

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：17K09751

研究課題名(和文) TDP-43量制御の脆弱性に着目した、核酸医薬によるALS治療戦略の検証

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for ALS with nucleic acid technology focusing on the vulnerability of TDP-43 autoregulation

研究代表者

須貝 章弘 (Sugai, Akihiro)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：70758903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)では核内タンパク質TDP-43が細胞質内に蓄積する。TDP-43はそのpre-mRNAに結合し、選択的スプライシングを誘発し、発現を自己調節している。本研究では、まず数理モデルを構築し、TDP-43自己調節を支える転写の冗長性がTDP-43病理を促進することを予測した。次に、アンチセンスオリゴを用いてマウス脊髄のTDP-43選択的スプライシングを抑制し、転写の冗長性を顕在化させた結果、不溶性TDP-43の増加と断片化、運動ニューロン数の減少を認めた。これらの結果は、ALSの病態の一部を再現しており、この選択的スプライシングがALSの有望な治療標的となる可能性を示唆した。

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)は、病理学的にTDP-43の凝集と蓄積によって特徴付けられる。しかし、このTDP-43病理がどのように駆動されているのかはほとんど分かっていない。本研究は、TDP-43量調節に潜在する脆弱性に着目し、遺伝子を改変せずに、マウス脊髄において、TDP-43の病態を模倣させた。これにより、TDP-43量調節に潜在する脆弱性が、ALSの治療標的となる可能性を示した。これらの成果は、難病であるALSの治療法の開発に向けた基盤を提供する。

研究成果の概要(英文)：In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the nuclear protein TDP-43 accumulates in the cytoplasm. TDP-43 binds to its pre-mRNA, induces alternative splicing, and autoregulates its expression levels. Here, we first constructed a mathematical model and predicted that transcriptional redundancy that underpins TDP-43 autoregulation could drive TDP-43 pathology. Then, we used an antisense oligo to suppress TDP-43 alternative splicing and manifested transcriptional redundancy. As a result, in the mouse spinal cord, the increase and fragmentation of insoluble TDP-43 and decrease in the number of motor neurons were observed. These results, which recapitulate part of the ALS pathology, suggested that this alternative splicing could be a promising therapeutic target for ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 TDP-43 アンチセンスオリゴ

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) は、運動ニューロンの変性によって特徴づけられる致死的な神経疾患である。ALS は、認知・行動異常を伴うことがあり、前頭側頭型認知症と類縁の疾患である。これらの神経変性疾患は、TDP-43 が断片化し、核から消失し、細胞質内の封入体を形成するという病理学的背景を共有する。この TDP-43 病理所見の拡がりは、これらの疾患の臨床的な進行と一致する。遺伝学的には、TDP-43 をコードする TARDBP 遺伝子の変異が家族性 ALS の 1~5% に存在し、この変異を有する患者は孤発性 ALS 患者と同様の TDP-43 病理を示す。これらの知見は、TDP-43 の異常が ALS/FTD の病態に直接的に関与していることを示唆している。

TDP-43 は、核局在化シグナルおよび核輸出シグナルを介して、核と細胞質の間を移動する核タンパク質である。RNA 認識モチーフを含み、幅広い RNA 代謝プロセスに影響を与える。さらに、C 末にプリオン様ドメインをもち、凝集性を示す一方、ストレス顆粒などの膜なしオルガネラの形成に関与する。TDP-43 ノックアウトは致死的であり、さらに運動ニューロン特異的なノックアウトは年齢依存性な神経変性をもたらす。一方、TDP-43 過剰発現は、発現量依存的に TDP-43 の凝集をもたらし、運動ニューロンを損失させる。すなわち、TDP-43 は細胞の機能維持と生存に必須であるだけでなく、その発現変動は特に運動ニューロンにおいて毒性を示す。

TDP-43 は負のフィードバック機構により発現を自己制御する。TARDBP プレ mRNA の 3' UTR に TDP-43 が結合すると、遠位のポリ A 部位が選択され、次いで、ふたつの選択的スプライシングが連続して誘発される。この選択的スプライシングを受けた RNA はナンセンス媒介崩壊 (NMD) によって分解される。遠位のポリ A 部位の使用にもかかわらず、選択的スプライシングを回避する RNA があるが、これらは核内に滞留し、核内 TDP-43 が正常のときには、細胞質内での翻訳には寄与しない (図 1)。このように、核内 TDP-43 の量は、細胞質内の TARDBP mRNA レベルを厳密に調節し、その機能を維持している (Koyama et al. 2016)。

しかし、厳密に制御されている TDP-43 の発現が、どのような因子により制御不能に陥るのかは明らかではない。また、内因性 TDP-43 の発現が制御不能に至った場合に、運動ニューロンには、どのような影響が起こるのかは分かっていない。これらの問いを解き明かすことは、ALS 病態の根本的な理解につながり得る。

