

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20890071

研究課題名(和文) 疾患関連変異 TDP-43 の運動神経細胞変性機序の解明

研究課題名(英文) analysis of pathomechanism of motor neuron degeneration caused by disease-related mutations of TDP43

研究代表者

横関 明男 (YOKOSEKI AKIO)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90515719

研究成果の概要(和文)：

TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43)は、筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis:ALS)患者のグリア細胞や神経細胞の細胞質内のユビキチン化封入体の主要な構成蛋白である。家族性および孤発性 ALS において、30 以上の TDP-43 の遺伝子変異が報告されていることから、変異 TDP-43 が神経変性に関わっている可能性を示している。変異 TDP-43 が野生型より断片化されやすいかどうかを調べるため、全長型 TDP-43 の野生型または疾患変異型を C6 細胞に発現させ、不溶性分画として SDS 分画をウエスタンブロットにより解析した。全長型の 43kDa と C 末断片型の 35kDa のバンドが検出されたが、野生型と変異型との間で出現の程度に違いはなかった。TDP-43 の C 末断片が毒性を有しているか否かを調べるため、C 末 25kDa 断片化または全長型 TDP-43 (野生型または変異型)を U-87MG 細胞に発現させ、fluorescence activated cell sorting を用いて AnnexinV 陽性、ヨウ化プロピジウム陽性細胞をアポトーシス細胞として検出した。C 末断片型 TDP-43 は、全長型より細胞毒性を有していたが、野生型と変異型との間に違いはなかった。TDP-43 は、嚢胞性線維症の原因遺伝子である Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) 遺伝子 exon9 の alternative splicing を制御していると報告されている。TDP-43 の野生型と変異型とで CFTR exon9 の skip 活性を評価するため、TDP-43 野生型または変異型と、Survival of Motor Neuron(SMN)遺伝子の exon6 , exon8 それと CFTR exon9 を含むレポータープラスミドを COS7 細胞に共発現させ、転写産物を RT-PCR で解析した。変異型 TDP-43 は野生型と同様の CFTR exon9 skip 活性を有していた。

研究成果の概要(英文)：

TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) is a major component of ubiquitinated intracytoplasmic inclusions in glia and neuron of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. More than 30 mutations in the *TDP-43* gene in familial and sporadic ALS have been reported which demonstrated that mutant TDP-43s may play a role in the neurodegeneration. To investigate whether mutant TDP-43s can be proteolytically processed to generate C-terminal fragment, we expressed wild type or mutant full-length TDP-43 in C6 cells and the SDS-insoluble pellets were subjected to immunoblot analyses. Full length (43 kDa) and C-terminal fragment (35 kDa) bands were detected and the difference was never found between wild type and mutant TDP-43 expressing cells. To examine whether C-terminal fragments of TDP-43 have cytotoxicity, we transfected full length or 25 kDa C-terminal fragment TDP-43 which was wild type or mutant into U-87MG cells and apoptotic cells which were Annexin V positive and propidium iodide positive were detected using fluorescence activated cell sorting. C-terminal fragments were more toxic than full-length TDP-43 and no difference was found between wild type and mutant TDP-43 expressing cells. TDP-43 has been reported to regulate the alternating splicing of exon 9 of Cystic Fibrosis Transmembrane

conductance Regulator (CFTR) gene. To evaluate the CFTR exon 9 skipping function of wild type or mutant TDP-43, we co-transfected the plasmid of wild type or mutant TDP-43 with reporter plasmid including Survival of Motor Neuron(SMN) exon6 , exon8 and CFTR exon9 into COS7 cells and the transcripts with or without CFTR exon9 insert were analyzed by RT-PCR. Mutant TDP-43s had same degree of CFTR exon9 skipping function as wild type.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：ALS, TDP-43, motor neuron, exon skip, CFTR

#### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis:ALS)は、発症原因が不明でかつ治療もない致死性の疾患である。本症の病理は、選択的な運動神経の変性、脱落を特徴とし、残存する運動神経細胞の細胞質内には、エオジン好性のブニナ小体やユビキチン陽性の skein 様封入体を認めることを特徴とする。ALS の多くは孤発性 ALS であるが、約 10% は家族性 ALS である。家族性 ALS の中で最も頻度が高いのが Cu/Zn superoxide dismutase1(SOD1)変異による ALS1 であるが、ALS1 の病理は孤発性 ALS で認めるブニナ小体やユビキチン陽性 skein 様封入体を伴わないことから、ALS1 と孤発性 ALS の発症メカニズムは異なることが指摘されてきた(Tan ら Acta Neuropathol 2004)。一方、家族性 ALS の中でブニナ小体や skein 様封入体を伴う家系が稀ながら報告されてきており、申請者のグループも報告してきた(Tagawa ら Acta Neuropathol 2007)。このような家系での原因遺伝子の単離が、孤発性 ALS の原因解明に向けて重要であると考えていた。

2006 年秋、孤発性 ALS に認められるユビキチン陽性の skein 様封入体の構成蛋白が、TAR DNA binding protein of 43 kDa(TDP-43)であることが報告された Neumann ら Science 2006, Arai ら Biochem Biophys Res Commun 2006)。この知見は、申請者の施設を含め多くの報告にて確認された。このことから、同

様に TDP-43 陽性封入体を形成する疾患 Frontotemporal dementia with ubiquitin-positive, tau-negative 封入体(FTD-U) と共に TDP-43 陽性封入体を形成する一連の神経変性疾患 “TDP-43 proteinopathies” として認識されるにいたった(Kwong ら Acta Neuropathol 2007)。しかし TDP-43 が ALS の発症に直接関わっているのか、変性の結果としての二次的な現象なのか、明らかになっていなかった。

興味深いことに TDP-43 陽性の skein 様封入体は、代表的な家族性 ALS である ALS1 では認めなかった(Tan ら Acta Neuropathol 2007)。一方、申請者のグループが報告した家族性 ALS では TDP-43 陽性 skein 様封入体を認めた。この家族性 ALS について、TDP-43 の遺伝子変異の可能性を考え遺伝子解析を実施したところ、家系内発症者 3 名において TDP-43 内にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異(Q343R)を見いだした。同変異は正常対称者 200 名には認めず、また同部位は種をこえて保存されており、本変異がこの家系の ALS の発症に寄与している可能性が強く示唆された(Yokoseki ら Ann Neurol 2008)。時期を同じくして複数のグループから TDP-43 変異を伴う家族性、孤発性 ALS が報告され、現在までに約 30 を超える TDP-43 の遺伝子変異が報告されている。申請者が報告した家系では、一般病理学的検討のみでなく、凍結脊髄を用いた生化学

学的検討も実施し、孤発性 ALS と同様の特徴を持つことも報告した。そのため、TDP-43 が ALS 発症に直接関与していることが強く示唆されるに至った。

TDP-43 は全身の臓器に発現している 43 kDa の核蛋白である。機能としては exon skip 活性による mRNA のスプライスへの関与 (Ayala ら FEBS Lett 2006) , 各種核内小体 (PML, GEM, Cajal body) との関連 (Wang ら Proc Natl Acad Sci USA 2002) が報告されている。しかし、その機能は未だ不明である。興味深いことに家族性および孤発性 ALS で見いだされた TDP-43 変異の大多数は、活性中心と考えられている glycine-rich domain を含む C 末に集積している。また skein-like 封入体の構成蛋白として同定された TDP-43 ペプチド断片はいずれも C 末由来であった。TDP-43 蛋白が caspase3 により切断され、C 末 25kDa の断片が産生されること (Zhang ら J Neurosci 2007)。さらに TDP-43 の C 末を認識する抗体で skein 様封入体は認識される。孤発性 ALS また我々の TDP-43 変異を有する家族性 ALS 症例の凍結脊髄を用いたウエスタンブロッティングで TDP-43 の C 末異常断片が検出されること。さらに申請者は TDP-43 の C 末断型が、細胞質内に凝集体を形成することを確認している。これらのことから、ALS 発症に TDP-43 の C 末が大きく関与していると推測し、同部位が ALS 発症に重要であると考えに至った。

