

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02740

研究課題名(和文) TBK1遺伝子ネットワークから解明するALSの分子病態とその制御

研究課題名(英文) Elucidating molecular pathology of ALS through TBK1 gene network

研究代表者

山中 宏二 (Yamanaka, Koji)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80446533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ALSの原因遺伝子として同定されたTBK1について機能解析を行った。TBK1は、神経炎症、タンパク質代謝において2面的な役割を持つことが示唆されている。運動神経変性におけるTBK1の役割を明らかにするため、ALSモデルマウスや神経損傷モデルにおいてTBK1二重欠失モデル(TBK1-DKO)を作成して機能解析を行った。TBK1-DKOでは、ALSや神経損傷モデルにおいて神経炎症の軽減傾向を認めた。また、ミトコンドリア・小胞体接触部(MAM)において、TBK1が活性化されることや、タンパク質恒常性ストレス応答においてMAMに局在する活性型TBK1が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、運動神経を傷害する指定難病である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子として同定されたTBK1について機能解析を行った。免疫系の分子として知られていたTBK1が、ALSの神経変性にどのように関与するかは不明であった。本研究を通じて、TBK1が神経炎症の調節およびタンパク質のストレス応答に寄与することや、ALSモデルマウスにおいてTBK1活性が低下していることを見出した。将来的にTBK1の活性調節を標的としたALSの治療法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we performed functional analyses of TBK1, which has been identified as a causative gene of ALS. TBK1 has been suggested to possess a dual role in neuroinflammation and protein metabolism. To clarify the role of TBK1 in motor neurodegeneration, we generated a TBK1 double deletion model (TBK1-DKO) in mouse models of ALS and nerve injury, and performed functional analysis of TBK1-DKO. We also investigated the role of TBK1 in proteostasis. We found that TBK1 is activated in the mitochondria-associated membrane (MAM) and that the active form of TBK1 localized in the MAM is involved in the protein homeostatic stress response.

研究分野：病態神経科学

キーワード：神経変性疾患 筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の病態研究では、変性する神経細胞の分子病態に着眼した研究が主流であり、神経周囲に存在する支持細胞であるグリア細胞の病的変化は脇役であると考えられてきた。しかし、運動神経の神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis)における代表者を含む一連の研究を通じて、神経細胞だけでなく、周囲のグリア細胞も病態に積極的に関与することが判明し、「非自律性の神経変性機序」として認識されている。したがって、神経細胞などの単一の細胞種のみに着目するのではなく、神経系における細胞間ネットワークの破綻という観点での病態解明の重要性が近年認識されるようになった。

ALSの大半は孤発性に発症し、約10%が遺伝性である。ところが、近年の大規模エクソーム解析により、孤発性ALSの約10-20%において原因遺伝子変異が認められ、その解析によりTBK1 (TANK-binding kinase 1) が新規原因遺伝子として同定された (Cirulli, Science, 2015; Freischmidt, Nat Neurosci, 2015)。TBK1は、免疫系のシグナル制御分子である non-canonical IKK (I κ B)キナーゼに属し、type I interferon (IFN)や炎症性サイトカインの産生を制御する分子として知られている。また、TBK1は、自然免疫経路を担う Toll 様受容体の必須アダプター分子 TRIF の下流に位置し、IFNシグナルやNF κ B経路を制御している。さらに興味深いことに、TBK1はオートファジーにも重要な役割を担っていることが最近報告された。TBK1は、遺伝性ALSの原因遺伝子であり、かつオートファジー受容体としても知られるオプチニューリン(OPTN)と共局在し、OPTNやp62をリン酸化することが報告されている(Korac, J Cell Sci, 2013)。したがって、TBK1はALSにおける重要な病態パスウェイである、オートファジーと神経炎症の双方に関与しうると考えられる。

2. 研究の目的

これまでの報告からALSおよび疾患スペクトラムを共有するFTD(前頭側頭型認知症)におけるTBK1のヘテロ変異は、ナンセンス変異やフレームシフト、OPTN結合ドメインに異常を来すミスセンス変異が目立つことから、ハプロ不全による Loss of function の病態機序が強く想定される。しかし、神経科学領域ではこれまで注目されてこなかったことから、TBK1に関する神経病態機序の解析やモデル動物に関する報告はほとんどない。また、本変異が孤発性ALS患者から発見されたことからTDP-43病態を呈することが想定され、TBK1異常によるALSの発症機構の解明は、孤発性ALSの病態解明にも寄与すると考えられる。