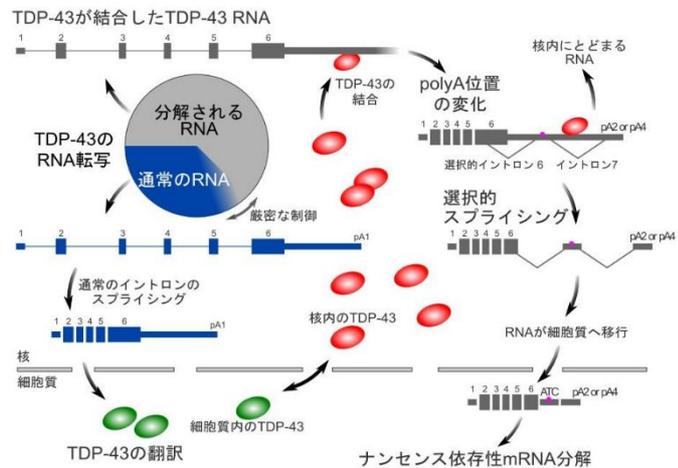


図 1. TDP-43 自己制御機構のモデル

2. 研究の目的

本研究では、TDP-43 発現制御機構がどのような擾乱により脆弱性を示すのかを、TDP-43 細胞内代謝を模した数理モデルを構築することにより予測する。さらに、TDP-43 発現制御機構の中心をなす選択的スプライシングを特異的に操作し、ALS の病態がどこまで再現されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子制御や生化学的ネットワークを描くための構造化ダイアグラムエディタである CellDesigner を用いて、TDP-43 の細胞内動態を模した数理モデルを構築した。実験結果をもとにモデルを設計したうえで、TARDBP ヘテロノックアウトマウスと TDP-43 トランスジェニックマウスの観察データと整合性が保たれるようにパラメータを調整し、最終的にモデルの妥当性を確認した。その後、それぞれのパラメータを変動させたときのシステムの挙動を調べ、どのような変動によりシステムが脆弱性を示すのかを調べた。

TDP-43 選択的スプライシングを特異的に抑制するアンチセンスオリゴの配列をマウス神経芽細胞腫 (Neuro2a) を用いて調べた。このアンチセンスオリゴを成体マウスの髄腔内に腰椎穿刺により注入し、脊髄組織における選択的スプライシング抑制効果を確認し、これによる生化学的、病理学的な変化を調べた。さらに、ヒトに対して同様な選択的スプライシング抑制効果があるアンチセンスオリゴ配列を同定し、ヒト iPS 細胞由来のニューロンにおいて、TDP-43 の細胞内局在を調べた。

4. 研究成果

TDP-43 の細胞内動態を模した数理モデルを解析すると、TDP-43 自己制御は転写の冗長性を伴い、多くの因子の擾乱に対してロバストであった。しかし、特定の因子がある一定期間以上において、ある閾値を超えた変動を示すと、自己制御機構の脆弱性が明らかになった。これらの要因には、TDP-43 の凝集傾向の増加、核細胞質における TDP-43 の輸送障害、異常タンパク質の分解効率の低下な

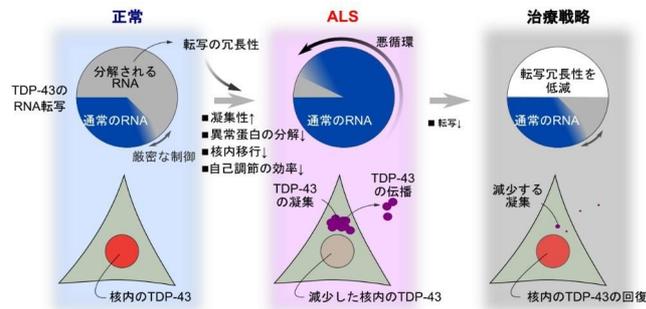


図 2. ALS の TDP-43 病態の仮説とその治療戦略

などが含まれており、これらはすべて家族性 ALS/FTD の原因遺伝子に関連する機能異常であった。この条件下では、TDP-43 病態が加速的に悪化するという負のスパイラルに陥る (図 2)。TDP-43 を制御するシステムは、状況に応じて健常状態と疾患状態の間で双安定性を示しており、このことが TDP-43 病理の病態の根底にある可能性を示した。このとき、疾患状態へ駆動させる転写の冗長性を抑制することは、潜在的な治療戦略となり得ることを予測した (Sugai et al. 2018)。

次に、疾患状態へ駆動させると予測した転写の冗長性が顕在化したときの病的意義を実験的に検証した。アンチセンスオリゴを成体マウスの髄腔内に投与し TDP-43 選択的スプライシングを特異的に阻害した。その結果、脊髄における TDP-43 mRNA 発現は 2 倍以上の増加を示し、TDP-43 タンパク質の不溶性画分の増加と断片化が誘導された。また、アンチセンスオリゴ投与 5 週間後には、脊髄運動ニューロン数の減少を認め (図 3)。ヒト iPS 細胞由来のニューロンにおいても、同様の選択的スプライシングの阻害により、TDP-43 mRNA が増加した一方、核内 TDP-43 は減少した (Sugai et al. 2019)。

