

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15480

研究課題名(和文) 孤発性ALSにおける小胞制御異常の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of dysregulation of exocytosis in sporadic amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

勝野 雅央 (KATSUNO, Masahisa)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50402566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の疾患関連分子であるTDP-43がインスリン分泌に関与しているか否かを解析した。ALS患者膵beta細胞では核TDP-43の消失がみられた。Min6細胞においてTDP-43をノックダウンすると、糖負荷時のインスリン分泌が低下し、TIRFイメージングでも初期相のインスリン分泌低下が確認された。膵臓特異的なTDP-43 knockoutマウスでもグルコース負荷による初期相のインスリン分泌低下を認めた。

研究成果の概要(英文)：TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) encoded by TARDBP gene is an RNA-binding protein, the nuclear depletion of which is the histopathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative disorder affecting both upper and lower motor neurons. Besides motor symptoms, ALS patients often develop non-neuronal signs including glucose intolerance, but underlying pathomechanism is still controversial: impaired insulin secretion and/or insulin resistance. Here we show that ALS subjects have reduced early phase insulin secretion and that nuclear localization TDP-43 is lost in the islets of autopsied pancreas of ALS. Loss of TDP-43 inhibits early phase insulin secretion in both Min6 cells and pancreatic beta cell-specific Tardbp knock-out mice. Nuclear loss of TDP-43 is thus implicated in not only selective loss of motor neurons, but glucose intolerance due to impaired insulin secretion at an early stage of ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 運動ニューロン エクソサイトーシス 糖尿病 インスリン

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロンの選択的変性をきたし、急速進行性の筋萎縮により発症後数年で死に至る神経難病である。2006年に孤発性ALSの病態分子として TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43)が同定された。TDP-43は通常核内に存在しているが、ALSではTDP-43が核内から喪失し、TDP-43凝集体が細胞質に出現する。我々はTDP-43の核内喪失(Loss of function)に注目して、運動ニューロン特異的TDP-43ノックアウトマウスを作成した。このマウスはTDP-43の消失に伴い運動ニューロン・前根萎縮や進行性脱神経などALSで見られる病理や臨床像を呈したが、TDP-43の喪失からニューロン変性にいたる分子経路の解明にまでは至らなかった。

一方、我々はこれまで運動ニューロン疾患のバイオマーカーの開発を進めており、予備的検討によりALS患者ではブドウ糖負荷時のインスリン分泌が低下していること、およびALSの剖検膵臓組織においてβ細胞核内のTDP-43が消失していることを明らかにしている。TDP-43はコピキタスに発現する核蛋白であることから、予備的検討結果に基づき、TDP-43の機能低下がインスリン分泌低下および運動ニューロン変性と共通の病態メカニズムを持つという仮説を立て、細胞・マウス・ヒト・患者検体を用いて検証を行う本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究ではTDP-43の機能低下がインスリン分泌機能に関与していることを証明する。さらに、インスリン分泌低下が起こる分子機構を解明することにより、ALSにおける運動ニューロン・内分泌系に共通した小胞輸送異常の関与を明らかにする。さらに、小胞輸送・分泌をターゲットとした治療法と新規バイオマーカー開発の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) ALS患者(ヒト)におけるインスリン分泌機能評価、および剖検膵臓組織における免疫組織化学評価

健常コントロール群とALS患者群に75g経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)を施行し、血糖およびインスリン値の変動を比較した。筋萎縮に伴うインスリン抵抗性の影響をなるべく少なくするために、ALS患者群は病態早期で萎縮の少ない患者群対象とした。

(2) *in vitro*, *in vivo*でのTDP-43の機能低下におけるインスリン分泌機構の解明

膵臓β細胞株(Min6細胞)において、RNAi

技術を用いてTDP-43をノックダウンしてインスリン分泌機能を評価する。次に網羅的遺伝子解析により、TDP-43によるインスリン分泌の制御分子を同定する。さらに、インスリン分泌の動態をTIRF(全反射照明蛍光顕微鏡)を用いて評価する。アデノ関連ウイルスベクター(AAVウイルス)によるCre-loxPシステムを用いた特異的TDP-43ノックアウトマウスにより*in vivo*で血糖およびインスリン変動を検証する。

