

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K23961

研究課題名（和文）DNAメチル化がTDP-43の自己調節に与える影響に着目したALS病態の解明

研究課題名（英文）The elucidation of ALS pathogenesis focused on the effects of DNA methylation on TDP-43 autoregulation

研究代表者

小池 佑佳 (Koike, Yuka)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：60844488

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）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）では、核蛋白TDP-43の量と分布の異常が病態に関与する。本研究では、以下のことが明らかにした：1）TDP-43量の自己調節領域の選択的脱メチル化により、TDP-43量が増加する。2）ヒト運動野におけるTDP-43自己調節領域の脱メチル化は、加齢とともにTDP-43量を増加させる。3）運動野におけるTDP-43自己調節領域のメチル化状態は、ALSの発症年齢と相関する。本研究により、加齢に伴うDNA脱メチル化によって、TDP-43量が自己調節される分子機序を明らかにした。申請者は、本研究成果をCommun Biol誌に報告した（Koike et al. 2021）。

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）をはじめとする神経変性疾患は、慢性進行性の経過をたどり、患者の生活の質を著しく低下させる。そのため、早期診断のためのバイオマーカーや根本的治療戦略の開発が強く望まれる。加えて、神経変性疾患の最大の発症リスクは、加齢であり、高齢化社会において、その制御は重要な課題である。しかし、加齢がALSや神経変性疾患の発症に寄与する機序は明らかでない。この機序の解明は、ALSや神経変性疾患発症のリスク制御、治療標的の開発に繋がる。本研究では、TDP-43の量調節の観点から、加齢と孤発性ALS発症を結ぶ分子機序の一端を明らかにし、今後のALS病態研究を展開していく上での土台となる。

研究成果の概要（英文）：In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), abnormalities in the amount and distribution of the nuclear protein TDP-43 contribute to the pathogenesis of the disease. This study found that: 1) Selective demethylation of TDP-43 autoregulatory regions increases TDP-43 levels. 2) Demethylation of TDP-43 autoregulatory regions in the human motor cortex increases TDP-43 levels with age. 3) The methylation status of TDP-43 autoregulatory regions in the motor cortex correlates with the age of onset of ALS. This study revealed the mechanism of self-regulation of TDP-43 levels by age-related DNA demethylation. We reported these findings in Commun Biol (Koike et al. 2021).

研究分野：神経内科学分野

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 TDP-43 DNAメチル化 加齢 運動野 スプライシング

## 1. 研究開始当初の背景

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (SALS) は運動神経細胞が選択的に障害される、神経変性疾患である。SALS 患者の運動神経細胞では、核蛋白 TDP-43 が細胞質に蓄積する。この背景には TDP-43 の増加が推定されている。TDP 43 は RNA 結合蛋白であり、RNA のスプライシングを調節する。申請者のグループは、TDP-43 が、自己の TARDBP pre-mRNA 3' 側非翻訳領域 (3' UTR) 内の選択的スプライシングを制御し、TDP-43 を一定量に保つこと (自己調節機構) さらには、SALS ではこの選択的スプライシングが乱れていることを、報告してきた。しかし、その背景となる機序は明らかでない。選択的スプライシングを制御する因子の一つに DNA メチル化がある。DNA メチル化は、エピジェネティックな因子の代表的なものであり、孤発性神経変性疾患の病態機序を説明しうる。さらに、TARDBP 3' UTR 内スプライシング領域近傍にはメチル化シトシン塩基 (CpG) が集中している。以上より、私は、SALS では、TARDBP 3' UTR の DNA メチル化状態が変化し、選択的スプライシングの異常をきたし、TARDBP 発現量が増加している、と仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、TDP-43 の自己調節機構に対する、TARDBP 3' UTR の DNA メチル化の寄与を明らかとし、さらに、TARDBP 3' UTR のメチル化状態の SALS 病態への寄与を明らかとすることである。これまでも SALS に対し DNA メチル化解析は行われてきた。しかし、プロモーター領域に焦点が当てられ、変化を見出せなかった。一方、申請者は TDP-43 の自己調節機構との関連から、DNA メチル化と選択的スプライシングとの関係に注目し、TARDBP 3' UTR のメチル化状態に着目した。

