

令和元年6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14956

研究課題名(和文) ALSにおけるポリグルタミン凝集体結合タンパク質DDX-17異常蓄積の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of abnormal accumulation of DDX17 in motor neuron of ALS

研究代表者

多田 美紀子 (Tada, Mikiko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30722467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々がポリグルタミン凝集体結合蛋白質(PAIP)として同定したタンパク質はALS/FTLDの病因タンパク質でもあることが次々と判明している。そこで未発表PAIPのうちDEAD box RNAヘリカーゼであるDDX17に着目しALS病態への関与について検討した。孤発性ALS剖検例を抗DDX17抗体で免疫組織学的に評価し腰髄前角細胞の細胞質にDDX17が微細顆粒状に凝集することを見出した。さらにこの顆粒状凝集は小胞体マーカーGRP78、PDIと共局在していることを示した。以上よりDDX17は孤発性ALSにおいて運動ニューロン内で小胞体に蓄積することでALSの病態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

DDX17はRNA代謝においてリボソームRNA生成、スプライシング、転写といった重要なポイントに関与するとされている。一方ALSはその病因としてRNA代謝異常が注目されており、DDX17が孤発性ALSの病態に関連しているのではないかと仮説をたて研究を行った。検索を行ったALS全症例で脊髄前角細胞の細胞質に微細顆粒状の蓄積が観察された。またDDX17の細胞質への微細顆粒状蓄積は小胞体マーカーと共局在を確認できた。本研究の結果はDDX17が孤発性ALSの小胞体に蓄積することでALSの病態に関与している可能性を示し、ALSにおける神経細胞障害の新たな機序を解明するきっかけとなりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Growing evidences revealed that many common molecules exist in polyglutamine aggregate-interacting proteins (PAIPs) and pathological proteins of ALS. In this study, we focused on DDX17, which was previously identified as a PAIP (unpublished data). DDX17 is described as functioning in transcription, splicing and ribosomal RNA biogenesis. We hypothesized that DDX17 is implicated in pathomechanism of sporadic ALS (SALS). Therefore, we evaluated the subcellular distribution of DDX17 in SALS. As the result of immunohistochemistry using anti-DDX17 antibody, motor neuron of SALS cases showed diffuse immunoreactivity in cytoplasm and no immunoreactivity in nucleus as those in control cases. Additionally, small granules are also observed in the cytoplasm of motor neurons of SALS cases. Interestingly, these granules were co-localized with endoplasmic reticulum (ER) marker GRP78 or PDI. Our results indicated that DDX17 was accumulated in ER in SALS and were possibly involved in SALS pathogenesis.

研究分野：神経病理学

キーワード：ALS DDX17 RNA代謝異常 SALS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々がポリグルタミン凝集体結合蛋白質 (PAIP) として同定してきた FUS/TLS、EWS、TAF15、ubiquilin2、matrin3 は、PAIP としての重要性に留まらず、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) / 前頭側頭葉変性症 (FTLD) の責任遺伝子がコードするタンパク質であることが次々と判明している。このことは PAIP 解析が、種々の神経変性疾患関連タンパク質の同定にも繋がる優れた方法であることを示している。

そこで我々は未発表 PAIP のうち DDX17 に着目した。DDX17 は DEAD box RNA helicase の一つで、そのパラログである DDX5 とともに転写から翻訳まで遺伝子発現過程のほとんどのステップに関与する (Linder, *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011) とされ、特に細胞分化における選択的スプライシングにおいて重要な役割を担っていること (Dardenne, *et al.*, *Cell Rep*, 2014)、マイクロ RNA (miRNA) 生合成に関わっていることが近年注目されている。

さらに我々はすでに孤発性 ALS の運動ニューロンにおいて DDX17 が細胞質に異常に凝集するという事実をつきとめている。そこで DDX17 が ALS の病態にどのように関与しているのかについて、病理学的側面、分子細胞生物学的側面、遺伝学的側面から検討を行い、ALS における新たな病態進展パスウェイを明らかにすることを目指し研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では孤発性 ALS の剖検例を用いて詳細な免疫組織学的解析を行うことで、孤発性 ALS における DDX17 凝集の局在、特徴、重要性を明らかにする。また培養細胞 (Neuro2a 細胞) において、DDX17 が孤発性 ALS の病因タンパク質である TDP-43 の凝集に与える影響を蛍光顕微鏡で観察・定量し、凝集の相互関係を検討する。