4. 研究成果

(1) 健常コントロール群とALS患者群における75gOGTTの血糖値とインスリン値の変動

健常コントロール群24名(59.8±7.5歳)、ALS患者群25名(63.6±7.8歳)を対象として、75gOGTTにおける血糖値およびインスリン値を比較した。血糖値は糖負荷0分、30分後で有意差はなかったが、30分以降の60分、90分、120分後でALS群の方が有意に高かった。またインスリン値は、基礎分泌値である0分で差はなかったが、初期分泌値である30分後でALS群の方が有意に低かった(図1)。

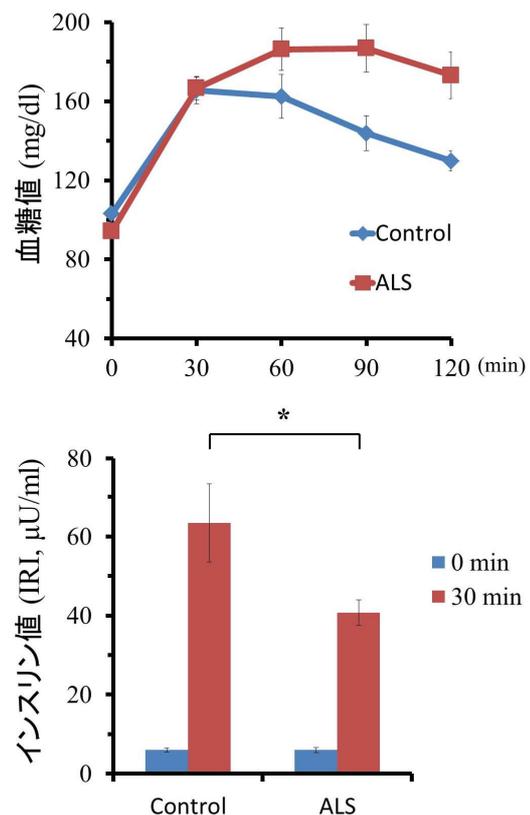


図1. ALS患者における耐糖能異常とインスリン分泌低下

(2) 疾患コントロール群とALS患者群の剖検膵臓組織におけるTDP-43の免疫組織

化学評価

ALS 患者群 4 名および疾患コントロール群 4 名 (肥厚性硬膜炎 1 名, パーキンソン病 2 名, 多系統萎縮症 1 名) の剖検膵臓組織に対し, TDP-43 抗体で免疫染色を行い, 膵島細胞内における TDP-43 陽性細胞率を算出した。その結果, ALS 患者の膵島内における TDP-43 陽性細胞率は疾患コントロール群に比べて有意に低下していた (Control: ALS = 0.70 ± 0.020 : 0.34 ± 0.026 , $p < 0.001$) (図 2)。

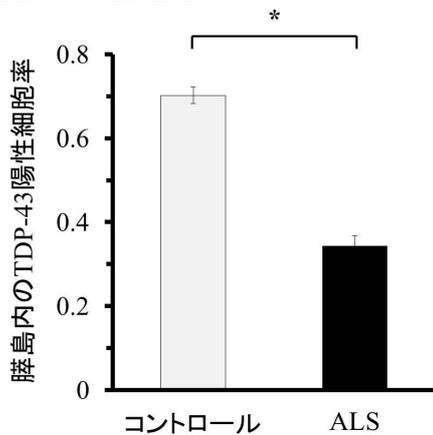
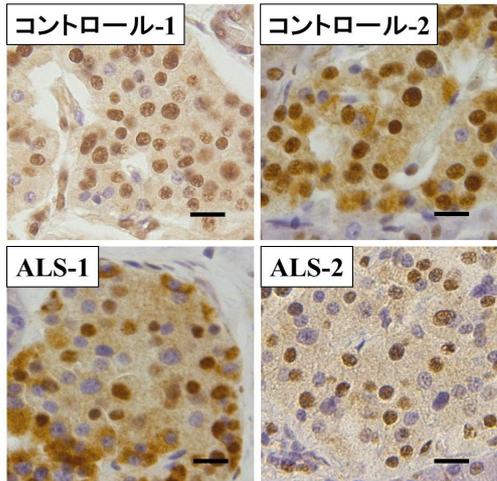


