

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08077

研究課題名(和文) TDP-43結合mRNAとその翻訳産物を標的にした孤発性ALSの病理及び治療研究

研究課題名(英文) Pathological and therapeutic research of sporadic ALS

研究代表者

守村 敏史 (Morimura, Toshifumi)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：20333338

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)：孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因蛋白質TDP-43の発現抑制に伴い発現変動する遺伝子解析を行い、その遺伝子の転写・翻訳産物の発現が劇的に低下する遺伝子を同定した。本遺伝子産物は、凝集活性を亢進させたTDP-43及び代表的な家族性ALS変異を持つsuperoxide dismutase と会合し、更に、これら異常蛋白質の細胞からの除去に重要な役割を担っているvon Hippel-Lindau (VHL)にも会合した。以上の結果から、本遺伝子産物はVHLの機能制御をすることにより、ALS及びTDP-43病理を伴うその他の疾患の進行に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

孤発性ALSは、原因蛋白質であるTDP-43の凝集塊形成による蛋白質毒性とその機能不全により引き起こされるものと考えられている。本研究期間に、TDP-43により発現制御を受ける遺伝子産物の一つが、高凝集性TDP-43や家族性ALSの原因蛋白質による凝集塊に共局在し、これら異常蛋白質の除去に関与している可能性を見出した。即ち、異常蛋白質からの毒性とTDP-43の機能不全はそれぞれ異なる分子メカニズムによりALSの病理基盤を形成すると考えられてきたが、本研究により共通のプレイヤーが存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytoplasmic mis-aggregation and nuclear-loss of TAR DNA binding protein of 43kDa (TDP-43) are observed in the lesions of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). To understand a mechanism how nuclear-loss of TDP-43 involves in the pathogenesis of sporadic ALS, transcriptome analysis was performed. I found a gene whose transcript and translation products are drastically reduced in the TDP-43 silenced HeLa and HEK293A cells. The gene product preferentially associated with aggregated TDP-43 species and superoxide dismutase (SOD1) mutants with mutations related to familial ALS, and it was also co-precipitated with von Hippel-Lindau (VHL), a substrate recognition unit of Cullin-2 E3 ligase complex, which had been identified as an E3 of C-terminal truncated TDP-43 and ALS associated SOD1 mutants. These results suggested that the TDP-43 deficiency may associate with clearance of misfolded TDP-43 and SOD1 through regulating VHL.

研究分野：分子神経科学

キーワード：TDP-43 ALS ノックダウン 細胞質凝集体 SOD1 VHL

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多岐に渡る疾患の制御は、医学・獣医学領域のみならず、生命科学上の最重要課題である。個々の疾患の臨床症状は、標的臓器・細胞種により全く異なるにも関わらず、『細胞内に異物が蓄積する』という点で、疾患発症に関し共通の病理分子基盤を有する。言い換えるなら、寄生体を含めた細胞内異物や発癌遺伝子産物、ミスフォールド蛋白質等の除去機構、即ちプロテアソームやオートファジーの恒常性維持が、多くの疾患制御の重要な位置を占めている。

小胞体は膜蛋白質・分泌蛋白質の成熟や細胞内カルシウムストア、脂質代謝の場として細胞の生存や機能発現に非常に重要な役割を担っている。その環境悪化は言わゆる小胞体ストレスを惹起し、感染症や生活習慣病、神経難病など幅広い疾患の危険ファクターとして認識されている。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の孤発例の脊髄病巣部では、RNA 結合蛋白質である TAR DNA binding protein of 43KDa (TDP-43)が、標的となる運動ニューロン細胞質に異所性に凝集体を形成する事が報告されている。私は、孤発性 ALS の分子病態における TDP-43 の機能欠損に焦点を当て、TDP-43 の発現を siRNA により抑制した HeLa 細胞における遺伝子発現プロファイルについて、特に ALS 病態に関連の深い小胞体ストレス関連遺伝子について焦点を当て解析し、TDP-43 の発現抑制に伴い、転写・翻訳産物の両者の発現が劇的に低下する遺伝子を同定した。