## 2. 研究の目的

孤発性 ALS と我々が解析した TDP-43 変異をもつ家族性 ALS において、ALS と TDP-43 との関連については、次のことが判明している。  
i) 患者運動神経細胞では、核内の TDP-43 が減少し、TDP-43 の細胞質への dislocation を認める  
ii) 細胞質内に C 末由来の凝集体を形成する  
iii) 今まで報告された変異が主として C 末に集中している。この事実から、TDP-43 による ALS の発症機序として次の様な仮説をあげた。

① TDP-43 の C 末断片が細胞毒性をもつ (gain of toxic function)

② 核内の TDP-43 が細胞質に移動するために核内での正常な TDP-43 機能の喪失により細胞死を来す (loss of function)。そのため“疾患関連 TDP-43 変異体の運動神経細胞変性機序の解明”を目的として、下記の点を解析した。

- (1) TDP-43 C 末断片の形成過程に疾患関連変異が関係する可能性について検討する
- (2) 野生型、疾患関連変異型での C 末断片の細胞毒性について検討する
- (3) TDP-43 欠失による細胞毒性の有無について

て検討する

(4) 野生型と変異型で exon skip 活性に違いがあるかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) TDP-43 C 末断片の形成過程の検討。

申請者が報告した Q343R を含む疾患関連変異を含む 15 種の変異型 TDP-43

(D169G, G287S, G290A, G294A, G298S, A315T, Q331K, M331K, M337V, Q343R, G348C, R361S, A382T, N390D, M390S) の全長型を C6 細胞に一過性発現させた。不溶性分画を抽出する目的で SDS 分画を回収して、western blot により C 末断片の形成率を検討した。

また、上記 EGFP でラベルした変異型または野生型の C 末 25kDa 断片の TDP-43 を C6 細胞や SH-SY5Y 細胞に一過性発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) TDP-43 C 末断片の細胞毒性について検討。EGFP 標識した C 末 25kDa 断片型の TDP-43 (野生型および前述の変異型) または EGFP 標識した全長型 TDP-43 (野生型および前述の変異型) を U-86MG 細胞に強制発現させ、fluorescence activated cell sorting を用いて Annexin V 陽性かつヨウ化プロピジウム陽性細胞を検出することにより細胞毒性を検討した。

(3) TDP-43 欠失による細胞毒性の検討。

U-87MG 細胞の内在性 TDP-43 を、siRNA を用いて発現を knock down し、western blot により TDP-43 の発現抑制を確認した上で、fluorescence activated cell sorting を用いて Annexin V 陽性かつヨウ化プロピジウム陽性細胞を検出することにより細胞毒性を検討した。

(4) exon skip 活性の検討

TDP-43 の既知の機能として CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) 遺伝子 exon9 の上流 intron 内の (TG)<sub>n</sub> の異常伸長配列を TDP-43 が認識して、exon9 を skip させる活性がある。CFTR 遺伝子の exon9 を SMN (Survival of Motor Neuron) 遺伝子の exon6 と exon8 で人工的に挟んだミニジーンをレポーターとして用い、野生型および前記疾患関連変異 TDP-43 を COS7 細胞に co-transfection し、ミニジーンの転写産物を RT-PCR で検出することにより exon skipping assay を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) TDP-43 C 末断片の形成過程の検討.

今回申請者が実施した実験系では、全長型の 43 kDa の TDP-43 に加え、35 kDa の C 末断片型 TDP-43 が検出された。43 kDa のバンドと 35kDa のバンドの比で、野生型と変異型との C 末断片の形成率を比較した。G290S, G298S はやや C 末断片の形成率がやや高い傾向を示したが、有意な差は認めなかった。またその他の変異や野生型と同程度であった。

共焦点レーザー顕微鏡の観察では、C 末断片型 TDP-43 の局在は、細胞質で凝集体を形成する型 (aggregation) と細胞質にびまん性に局在する型 (diffuse), 細胞質での凝集体とびまん性が混在する型 (intermediate) が存在した。強制発現させた全細胞に対するそれぞれの局在パターンの細胞数の割合を比較したが野生型、変異型で局在パターンの割合に違いはなく、50-60% が aggregation, 30-40% が diffuse, 1-2% が intermediate であった。

