

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09690

研究課題名(和文) 軸索内リボソーム機能障害による翻訳能低下に基づくALS/FTLD病態の統合的理解

研究課題名(英文) Investigation of ALS/FTLD pathogenesis based on translational deterioration due to ribosome dysfunction in axons

研究代表者

長野 清一 (NAGANO, Seiichi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40362727

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)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)、前頭側頭葉変性症(FTLD)ではRNA結合蛋白質TDP-43の神経細胞内での異常沈着がみられ、病態との関連が示唆される。我々はTDP-43による神経軸索へのmRNAの輸送障害がALS/FTLDを発症すると考え、その標的としてリボソーム蛋白質(Rp)mRNAを同定した。Rp mRNAは軸索内でTDP-43と結合・共局在して輸送され、輸送されたRp mRNAは軸索内で局所翻訳されて内在性リボソームにアセンブリされることが示唆された。TDP-43が発現低下した軸索ではリボソームによる局所翻訳能が低下し軸索伸長障害がみられたが、Rpの発現上昇によりこの障害が是正された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症(ALS)、前頭側頭葉変性症(FTLD)は根本的治療法のない重篤な神経変性疾患であり、一刻も早い効果的治療法の開発が切望されている。ALS/FTLDではRNA結合蛋白質TDP-43の神経細胞での局在異常が知られているが、我々は独自に開発した神経細胞区画培養法を用いて神経軸索を選択的に解析する手法を確立し、それによりTDP-43による軸索輸送標的としてリボソーム蛋白質(Rp)mRNAを同定した。Rp mRNAの発現を増加させる薬剤により、ALS/FTLDの新たな治療法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD), abnormal deposition of the RNA-binding protein TDP-43 in neurons was observed, suggesting a relationship with the pathogenesis. We hypothesized that impairment of TDP-43-mediated mRNA transport to neuronal axons would cause ALS/FTLD, and identified ribosomal protein (Rp) mRNA as its target. It was suggested that Rp mRNA is transported by binding and colocalizing with TDP-43 in axons, and the transported Rp mRNA is locally translated in axons and assembled into endogenous ribosomes. In the axons in which TDP-43 was down-regulated, local translational ability by ribosomes and axonal outgrowth was impaired, while the disturbance was ameliorated by overexpression of each Rp.

研究分野：神経内科学

キーワード：TDP-43 軸索輸送 筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉変性症 リボソーム蛋白質 局所翻訳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) およびユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) では RNA 結合蛋白質である TAR-DNA binding protein (TDP) -43 が病変部位の神経細胞内に異常凝集、沈着することが知られている。TDP-43 は核内での遺伝子の転写や pre-mRNA のスプライシングの制御に加え、核外での mRNA の輸送に関与することが推測されている。特に神経細胞は軸索や樹状突起といった長い神経突起を持つため、その突起内に必要な mRNA を輸送し局所で蛋白質に翻訳して供給することは神経細胞の形態や機能を維持する上で重要である。我々は ALS/FTLD-U においては、TDP-43 の異常沈着によりその軸索への特定の mRNA の輸送機能が障害され、神経細胞の形態や機能を維持できずに神経変性が生じる可能性を考え、培養神経細胞を用いた検討により TDP-43 の輸送標的 mRNA 候補としてリボソーム蛋白質 (Rp) mRNA を同定した。このことは ALS/FTLD-U では TDP-43 の機能障害により Rp mRNA の軸索への輸送が障害され、それにより軸索でのリボソームによる全般的な蛋白質合成能が低下して神経変性が生じる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

そこで本研究では TDP-43 が軸索への Rp mRNA の輸送と軸索局所でのリボソームによる蛋白質合成能の制御に関与しているか、TDP-43 による Rp mRNA の軸索輸送に他の RNA 結合蛋白質が関与しているか、TDP-43 の発現低下によりリボソーム機能を介した軸索の形成に障害が生じるか、TDP-43 の機能障害による神経変性が Rp の発現上昇により軽減されるか、を初代神経培養細胞、神経特異的 TDP-43 遺伝子欠損マウス、ヒト TDP-43 過剰発現ショウジョウバエを用いた解析により検証した。

