活性化による病原タンパク質断片の生成と、その凝集体が惹起する神経細胞障害性が、病態生理に与ると考えられている。これまで、それら分子病変の評価は、患者死後脳の病理学的解析で行われるのみで、生前に病変をin vivoで画像化、定量解析する技術の創出が俟たれていた。本研究では、前頭側頭葉変性症(FTLD)に焦点を当て、その原因タンパク質TDP-43断片の生成をMRIで画像化する分子イメージング技術を創出し、その診断・治療への応用を図ることを目標とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病をはじめとする認知症は社会の高齢化と共に益々患者数も増加している。認知症の中でもFTLDは社会的行動変化、感情変化が初発症状であり、その社会性欠如の行動変化が初期から出現するため社会に与える影響は大きい。TDP-43のC末断片と凝集体の生成が観察されているが、それらの生起過程をin vivoで解析することができる脳内分子動態解析技術は、これまでになく、病態初期の分子病変の病理を詳解し、早期診断、根本的治療のためのin vivo分子イメージング技術が創出できれば社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：It is thought that the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease is caused by the generation of cytotoxic protein piece and accumulation of cohesion body in the cranial nerve tissue. The evaluation of those molecular lesions was carried out by pathological analysis of the patient postmortem brain, because it has not been established the technique to analyzed these lesion in vivo. In this study, I focused on fronto-temporal lobe degeneration (FTLD) and create a molecular imaging technology for detecting the generation of the protein TDP-43 piece by MRI.

研究分野：脳機能イメージング

キーワード：脳機能イメージング 前頭側頭型認知症 早期診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration: FTLN)は、アルツハイマー病、レビー小体型認知症に次ぐ認知症の原因疾患であり、社会的行動変化、感情変化が著明な初発症状である。罹患脳では神経細胞、グリアにユビキチン陽性封入体が観察され、FTLD-Uとも称される。最近、TAR DNA-binding protein of 43 kD(TDP-43)が細胞内封入体の主要構成タンパク質であることが確認され、TDP-43 が FTLN の病態生理に与る仕組みに関心が寄せられている(Lee et al., Nat Rev Neurosci, 2012)。従前の FTLN 患者死後脳の病理学的、生化学的解析により、TDP-43 の C 末断片と凝集体の生成が観察されているが、それらの生起過程を *in vivo* で解析することができる脳内分子動態解析技術は、これまでになく、病態初期の分子病変の病理を詳解し、早期診断、根本的治療のための *in vivo* 分子イメージング技術の創出が俟たれていた。

最近、精神神経疾患病態脳での神経細胞死に与るプロテアーゼの一種、カスパーゼ-3の酵素活性を、神経細胞培養系でNMRを用い定量評価するための機能プローブを創製し、それにより、アポトーシスを誘導した神経細胞培養系におけるカスパーゼ-3の活性化を、リアルタイムで測定することに成功した。即ち、 Gd^{3+} 等の常磁性体の近傍では ^{19}F 等のNMR核種の T_2 緩和時間が短縮する(paramagnetic relaxation enhancement effect: PRE効果)ことに着目し、障害神経細胞でのカスパーゼ-3の活性化により基質ペプチドが切断される結果、 Gd^{3+} が ^{19}F から遊離しNMRシグナルを回復するNMR機能プローブを創製した(図1)。このプローブでは、C末に細胞膜透過性を持つTATペプチドを結合してあるので、培養細胞へのプローブの導入は、培地にプローブを添加するのみで容易に行うことができる。

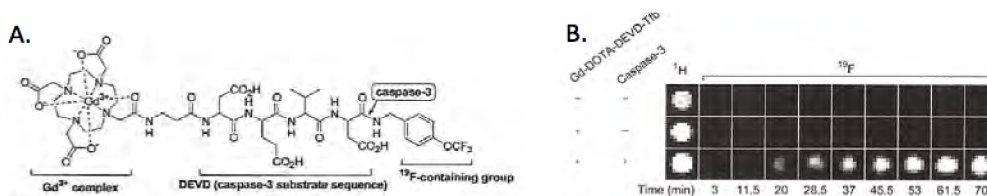


図1(A) NMR機能プローブの分子設計。カスパーゼ-3が活性化し、基質ペプチド(DEVD)を切断する結果、 Gd^{3+} が ^{19}F から遊離し、 Gd^{3+} により短縮していた ^{19}F の T_2 緩和時間が回復する。そのため、カスパーゼ-3の活性化によりプローブがNMRシグナルを生じる。(B) カスパーゼ-3酵素活性のNMRによるリアルタイム解析。神経培養系にNMRプローブを導入した後、アポトーシスを誘導し、カスパーゼ-3の酵素活性をNMRで定量評価した。