### 2. 研究の目的

マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を基に、siRNA により TDP-43 の発現を抑制した HeLa 細胞と HEK293A 細胞において、転写・翻訳産物の発現が劇的に低下する遺伝子 TDP-43 regulated gene (TRG、仮称)を同定した。本研究は培養細胞を用いた本遺伝子産物の機能解析を進め、ALS ならびに関連する神経変性疾患の進行の位置づけを解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) TDP-43 発現低下に伴う候補遺伝子の同定

TDP-43 の遺伝子発現を抑制した HeLa 細胞を用いたマイクロアレイ解析から、転写産物の発現が2倍以上変動し、特に小胞体ストレスとの関連性が予想または報告される6遺伝子についてピックアップした。これら遺伝子については、実験間の誤差やオフターゲットの可能性を否定する目的で、3種の異なる siRNA により内在性 TDP-43 の発現を抑制した HeLa 細胞及び HEK293A 細胞を用いた定量的 PCR (qPCR)により解析を行い、候補遺伝子の絞り込みを進めた。2つの株化細胞で発現変動が確認された遺伝子については、更に Western blot により翻訳産物の発現変動について解析した。次に、TDP-43 遺伝子の 3' UT を認識する siRNA を新たに利用し、ノックダウンした HeLa 細胞に 3' UT を含まない外来性 TDP-43 の強制発現を行い、TRG 遺伝子産物の発現を比較した。

#### (2) TRG 遺伝子産物の細胞内局在の解析

2種のヒト由来細胞株である HeLa 細胞及び HEK293A 細胞において、TDP-43 の発現抑制により転写・翻訳産物が劇的に低下する事が確認できた TRG 遺伝子について、ALS 標的脊髄運動ニューロンで発現しているか否かを解析する目的で、サル脊髄標本を TRG 特異的抗体と運動ニューロンのマーカーである抗 choline acetyltransferase (CHAT)抗体及びニューロンマーカーである抗 microbubble associated protein 2 (MAP2)抗体で共染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

次に ALS 細胞病理を再現した培養細胞系で、TRG 遺伝子産物の細胞局在を解明する目的で、TDP-43 の核移行シグナルと分子内 S-S 結合の標的であり二量体に必須なシステイン残基をセリンに置換し細胞質内凝集活性を亢進させた TDP-43 を GFP 融合蛋白質とし、HA 融合 TRG と HEK293A 細胞に共発現させ、それぞれの細胞局在の解明を進めた。また、代表的な家族性 ALS の原因蛋白質の Superoxide dismutase (SOD1)の凝集体形成における TRG の位置付けを解明する目的に、HA-TRG を GFP 融合 SOD1 (A4V)と共発現させ、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。

#### (3) TDP-43/SOD1 と TRG の免疫沈降による蛋白質相互作用の解析

蛋白質相互作用の解明を目的に、FLAG ペプチドに融合した高凝集型 TDP-43、核移行シグナル変異 TDP-43 及び家族性 ALS の変異を持つ SOD1 と外来性 TRG を、HEK293A 細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体により免疫沈降後、Western blot を行なった。更に、TDP-43 のユビキチン化は病態進行に重要な役割を担っているものと考えられている。それ故、上記の手法で細胞より調整した各種 TDP-43 のユビキチン化についても、Western blot により解析を進めた。

#### (4) ノックダウン細胞における小胞体ストレス下流遺伝子の発現変動

これまでの報告から、TRG 遺伝子産物は小胞体ストレス制御に関わる事が示唆されている。その事を検証する目的で、ノックダウン細胞における小胞体ストレス活性化に伴う下流遺伝子の発現変動について、qPCR 解析を行った。

