

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07391

研究課題名(和文) 中枢神経系多様性獲得機構からみた神経変性疾患における選択的脆弱性及び進行性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of selective vulnerability in neurodegenerative diseases from the perspective of neuronal diversity acquisition and maintenance

研究代表者

田辺 康人 (Tanabe, Yasuto)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：10311309

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)：筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は進行性の全身性の筋力低下をきたし、嚥下障害や呼吸不全により発症後数年で死に至る過酷な神経難病である。現在有効な治療法はない。どのような分子機構により選択的な脆弱性が運動ニューロンに賦与されるのかは不明でありそれを明らかにすることは新たな治療戦略を与える。一方、中枢神経系を構成する個々の神経細胞の個性が将来にわたり維持される分子機構についても多くの場合明らかではない。本研究ではALSにおいて選択的に障害を受ける運動ニューロンの個性維持の破綻がALS脆弱性賦与に結びついている可能性を示唆する研究成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経発生学の進展とともに胎生期においてどのようにして中枢神経系を構成する個々の神経細胞の個性が獲得されるのかについては理解が進んだ。しかしながら一旦獲得された個性がどのような分子メカニズムにより成体において維持されているのかの理解は少ない。さらにはその個性維持機構の破綻がどのような病態発現に結びつくのかに関してもその可能性すら考慮されてはいない。本研究は中枢神経系を構成する神経細胞の個性維持機構の破綻が神経変性疾患の選択的脆弱性に結びつく可能性を示唆した。病態を理解する上での新たな治療戦略を与えると考える。

研究成果の概要(英文)：Dlk1, the fast-fatigable motor neuron cell-fate determinant among generic motor neuron population during embryonic stages, was persistently expressed in adult spinal cord motor neurons until the middle-ages in mice. Our data suggested that Dlk1 may mediate a nucleocytoplasmic transport to take out presumably senescence-associated genotoxic DNAs into the cytoplasm. Given the increased levels of Dlk1 in MNs of TDP-43 Tg homozygotes when motor symptoms progress and the capability of over-expressed Dlk1 for the induction of TDP-43 aggregate in vitro, increased levels of Dlk1 may enhance the nucleocytoplasmic transport system and trigger the formation of TDP-43 aggregates. In contrast, however, our data did not rule out the possibility that Dlk1-mediated nucleocytoplasmic transport system may contribute to the proper transport of genotoxic nuclear materials including TDP-43 for degradation and to prevent the formation of cytoplasmic TDP-43 aggregates in pathological conditions.

研究分野：神経変性疾患 老化 認知症

キーワード：筋萎縮側索硬化症 神経変性疾患

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 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は進行性の全身性の筋力低下をきたし、嚥下障害や呼吸不全により発症後数年で死に至る過酷な神経難病である。ALS の本邦での罹患者数は、現在約1万人とされ、今後も急速な高齢化の進展に伴った増加が見込まれる。現在有効な治療法はない。ALS をはじめとする神経変性疾患においては、すべての神経細胞が障害を受けるのではなく、それぞれの疾患に特徴的な神経細胞が選択的に障害され、その変性・脱落が時間の経過とともに確実に他の領域へと進展する。どのような分子メカニズムにより選択的な脆弱性ならびに病態の確実な進行性が賦与されているのかを理解することは神経変性疾患に対する新たな治療戦略の手立てとなる可能性が期待できる。

ALS においては中枢神経系のうち、皮質および脳幹・脊髄レベルの運動ニューロンが選択的かつ緩徐進行性に障害を受ける。脳幹・脊髄レベルの運動ニューロンは、支配する骨格筋の収縮速度や疲労性に従って、S-MN (遅筋支配、疲労抵抗性)、FR-MN (速筋支配、疲労抵抗性)、FF-MN (速筋支配、易疲労性) に分類されるが、ALS においてはそれらすべての運動ニューロンが病初期から同様に障害を受けるのではない。FF-MN がもっとも早期に障害を受け、その後、緩徐進行性に FR-MN および S-MN にも障害が広がることが知られている (Saxena et al., 2009; Kanning et al., 2010)。これはすなわち FF-MN と FR/S-MN の細胞内因的な特異性の違いに ALS に対する脆弱性および抵抗性の謎を解く鍵があることを示唆する。

過去の研究において ALS において最も強い脆弱性を示す FF-MN は発生期において Dlk1 (delta-like 1 homologue) によりその性質が決定されることが示された (Muller et al., 2014)。Dlk1 は non-canonical Notch リガンドとして働き Notch 活性を抑制することで、FF-MN に特徴的な細胞内因的な特異性を賦与する。一方、過去のショウジョウバエを用いた遺伝学的実験においては、ALS の原因遺伝子の一つである TDP-43 による細胞毒性の表現型が Notch 遺伝子により影響を受け、Notch 活性亢進が毒性を付与することが示された (Zhan et al., 2013)。また、その他の研究グループによって ALS 病態モデルマウスならびに培養細胞系において障害を受けた FF-MN の Notch シグナルは正常マウスの FF-MN と比較して亢進していることが免疫組織学的に示された (Wan et al., 2015)。