3. 研究の方法

マウス大脳皮質神経細胞を培養し、軸索での Rp mRNA および TDP-43 蛋白質の局在をそれぞれ in situ hybridization、免疫染色により観察した。また同神経細胞に対してファージ蛋白質 MS2 と Venus との融合蛋白質および MS2 により認識される RNA 配列を組み込んだリボソーム蛋白質 cDNA の発現プラスミドを共発現させ、Rp mRNA の軸索での局在を可視化した。さらにその際 FLAG タグを融合した種々の RNA 結合蛋白質あるいは mCherry を融合した TDP-43 cDNA の発現プラスミドを共発現させ、Rp mRNA と各 RNA 結合蛋白質あるいは mCherry-TDP-43 の共局在の有無を観察した。また Neuro2a 細胞に対して Myc タグを融合したヒト TDP-43 cDNA および Rp cDNA の発現プラスミドを共発現させ、抗 Myc 抗体を用いて TDP-43 を免疫沈降した上で沈降物中の Rp mRNA 量を PCR により定量し、TDP-43 蛋白質と Rp mRNA との結合を解析した。

次にマウス大脳皮質培養神経細胞に対し shRNA レンチウイルスベクターを用いて TDP-43 の発現を低下させ、その際の神経突起伸長の程度を定量するとともに、神経突起区画のみをピューロマイシン標識し、そこでの新規の蛋白質合成能を検出した。また大脳皮質培養神経細胞の神経突起区画のみに in vitro 合成した GFP 融合 Rp の mRNA を導入し、同部位で翻訳された Rp の内在性リボソームとのアセンブリの有無を検証した。次に大脳皮質培養神経細胞に対し TDP-43 shRNA 発現プラスミドと Rp cDNA あるいは上記 RNA 結合蛋白質 cDNA 発現プラスミドを共発現させ、TDP-43 の発現低下による神経突起伸長障害に対する Rp cDNA、他の RNA 結合蛋白質の保護効果を解析した。さらに各 Rp を複眼で過剰発現するショウジョウバエを作成してヒト野生型 TDP-43 を複眼で過剰発現するショウジョウバエと交配し、その複眼変性に対する Rp の保護効果を観察した。

また TDP-43 flox マウスと Enolase2-Cre マウスとの交配により神経細胞特異的に TDP-43 を欠損したマウスを作成し、その大脳白質をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、RNA を抽出して Rp mRNA の定量 PCR を行い、対照マウスと比較した。さらに同マウス由来の大脳皮質神経細胞を培養し、神経突起伸長の程度や新規蛋白質合成能を前述と同様の方法により解析した。

4 . 研究成果

マウス大脳皮質神経細胞において Rp mRNA は神経突起内で TDP-43 と共局在して移動していた。Rp mRNA は TDP-43 と結合するがその非翻訳領域の欠失により TDP-43 との結合は減少しその神経突起内での量も減少した。このことより Rp mRNA の神経突起への輸送に TDP-43 が重要な働きを果たしていることが推測された。RNA 結合蛋白質の中で La 蛋白質は神経突起内で Rp mRNA および TDP-43 と最もよく共局在していた。

TDP-43 の発現を低下させた大脳皮質神経細胞では神経突起伸長が阻害され、その際神経突起での局所蛋白質合成能の低下がみられ、神経突起におけるリボソームの機能障害が起こっていることが示唆された。

大脳皮質神経細胞の神経突起区画に GFP-Rp mRNA を加えたところ、GFP-Rp は神経突起内で局所翻訳され取り込まれて内在するリボソームと共局在した。GFP 配列のみではこのような局所翻訳や内在性リボソームへの取り込みはほとんど起こらず、神経突起に存在する Rp は内在性リボソームへアセンブリされることが確認された。TDP-43 shRNA プラスミドを導入した大脳皮質神経細胞では突起伸長障害がみられたが、各 Rp あるいは La 蛋白質の cDNA を共発現させると突起伸長が改善することが明らかとなった。ヒト野生型 TDP-43 を複眼で過剰発現するショウジョウバエでは複眼変性がみられたが、各 Rp を複眼で過剰発現するショウジョウバエと交配させるとその複眼変性が軽減した。