FTLD 病態脳では、TDP-43 が病態特異的に未同定のプロテアーゼの活性化により切断され、C 末断片を生成するので、本研究では TDP-43 の切断領域ペプチドの一端を Gd^{3+} で、他端を ^{19}F で標識した NMR プローブを新たに調製する。そして、当該プローブを FTLN 病態モデル培養細胞に導入し、病態プロテアーゼの活性化による TDP-43 の C 末断片の生成を、NMR を用いてリアルタイムで定量解析する。ここで、さらにプローブの TAT ペプチドを、血液脳関門透過性を持つ RVG(狂犬病ウイルス糖タンパク質)ペプチドに置換することによって、その脳への薬剤送達を可能とする。FTLD 病態と関連付けられる諸因子の相互作用並びに脳内動態の変遷についての解析は、これまでなされてこなかったため、*in vivo* で TDP-43 断片生成等の分子病変を描出する分子イメージング技術の創出と、その早期診断及び創薬への応用が俟たれていたところである。特に、本研究の結果創出の見込まれる

独自の MRI 機能プローブによる精神・神経疾患罹患脳での病原タンパク質の MRI での in vivo 動態解析の例は、国内外でこれまでに報告がなく、当該画像法は、病原タンパク質のプロセッシング異常が与る多疾患の診断・治療にも有用と考えられる独創性に富むものである。

2．研究の目的

FTLD は、アルツハイマー病、レビー小体型認知症に次ぐ認知症の原因疾患であり、社会的行動変化、感情変化が著明な初発症状である。罹患脳では神経細胞、グリアにユビキチン陽性封入体が観察され、FTLD-U とも称される。最近、TAR DNA-binding protein of 43 kD(TDP-43)が細胞内封入体の主要構成タンパク質であることが確認され、TDP-43 が FTLD の病態生理に与る仕組みに関心が寄せられている。本研究では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の罹患脳脊髄運動ニューロンにて病態早期より確認される TAR-DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43)の 35 kDa C 末断片生成に与るプロテアーゼ様酵素の活性を、生細胞で蛍光イメージング技術により画像化する技術を創出するとともに、当該蛍光機能プローブを改変することで、TDP-43 C 末断片生成を核磁気共鳴画像法(MRI)により生体脳においてリアルタイムに画像化する in vivo イメージング技術の創成を行うことを目的とした。

3．研究の方法

初年度は、我々が京都大学と共同研究中であるアルツハイマー病病態モデル培養細胞で、 γ セクレターゼの酵素活性を画像化することに成功済の FRET の原理に基づく蛍光イメージング技術の一部を改変し、FTLD 病態モデル培養細胞にて TDP-43 C 末断片の生成を画像化することを目標とした。まずプローブペプチドのアミノ酸配列を至適化し、プロテアーゼ酵素活性依存的なシグナルの発生効率を高めた。FTLD 病態モデル培養細胞は、SH-SY5Y 細胞株をプロテアソーム阻害剤ラクタシスチンで処理し、TDP-43 の C 末断片と凝集体の生成を確認することで調製した。病態プロテアーゼによる TDP-43 の切断領域のペプチドの一端を蛍光剤 Cy5 で、他端を消光剤 TAMRA で標識し調製したプローブに、TAT ペプチドを結合し細胞膜透過性を持たせた。当該プローブは、病態プロテアーゼが活性化し TAMRA を遊離する結果、蛍光を生じる。次に、蛍光プローブの標識を置換し、NMR で TDP-43 C 末断片の生成を定量評価するための NMR プローブを創製した。

2016 年度では、APP からの $A\beta_{1-42}$ の産生に与る γ セクレターゼ酵素活性を、NMR を用い培養細胞で画像化、定量解析するため、家族性アルツハイマー病遺伝子変異(PS1A246E)を持つ Neuro2a 細胞株(N2a/A246E 細胞)にて、 γ セクレターゼ酵素活性依存的に MRI シグナルを生じる MRI 機能プローブを調製した。さらに、FTLD 病態脳では、TDP-43 が病態特異的に未同定のプロテアーゼの活性化により切断され、C 末断片を生成するので、我々は、TDP-43 の切断領域ペプチドの一端を Gd^{3+} で、他端を ^{19}F で標識した NMR プローブを新たに調製した。すなわちカスパーゼ-3 酵素活性の定量評価のための NMR 機能プローブを改変し、FTLD 病態モデル培養細胞で TDP-43 の C 末断片生成に依存し NMR シグナルを発する新規プローブを合成した。

