

令和元年6月12日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07045

研究課題名(和文) 小型魚類ALSモデルを用いたTDP-43毒性の理解と制御

研究課題名(英文) Development of zebrafish ALS model for understanding and regulation of TDP-43 neurotoxicity

研究代表者

浅川 和秀 (ASAKAWA, Kazuhide)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：30515664

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)：ヘテロリボ核タンパク質TDP-43は、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)における変性運動ニューロンに蓄積する封入体の主成分である。代表者は、ゼブラフィッシュの脊髄運動ニューロンにおいて、TDP-43の過剰発現とノックアウトの何れもが、神経軸索の伸長を阻害することを見出し、これらの軸索の伸長阻害が、PI3キナーゼ-mTOR経路の活性化によってレスキューされることを見出した。これらの結果は、TDP-43のタンパク質恒常性の破綻が、脊髄運動ニューロンの機能障害を引き起こすことを示している。また、PI3キナーゼ-mTOR経路の活性調節が、ALSの治療戦略の一つとなる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘテロリボ核タンパク質TDP-43の過度の増量や減少(TDP-43タンパク質恒常性の破綻)によって運動ニューロンの成長が阻害されることを示し、さらに、この成長阻害をレスキューすることのできる生物学的経路を見出した。これらの新しい知見は、ALSの病態メカニズムの理解と、治療戦略の構築に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) is a major component of the cytoplasmic inclusions accumulating in degenerating motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In this study, we show that both overexpression and knockout of TDP-43 result in motor axon outgrowth defects. We further demonstrate that the targeted activation of PI3 kinase effectively restores the axonal outgrowth in both TDP-43 overexpression and knockout conditions. The PI3 kinase-dependent rescue is cancelled by the mTOR inhibitor rapamycin treatment. Thus, our results suggest that abrogation of TDP-43 proteostasis halts axon outgrowth, which can be rescued through the activation of PI3K-mTOR pathway. Modulation of PI3K-mTOR pathway could offer a potential therapeutic strategy for ALS.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：ALS 運動ニューロン TDP-43 PI3K mTOR 神経変性 タンパク質恒常性 ゼブラフィッシュ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）は、筋収縮を指令する運動ニューロンの変性が原因で致死的な筋萎縮が誘発される神経難病であり、現在、有効な治療法が存在しない。変性運動ニューロンの細胞質にヘテロリボ核タンパク質 TDP-43 を主成分とする凝集体が蓄積する、という病理的特徴から、TDP-43 の凝集体形成が ALS の発症や進行に関与していると予想されている。代表者は本研究に先立ち、脊髄運動ニューロンに TDP-43 を過剰発現すると神経軸索の伸長が阻害される、という知見を得ていた。この時、過剰発現された TDP-43 は核局在を示し、細胞質における凝集は認められなかった。このことから、TDP-43 は、凝集形成に依存しないで細胞毒性を発揮しうると考えられた。さらに、これらの軸索伸長の欠損は、活性化型 PI3 キナーゼの運動ニューロン特異的な発現によってレスキューされることも見出していた。代表者は、これらの現象が ALS 病態の一部を模倣し、さらには、PI3 キナーゼの活性化が ALS の治療戦略の一つとなる可能性を考慮し、本研究を提案した。

### 2. 研究の目的

本研究は、TDP-43 の異常な増加・減少（TDP-43 タンパク質恒常性の崩壊）によって誘発される脊髄運動ニューロンの機能障害のメカニズムを解析する為のゼブラフィッシュ筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデルを構築し、ALS における運動ニューロン変性の分子基盤の理解を深めることを目指した。さらに、脊髄運動ニューロンにおける TDP-43 過剰発現の毒性が、PI3 キナーゼの活性化によって緩和される、という独自に見出した現象のメカニズムを解明し、PI3 キナーゼ経路の機能修飾という視点から、ALS 治療戦略の構築の可能性を検討することを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ脊髄運動ニューロンのサブタイプ CaP では TDP-43 の過剰発現が、神経軸索の伸長を阻害するのに対して、TDP-43 の欠損は神経軸索の伸長にどのような影響を与えるのだろうか。この問題を検証するために、遺伝子破壊ゼブラフィッシュを作製し、TDP-43 の欠損が脊髄運動ニューロンに与える影響を検証した。これによって、TDP-43 の異常な増加・減少（タンパク質恒常性の崩壊）が、脊髄運動ニューロンに与える影響を解析することを目指した。

(2) PI3 キナーゼによる TDP-43 毒性の緩和が、神経興奮性の回復を伴うのか否かを検証するために、脊髄運動ニューロンにカルシウムイメージング用プローブ GCaMP を発現させるためのトランスジェニック系統を構築した。TDP-43 の過剰発現と GCaMP の発現を実現するための Gal4/UAS コンストラクトを構築した。

(3) PI3 キナーゼによる TDP-43 毒性の緩和メカニズムを理解するために、PI キナーゼの下流において機能すると想定される因子の活性を抗体染色により検証した。また、薬浴処理を用いて、PI3 キナーゼの緩和効果を相殺する因子を探索した。

### 4. 研究成果

(1) 脊髄運動ニューロンのサブタイプ CaP において、酵母転写因子 Gal4 依存的に活性化型 PI3 キナーゼ (zp110\*) とカルシウムプローブ GCaMP を共に発現するトランスジェニック系統 Tg[prdm14-Gal4] Tg[zp110\*-UAS-GCaMP] 系統を作製した。さらに、同様の条件下で CaP に TDP-43 を過剰発現する Tg[prdm14-Gal4] Tg[UAS-TDP-43] Tg[zp110\*-UAS-GCaMP] 系統を作製した。二光子励起顕微鏡による CaP のカルシウムイメージング法を用いて、CaP の神経興奮性の比較を行った。その結果、PI3 キナーゼの活性化が、TDP-43 過剰発現による神経興奮性の低下を緩和することを確認した。