#### (5) TRG の von Hippel-Lindau (VHL) との相互作用の解析

TDP-43 及び SOD1 による ALS 細胞病理における共通プレイヤーとして、これまでに Cullin2-E3 リガーゼ複合体が報告されている。下記の研究結果から、TRG の結合パートナーとして Cullin2-E3 複合体のリガンド認識ユニットが想定された。そこで、Cullin2-E3 リガーゼ複合体の基質認識部位である VHL 並びに receptor of activated protein C kinase (RACK1) を Myc ペプチド融合蛋白質として細胞質高凝集型 TDP-43 や HA-TRG と HEK293A 細胞に導入し、細胞局在や蛋白質相互作用に関わる研究を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) TDP-43 発現低下に伴う候補遺伝子の発現変動

マイクロアレイ解析の結果から 6 種の候補遺伝子を選び、qPCR により結果の信頼性を検討した。その結果、異なる 3 種の siRNA により TDP-43 遺伝子がノックダウンされた HeLa 細胞において転写及び翻訳産物の発現がともに劇的に抑制される遺伝子を同定し、TDP-43 regulated gene (TRG) と仮称した (図 1A, B)。TRG 発現に対する TDP-43 のノックダウン効果は HEK293A 細胞でも確認でき (図 1A)、ノックダウン効果は外来性 TDP-43 で回復可能である事が確認できた (図 1C, D)。また、control siRNA 導入細胞に、TDP-43 を強制発現すると mRNA の発現変動なしに (図 1C) 内在性 TRG 翻訳産物の発現が低下する傾向が観察された (図 1D)。このような現象は、野生型 TDP-43 単独の強制発現系でも確認でき、変異体を用いた実験から (核に局在する) ALS 疾患関連変異を有する TDP-43 の強制発現では同様に内在性 TRG の発現が低下したが、核移行シグナルに変異を導入した細胞質型 TDP-43 では低下が認められなかった (結果は示さず)。

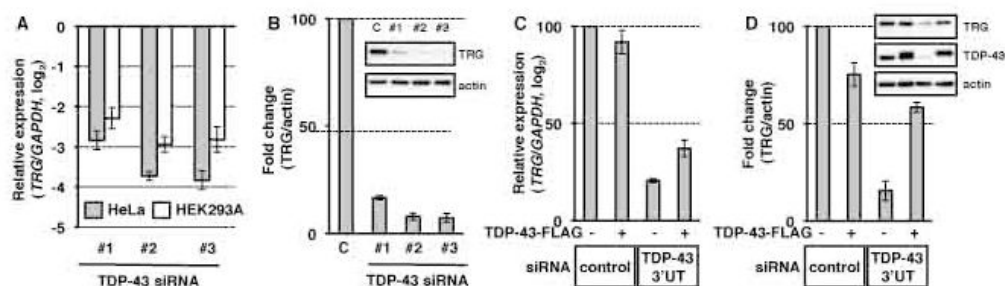


図 1、TDP-43 ノックダウン細胞における TRG の転写・翻訳産物の発現解析。

#### (2) TRG 遺伝子産物の脊髄前角運動ニューロンにおける発現解析

TRG の ALS 標的細胞である脊髄前角運動ニューロンでの発現について、ヒトに最も近い実験動物であるカンクイザルの脊髄標本を用いて解析した。その結果、TRG は、CHAT 陽性の脊髄前角運動ニューロンで核及び細胞質で強いシグナルが検出された (図 2)。同様の染色パターンはマウスの脊髄前角でも確認できた (結果は示さず)。後に述べる通り HA 融合 TRG を株化細胞に強制発現させた場合、抗 HA 抗体のシグナルは核及び細胞質で確認できる事から、TRG は細胞や動物種を問わず細胞質から核に至る diffuse な細胞局在を示す事が明らかとなった。

