

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23785

研究課題名(和文) TDP-43のシード能獲得過程の解析による神経変性疾患治療標的の同定

研究課題名(英文) Screening targets modify the gain of seeding activity of TDP-43

研究代表者

田中 良法 (TANAKA, Yoshinori)

岡山理科大学・獣医学部・助教

研究者番号：00747933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くの筋萎縮性側索硬化症や半数程度の前頭側頭葉変性症(FTLD)の患者脳では核タンパク質TDP-43が細胞質に凝集・蓄積することが疾患の進行と密接に関係していることが知られている。細胞内成分を分解する主要な機構であるオートファジーは、TDP-43の細胞内蓄積を抑制することが示唆されているが、疾患との因果関係は明らかとなっていない。本研究では、FTLDの原因因子であるプログランユリン(PGRN)がTDP-43の蓄積を抑制する機構について調べた。PGRNはオートファゴソームとリソソームの融合を促進することでTDP-43の細胞内蓄積を抑制してい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

前頭側頭葉変性症(FTLD)は四大認知症の1つに分類される未だ治療法のない神経変性疾患である。TDP-43の蓄積を特徴とするFTLD(FTLD-TDP)の原因遺伝子であるプログランユリン(PGRN)が細胞内分解制御機構であるオートファジーの過程の一部を制御していることが明らかとなったことで、オートファジー制御機構の一端が明らかになったことに加え、オートファジーの破綻がFTLD-TDPの原因となる可能性が示唆された。一方で、PGRNによるオートファジー制御機構を明らかにすることで、FTLDの新規治療標的を見出せる可能性があり、将来的な発展が期待できる成果となった。

研究成果の概要(英文)：A nuclear protein TDP-43 accumulation in the cytoplasm is a hallmark of most of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and about a half of frontotemporal lobar degeneration (FTLD), and closely related to these diseases progression. Autophagy is a main cell degradation system, and inhibits TDP-43 accumulation. However, it remains unknown whether autophagy regulates diseases progression accompanied with TDP-43 accumulation. Here we focused on how progranulin (PGRN), a causal gene product of FTLD, suppresses TDP-43 accumulation. Our results suggested that PGRN suppresses TDP-43 accumulation in the cytoplasm through promoting autophagosome and lysosome fusion.

研究分野：分子神経病理学

キーワード：プログランユリン オートファジー リソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及び半数近くの前頭側頭葉変性症 (FTLD) では、核タンパク質 TDP-43 が細胞質に蓄積することが病気の進行と密接に関係している。プリオン病の異常プリオンのように、正常な TDP-43 を異常型へと変換するシード能のある TDP-43 が原因となり、これらの TDP-43 の蓄積が引き起こされると考えられている。しかし、TDP-43 のシード能獲得を制御する因子は明らかにされていない。そこで、ALS の原因遺伝子であるプロフィリン 1 (PFN1) 変異体、及び FTLD の原因となるプログラニュリン (PGRN) 産生低下に着目した。その結果、ALS の原因となる変異型 PFN1 を発現した細胞の界面活性剤不溶性画分に、正常な TDP-43 を病的な TDP-43 へ変換するシード能があること、及び PGRN の発現抑制が界面活性剤不溶性の TDP-43 を増加させることを明らかにした。

2. 研究の目的

PFN1 変異体の発現や PGRN の発現抑制が不溶性の TDP-43 を増加させる機構を解明すること。

3. 研究の方法

ハイスループットなシード依存性 TDP-43 細胞質内蓄積検出システムを構築し、変異型 PFN1 の発現や PGRN の発現抑制により作出したドナー細胞の界面活性剤不溶性画分のシード能を評価する。さらには、ドナー細胞のシード能獲得過程で siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行うことで、TDP-43 のシード能獲得過程を制御する因子を同定する。

PGRN と相互作用のある候補因子を質量分析により同定する。さらに、細胞においてそれらを発現増加・抑制し、TDP-43 の凝集を制御する因子を同定する。

4. 研究成果

(1) PGRN と相互作用する候補因子を質量分析法により同定し、それら候補因子の中から、オートファジー・リソソーム系を制御する因子 A を同定した。因子 A を強制発現すると、リソソームの酸性化が亢進した。逆に、因子 A を発現抑制するとリソソームの酸性化が抑制された。これまでの申請者の研究で、PGRN がリソソーム酸性化を促進することを明らかにしていたので、因子 A が PGRN によるリソソーム酸性化に与える影響を調べた。因子 A の発現抑制下では、PGRN によるリソソーム酸性化の促進は認められなかった。したがって、PGRN によるリソソーム酸性化を因子 A が仲介している可能性が考えられた。因子 A の機能を亢進する薬物を添加する実験では、薬物濃度依存的にリソソーム酸性化を亢進した。因子 A の発現抑制は、オートファジー・リソソーム系を構成するタンパク質の主要転写因子である TFEB の細胞質から核への移行を促した。この機構は TFEB のリン酸化によって一部制御されていることが知られているが、因子 A の発現抑制は、TFEB の脱リン酸化の原因となることが明らかとなった。それを裏付けるように、因子 A の発現抑制によって、リソソームの細胞内蓄積が増加し、リソソーム腔の拡張が生じた。さらに、因子 A がオートファジーに与える影響を調べたところ、因子 A の発現増加はオートファジーフラックスを促進し、因子 A の発現抑制はオートファジーフラックスを抑制した。また、因子 A の発現抑制は、TDP-43 の C 末端に GFP が付加したハイブリッドタンパク質の凝集を促進した。以上のことから、因子 A は PGRN のオートファジー・リソソーム機能を仲介していることが示唆された。