そこで本研究課題では、TBK1異常を再現するモデルマウスの作成と解析を通じて、神経炎症、タンパク質分解系異常の双方の観点から、さらに複数の細胞群に注目してTBK1異常による神経変性メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本分子解析の第一歩として、神経組織におけるTBK1の発現分布およびALSモデルマウスにおける発現変化等についても検証を行う。TBK1ノックアウトマウス(TBK1-KO)は胎生致死である(Hemmi, J Exp Med, 2004)が、TBK1/TNFのダブルノックアウトマウス(DKO)は生存可能であるということが文献情報から示唆されている。TBK1/TNF-DKOの若年マウスにおける免疫学的側面はよく研究されているが、加齢による神経変性や神経炎症に関しては全く解析されていない。そこで、TBK1/TNF-DKOを作成し、加齢による運動系表現型(体重、rotarod、握力等)、組織学的解析による運動、グリア細胞の変化を検討して、神経変性疾患モデル動物としての妥当性を検証する。さらに、SOD1-ALSマウスとの交配試験や、坐骨神経損傷モデルに対する脆弱性についても解析する。

プロテオスタシスの面からは、代表者の独自の知見である、MAM(ミトコンドリア・小胞体接触部)のALSにおける関与という観点から解析を行う。代表者は、若年性ALSの原因遺伝子産物Sigma1RがMAMに存在し、その欠失あるいはALS病因タンパク質の蓄積によりMAMが崩壊することがALSに広く共通する病態メカニズムであることを報告してきた(Watanabe et al. EMBO Mol Med, 2016)。TBK1がMAMと関連することを予備的検討で見出しており、MAM異常の観点から、SOD1-ALSマウスやSigma1R-KOマウスを用いて病態メカニズム解析を行う。

4. 研究成果

(1) TBK1の中樞神経系における発現

まず、TBK1ノックアウトマウスの作成を行った。TBK1の欠失は胎生致死であるが、TBK1/TNF二重欠失マウス(TBK1-DKO)を作成すると、成体まで生存しうることを確認できた。脳・脊髄

における TBK1 の発現様式を免疫組織化学により検討した。野生型マウスにおいて、TBK1 は脊髄運動神経およびオリゴデンドロサイトをはじめとするグリア細胞に発現していた。

(2) TBK1-DKO マウスの解析

TBK1-DKO マウスは正常に出生し、約 20 ヶ月齢まで観察を行ったが、野生型マウスと比較して有意な運動機能低下を認めなかった。そのため、2 ヶ月齢において片側坐骨神経軸索損傷モデルを作成し、ストレス応答の変化を検討した。片側坐骨神経損傷を誘導したところ、ミクログリア活性化、運動神経における ATF 3 の上昇を認めた。DKO および TNF-KO(TKO)マウスにおいて同様に損傷モデルを作成して脊髄における炎症関連分子の発現について qPCR 法により比較検討を行った。Mac2, Cxcl10, Ccl2 等の発現は DKO, TKO において低下しており、これらのマウスでは神経損傷に対する神経炎症反応が軽減されることが判明した。また、損傷モデルにおける運動機能評価として汎用される Sciatic Functional Index (SFI) を用いて評価した。坐骨神経損傷モデルにおける SFI はこれらの分子の欠失により改善傾向を示した。したがって、TBK1 は運動神経損傷モデルにおける炎症調節に一定の役割を果たすことが示された。