3. 研究の方法

孤発性 ALS の剖検例 13 例とコントロール症例 6 例について抗 DDX17 抗体 (rabbit polyclonal, dilution 1:500, PA5-26330, Thermo Fisher) を用いて免疫組織学的評価を行った。その他、ALS の代表的病理所見との比較のため抗 TDP-43 (full length) 抗体 (mouse monoclonal, dilution 1:1000, 60019-2-Ig, proteintech)、小胞体マーカーとして抗 PDI 抗体 (mouse monoclonal, dilution 1:500, ADI-SPA-891 Enzo)、抗 GRP78 抗体 (mouse monoclonal, dilution 1:500, 610978, BD Biosciences) を用いた。

次に Neuro2A 細胞にそれぞれ DDX17、そのパラログである DDX5 と野生型または変異型 (A315T/A382T) TDP-43 を過剰発現させ、細胞内局在を解析した。

4. 研究成果

(1) 腰髄前角運動ニューロンにおける抗 DDX17 抗体の免疫組織学的評価

コントロール例では核に染色性はなく細胞質に淡くびまん性に染色性を認めた。孤発性 ALS ではコントロールと同様に核に染色性がみられなかったが、細胞質にはびまん性染色性に加えて微細な顆粒状の凝集を複数認めた (図 1)。この DDX17 の微細顆粒状の細胞質への蓄積は検索を行った ALS 全 13 例で観察された。次に微細顆粒状の蓄積が形態的に小胞体と類似していたため、小胞体マーカーである PDI、GRP78 の抗体を用いて DDX17 との蛍光二重染色を行なった。その結果、ALS 症例では DDX17 陽性の細胞質内凝集に小胞体マーカーの共局在が認められた (図 2)。一方で孤発性 ALS の代表的な病理学的指標である TDP-43 陽性の細胞質内封入体には DDX17 は共局在を認めなかった (図 3)。以上のデータは DDX17 が孤発性 ALS において TDP-43 とは異なり、小胞体に蓄積することで ALS の病態に関与している可能性を示す重要な証拠となると考えられた。

(2) TDP-43 を過剰発現させた培養細胞における DDX17 の細胞内局在

DDX17 と TDP-43 (WT、A315T、A382T) の共トランスフェクションではいずれの細胞においても DDX17 は細胞質内に存在した。一方 DDX5 の過剰発現系では、変異型 TDP-43 を発現させた細胞で TDP-43 とともに DDX5 も核から細胞質へ局在が変化していることが観察され (図 2a)、核細胞質輸送障害が示唆された。

以上剖検例の病理学的検討より DDX17 は孤発性 ALS の病態に関与している可能性が示されたが、

培養細胞実験ではパラログである DDX5 に変異型 TDP-43 発現細胞での局在異常がみられた。また同じ DEAD box RNA helicase の一つである DDX58 は TDP-43 変異トランスジェニックマウスモデルの脊髄運動ニューロンで発現の異なる遺伝子として見出されているが、興味深いことに ALS 患者の脊髄前角運動ニューロンで、我々が確認した細胞質内 DDX17 凝集体に類似した微細顆粒状の構造物を形成していることが確認されている (MacNair, *et al.*, *Brain* 2016)。今後はさらに分子細胞生物学的側面、遺伝学的側面から DDX17 および DDX5 の ALS 病態への関与を明らかにし、ALS における新たな病態進展パスウェイを明らかにすることを目指していく。