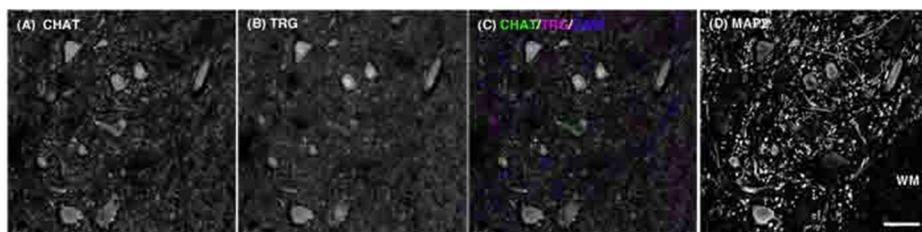


図 2、カンクイザル脊髄前角における TRG 遺伝子産物の発現。スケルバーは 50 マイクロメートル、WM: 白質領域を示す。

#### (3) TRG 遺伝子産物の発現と TDP-43 との相互作用の解析

##### 1) 細胞質凝集性 TDP-43 及び SOD1 と TRG の細胞内局在解析

孤発性 ALS の細胞病理を株化細胞で再現し、病態進行における TRG の機能を類推する目的で、HA 融合 TRG と GFP 融合細胞質高凝集性変異 TDP-43 (mTDP-43-GFP) を HEK293A 細胞に強制発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により細胞局在解析を行った。その結果 HA-TRG は先に述べた通り比較的 diffuse に局在するが、TDP-43 による凝集塊の位置に共局在する事が明らかとなった (図 3)。このような現象は、同じ蛋白質ファミリーに属し、その構造上最も近い蛋白質では認められなかったことから、TRG 特異的現象である事が明らかとなった (結果は示さず)。次に ALS の原因遺伝子とし最も古くから知られている SOD1 の疾患関連変異体について同様の顕微鏡観察を行った。驚くべきことに、HA-TRG は GFP 融合変異 SOD1 (A4V) により形成される凝集塊と一致

した染色性を示した (図 3)。

## 2) 細胞質凝集性 TDP-43 及び家族性 ALS 変異を有する SOD1 と TRG の結合解析

細胞染色の実験結果より、TRG と細胞質凝集性 TDP-43 及び ALS 疾患関連変異を有する SOD1 は、細胞内で会合する可能性が示唆された。そこでまず、FLAG ペプチド融合 TDP-43 種と HA-TRG を HEK293A 細胞に強制発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降後、Western blot 解析を行った。その結果、empty vector 導入細胞を用いた免疫沈降でも非特異的結合を完全に除去することは出来なかったが、特に分子内 S-S 結合の標的であり二量体に必須なシステイン残基をセリンに置換した凝集性の強い 3 つの変異体で、TRG の共沈量が増加する傾向が認められた。

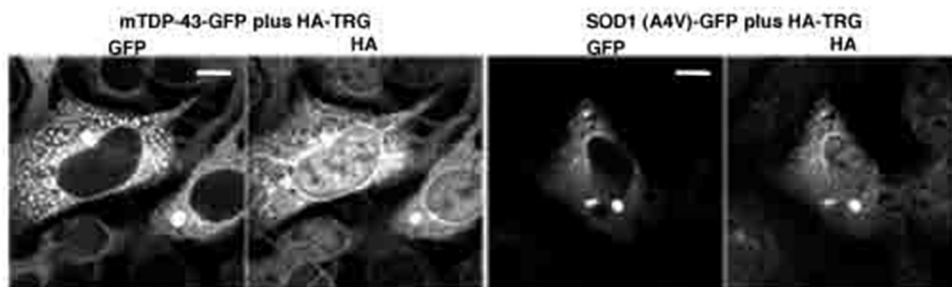


図 3、HEK293A 細胞における凝集性変異 TDP-43/SOD1 及び TRG の細胞内局在解析。図中に示す発現ベクターを HEK293A 細胞に強制発現し、抗 HA 抗体で染色後共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。スケールバーは 10 マイクロメートル。

