

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09750

研究課題名（和文）TDP-43選択的スプライシングによる ALS病態機序とバイオマーカー利用の検討

研究課題名（英文）The disease mechanism and biomarker of ALS, the view from TDP-43 alternative splicing

研究代表者

石原 智彦 (Ishihara, Tomohiko)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70612232

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々は筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態機序解明を目的とし、TDP-43 mRNA 選択的スプライシング（AS：alternative splicing）解析を行った。TDP-43はALSの主要な封入体構成蛋白質であり、本症のkey moleculeである。我々はALS症例由来神経組織で特異なTDP-43 mRNA ASパターンを見出した。さらに同AS由来の蛋白質は易凝集性を有し、ALSにおける封入体形成に関与していることが示唆された。同ASパターンはALSの非障害部位である小脳でも認められたが、血液細胞由来mRNAでは対照群との差異を認めず、バイオマーカーとしての確立には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSの治療が困難な理由として、その病態機序が不明なこと、早期診断が困難なこと、がんにおける腫瘍マーカーのようなバイオマーカーが確立していないことがあげられる。本研究で解析した、TDP-43 mRNA の特異な選択的スプライシングパターンは、ALSの病態機序解明やバイオマーカーの確立に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We carried out TDP-43 mRNA alternative splicing (AS) analysis to elucidate the pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). TDP-43 is a major component of inclusion body in ALS and is a key molecule of this disease. We found a unique TDP-43 mRNA AS pattern in neural tissue from ALS autopsied cases. Furthermore, the protein derived from the AS mRNA showed easy aggregation property. The same AS pattern was also found in the cerebellum, which is a non-injured tissue of ALS, but no difference was found in the blood cell mRNA from the control group, and it was not established as a biomarker.

研究分野：医歯薬学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 選択的スプライシング バイオマーカー

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。

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: Amyotrophic lateral sclerosis) は代表的な運動神経変性疾患である。根本的な治療は未確立で、多くの症例は5年前後で不幸な転機をたどる。特に1) 病態機序が不明である事、2) 早期診断が困難である事が疾患の克服を困難としている。TDP-43 蛋白をはじめとする RNA 代謝関連蛋白質を key molecule とする病態機序研究や、早期診断のためのバイオマーカー研究もそれぞれ進められているが、実用化には至っていない。

ALS では TDP-43 の生理的機能低下が病態に寄与すると推察されている。申請者らは、ALS 罹患組織における TDP-43 の機能低下の一例として、核内小体 GEM 数の減少と、機能的 RNA、U snRNA の発現低下を報告した (Ishihara T. et al. Hum mol Genet, 2013)。また申請者らは TDP-43 自身の C 末端側の選択的スプライシング (alternative splicing: AS) に注目し報告を行った (Koyama A. et al. Nucleic Acids Research 2016)。さらに TDP-43 は AS により C 末側アミノ酸の異なる複数種類の variant TDP-43 蛋白質 (vTDP-43) が存在することを見出している。

また ALS の最終的な診断は罹患組織の病理診断にて確定されるが、生前の運動神経組織生検は不可能である。一方で ALS 症例皮膚線維芽細胞由来の分化細胞が疾患特性を示す報告 (Meyer, K. et al. PNAS, 2014) がある。この事実は孤発性の ALS においても、非罹患組織をバイオマーカーとして用いる可能性を示し、早期診断、早期治療に大きく寄与しうるものである。

## 2. 研究の目的

(1) 特異的 AS 由来の vTDP-43 蛋白質が、より高い凝集性を有し、TDP-43 陽性封入体の形成開始に寄与するという仮説 (vTDP-43 封入体形成仮説) の検証: AS により生じる複数種類の variant TDP-43 蛋白質 (vTDP-43) はげっ歯類においても報告され、一部は培養細胞実験にて凝集性を持つ (Simon D. et al. RNA, 2015)。実際の ALS 罹患組織における vTDP-43 の量的変化やその凝集性を評価し、病原性について明らかにする。

(2) TDP-43 AS mRNA, vTDP-43 蛋白質を用いた診断バイオマーカーの確立: 本研究計画において、挑戦的な課題として ALS 非罹患部位で TDP-43 mRNA AS の変化を検討する。もし肝臓、筋肉、血液などのアクセス可能な諸臓器で、ALS 症例特有の変化が確認されれば、これをバイオマーカーとしての ALS 診断目的の生検も想定される。