## 3. 研究の方法

TARDBP 3' UTR の DNA の CpG 部位のメチル化状態の変容が、TARDBP の選択的スプライシングや発現量に与える影響を明らかとする。次に正常者と SALS 脳組織で、同部のメチル化の状態を、組織間、年齢間で比較し、同部のメチル化の病態への寄与の有無を明らかとする。そのために、以下の方法を用いた。

- (1) 脱メチル化酵素共役型 CRISPR/Cas9 システムを用いて、TARDBP 3' UTR の選択的な脱メチル化操作を行い、TARDBP pre-mRNA のスプライシング評価、TARDBP mRNA 発現量を評価した。
- (2) ヒト凍結剖検脳を用い、バイサルファイト処理と Miseq (Illumina) により、TARDBP 3' UTR に位置する 15 か所の CpG 部位の DNA メチル化状態を、直接、網羅的、定量的に解析した。解析対象部位は運動野皮質、後頭葉皮質、小脳とした。
- (3) ヒト脳組織の部位別の TARDBP 3' UTR の DNA メチル化とスプライシングの関連を解析した。運動野皮質、後頭葉皮質、小脳において、TARDBP 3' UTR の DNA メチル化状態を解析し、各領域由来の組織より RNA を抽出し、TARDBP mRNA の発現量を評価した。TARDBP mRNA の発現量解析には、droplet digital PCR 法を用いた。

上記方法により、SALS に特徴的な DNA メチル化状態の変化の有無、脳領域特異性や加齢性変化による乱れの有無を、検討した。

## 4. 研究成果

本研究により、以下の内容を明らかとした。

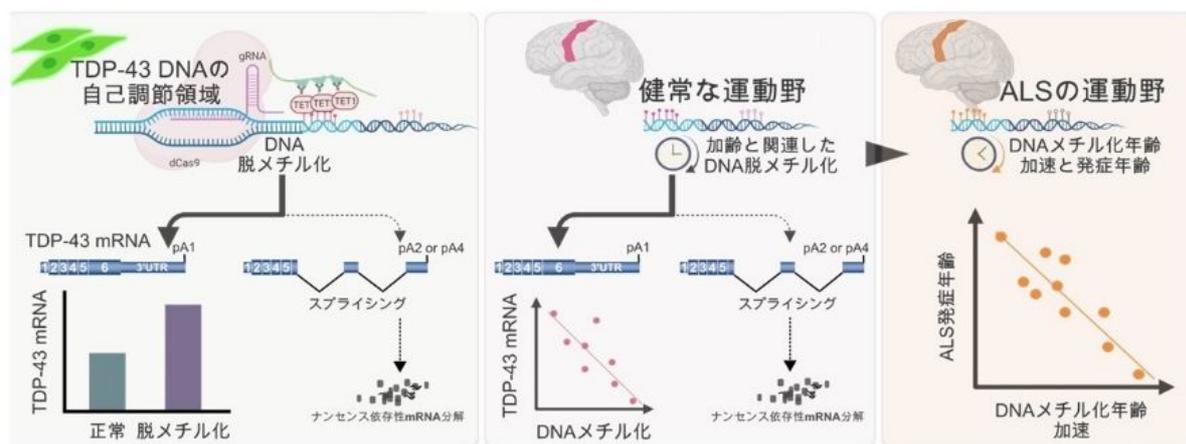
- (1) ヒト培養細胞を対象に、脱メチル化酵素共役型 CRISPR/Cas9 システムを用いて、TDP-43 自己調節領域の選択的な脱メチル化操作を行った。その結果、同領域の脱メチル化により、選択的スプライシング効率の低下を介して、TARDBP mRNA 発現量が増加することを証明した。
- (2) ALS 及び非中枢神経疾患コントロール由来のヒト凍結剖検脳 (運動野、後頭葉皮質、小脳) を用いて、TARDBP 3' UTR のメチル化状態を解析した。その結果、クラスター解析や主成