また、システイン残基に変異を持つ TDP-43 (CS 変異体) のポリユビキチン化は、野生型や核移行シグナル単独変異体のそれより亢進する傾向が認められたことから、TDP-43 種のポリユビキチン化について、外来性 TRG の存在、非存在下で比較した。その結果、特に CS 変異体のポリユビキチン化が TRG の強制発現により亢進する事が明らかとなった。更に、それぞれの TDP-43 種について注意深く観察すると、野生型、変異体を問わず TDP-43 から断片化した 35kDa の C 末切断断片 (CTF-35) の全長 TDP-43 に対する比率が低下する事が明らかとなった (図 4 B)。また、C 末に FLAG ペプチドを融合した CTF-35 を構築し、同様の免疫沈降を行ったところ、TRG との結合およびポリユビキチン化の亢進が観察された (結果は示さず)。

次に、家族性 ALS の変異を有する SOD1 と TRG の結合について免疫沈降法により解析した。その結果、TRG は調べた全ての変異 SOD1 と共沈した。以上の結果より、TRG は孤発性 ALS のみならず、SOD1 変異による家族性 ALS における共通の疾患メディエーターとなりうる事が示唆された (図 4 C)。

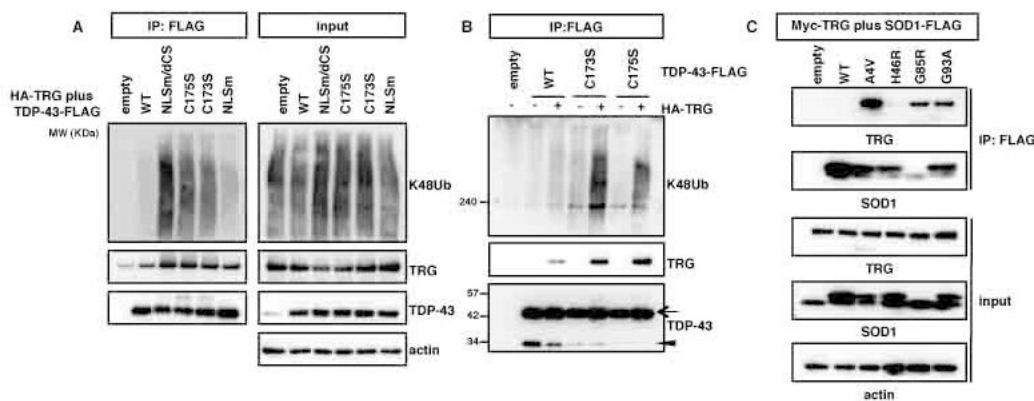


図 4、高凝集性 TDP-43 及び家族性 ALS 変異を持つ SOD1 と TRG の免疫沈降。外来性 TRG と FLAG 融合各種 TDP-43 (A, B) 及び SOD1 (C) を HEK293A 細胞に co-transfection し、FLAG 抗体で免疫沈降後、図中に示した抗体で Western blot 解析を行った。B の矢印と矢頭はそれぞれ全長 TDP-43 及び 35kDa の C 末切断断片のバンドを示す。

## (4) ノックダウン細胞における小胞体ストレス下流遺伝子の発現変動

本遺伝子産物の小胞体ストレスにおける役割を解明する目的で、TDP-43 遺伝子発現抑制 HeLa 細胞及び HEK293A 細胞における小胞体ストレス下流遺伝子の発現プロファイルの解明を行った。小胞体ストレス下流の代表的遺伝子である、*HSPA5/GRP78*、*DDIT3/CHOP* 及び *PPP1R15A/GADD34* 遺伝子の発現量は、二つの株化細胞において、ノックダウンによる一定のコンセンサスのある結果を得る事はできなかった (図 5 A, B, E)。また、小胞体ストレスにより転写及びスプライシングの亢進を受ける *XBPI1* 遺伝子の発現は、試した 5 種類の TDP-43 遺伝子に対する siRNA のうち、4 種類で両細胞株における発現を抑制する事が明らかとなった (図 5 C)。しかし、TRG 遺伝

子抑制細胞では、HeLa 細胞でのみ *XBP1* 遺伝子の発現低下が認められたに過ぎず ( 図 5F ) *XBP1* 遺伝子の発現低下傾向は TRG 非依存的である事が推測された。また、*TRG* 遺伝子発現抑制 HeLa 細胞について、更に小胞体ストレス試薬である thapsigardin (250nM) 及び tunicamycin (2  $\mu$ M) で 8 時間処理した後、qPCR で上記遺伝子の発現変動を control siRNA 導入細胞と比較したが、大きな違いを見出す事はできなかった ( 結果は示さず )。

