

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15904

研究課題名（和文）TDP-43の機能異常に着目した運動ニューロン保護機構の解明とALS治療戦略

研究課題名（英文）Mechanisms of motor neuron homeostasis and ALS therapeutic strategies focusing on TDP-43 dysfunction.

研究代表者

長谷川 実奈美（Hasegawa, Minami）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00778764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：全長TDP-43に対しドミナントネガティブ活性（ドミネガ活性）を示すTDPsvの神経毒性の有無およびドミネガ活性の発現機序について検証した。本研究結果により、TDPsvのドミネガ活性は全長TDP-43と複合体を形成することにより、全長TDP-43ホモダイマー形成を競合的に阻害することに起因することがわかった。また、iPS細胞由来ニューロンにおいてTDPsvが神経毒性を示すことがわかった。よって通常発現が低く抑えられているTDPsvが一定量を超えた場合、TDP-43の機能異常が促進され、最終的に神経毒性へと繋がること示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSの9割を占める孤発性ALSにおいてTDP-43スプライシング機能の低下が見られていること、遺伝子変異の有無に関わらずほとんどのALS死後病理においてTDP-43の特徴的所見を示すことから、ALSでは原因に関わらず最終的にTDP-43の機能異常に収束することが示唆される。本研究結果はALSにおいて重要なTDP-43の機能維持メカニズムの解明に繋がる新たな知見を提供することができると考える。本知見をもとに今後はTDP-43の機能を是正するALS治療戦略や、TDP-43の機能をモニタリングしALS診断を可能とするバイオマーカーの開発等に繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined whether TDPsv, which exhibits dominant-negative activity against full-length TDP-43, is neurotoxic, and the mechanism of its dominant-negative activity. Our results indicate that the dominant-negative activity of TDPsv is due to its competitive inhibition of full-length TDP-43 homodimer formation. We also found that TDPsv is neurotoxic in iPS cell-derived neurons. Thus, it is suggested that if levels of TDPsv, whose expression is normally suppressed, are exceed a threshold, TDP-43 function may deviate from optimal range for over a long period of time, ultimately leading to the ALS-induced neurodegeneration over a long period of time.

研究分野：神経科学

キーワード：ALS TDP-43 スプライスバリエント

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 (ALS) は、運動ニューロン特異的な脱落により呼吸機能を含む運動機能を全廃に至らしめる最も悲惨な神経変性疾患の一つである。9 割以上の ALS 患者において、運動ニューロンに見られる不溶性構造物である封入体に、RNA 結合タンパク質 TDP-43 が含まれることが示されている (1)。さらに、ALS の大多数を占める孤発性 ALS 患者の脳内において、TDP-43 スプライシング機能の低下が検出された (2)。よって、ALS で運動ニューロンの脱落が起こるまでの過程において、共通して TDP-43 の機能異常が関与することが強く疑われるが、その分子メカニズムは未だ不明である。

TDP-43 は機能的スプライスバリエーションである全長 TDP-43 の比率を一定に保ち、発現量や機能を適正範囲に維持していると考えられている (3)。近年、マウスでは TDP-43 スプライスバリエーションの半分以上が機能的バリエーションであるものの、ヒトにおいては 10% にも満たないことが RNA-seq 解析により示された (4)。つまり、ヒトでは 9 割以上が機能的バリエーション以外のスプライスバリエーションであるにも関わらず、これらのスプライスバリエーションの機能や存在意義については不明な点が多い。これまでの本研究成果より、TDP-43 スプライスバリエーションの一つ (TDPsv-1) が翻訳され ALS 患者の脊髄運動ニューロンにおいて有意な局在パターン変化を示すこと、および TDPsv-1 が正常型 TDP-43 のスプライシング機能をドミナントネガティブに阻害することを見出している (Hasegawa-Ogawa et al. in preparation)。よって、ALS における TDP-43 機能異常および運動ニューロン変性には、TDPsv-1 によるドミナントネガティブ活性が関与する可能性について着想した。

2. 研究の目的

本研究は ALS における TDP-43 機能異常および運動ニューロン変性には TDPsv-1 のドミナントネガティブ活性が関与するという仮説のもと、その分子メカニズムを明らかとすることで TDP-43 機能異常を是正し運動ニューロンを保護する新規治療戦略を考案することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究期間において、TDPsv-1 の翻訳産物の機能および細胞内動態の解析、運動ニューロン恒常性維持への影響について検証した。