分分析により、この3つの脳領域を分類することができた。つまり、脳領域毎に TDP-43 自己調節領域の DNA メチル化プロファイルが異なることを明らかにした。

(3) 健常運動野において、加齢により TDP-43 の自己調節領域の脱メチル化が進行し、さらに TDP-43 量が増加することを見出した。後頭葉皮質や小脳では、加齢に伴うメチル化状態の変化はみとめなかった。

(4) 健常運動野における、TDP-43 自己調節領域のメチル化率をもとに、DNA メチル化年齢を規定し、ALS 症例では、そのメチル化年齢の加速度を計算した。それにより、ALS では、DNA メチル化年齢が加速するほど、つまり、TDP-43 自己調節領域の脱メチル化率が高い症例ほど、疾患発症年齢が若くなることを示した。こ

これらの研究結果により、加齢関連性の DNA 脱メチル化による、TDP-43 量の自己制御機構を解明した。この成果を Commun Biol 誌 (Koike, et al. 2021) に報告した (下図)。



一方で、本研究では、TDP-43 自己調節領域の脱メチル化率自体は、ALS 患者脳と、健常脳で有意な差を認めなかった。つまり、DNA メチル化修飾と ALS 病態に関する国内外の他の先行研究と同様に、ALS 患者と健常者を区別しうる、DNA メチル化修飾は見出せなかった。この原因として、脳の組織単位を解析対象としていることが問題と考える。組織単位では、神経細胞とグリア系細胞を含む非神経細胞、罹患細胞、非罹患細胞が混在した状態を解析することになる。さらに、ALS 罹患組織では、神経細胞の脱落やグリア系細胞の増生が進んでいることが想定される。つまり変性が進んだ罹患神経細胞での、DNA メチル化修飾の変化を、正確に捉えることは困難であった可能性が高い。ヒト運動野の神経細胞を分離し、単一細胞レベルで解析することができれば、ALS 病態における DNA メチル化修飾の寄与をより正確かつ詳細に評価できると考える。今後は、この目的のために、ALS 患者脳を対象としたシングル核メチローム解析のプロトコールを樹立していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuka Koike, Akihiro Sugai, Akio Yokoseki, Tomohiko Ishihara, Norikazu Hara, Junko Ito, Shintaro Tsuboguchi, Takuma Yamagishi, Mari Tada, Takeshi Ikeuchi, Akiyoshi Kakita, Osamu Onodera	4. 巻 4
2. 論文標題 Age-related demethylation of the TDP-43 autoregulatory region in the human motor cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02621-0	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuka Koike, Akihiro Sugai, Akio Yokoseki, Tomohiko Ishihara, Norikazu Hara, Junko Ito, Takeshi Ikeuchi, Akiyoshi Kakita, Osamu Onodera
2. 発表標題 Alteration of TDP-43 autoregulation-relevant splicing by DNA methylation status of TARDBP DNA
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuka Koike, Akihiro Sugai, Akio Yokoseki, Tomohiko Ishihara, Norikazu Hara, Junko Ito, Shintaro Tsuboguchi, Takuma Yamagishi, Mari Tada, Takeshi Ikeuchi, Akiyoshi Kakita, Osamu Onodera
2. 発表標題 加齢と関連したDNA脱メチル化がTDP-43量の自己調節機構を障害する
3. 学会等名 日本認知症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Koike
2. 発表標題 DNA demethylation in the TDP-43 autoregulatory region links to aging
3. 学会等名 UK-Japan Neuroscience Symposium 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Koike
2. 発表標題 Perturbation of DNA methylation in the TDP-43 autoregulatory region links to aging
3. 学会等名 The 14th BRI International Symposium, Niigata University (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------