## 3. 研究の方法

(1) 剖検組織での TDP-43 mRNA の選択的スプライシング (AS) 多様性の確認と定量:

ALS 罹患患者/対照疾患剖検例由来の脊髄由来 mRNA (n=10) を用い、TDP-43 各 AS のクローニングを行った。RNA 抽出には mirVana miRNA isolation kit (Applied Biosystems) を、cDNA 合成には SuperScript® VILOTM cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を使用した。予備的実験にて両群間で発現量に差異が見られた TDP-43 AS について digital droplet PCR (QX200, Bio-Rad) を用いて定量 PCR (Taqman probe) を実施した。同様の手法で非神経組織を含む複数の

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

領域, 大脳皮質, 視床, 筋肉, 肝臓で TDP-43 mRNA AS の発現解析を行った。

(2) 組織中での TDP-43 mRNA AS に関する因子の解析:

AS に影響を与える因子として mRNA 側の塩基配列 (cis 因子) と splicing 調節関連蛋白質, 機能性 RNA など (trans 因子) がある。このうち Trans 因子として想定される, SNRNP4, SNRNP48, ZRSR2, PDCD7 などの splicing 関連蛋白 mRNA の発現量を定量 PCR 法で解析を行い, 各臓器での TDP-43 mRNA AS との関連性を検討した。

(3) AS mRNA 由来の vTDP-43 蛋白の生化学的解析:

ALS で特異的な変化を呈する TDP-43 AS mRNA 由来の vTDP-43 蛋白質の生化学的解析を行った。vTDP-43 発現プラスミド (pcDNA DEST40) を作成し, HEK293T 細胞に強制発現させ, 72 時間後に回収した。ALS 症例, 対照群のパラフィン固定腰髄組織で vTDP-43 蛋白質を対象とし免疫染色を行った。特異的染色のため, 対象の vTDP-43 蛋白 C 末端を認識部位とする特異抗体を, 外部委託で作成した。観察は LSM 710 NLO laser-scanning 共焦点顕微鏡を用いた。

(4) リキッドバイオプシー検体由来の AS TDP-43 mRNA の解析:

本研究所関連病院に入院中で研究に同意の得られた ALS 症例, および対照群として採血を行い, Paxgene 社 Blood RNA, 同 DNA kit を用いて, 血液からの RNA, DNA 抽出を行った。剖検組織での検討と同様の手法で AS TDP-43 mRNA の定量を行った。

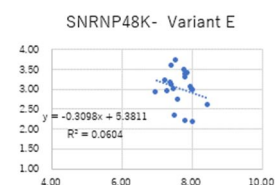
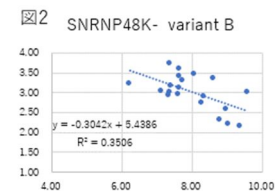
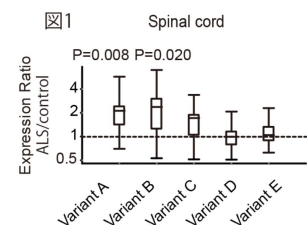
#### 4. 研究成果

(1) 剖検組織での TDP-43 mRNA の選択的スプライシング (AS) 多様性の確認と定量:

ALS 罹患患者および対象疾患剖検脊髄 (n=10) より mRNA を抽出した。TDP-43 C 末端側の AS の解析で, ALS 群に有意に多く発現する AS パターンが存在することを見出し, TA クローニングで, 特異的 AS 配列を確認した。次いで各 AS 配列を特異的に認識する定量 PCR primer, probe を作成し, digital droplet PCR 法にて TDP-43 AS mRNA 定量を実施した。その結果, ALS 脊髄では対照群と比較して, 複数の TDP-43 AS mRNA 発現が, 統計学的に有意に増加していることを見出した (図 1)。

(2) 組織中での TDP-43 mRNA AS に関する因子の解析:

Splicing site の認識に関わる spliceosome 関連蛋白 mRNA の解析を行った。Rabin らの検討 (Hum Mol Genet, 2010) では,