図2. 膵臓β細胞のTDP-43の核内局在の低下

(3) Min6 細胞における control siRNA と TDP-43 siRNA におけるインスリン分泌機能

Min6 細胞に対して RNAi 技術を用いて, TDP-43 のノックダウンを試みた (set1 = T1, set2 = T2). その結果, Control と比較すると RNA レベルで T1 は 62%減, T2 は 54%減, タンパク質レベルで T1 は 56%減, T2 は 40%減に成功した. TDP-43 をノックダウンした Min6 細胞を用いて, 低グルコース KRB buffer (2.8mM) と高グルコース KRB buffer (16.7mM) の刺激を行い HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) 法を用いて上清中のインスリン量 (release) および上清回収後のインスリ

ン含有量 (content) を測定し, release/content (%) を算出することによりインスリン分泌能を測定した. その結果, Control は高グルコース負荷により有意にインスリン分泌能を示したが, TDP-43 ノックダウン (T1, T2) では, インスリン分泌の低下を認めた (図 3)。

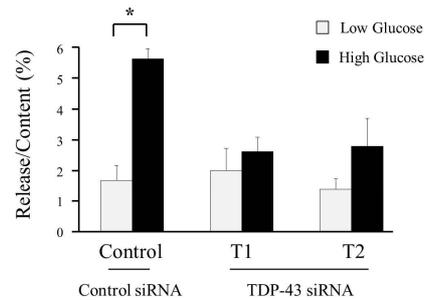


図3. TDP-43ノックダウンによるインスリン分泌低下

(4) TIRF イメージングを用いた TDP-43 ノックダウン Min6 細胞におけるインスリン分泌の動態評価

インスリン-GFP を Control siRNA および TDP-43 siRNA と共に Min6 細胞に導入をし, グルコースの負荷により 1 分間毎に TIRF イメージングを用いてインスリン分泌顆粒をカウントした。

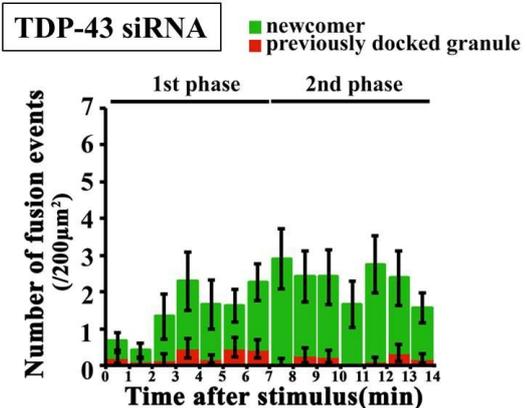
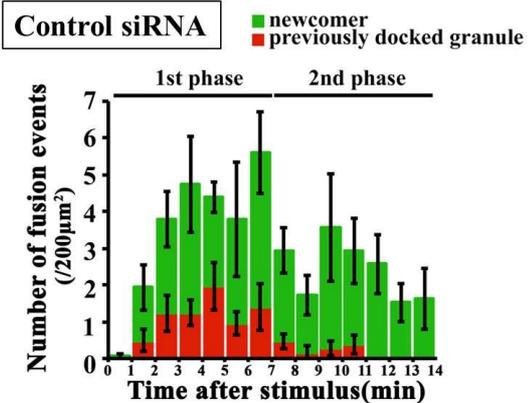


図4. TDP-43ノックダウンで初期相のインスリン分泌が低下する

初めの7分間を初期相, 7-14分を第2相とした。その結果, Control siRNA と比べて, TDP-43 siRNA を導入した Min6 細胞では初期相におけるインスリン分泌が有意に低下していた (図 4)。