次に、ALS モデルとして汎用されている SOD1-G93A マウスとの交配実験を行い、SOD1-ALS モデルにおける TBK1 の役割を検証した。先行研究では、TBK1 の部分欠失により発症が早く、生存期間が延長傾向であった (Brenner, 2019; Gerbino, 2019)。SOD1G93A-TKO, SOD1G93A-DKO を作成して生存解析を行った。SOD1-DKO の発症時期は SOD1-TKO と比較して約 15 日早期化した。一方で両群の生存期間に有意な差を認めなかった。したがって、TBK1 欠失は、発症時期の早期化と疾患進行の遅延効果を示すことが考えられた。3 重交配実験のため、解析に必要な個体数を得るために相当数の交配が必要である。今後、個体数を増やして、生存解析データ、組織解析や遺伝子発現データの解析を完了する計画である。

(3) MAM に着目した神経変性メカニズム解析

代表者は、これまでに若年性 ALS の原因遺伝子産物 Sigma1R が MAM に存在し、その欠失あるいは ALS 病因タンパク質の蓄積により MAM が崩壊することが ALS に広く共通する病態メカニズムであることを報告してきた (Watanabe et al., 2016)。まず、培養細胞における MAM の定量評価系を樹立した。分割 GFP, 分割 Luciferase を応用した MAM-Green, MAM-Luc をそれぞれ作成して、Neuro2a 細胞に恒常的に発現する実験系を構築した。特に MAM-Luc は定量性に優れていることから、このレポーターを用いて、ALS の原因遺伝子 (疾患変異体) 約 20 種類を発現させて、MAM の変化を網羅的に定量解析した。多くの遺伝子では、MAM の発現が低下したことから、遺伝性 ALS において MAM の崩壊は広く共通する現象であることを見出した (Sakai, et al. FASEB J, 2021)。一方で、TBK1 の発現により MAM の増加が認められることが判明したことから、TBK1 と MAM の関係について解析を進めた。前述の通り、TBK1 はオートファジー等の proteostasis に関与することが知られている。MAM には多くの機能が知られているが、その一つにオートファジー隔離膜の形成への関与が報告されている (Vance, *Biochim Biophys Acta*, 2014)。まず、MAM に局在する ALS 原因遺伝子産物 Sigma1R との関係について解析した。Sigma1R-KO マウス (Watanabe et al. 2016) における TBK1 の挙動を検討したところ、神経系において TBK1 は Sigma1R 依存性に活性化されることが判明した。Sigma1R 欠失モデルにおいて MAM を損傷させると TBK1 の活性化は消失した。また、前述の SOD1 変異マウス (SOD1-G93A, SOD1-G85R) の脊髄病巣において、免疫蛍光染色による検討で TBK1 の活性化は低下していることが判明した。細胞内局在を生化学的分画法によって検討したところ、活性型 TBK1 は MAM および細胞質に局在することが判明した。MAM における TBK1 活性化の意義を明らかにするため、TBK1 活性化を再現する細胞モデルを構築した。ヒ素処理によるタンパク質の恒常性ストレスを負荷した場合に、MAM にユビキチン化タンパク質の蓄積、活性型 TBK1 がリクルートされることが判明した。現在そのメカニズムの詳細について解析し、原著論文として投稿している (Watanabe et al. submitted)。