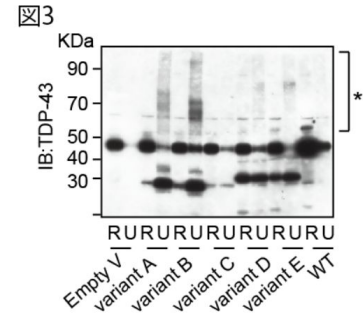


様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

spliceosome 関連蛋白のうち SNRNP48K の低下が示されている。我々は、SNRNP48K に加え、spliceosome 関連蛋白の SNRPA、ZRSR2、SNRNP 59K mRNA の発現量を定量 PCR 法にて確認した。その結果、SNRNP48K の発現量が ALS で増加の見られる特定の TDP-AS (variant A,B) の変化に相関していることを見いだした。

(3) AS mRNA 由来の C 末端変異型 TDP-43 (vTDP-43) 蛋白の生化学的解析：

回収した vTDP-43 発現細胞から、RIPA、Urea buffer 可溶性分画をそれぞれ回収し、TDP-43 N-末抗体を一次抗体としてウエスタンブロットを行った。野生型 TDP-43 発現細胞と比較して、vTDP-43 発現細胞では有意に Urea 分画で多く発現蛋白質が検出された (図 3、\*)。また免疫染色では、vTDP-43 発現細胞での凝集体形成が確認された。この結果から、vTDP-43 蛋白の不溶性、凝集性が確認された。さらに vTDP-43 特異的抗体を用いた、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 症例腰髄組織の免疫染色では、一部の残存運動神経細胞に vTDP-43 特異的抗体で認識される封入体を確認し得た。これらの結果より、vTDP-43 蛋白質が ALS 病態に関与している事が示唆された。



(4) リキッドバイオプシー検体由来の AS TDP-43 mRNA の解析：

我々は複数の ALS 症例 20 例および健常例 10 例より血液検体を採取し、血液細胞由来の mRNA を回収し、TDP-43 AS パターンを確認したが、罹患組織である脊髄、大脳運動皮質で見出された ALS 特異的な AS パターンは見出されなかった。最も容易に採取可能な検体である血液を用いてのバイオマーカーとしての確立には至らなかったが、早期診断法の確立に向けて、検体の種類、対象とする mRNA の選定など、今後も検討を続ける必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Okii Ryosuke, Izumi Yuishin, Nodera Hiroyuki, Ishihara Tomohiko, Kaji Ryuji, JETALS et al.  | 4. 巻<br>7                     |
| 2. 論文標題<br>The Japanese Early-Stage Trial of High-Dose Methylcobalamin for Amyotrophic Lateral Sclerosis (JETALS): Protocol for a Randomized Controlled Trial | 5. 発行年<br>2018年               |
| 3. 雑誌名<br>JMIR Research Protocols   | 6. 最初と最後の頁<br>e12046 ~ e12046 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2196/12046   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Sugai Akihiro, Kato Taisuke, Koyama Akihide, Koike Yuka, Kasahara Sou, Konno Takuya, Ishihara Tomohiko, Onodera Osamu   | 4. 巻<br>12        |
| 2. 論文標題<br>Robustness and Vulnerability of the Autoregulatory System That Maintains Nuclear TDP-43 Levels: A Trade-off Hypothesis for ALS Pathology Based on in Silico Data | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Neuroscience   | 6. 最初と最後の頁<br>0,0 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fnins.2018.00028  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tomohiko Ishihara   |
| 2. 発表標題<br>The SMN2 gene copy number states can affect the onset risk and survival time in Japanese ALS. |
| 3. 学会等名<br>PACTALS 2018 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tomohiko Ishihara   |
| 2. 発表標題<br>Efficacy evaluation of nusinersen in an adult spinal muscular atrophy case using peripheral blood mRNA. |
| 3. 学会等名<br>29th international symposium on ALS/MND, (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ishihara T  |
| 2. 発表標題<br>The SMN2 gene copy number states can affect the onset risk and survival time in Japanese ALS. |
| 3. 学会等名<br>XX World Congress of Neurology. (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Ishihara T  |
| 2. 発表標題<br>The SMN2 gene copy number states can affect the onset risk and survival time in Japanese ALS. |
| 3. 学会等名<br>28th international symposium on ALS/MND, (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  |                           |                       |    |