(5) 膵臓特異的 TDP-43 ノックアウトマウスによる糖負荷試験およびインスリン値

Cre-loxP システムを用い TDP-43-loxP 発現マウスに膵臓特異的に発現する RIP (Rat Insulin Promoter) 支配下で Cre 酵素を発現する AAV ウィルス投与することにより, 膵臓特異的な TDP-43 ノックアウトマウスを作製した。AAV-RIP-Cre(Control) と AAV-RIP-Cre(TDP-43 knockout)マウスにそれぞれ腹腔糖負荷試験 (IPGTT) とインスリン分泌測定を行った。IPGTT では 15, 30, 60, 120 分で Control に比べて TDP-43 knockout で高値となり, 15 分後のインスリン値では有意にインスリン分泌能の低下を認めた。

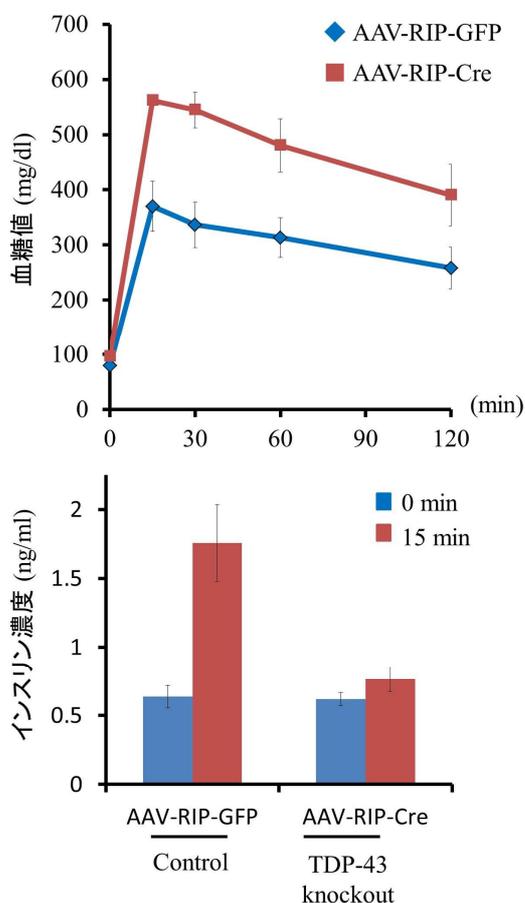


図5. TDP-43 ノックアウトマウスの耐糖能異常とインスリン分泌低下

以上より, ALS 患者におけるインスリン分泌能の低下が TDP-43 の核内消失における原因で起こっていることが示された。インスリン分泌機構は, 主に基礎分泌とグルコース負荷による 2 相性 (初期相と第 2 相) 分泌に分かれる。上記のヒトでの結果 (1) と

Min6 細胞による *in vitro* の結果 (3) から, TDP-43 ノックダウンを行うことでグルコース負荷による初期相の分泌低下が想定された。TIRF イメージング (4) により直接単一インスリン顆粒を評価することにより初期相のインスリン分泌が低下していることが検証できた。また, AAV を用いた膵臓特異的な TDP-43 knockout マウスを作製し, 血糖およびインスリンの変動を評価した。その結果, ヒトや *in vitro* の実験で見られた現象と同様にグルコース負荷による初期相のインスリン分泌低下を認めた (図 5)。

TDP-43 は全身にユビキタスに発現しているタンパク質であるが, 神経系以外での機能についてはほとんど解明されていない。今回の研究では, 神経系以外で初めて TDP-43 の機能が解明された。初期相のインスリン分泌には, ATP 依存性 K チャネル, 電位依存性 Ca チャネル, SNARE complex の構成分子や Rab など小胞が関与しており, 神経系と類似する点が多い。今回の研究では原因遺伝子の解明にまで至らなかったため, 今後は小胞制御分子の異常を見つけ, 小胞輸送・分泌をターゲットとした治療法と新規バイオマーカー開発の可能性を検討する。