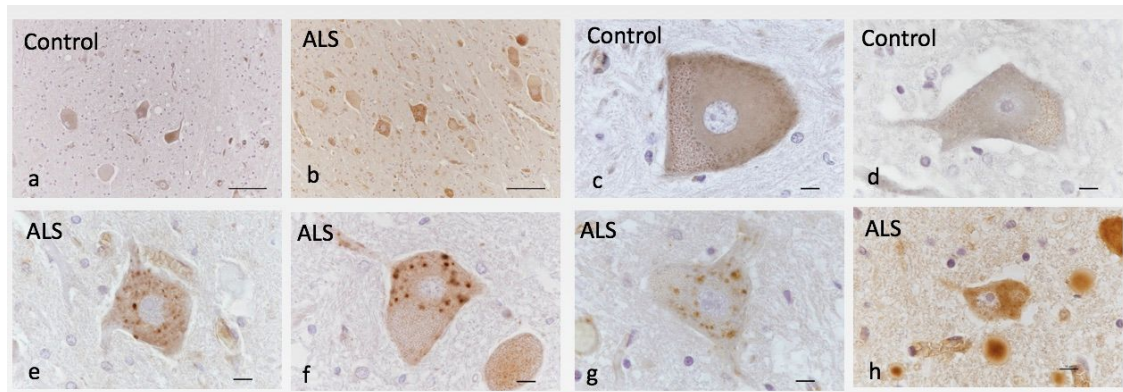


図 1. 運動ニューロンにおける DDX17 の代表的所見

a. コントロール例の前角 b. ALS 例の前角

cd. コントロール例の運動ニューロンは細胞質がびまん性に淡く染色され、核に染色性はない

e-h. ALS 例の運動ニューロンでは細胞質のびまん性染色性に加え微細顆粒状の凝集を認める

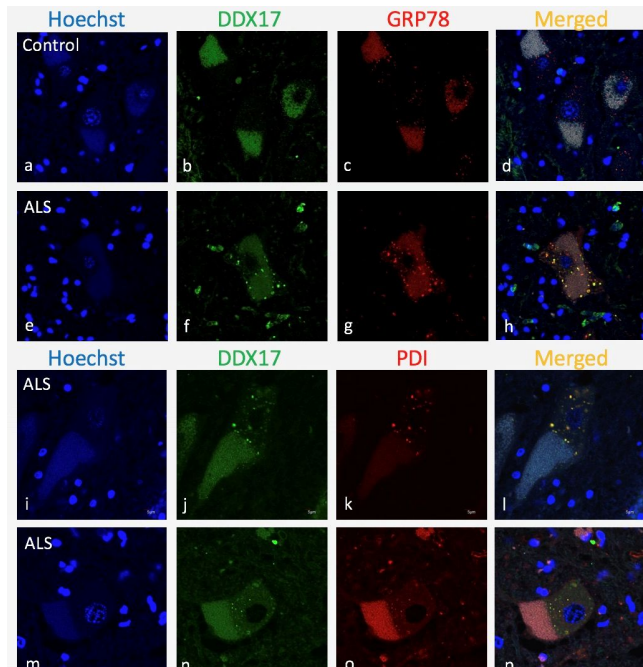


図 2. コントロール例、ALS 例の前角運動ニューロンにおける DDX17 と小胞体マーカーの蛍光免疫染色

a-d. コントロール症例では GRP78 (赤) でのみ細胞質に顆粒状の構造がみられる

e-h, i-l, m-p: ALS 症例では DDX17 (緑) と GRP78 (赤) または PDI (赤) で細胞質に微細顆粒状の共局在を認める

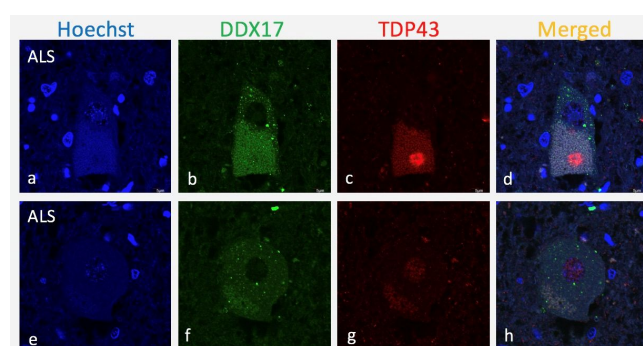


図 3. ALS 例の前角運動ニューロンにおける DDX17 と TDP-43 (full length) の蛍光免疫染色
a-d. TDP-43 (赤) 陽性細胞質内封入体 (round inclusion) と DDX17 (緑) 陽性凝集体は共局在していない

e-h. TDP-43 が核内に存在する細胞においても DDX17 陽性の細胞質凝集体がみられる

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tada M, Doi H, Koyano S, Kubota S, Fukai R, Hashiguchi S, Hayashi N, Kawamoto Y, Kunii M, Tanaka K, Takahashi K, Ogawa Y, Iwata R, Yamanaka S, Takeuchi H and Tanaka F, Matr3 is a component of neuronal cytoplasmic inclusions of motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, Am J Pathol. 査読有, 188(2), 2018, 508-514

〔学会発表〕(計 1 件)

Tada M et al., DDX17 accumulates in endoplasmic reticulum of motor neurons in sporadic ALS, 第 60 回日本神経学会学術大会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田中 章景

ローマ字氏名：Fumiaki Tanaka

研究協力者氏名：土井 宏

ローマ字氏名：Hiroshi Doi

研究協力者氏名：竹内 英之

ローマ字氏名：Hideyuki Takeuchi

研究協力者氏名：児矢野 繁

ローマ字氏名：Shigeru Koyano

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。