(1) TDPsv-1 のストレス顆粒 (SGs) 形成への影響

TDPsv-1 を HeLaS3 細胞に発現させると核内に顆粒を形成し、その多くが核内小体 PML body に局在することを見出している。PML body はミスフォールドタンパク質の分解を促進し神経細胞に対し保護的に働くことが示されている (5)。よって、TDPsv-1 の核内顆粒形成は細胞ストレスとなり得ることが示唆される。そこで、FLAG-TDPsv-1 を発現させた HeLaS3 細胞におけるストレス顆粒マーカー G3BP1 の陽性率を算出した。対照群として、TDPsv-1 とは別の TDP-43 スプライスバリエーションでドミナントネガティブ活性の弱い TDPsv-2 と比較した。また、TDPsv-1 は核及び細胞質の両方への細胞内局在を示すが、TDPsv の細胞内局在による G3BP1 陽性率についても算出し、TDPsv の細胞内局在による細胞ストレスの程度を比較した。

(2) iPS 細胞由来ニューロンにおける TDPsv-1 の毒性評価

ヒト iPS 細胞よりニューロンに分化させた (iNeurons)。レンチウイルスを用いて Venus、TDPsv-1-Venus、TDPsv-2-Venus を発現させ、レンチウイルス導入後 3 日および 7 日の MAP2 陽性ニューロンにおける神経細胞死マーカー Cleaved caspase-3 (CC3) の陽性率を比較した。

(3) TDPsv と全長 TDP-43 の複合体形成有無の検証

全長 TDP-43 は N-terminal domain (NTD) を介してホモダイマーを形成し標的に対するスプライシング機能を発揮することが示されている (6)。TDPsv-1 が全長 TDP-43 とヘテロダイマーを形成する場合、全長 TDP-43 ホモダイマーの不足が引き起こされることが示唆される。そこで、TDPsv-1 と全長 TDP-43 の複合体形成の有無を検証する為、FLAG-TDPsv-1 および全長 TDP-43-Venus を HEK293T に共発現させ、抗 FLAG-tag 抗体で免疫沈降を行い、抗 Venus 抗体でウエスタンブロットを行った。

(4) TDPsv-1 と全長 TDP-43 の複合体形成不全による TDPsv-1 のドミナントネガティブ活性への影響

TDPsv-1 の NTD に変異を導入したコンストラクト (NTDmt) を作製し、全長 TDP-43 との複合体形成が行われるか (4) と同様の手法で確認した。ここで TDP-43 は、GPSM2 や ATG4B など標的のイントロン中のエクソンに似た配列 (偽エクソン) の誤った選択を抑制する働きを持つことが知られている (2)。本研究においてこれまでに、TDPsv-1 を過剰発現させた細胞ではこれら

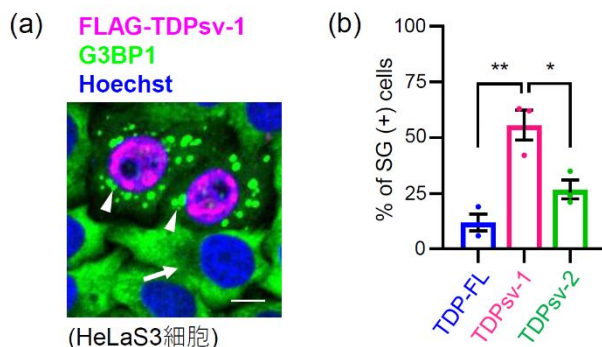
標的の偽エクソンの誤選択が促進されることから、TDPsv-1 が全長 TDP-43 に対しドミナントネガティブに機能阻害することが示唆されている (Hasegawa-Ogawa et al. in preparation)。これと同様の手法を用い、本計画では TDPsv-1 NTDmt を HEK293T に発現させ、偽エクソンの誤選択 = ドミナントネガティブ活性が見られるか RT-PCR により検証した。

4. 研究成果

(1) TDPsv-1 のストレス顆粒 (SGs) 形成への影響

FLAG-TDPsv-1 を HeLaS3 細胞に過剰発現させたところ、SGs マーカー G3BP1 陽性の細胞質内顆粒を認められた (図 1a)。この細胞質 SGs の陽性率を全長 TDP-43 (TDP-FL)、TDPsv-1、TDPsv-2 発現細胞において比較したところ、TDPsv-1 では有意な SGs 陽性率の上昇を認められた (図 1b)。さらに、SGs 陽性細胞において FLAG-TDPsv-1 が核内に顆粒状に局在するパターンの占める割合が多い傾向であった。このことから、TDPsv-1 の核局在は細胞にとってストレス状態とみなされ、SGs 形成を促進することが示唆された。