神経細胞特異的 TDP-43 欠損マウスの大脳白質は対照マウスと比較して形成が不良でそこでの Rp mRNA 量は低下傾向であった。さらに同マウス由来の大脳皮質神経細胞は神経突起の伸長が悪く、神経突起でのリボソームによる局所蛋白質合成能も低下していた。

以上より ALS/FTLD-U において TDP-43 の局在変化・異常沈着に伴う神経変性機序として、同蛋白質による Rp mRNA 軸索輸送の障害を介した同部位での局所蛋白質合成能の低下が関与することが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikenaka K, Ishigaki S, Iguchi Y, Kawai K, Fujioka Y, Yokoi S, Abdelhamid RF, Nagano S, Mochizuki H, Katsuno M, Sobue G.	4. 巻 79
2. 論文標題 Characteristic Features of FUS Inclusions in Spinal Motor Neurons of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neuropathol Exp Neurol	6. 最初と最後の頁 370-377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayakawa H, Nakatani R, Ikenaka K, Aguirre C, Choong CJ, Tsuda H, Nagano S, Koike M, Ikeuchi T, Hasegawa M, Papa SM, Nagai Y, Mochizuki H, Baba K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Structurally distinct α -synuclein fibrils induce robust parkinsonian pathology.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mov Disord	6. 最初と最後の頁 256-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.27887	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hideshima M, Beck G, Yamadera M, Motoyama Y, Ikenaka K, Kakuda K, Tsuda H, Nagano S, Fujimura H, Morii E, Murayama S, Mochizuki H.	4. 巻 40
2. 論文標題 Clinicopathological study of ALS with L126S mutation in the SOD1 gene presenting with isolated inferior olivary hypertrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 191-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagashima S, Takeda K, Shiiba I, Higashi M, Fukuda T, Tokuyama T, Matsushita N, Nagano S, Araki T, Kaneko M, Shioi G, Inatome R, Yanagi S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Critical role of CRAG, a splicing variant of centaurin-3/AGAP3, in ELK1-dependent SRF activation at PML bodies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 20107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56559-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Y, Uchino A, Shioya A, Sano T, Matsumoto C, Numata-Uematsu Y, Nagano S, Araki T, Murata M, Murayama S, Saito Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Altered immunoreactivity of ErbB4, a causative gene product for ALS19, in the spinal cord of patients with sporadic ALS.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 268-278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長野清一, 望月秀樹.	4. 巻 4964
2. 論文標題 筋萎縮性側索硬化症とRNA代謝異常.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 長野清一, 割田 仁, 望月秀樹, 青木正志.	4. 巻 36
2. 論文標題 筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子を用いた治験.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 462-464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Numata-Uematsu Y, Wakatsuki S, Nagano S, Shibata M, Sakai K, Ichinohe N, Mikoshiba K, Ohshima T, Yamashita N, Goshima Y, Araki T.	4. 巻 139
2. 論文標題 Inhibition of collapsin response mediator protein-2 phosphorylation ameliorates motor phenotype of ALS model mice expressing SOD1G93A.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 63-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.08.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakuda K, Ikenaka K, Araki K, So M, Aguirre C, Kajiyama Y, Konaka K, Noi K, Baba K, Tsuda H, Nagano S, Ohmichi T, Nagai Y, Tokuda T, El-Agnaf O, Ogi H, Goto Y, Mochizuki H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Ultrasonication-based rapid amplification of α -synuclein aggregates in cerebrospinal fluid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 6001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42399-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 長野清一, 望月秀樹.	4. 巻 35
2. 論文標題 大脳皮質基底核変性症 歴史と概要.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 302-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomioka I, Ishibashi H, Minakawa EN, Motohashi HH, Takayama O, Saito Y, Popiel HA, Puentes S, Owari K, Nakatani T, Nogami N, Yamamoto K, Noguchi S, Yonekawa T, Tanaka Y, Fujita N, Suzuki H, Kikuchi H, Aizawa S, Nagano S, Yamada D, Nishino I, Ichinohe N, Wada K, Kohsaka S, Nagai Y, Seki K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Transgenic monkey model of the polyglutamine diseases recapitulating progressive neurological symptoms.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 e0250-16. 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0250-16.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Nagano S, Jinno J, Mochizuki H, Araki T.
2. 発表標題 TDP-43 controls ribosomal RNA maturation by regulating the function of ribosomal proteins.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野清一.
2. 発表標題 鉄と神経変性疾患 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を中心に .
3. 学会等名 第43回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野清一.
2. 発表標題 TDP-43により軸索輸送される標的mRNAの探索.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagano S, Mochizuki H, Araki T.
2. 発表標題 Regulation of TDP-43-mediated neurotoxicity by ribosome-related factors.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagano S.
2. 発表標題 Gene therapy for ALS.
3. 学会等名 第24回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagano S, Ueyama M, Nagai Y, Mochizuki H, Araki T.
2. 発表標題 Identification of target mRNA transported to axons by TDP-43.
3. 学会等名 143rd Annual Meeting of the American Neurological Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagano S, Mochizuki H, Araki T.
2. 発表標題 Regulation of TDP-43-mediated neurotoxicity by ribosome-related factors.
3. 学会等名 5th RNA Metabolism in Neurological Disease Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長野清一、割田 仁、望月秀樹、青木正志 .
2. 発表標題 ALSにおけるHGF治験 .
3. 学会等名 第36回日本神経治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長野清一、望月秀樹 .
2. 発表標題 リボソームの機能促進による筋萎縮性側索硬化症の新規治療戦略 .
3. 学会等名 大阪大学先導的学際研究機構シンポジウム「未来医療を推進する革新的技術のフロンティア」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagano S, Ueyama M, Nagai Y, Mochizuki H, Araki T.
2. 発表標題 Identification of target mRNA transported to axons by TDP-43.
3. 学会等名 第15回成体脳ニューロン新生懇談会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Nagano, M. Ueyama, Y. Nagai, H. Mochizuki, T. Araki
2. 発表標題 Identification of target mRNA transported to axons by TDP-43
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長野清一、望月秀樹、荒木敏之
2. 発表標題 リボソーム関連因子によるTDP-43神経毒性の制御
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長野清一
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態解明と治療薬開発に向けて-Review メタルバイオの視点から -
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 S. Nagano, M. Ueyama, Y. Nagai, H. Mochizuki, T. Araki
2 . 発表標題 Identification of target mRNA transported to axons by TDP-43
3 . 学会等名 28th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Nagano S, Ueyama M, Wada K, Nagai Y, Saito Y, Araki T.
2 . 発表標題 Neuronal toxicity of TDP-43 is associated with the dysfunction of ribosomal proteins in axons
3 . 学会等名 第57回日本神経学会学術大会
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 Nagano S, Ueyama M, Wada K, Nagai Y, Araki T.
2 . 発表標題 Identification of target mRNA transported to axons by TDP-43
3 . 学会等名 11th Brain Research Conference (国際学会)
4 . 発表年 2016年