以上の結果は、TDP-43 選択的スプライシングの変化が TDP-43 の発現を制御不能に陥れ、この持続により、ALS 病態の一部が再現されることを示した。このことは、逆に、制御不能になった TDP-43 に対しての適切な介入が、ALS 病態を修飾する治療に結びつく可能性を示唆した。

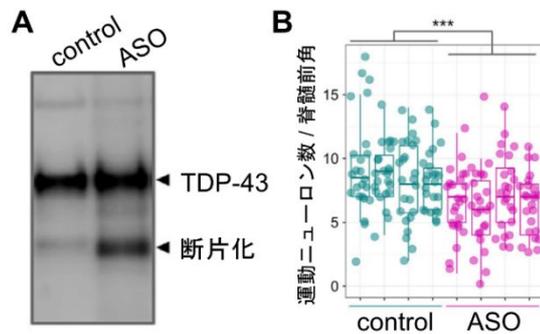


図 3. マウス脊髄の TDP-43 の断片化 (A) 運動ニューロンの減少 (B)

< 引用文献 >

Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. Koyama A, [Sugai A \(co-first author\)](#), Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. *Nucleic acids research* 44(12) 5820-36, 2016

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. [Sugai A \(corresponding author\)](#), Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Konno T, Ishihara T, Onodera O. *Frontiers in neuroscience* 12:28, 2018

Non-genetically modified models exhibit TARDBP mRNA increase due to perturbed TDP-43 autoregulation. [Sugai A](#), Kato T, Koyama A, Koike Y, Konno T, Ishihara T, Onodera O. *Neurobiology of disease* 130:10453, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 2件）

1. 著者名 Sugai Akihiro, Kato Taisuke, Koyama Akihide, Koike Yuka, Kasahara Sou, Konno Takuya, Ishihara Tomohiko, Onodera Osamu	4. 巻 12
2. 論文標題 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 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/FNINS.2018.00028	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 Sugai Akihiro, Kato Taisuke, Koyama Akihide, Koike Yuka, Konno Takuya, Ishihara Tomohiko, Onodera Osamu	4. 巻 130
2. 論文標題 Non-genetically modified models exhibit TARDBP mRNA increase due to perturbed TDP-43 autoregulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104534 ~ 104534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2019.104534	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 Kasahara Sou, Ishihara Tomohiko, Koike Yuka, Sugai Akihiro, Onodera Osamu	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular mechanism of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from the viewpoint of the formation and degeneration of transactive response DNA-binding protein 43?kDa (TDP-43) inclusions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Shinkeigaku	6. 最初と最後の頁 109 ~ 116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5692/clinicalneuroi.cn-001362	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 坪口 晋太郎、石原 智彦、須貝 章弘、横関 明男、小野寺 理	4. 巻 71
2. 論文標題 増大特集 ALS2019 TDP-43封入体から解くALSの分子病態	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 1183 ~ 1189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1416201428	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 小池 佑佳、須貝 章弘、小野寺 理	4. 巻 50
2. 論文標題 脳タンパク質とその標的RNAの均衡と破綻	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 303 ~ 306
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Akihiro Sugai, Takuya Konno, Akihide Koyama, Osamu Onodera
2. 発表標題 TARDBP pre-mRNA with a mutation causes disturbance of TDP-43 autoregulation via altered interaction with ALS-related splicing factors
3. 学会等名 29th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Sugai, Takuya Konno, Akihide Koyama, Osamu Onodera
2. 発表標題 TARDBP mutations and ALS-related splicing factors that cause disturbances in TDP-43 autoregulation
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 Akihiro Sugai, Genri Tohyama, Taisuke Kato, Tomohiko Ishihara, Osamu Onodera
2. 発表標題 A non-genetically modified iPSC-derived neuron model with an increased expression of intrinsic TDP-43
3. 学会等名 Gordon Research Conferences 2017 Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) & Related Motor Neuron Diseases (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Tomohiko Ishihara, Osamu Onodera
2. 発表標題 A non-genetically modified human neuronal model of ALS with an increased expression of intrinsic 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 須貝 章弘, 廣川 祥子, 小山 哲秀, 今野 卓哉, 小野寺 理
2. 発表標題 ALS原因遺伝子TDP-43の点変異によるアレル特異的遺伝子発現の変化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須貝 章弘
2. 発表標題 ALS病態モデルとその応用展開
3. 学会等名 第47回新潟神経学夏期セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017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
研究 分担者	石原 智彦 (Ishihara Tomohiko) (70612232)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	