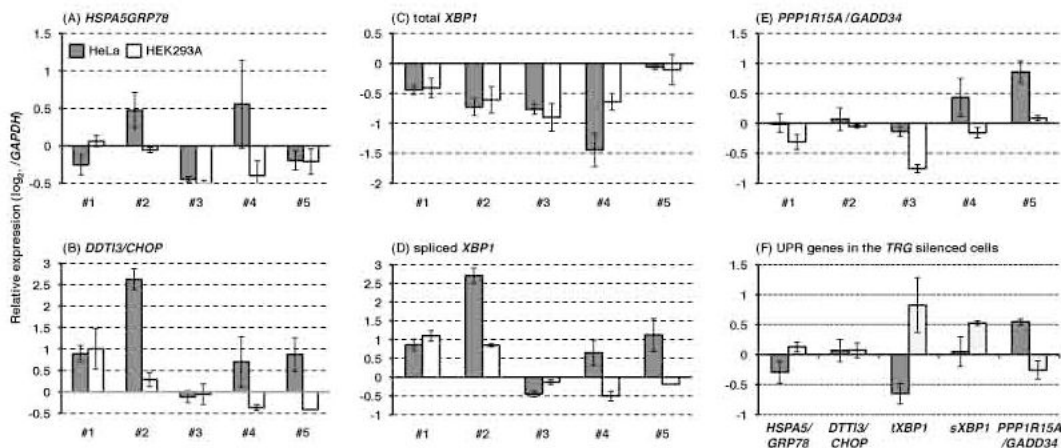


図 5、ノックダウン細胞における小胞体ストレス関連遺伝子の発現変動。TDP-43 遺伝子 ( A-E ) 及び TRG 遺伝子の発現を siRNA により抑制した HeLa 細胞 ( グレイ ) 及び HEK293A 細胞における小胞体ストレス関連遺伝子の発現を qPCR により解析した。

#### ( 5 ) TRG と von Hippel-Lindau ( VHL ) との相互作用の解析

Cullin-2 複合体は CTF-35 の E3 リガーゼとして機能し、ALS 疾患関連 SOD1 変異体にも結合する事が報告されている。TRG の強制発現により、凝集活性の強い TDP-43 変異体に結合する事、疾患関連 SOD1 に結合する事、CTF-35 の全長 TDP-43 に対する相対量が低下する事などから、TRG は、Cullin-2 複合体の機能調節することにより、TDP-43 の細胞病理を制御する可能性を考えた。また、CTF-35 の発現は、Cullin-2 複合体の基質認識ユニットの VHL の強制発現により低下し、ノックダウンにより亢進する事が過去に報告されている。そこで、HA 融合 VHL 及び別の基質認識ユニットである RACK1 と Myc ペプチド融合 TRG を HEK293A 細胞に強制発現させ免疫沈降法により、両者の結合を解析した。RACK1 は TDP-43 の結合パートナーとしてこれまでに報告されており、実際に両者とも細胞質高凝集性 TDP-43 と共局在した ( 図 6 A )。しかし、免疫沈降の結果、TRG は VHL と共沈したが、RACK1 による TRG の共沈は観察されなかった ( 図 6 B )。