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 7 件) 全て査読有

1. Nakatsuji H, Araki A, Hashizume A, Hijikata Y, Yamada S, Inagaki T, Suzuki K, Banno H, Suga N, Okada Y, Ohyama M, Nakagawa T, Kishida K, Funahashi T, Shimomura I, Okano H, Katsuno M, Sobue G. Correlation of insulin resistance and motor function in spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurol*. doi: 10.1007/s00415-017-8405-3. [Epub ahead of print]2017
2. Yamada S, Hashizume A, Hijikata Y, Inagaki T, Suzuki K, Kondo N, Kawai K, Noda S, Nakanishi H, Banno H, Hirakawa A, Koike H, Halievski K, Jordan CL, Katsuno M, Sobue G. Decreased Peak Expiratory Flow Associated with Muscle Fiber-Type Switching in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *PLoS One*. 2016, 11, e0168846. doi: 10.1371/journal.pone.0168846.
3. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Takumi T, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS acts as an aggregation-dependent modifier of polyglutamine disease model mice. *Sci Rep*. 2016, 6, 35236. doi: 10.1038/srep35236.
4. Hijikata Y, Katsuno M, Suzuki K,

- Hashizume A, Araki A, Yamada S, Inagaki T, Iida M, Noda S, Nakanishi H, Banno H, Mano T, Hirakawa A, Adachi H, Watanabe H, Yamamoto M, Sobue G. Impaired muscle uptake of creatine in spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016, 3, 537-546. doi: 10.1002/acn3.324.
5. Ding Y, Adachi H, Katsuno M, Sahashi K, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Sobue G. BII021, a synthetic Hsp90 inhibitor, induces mutant ataxin-1 degradation through the activation of heat shock factor 1. *Neuroscience* 2016, 327, 20-31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.064.
6. Bott LC, Badders NM, Chen KL, Harmison GG, Bautista E, Shih CC, Katsuno M, Sobue G, Taylor JP, Dantuma NP, Fischbeck KH, Rinaldi C. A small-molecule Nrf1 and Nrf2 activator mitigates polyglutamine toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2016, 25, 1979-1989. doi: 10.1093/hmg/ddw073.
7. Pourshafie N, Lee PR, Chen KL, Harmison GG, Bott LC, Katsuno M, Sobue G, Burnett BG, Fischbeck KH, Rinaldi C. MiR-298 Counteracts Mutant Androgen Receptor Toxicity in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *Mol Ther*. 2016, 24, 937-945. doi: 10.1038/mt.2016.13.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 神経変性疾患モデルにおけるタクロリムスとその誘導体の治療効果, ポスター, 藤内玄規, 勝野雅央, 足立弘明, 佐橋健太郎, 近藤直英, 中辻秀朗, 飯田円, 祖父江元, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
2. Dysregulated Akt signaling pathway in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), ポスター, 飯田円, 勝野雅央, 佐橋健太郎, 中辻秀朗, 近藤直英, 藤内玄規, 祖父江元, 第 39 回日本神経科学大会, 第 39 回日本神経科学大会, 2016/7/20-22, パシフィコ横浜(神奈川県 横浜市)
3. Dissection of mechanisms of neuronal degeneration in polyglutamine disease, ポスター, 佐橋健太郎, 近藤直英, 中辻秀朗, 藤内玄規, 飯田円, 勝野雅央, 祖父江元, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18-21, 神戸コンベンションセンター(兵庫県 神戸市)
4. Dysregulated Akt signaling pathway in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), ポスター, 飯田円, 勝野雅央, 佐橋健太郎, 中辻秀朗, 近藤直英, 藤内

玄規, 祖父江元, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18-21, 神戸コンベンションセンター(兵庫県 神戸市)

5. The effect of exercise in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy, 口演, 中辻秀朗, 勝野雅央, 近藤直英, 藤内玄規, 佐橋健太郎, 飯田円, 祖父江元. 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18-21, 神戸コンベンションセンター(兵庫県 神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝野 雅央 (KATSUNO, Masahisa)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50402566

(2) 研究分担者

石垣 診祐 (ISHIGAKI, Shinsuke)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号: 40378170