2. 研究の目的

FF-MN の細胞特異性を付与する Dlk1 が ALS 病態発現においては FF-MN に ALS 発症の脆弱性を付与する可能性があるのかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マウス: Thy1-TARDBP トランスジェニックマウス (JAX)
- (2) 培養細胞: HEK293T 細胞
- (3) 免疫組織学的解析、Western blotting、顕微鏡的解析及び定量的解析は従来手法に従った (Hagimoto et al., 2017)

4. 研究成果

(1) Dlk1 は野生型マウスの脊髄前角細胞の核膜に発現され、Thy1-TARDBP トランスジェニックマウス (以下、TDP-43 Tg マウス) のホモ接合体においてはその発現は野生型と比較して亢進していた

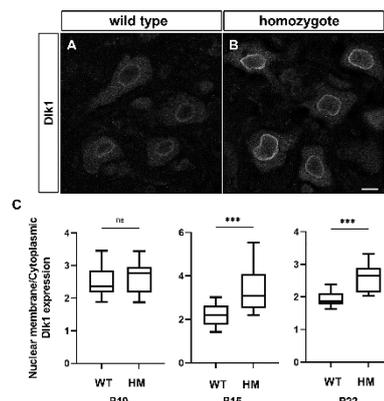
TDP-43Tg マウス (ホモ接合体) は生後 15 日 (P15) 以降において運動症状を示すようになり、生後第 3 週目においては運動麻痺、歩行困難をきたし、生後約 28 日目において個体死に至る。TDP-43Tg マウスの野生型およびホモ接合体由来の脊髄に対して Dlk1 に対する免疫組織学的を行ったところ、Dlk1 は細胞質と比較して核膜に強く発現していた。また運動症状が出現する時期 (P15 以降) に一致して Dlk1 の発現はホモ接合体において亢進していた。この結果は Dlk1 発現亢進と TDP-43 凝集体形成との関連性を示唆した (右図)。

(2) 運動ニューロン細胞死にいたる生後第 3 週目においては脊髄前角細胞の核は屈曲した像を示した

運動麻痺、歩行困難をきたす第 3 週目の TDP-43Tg マウスの脊髄 (腰髄レベル) において、Dlk1、laminB1、TDP-43 に対する抗体免疫染色および DAPI 核染色を行い共焦点顕微鏡での解析をおこなったところ、脊髄前角細胞の核膜は屈曲し一部は細胞体の辺縁に局在する像を認めた。この結果は核膜屈曲と TDP-43 凝集体形成との関連性を示唆した (結果を示さず)。

(3) 野生型マウス及び TDP-43Tg マウスヘテロ接合体の生後 9 か月齢 (中年期に相当) においては Dlk1 は核成分とともに細胞質に凝集体形成を示していた

野生型マウス (4 か月、9 か月齢) および TDP-43Tg ヘテロマウス (9 か月齢) において、Dlk1、TDP-43 の抗体染色および DAPI 核染色を行い共焦点顕微鏡により Dlk1 の発現分布を解析した。Dlk1 は、4 か月齢の野生型マウスにおいて生後発達期と同様に主に核膜に強く発現を認めたが、一部は細胞質にも点状の凝集体形成を認めた。さらに 9 か月齢の野生型および TDP-43Tg ヘテロ



マウスにおいては、D1k1 の細胞質での凝集体形成は亢進していた。興味深いことに D1k1 細胞質凝集体は DAPI により標識される核成分を多くの場合取り込んでいる像を認めた。この結果は中年期以降に現れてくる老化関連の genotoxic debris を核外に輸送する核-細胞質トランスポートシステム的一端を D1k1 が担う可能性を示唆した（一部結果を示さず。右図 A-0）。