1 . 発表者名 長野清一 , 荒木敏之 .
2 . 発表標題 TDP-43によるリボソーム蛋白質mRNAの神経軸索への輸送
3 . 学会等名 第39回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4 . 発表年 2016年

1. 発表者名 Nagano S, Ueyama M, Wada K, Nagai Y, Araki T.
2. 発表標題 Neurotoxicity of TDP-43 is linked to axonal dysfunction of ribosomal proteins
3. 学会等名 第35回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 長野清一, 望月秀樹.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2192
3. 書名 今日の治療指針	

1. 著者名 長野清一, 望月秀樹.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 406
3. 書名 神経変性疾患ハンドブック	

1. 著者名 長野清一、望月秀樹	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 344
3. 書名 Annual Review 神経 2018	

1. 著者名 Nagano S, Araki T.	4. 発行年 2016年
2. 出版社 InTech Publisher	5. 総ページ数 278
3. 書名 Update on amyotrophic lateral sclerosis	

1. 著者名 長野清一, 金井雅裕, 永井義隆.	4. 発行年 2016年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 351
3. 書名 実験医学別冊「マウス表現型解析スタンダード」	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 筋萎縮性側索硬化症を含む神経疾患の予防剤及び/又は治療剤	発明者 望月秀樹、長野清一、佐々木勉、鐘其静、岡田尚巳、平井	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-141692	取得年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 TDP-43プロテノパチー治療用組成物	発明者 長野清一、荒木敏之、上山盛夫、永井義隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-087320	取得年 2017年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

研究室ホームページ http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neurol/myweb6/Top.html
--