(4) 結語

元々免疫系の分子として同定・解析されてきた TBK1 は、神経系において多様な役割を果たすことが判明した。神経炎症との関連では、運動神経損傷モデル、遺伝性 ALS モデルマウスを用いた解析により、炎症を調節する役割が示唆された。一方、運動神経におけるタンパク質代謝の観点から、TBK1 は、MAM において、タンパク質のストレス応答に寄与する可能性が考えられた。TBK1 変異による ALS では、Loss of function の機序が想定されている。したがって、TBK1 の活性を維持することが神経炎症、タンパク質ストレス応答の観点から、神経保護に寄与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Watanabe Seiji, Inami Hidekazu, Oiwa Kotaro, Murata Yuri, Sakai Shohei, Komine Okiru, Sobue Akira, Iguchi Yohei, Katsuno Masahisa, Yamanaka Koji	4. 巻 11
2. 論文標題 Aggresome formation and liquid-liquid phase separation independently induce cytoplasmic aggregation of TAR DNA-binding protein 43	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-03116-2	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 Ampornndanai Kangsa, Rogers Michael, Watanabe Seiji, Yamanaka Koji, O'Neill Paul M., Hasnain S. Samar	4. 巻 59
2. 論文標題 Novel Selenium-based compounds with therapeutic potential for SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eBioMedicine	6. 最初と最後の頁 102980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2020.102980	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 該当する
1. 著者名 Nishino Kohei, Watanabe Seiji, Shijie Jin, Murata Yuri, Oiwa Kotaro, Komine Okiru, Endo Fumito, Tsuiji Hitomi, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Mishra Amit, Yamanaka Koji	4. 巻 7
2. 論文標題 Mice deficient in the C-terminal domain of TAR DNA-binding protein 43 develop age-dependent motor dysfunction associated with impaired Notch1-Akt signaling pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-019-0776-5	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 該当する
1. 著者名 Watanabe Seiji, Oiwa Kotaro, Murata Yuri, Komine Okiru, Sobue Akira, Endo Fumito, Takahashi Eiki, Yamanaka Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 ALS-linked TDP-43M337V knock-in mice exhibit splicing deregulation without neurodegeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-0550-4	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 Komine O, Yamashita H, Fujimori-Tonou N, Koike M, Jin S, Moriwaki Y, Endo F, Watanabe S, Uematsu S, Akira S, Uchiyama Y, Takahashi R, Misawa H, Yamanaka K.	4. 巻 25
2. 論文標題 Innate immune adaptor TRIF deficiency accelerates disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Differentiation	6. 最初と最後の頁 2130-2146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-018-0098-3	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 Trias E, Barbeito L, Yamanaka K	4. 巻 9
2. 論文標題 Phenotypic heterogeneity of astrocytes in motor neuron disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Exp Neuroimmunol	6. 最初と最後の頁 225-234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12476	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 該当する

1. 著者名 Yamashita Hirofumi, Komine Okiru, Fujimori-Tonou Noriko, Yamanaka Koji	4. 巻 17
2. 論文標題 Corrigendum: Comprehensive expression analysis with cell-type-specific transcriptome in ALS-linked mutant SOD1 mice: Revisiting the active role of glial cells in disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1045647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2023.1160444	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 Watanabe Seiji, Horiuchi Mai, Murata Yuri, Komine Okiru, Kawade Noe, Sobue Akira, Yamanaka Koji	4. 巻 179
2. 論文標題 Sigma-1 receptor maintains ATAD3A as a monomer to inhibit mitochondrial fragmentation at the mitochondria-associated membrane in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 106031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2023.106031	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 Sakai Shohei, Watanabe Seiji, Komine Okiru, Sobue Akira, Yamanaka Koji	4. 巻 35
2. 論文標題 Novel reporters of mitochondria associated membranes (MAM), MAMtrackers, demonstrate MAM disruption as a common pathological feature in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100137R	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9件(うち招待講演 8件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 Glia-immune communication in ALS.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 グリア - 免疫連関からみた神経変性疾患.
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊征爾、山中宏二
2. 発表標題 運動神経変性における小胞体・ミトコンドリア連関の破綻.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamanaka K.
2. 発表標題 The role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases.
3. 学会等名 The 15th International Symposium on Geriatrics and Gerontology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 神経変性疾患の治療標的としてのグリア細胞 (Overview: glia as therapeutic targets for neurodegenerative diseases.)
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症における免疫・グリア連関
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学学会大会 合同年会シンポジウム. (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Komine O, Yamashita H, Fujimori-Tonou N, Koike M, Jin S, Moriwaki Y, Endo F, Watanabe S, Uematsu S, Akira S, Uchiyama Y, Takahashi R, Misawa H, Yamanaka K.
2. 発表標題 Innate immune adaptor TRIF confers neuroprotection in ALS mice by eliminating abnormal astrocytes.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中宏二
2. 発表標題 神経変性疾患における蛋白質品質管理異常.
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊征爾、山中宏二
2. 発表標題 TANK結合キナーゼ1 (TBK1) は小胞体・ミトコンドリア接触領域において細胞のタンパク質恒常性ストレス応答を促進する.
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学 環境医学研究所 病態神経科学分野 山中宏二研究室 http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mnd/index.html 名古屋大学 環境医学研究所 http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/index.html

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	高橋 英機 (Takahashi Eiki) (40446521)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・副部門長 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------