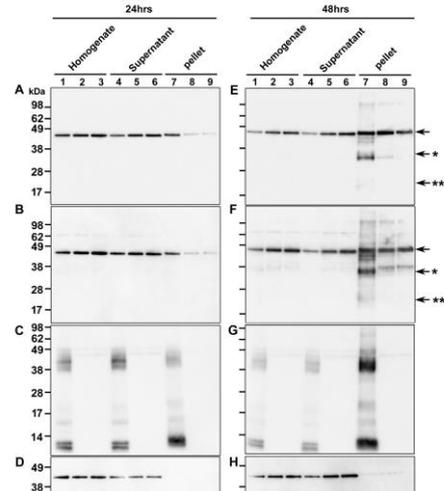
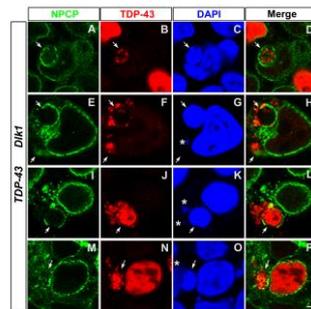
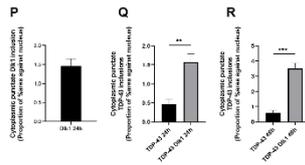
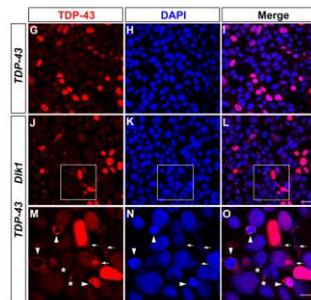
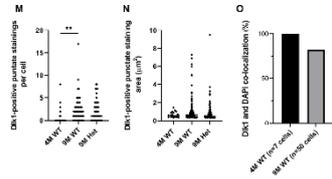
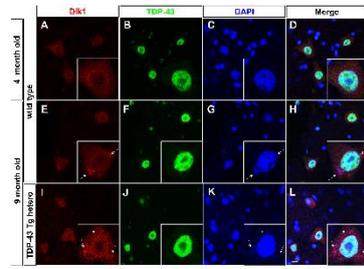
(4) HEK293T 細胞を宿主細胞とした D1k1 単独または D1k1 かつ TDP-43 共発現での *in vitro* 解析系

HEK293T 細胞を宿主細胞としてヒト D1k1 全長遺伝子もしくはヒト D1k1 全長遺伝子かつヒト TDP-43 野生型全長遺伝子を一過性に発現させ、D1k1、TDP-43 蛋白質の発現分布様式を共焦点顕微鏡により解析した

- ① D1k1 単独発現において、D1k1 は核成分とともに細胞質に凝集体形成を示した（一部結果を示さず、右図 P-R）
- ② TDP-43 を D1k1 と共発現において、TDP-43 は核成分とともに細胞質に凝集体形成を示した（右図 G-0, asterisk）。細胞質での TDP-43 凝集体は D1k1 と共存していた（結果を示さず）。D1k1 および TDP-43 発現細胞の核膜は屈曲し微小核様の構造を主核の辺縁に認めた（右図 G-0 矢頭, P-R）
- ③ 屈曲した核膜の一部は局所的に消失し、その破綻部位に一致して TDP-43 ならびに DAPI 陽性の核成分の核から細胞質への拡散を認めた（右図 A-R）
- ④ D1k1 強制発現により TDP-43 蛋白質の切断および不溶画形成が誘導された（右下 Western blot 図）

これらの結果は、*in vitro* における D1k1 発現は細胞質での TDP-43 凝集体形成、TDP-43 蛋白質切断、TDP-43 不溶画形成といった従来から特徴づけられていた TDP-43 プロテノパチーの細胞生物学的かつ生化学的性質を再構築しうることを示唆する。また D1k1 の発現により微小核様の局所的に屈曲した核膜構造に伴って TDP-43 及び核内成分が細胞質へと分布が変化していることは、D1k1 が TDP-43 および核内成分の核-細胞質移送に関与することを示唆した。

FF-MN の運命決定因子である D1k1 は発生期のみならず少なくとも中年期に至るまで脊髄前角細胞の主に核膜に発現されることが示された。さらに中年期における脊髄前角細胞においては D1k1 が核膜だけではなく細胞質に核内成分とともに凝集体を形成していることが示された。これらの結果は D1k1 が加齢やストレス下での核から細胞質への genotoxic 核内成分の移送に関与する可能性を示唆した。D1k1 の核膜での発現量が ALS 病態モデルマウスの脊髄前角細胞においては細胞障害が引き起こされる時期に一致して亢進していること、実際に *in vitro* において D1k1 の強制発現により TDP-43-D1k1-核内成分の細胞質凝集体形成が促進する結果は、病態下において D1k1 は核-細胞質移送を促進し TDP-43 細胞質凝集体形成に関与する可能性を示唆した。しかしながら他方、D1k1 は TDP-43 の細胞質への移送さらには細胞質での蛋白質分解を促進し TDP-43 の細胞質凝集体形成を抑制している可能性も残った。中年期以降の脊髄前角細胞の核膜での D1k1 発現が低下傾向にあることは D1k1 の核-細胞質移送システムの低下が TDP-43 細胞質凝集体形成に結びつく考えを支持する。さらには Notch シグナルが ALS 病態モデルマウスにおいて発現亢進し細胞毒性を付与するとした過去の研究結果は、Notch シグナル抑制に働く D1k1 の発現が低下することが Notch シグナル活性化につながりひいては TDP-43 細胞質形成をはじめとする細胞毒性付与に関与する可能性を示唆する。将来的に FF-MN 特異性を付与する D1k1 のどのような機能異常が潜在的に FF-MN 選択的脆弱性付与に結びつくのか更なる解析が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田邊康人 渡邊大 高橋良輔
2. 発表標題 DIK1 contributes to the induction of cytoplasmic TDP-43 aggregates through the formation of micronucleus-like structures
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------