2017、2018 年度では、精神神経疾患病態脳での神経細胞死に与るプロテアーゼの一種、カスパーゼ-3 の酵素活性を、神経細胞培養系で NMR を用い定量評価するための機能プローブを創製し、それにより、アポトーシスを誘導した神経細胞培養系におけるカスパーゼ-3 の活性化を、リアルタイムで測定することに成功した。FTLD 病態脳では、TDP-43 が病

態特異的に未同定のプロテアーゼの活性化により切断され、C末断片を生成するので、本研究ではTDP-43の切断領域ペプチドの一端をGd³⁺で、他端を¹⁹Fで標識したNMRプローブを新たに調製した。すなわち、カスパーゼ-3酵素活性の定量評価のためのNMR機能プローブを改変し、FTLD病態モデル培養細胞に導入し、病態プロテアーゼの活性化によるTDP-43のC末断片の生成を、NMRを用いて今後さらにリアルタイムで定量解析していく予定である。

4. 研究成果

本研究では、TDP-43のプロセッシングに与るプロテアーゼ様酵素の活性を、ALS病態モデル培養細胞で検出するための蛍光機能プローブを作製した。即ち、TDP-43 C末断片を生じるプロテアーゼ様酵素切断部位ペプチドのN末側にCy5等の蛍光物質を、C末側にTAMRA等の消光剤及びcell penetrating peptide (CPP)を結合した膜透過性の蛍光機能プローブを創製した。当該プローブは、ALS病態モデル培養細胞にて未特定のプロテアーゼ様酵素によるプロセッシングを受け消光剤を遊離するので、酵素活性依存的に蛍光を発する。ここでは、独自のプロテアーゼ阻害剤ライブラリーからの種々の化合物を病態モデル培養細胞に投与することで、病原性TDP-43断片の生成を阻害する薬剤候補化合物の探索を行った。

次に本研究では、創製した蛍光プローブを改変し、まず培養細胞で核磁気共鳴(NMR)により、TDP-43断片生成プロテアーゼ様酵素活性を定量的に評価するための独自のNMR機能プローブを、プローブ・ペプチドのN末側にガドリニウム(Gd³⁺)等の常磁性体を、C末側にフッ素及びCPPを結合することで創製した。ここでは、常磁性体の影響により短縮されるフッ素のT₂緩和時間が、プローブのプロセッシングに伴い回復するので、それによるNMRシグナルをNMRで検出し、プロテアーゼ様酵素活性を定量解析した。そして、当該プローブのCPPを、血液脳関門透過性を持つ狂犬病ウイルス糖タンパク質のRVGに置換し、TDP-43断片生成をALS病態モデルマウス生体脳においてin vivoでMRIにより画像化することをを行った。そして、プローブの構造を最適化し、プロテアーゼ様酵素活性の検出感度を増すことで、将来におけるヒトへの応用をねらった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Uchida Y, Kan H, Sakurai K, Arai N, Kato D, Kawashima S, Ueki Y, Matsukawa N.
Voxel-based susceptibility mapping in Parkinson's disease mild cognitive impairment.
Mov Disord. 2019 May 15. PMID: 31091347 (査読有り)

〔学会発表〕(計 5件)

1. Uchida Y, Kan H, Arai N, Sakurai K, Kawashima S, Ueki Y and Matsukawa N. Mild cognitive impairment in Parkinson's disease: the voxel-based QSM analysis The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2018, November 3, San Diego, USA)
2. Horiba M, Ueki Y, Mima T, Takamatsu Y, Sahashi K, Itamoto S, Shimizu Y, Matsuhashi M, Matsukawa N and Wada I. Non-invasive closed-circuit brain stimulation for gait rehabilitation of patients with Parkinsonian syndrome the 31st International Congress of Clinical Neurophysiology (2018, May 1-6, Washington DC, USA)

3. Yamada G, Ueki Y, Oishi N, Oguri T, Fukui A, Nakayama M, Matsukawa N. Altered cortico-striatal functional connectivity in RBD with subtle motor dysfunction The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2017, November 11-15, Washington DC, USA)
4. Suzuki A, Shinozaki S, Yazawa Y, Ueki Y, Matsukawa N, Shimohama S and Nagamine T. Establishing a new screening system for MCI and AD with mental rotation tasks that evaluate visuospatial function XII World Congress of Neurology (2017, September 16-21, Kyoto)
5. Yamada G, Ueki Y, Oishi N, Oguri T, Fukui A, Nakayama M, Matsukawa N. Altered cortico-striatal functional connectivity in RBD with subtle motor dysfunction XII World Congress of Neurology (2017, September 16-21, Kyoto)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：福山秀直

ローマ字氏名：Fukuyama Hidenao

所属研究機関名：京都大学

部局名：健康長寿社会の総合医療開発ユニット

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：90181297

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。