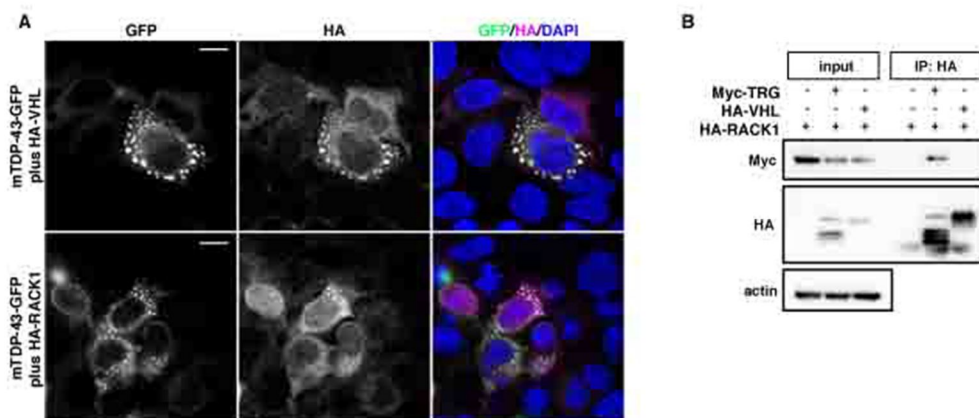


図 6、VHL と TRG の結合解析。( A ) 細胞質高凝集性 TDP-43 と Cullin-2 複合体基質認識ユニットである HA 融合 VHL 及び RACK1 の細胞内局在解析。図中に占める発現ベクターを HEK293A 細胞に co-transfection し、抗 HA 抗体で染色後、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。スケールバーは 10 マイクロメートル。( B ) VHL による TRG の免疫沈降。図中に示す発現ベクターを HEK293A 細胞に導入し、HA 抗体で免疫沈降後、Myc、HA 及び actin 抗体で Western blot を行った。

以上の結果を総括し、TRG は TDP-43 の C 末切断断片や家族性 ALS の蛋白質分解を制御する VHL の機能を制御する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tamaki Y, Shodai A, Morimura T, Hikiami R, Minamiyama S, Ayaki T, Tooyama I, Furukawa Y, Takahashi R, Urushitani M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Elimination of TDP-43 inclusions linked to amyotrophic lateral sclerosis by a misfolding-specific intrabody with dual proteolytic signals.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6030-6045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-24463-3.	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 Seita Y, Morimura T, Watanabe N, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Suzuki T, Yanagisawa D, Tsukiyama T, Nakaya M, Okamura E, Muto M, Ema M, Nishimura M, Tooyama I.	4. 巻 75
2. 論文標題 Generation of Transgenic Cynomolgus Monkeys Overexpressing the Gene for Amyloid- Precursor Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 45-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-191081.	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 Buyandelger U, Walker DG, Yanagisawa D, Morimura T, Tooyama I.	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of FTMT Expression by Retinal Pigment Epithelial Cells on Features of Angiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International's Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3635-3653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21103635.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 引網 亮太、小代 明美、南山 素三雄、玉木 良高、守村 敏史、高橋 良輔、漆谷 真
2. 発表標題 Generating new ALS model mice replicating TDP-43 proteinopathy.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobashi S, Terashima T, Nakae Y, Katagi M, Morimura T, Kojima H, Urushitani M.
2. 発表標題 Development of an effective technology for inductive differentiation from bone marrow-derived mononuclear cells to neuroprotective microglia.
3. 学会等名 World Congress of Neurology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tamaki Y, Shodai A, Hikiami R, Minamiyama S, Morimura T, Ayaki T, Takahashi R, Urushitani M.
2. 発表標題 Degradative intrabody for selective elimination of pathogenic TDP-43 aggregates in vitro and in murine embryos' cerebrum.
3. 学会等名 World Congress of Neurology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jean-Pierre Bellier, Toshifumi Morimura, Yu Xie, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 In vivo interaction between GTP cyclohydrolase 1 and its regulatory protein GFRP
3. 学会等名 第61回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 守村 敏史、清田 弥寿成、渡邊 直希、岩谷 千鶴、土屋 英明、中村 紳一郎、鈴木 利治、依馬、正次、西村 正樹、遠山 育夫
2. 発表標題 アルツハイマー病関連変異型amyloid precursor protein発現トランスジェニックカニクイザルの作出
3. 学会等名 第46回日本脳科学学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	漆谷 真 (Urushitani Makoto)  (60332326)	滋賀医科大学・医学部・教授  (14202)	