(2) PGRN の働きを仲介する候補因子 A はオートファジーを制御していたが、PGRN がオートファジーを制御する機構は明らかとなっていなかった。そこで、PGRN によるオートファジー制御機構を調べた。PGRN の発現抑制は、オートファジーフラックスを抑制した。一方で、PGRN の発現亢進は、オートファゴソーム産生を抑制した。次に、空胞形成に伴いオートファゴソームとリソソームの融合を阻害する薬物を用いて、PGRN がオートファゴソームとリソソームの融合に与える影響を調べた。PGRN を発現抑制すると、薬物による空胞形成は認められなくなった。逆に、PGRN の発現増加は、薬物による空胞形成を促進した。薬物による空胞は、オートファゴソームマーカー、及びリソソームマーカー陽性であったことからオートリソソームであることが推測された。そこで、リソソームマーカーを用いて、PGRN がリソソーム数や大きさ、空胞形成に与える影響を調べた。PGRN を発現抑制すると、リソソーム数は増加したが、PGRN を補充すると、リソソーム数の増加は抑えられたことから、PGRN は濃度依存的にリソソーム数を制御することが考えられた。PGRN の発現抑制はリソソームの大きさに影響しなかったが、薬物によるリソソーム腔の拡張を抑制した。よって、PGRN の発現抑制は、薬物によるオートリソソーム形成を抑制していることが示唆された。そこで、薬物を用いて PGRN がオートリソソーム形成に与える影響を調べた。野生型細胞では、薬物はオートリソソーム数に影響せず、オートファゴソームの蓄積を増加した。一方で、PGRN 発現抑制下では、オートリソソームが増加し、オートファゴソーム

ムが減少した。空胞がオートファゴソームとリソソームが過剰に融合したオートリソソームであると仮定すると、野生型の細胞では、リソソームがオートファゴソームとの過剰な融合によって消費された結果、オートファゴソームとリソソームの融合が阻害されている可能性が考えられた。そこで、この仮説を検討するために、空胞を形成する前に薬物がオートファジーに与える影響を調べたところ、薬物はオートファジーフラックスを促進した。さらには、空胞形成はオートファジー依存적であった。よって、薬物による空胞形成はオートファゴソームとリソソームが過剰に融合した結果であることが示唆された。以上の結果から、PGRN はオートリソソーム形成を促進し、TDP-43 蓄積を抑制していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中良法、亀谷富由樹、竹谷浩介、長谷川成人、江藤真澄
2. 発表標題 PGK1によるリソソームを通じたTDP-43凝集抑制作用
3. 学会等名 第39回日本認知症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshinori Tanaka, Kanami Matsubara, Hirotugu Hino, Kosuke Takeya, Masumi Eto
2. 発表標題 The role of progranulin in autolysosome formation
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshinori Tanaka, Kosuke Takeya, Masumi Eto
2. 発表標題 The role of progranulin in neurite outgrowth involved in acidification of lysosomes
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshinori Tanaka, Kosuke Takeya, Masumi Eto
2. 発表標題 Progranulin suppresses neurite outgrowth induced by lysosomal dysfunction in Neuro2a cells
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究・教員紹介 岡山理科大学獣医学部 https://www.vet.ous.ac.jp/seminar/seikagaku/tanaka/ 岡山理科大学 獣医学部 生化学講座 田中班 https://progranulintdp.wixsite.com/website

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
研究協力者	松原 叶実 (Matsubara Kanami)		
研究協力者	楠本 竣也 (Kusumoto Shun-ya)		
研究協力者	菊池 美咲 (Kikuchi Misaki)		
研究協力者	伊藤 俊一 (Ito Shun-ichi)		
連携研究者	江藤 真澄 (Eto Masumi) (20232960)	岡山理科大学・獣医学部・教授 (35302)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	竹谷 浩介 (Takeya Kosuke) (20586862)	岡山理科大学・獣医学部・講師 (35302)	
連携研究者	日野 浩嗣 (Hino Hirotsugu) (30793468)	日本大学・医学部・助教 (32665)	
連携研究者	長谷川 成人 (Hasegawa Masato) (10251232)	公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・分野長 (82609)	
連携研究者	亀谷 富由樹 (Kametani Fuyuki) (70186013)	公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・研究員 (82609)	

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