##### (2) 野生型、疾患関連変異型での C 末断片の細胞毒性について検討する

C末断片型TDP-43は全長型と比較してAnnexin V陽性細胞の割合が高かったが、野生型と変異型での違いはなかった。

##### (3) TDP-43 欠失による細胞毒性の検討

TDP-43 の siRNA による発現抑制群とコントロール siRNA 群で、apoptosis 細胞に数に違いはなかった。

##### (4) exon skip 活性

いずれの疾患変異 TDP-43 は、野生型と同様の exon skipping 活性を有しており、exon skip の効率も野生型と変異型で違いはなかった。

今回申請者が実施した研究では、変異型 TDP-43 の機能異常を示すことはできなかった。一方、TDP-43 の C 末断片は細胞毒性を有することが証明されたことから、今後は C 末断片の毒性について、ユビキチンプロテアソーム系などの蛋白分解系からのアプローチが必要であると考えられる。また、CFTR の exon9 の exon skip 活性に違いは見いだせなかったが、TDP-43 により alternating splicing され ALS 発症に関与すると考えられる遺伝子の検索も今後の課題である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 石原智彦, 横関明男, 西澤正豊, 高橋均, 小野寺理, TDP-43 の遺伝子変異とその意義, BRAIN and NERVE, 査読無, 61 巻, 2009, 1301-1307
- ② Tan CF., Yamada M., Totoshima Y., Yokoseki A., Miki Y., Hoshi Y., Ikeuchi T., Onodera O., Kakita A., Takahashi H. Acta Neuropathologica. 査読有, 118, 2009, 553-560
- ③ 横関明男, 譚春鳳, 田川朝子, 岡本幸市, 西澤正豊, 高橋均, 小野寺理, TAR DNA binding protein-43 遺伝子変異を伴った筋萎縮性側索硬化症, Dementia Japan, 査読無, 22 巻, 2008, 60-67
- ④ 譚春鳳, 横関明男, 小野寺理, 高橋均, 家族性 ALS と TDP-43, 神経内科, 査読無, 68 巻, 2008, 558-564
- ⑤ Yokoseki A., Shiga A., Tan CF., Tagawa A., Kaneko H., Koyama A., Eguchi H., Tsujino A., Ikeuchi T., kakita A., Okamoto K., Nishizawa M., Takahashi H., Onodera O. TDP-43 Mutation in Familial Amyotrophic lateral Sclerosis. Ann Neurol. 査読有, 63, 2008, 538-542

[学会発表] (計 4 件)

- ① 横関明男, 志賀篤, 小池佑佳, 石原智彦, 有泉優子, 横尾麻理子, 小野寺理, 西澤正豊, ALS 関連変異型 TDP-43 の機能と細胞毒性の検討, 第 50 回日本神経学会総会, 2009 年 5 月 21 日, 仙台市
- ② Yokoseki A., Shiga A., Tan CF., Tagawa A., Kaneko H., Koyama A., Eguchi H., Tsujino A., Ikeuchi T., kakita A., Okamoto K., Nishizawa M., Takahashi H., Onodera O. TDP-43 Mutation in Familial Amyotrophic lateral Sclerosis. Society for Neuroscience 2008 年 11 月 17 日, ワシントン DC
- ③ Yokoseki A., Shiga A., Tan CF., Tagawa A., Kaneko H., Koyama A., Eguchi H., Tsujino A., Ikeuchi T., kakita A., Okamoto K., Nishizawa M., Takahashi H., Onodera O. TDP-43 Mutation in Familial Amyotrophic lateral Sclerosis. 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 11 日, 東京
- ④ 横関明男, 志賀篤, 金子博之, 田川朝子, 譚春鳳, 柿田明美, 高橋均, 西澤正豊, 小野寺理, Bunina 小体を認める家族性 ALS に認めた TDP43 ミスセンス変異, 第 49 回

日本神経学会総会，2008年5月16日，  
横浜市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

[http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research\\_basic\\_002.html](http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research_basic_002.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横関 明男 (YOKOSEKI AKIO)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90515719

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