(2) TDP-43 の遺伝子破壊が脊髄運動ニューロンにもたらす影響を検討した。ゼブラフィッシュには、2つの TDP-43 パラログ (*tardbp* と *tardbpl*) が存在するが、CRISPR-Cas9 法を用いて、*tardbp* と *tardbpl* のそれぞれのノックアウト系統を作製した。それぞれの単独ノックアウトは生存に影響を与えないが、*tardbp* と *tardbpl* のダブルノックアウトは致死であった。さらに、*tardbp* と *tardbpl* ダブルノックアウトにおいて、脊髄運動ニューロンの軸索伸長が阻害されることを見出した。また、*tardbp* と *tardbpl* のダブルノックアウトによる軸索伸長の欠損は、活性化型 PI3 キナーゼによってレスキューされた。これらの結果は、TDP-43 タンパク質恒常性の崩壊が脊髄運動ニューロンに毒性をもたらす、その毒性は PI3 キナーゼによってレスキューされることを示している。PI3 キナーゼによるレスキューのメカニズムを解明することで、TDP-43 タンパク質恒常性の崩壊によってもたらされる細胞毒性のメカニズムに迫ることができるのではないかと期待された。

(3) TDP-43 毒性の緩和に必要な PI3 キナーゼの標的として、PI3K キナーゼの下流因子の一つとして知られている mTOR 経路の関与を検証した。活性化型 PI3 キナーゼを CaP に発現させると、

mTOR 経路の標的であるリボソーム S6 サブユニットのリン酸化が亢進することを、抗体染色によって明らかにした。さらに、活性化型 PI3 キナーゼの発現は、野生型の脊髄運動ニューロンの軸索の伸長も促進することがわかった。この活性化型 PI3 キナーゼによる軸索伸長の促進は、mTOR 阻害剤のラパマイシンの薬浴処理によって阻害されることがわかった。これらの結果は、PI3 キナーゼが mTOR 経路を活性化することで、TDP-43 毒性による神経軸索の伸長阻害をレスキューしていることを示している。mTOR は、細胞内のタンパク質分解機構であるオートファジーの制御因子であるため、TDP-43 毒性とオートファジーの関連性の検証が今後の課題となると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① [Asakawa K](#), Kawakami K. Protocadherin-Mediated Cell Repulsion Controls the Central Topography and Efferent Projections of the Abducens Nucleus. *Cell Reports*, 査読有, 24, 2018, 1562-1572  
DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.024.
- ② Kamezaki A, Sato F, Aoki K, [Asakawa K](#), Kawakami K, Matsuzaki F, Sehara-Fujisawa A. Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 査読有, 6, 2017, 28873  
DOI: 10.1038/srep28873.
- ③ Ohki Y, Wenninger-Weinzierl A, Hruscha A, [Asakawa K](#), Kawakami K, Haass C, Edbauer D, Schmid B. *Molecular Neurodegeneration*, 査読有, 12, 2017, 6  
DOI: 10.1186/s13024-016-0146-8.

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① 浅川 和秀、TDP-43 タンパク質恒常性の崩壊によって誘導される脊髄運動ニューロンの神経萎縮は PI3K $\alpha$ /mTOR 経路の活性化によってレスキューされる、第 41 回日本神経科学大会 2018 年
- ② [Asakawa K](#), PI3K $\alpha$ /mTOR pathway rescues TDP-43 toxicity in the spinal motor neuron in zebrafish, 28th International Symposium on ALS/MND, 2017
- ③ [Asakawa K](#), Activation of PI3K/mTOR pathway alleviates TDP-43-induced axonopathy in the spinal motor neuron in a zebrafish ALS model, *Neuroscience 2017*, 2017
- ④ 浅川 和秀、ゼブラフィッシュ ALS モデルを用いた TDP-43 毒性の緩和法の探索、第 3 回ゼブラフィッシュ創薬研究会 2017 年
- ⑤ 浅川 和秀、ゼブラフィッシュ ALS モデルを用いた TDP-43 毒性の緩和法の探索、情報計算化学生物学会 2017 年大会 2017 年
- ⑥ 浅川 和秀、PI3K/mTOR pathway rescues TDP-43 toxicity in the spinal motor neuron in a zebrafish ALS model、第 23 回小型魚類研究会 2017 年
- ⑦ [Asakawa K](#), PI3 kinase activation alleviates TDP-43-induced axonopathy in the spinal motor neuron in a zebrafish ALS model, 27th International Symposium on ALS/MND, 2016
- ⑧ 浅川 和秀、PI3K activation alleviates TDP-43-induced axonopathy in a zebrafish ALS model、第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年
- ⑨ [Asakawa K](#), PI3K activation alleviates TDP-43-induced axonopathy in a zebrafish ALS model, 4th RNA Metabolism in Neurological Disease, 2016
- ⑩ 浅川 和秀、PI3K activation alleviates TDP-43-induced axonopathy in a zebrafish ALS model、The 22nd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting 2016 年
- ⑪ 浅川 和秀、PI3 キナーゼ経路の活性化は TDP-43 によって誘導される脊髄運動ニューロンの機能障害を緩和する、第 39 回日本神経科学大会 2016 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：融合タンパク質及びその利用

発明者：浅川和秀、川上浩一

権利者：情報・システム研究機構

種類：特許

番号：特願 2018-186569

出願年：2018

国内外の別：国内

○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

- ① ResearchMap  
<https://researchmap.jp/kazuhideasakawa/>
- ② 浅川和秀 HP  
<https://kazuhide-asakawa.com/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
無し

(2)研究協力者  
無し

※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。