図 1. TDPsv-1 によるストレス顆粒形成の促進



- (a) FLAG-TDPsv-1 (マゼンタ) を過剰発現させた HeLaS3 細胞における G3BP1 陽性 SGs (緑)、核は Hoechst (青) で示した。矢頭および矢印は、SGs 形成細胞および非形成細胞をそれぞれ示した。スケールバーは 10 μm。
- (b) FLAG 陽性細胞 100 個あたりの G3BP1 陽性 SGs の陽性率。ANOVA 解析の後、Tukey の多重比較検定を行った (N=3 (各群につき 300 個の FLAG 陽性細胞)、平均値 ± SEM、*P<0.05、**P<0.01)。

(2) iPS 細胞由来ニューロンにおける TDPsv-1 の毒性評価

レンチウイルス感染後 3 日後および 7 日後の両方において、TDPsv-1 群では Venus および TDPsv-2 と比較して有意な CC3 陽性率の上昇を認められた (図 2a)。このことから、TDPsv-1 の過剰状態はニューロンの細胞死を引き起こすことが推察された。

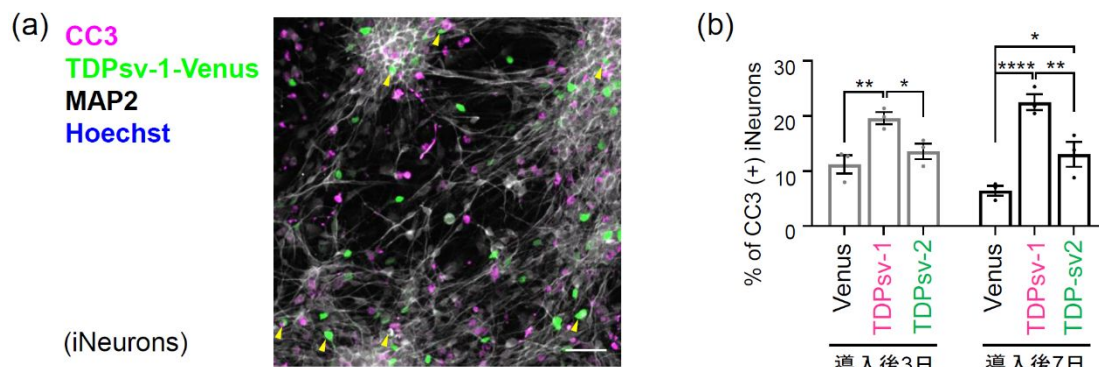


図 2. TDPsv-1 による神経毒性

- (a) TDPsv-1-Venus を過剰発現させた iNeurons (導入後 7 日)。TDPsv-1-Venus (緑)、CC3 (マゼンタ)、神経細胞マーカー MAP2 (白)、核は Hoechst (青) で示した。矢頭は CC3 陽性 TDPsv-1-iNeurons を示す。スケールバーは 50 μm。
- (b) TDPsv-1-iNeurons における CC3 の陽性率。ANOVA 解析の後、Sidak の多重比較検定を行った (N=3 (各群につき 300 個の Venus 陽性細胞)、平均値 ± SEM、*P<0.05、**P<0.01、****P<0.0001)。

(3) TDP^{sv}-1 と全長 TDP-43 の複合体形成有無の検証

TDP-FL-Venus と FLAG-TDP^{sv}-1 を HEK293T に共発現させ、免疫沈降法により両者のタンパク質複合体形成について検証した。その結果、TDP-FL と TDP^{sv}-1 との複合体形成が認められた (図 3a)。さらに、TDP^{sv}-1 は TDP-FL よりも TDP-FL との複合体形成能が高いことが示唆された。

(4) TDP^{sv}-1 と全長 TDP-43 の複合体形成不全による TDP^{sv}-1 のドミナントネガティブ活性への影響

TDP^{sv}-1 の NTD に変異を導入したコンストラクト (NTDmt) を作製し同様の検討を行ったところ、両者の相互作用はほぼ消失した (図 3b)。

TDP-FL と TDP^{sv}-1 のタンパク質相互作用を阻害するとこれと相関してこの偽エクソンはほぼ消失した (図 3c)。このことから、TDP^{sv}-1 によるドミナントネガティブ活性は、TDP-FL との競合的なヘテロダイマー形成により TDP-FL ホモダイマー不足が起こることによって引き起こされることが示唆された。

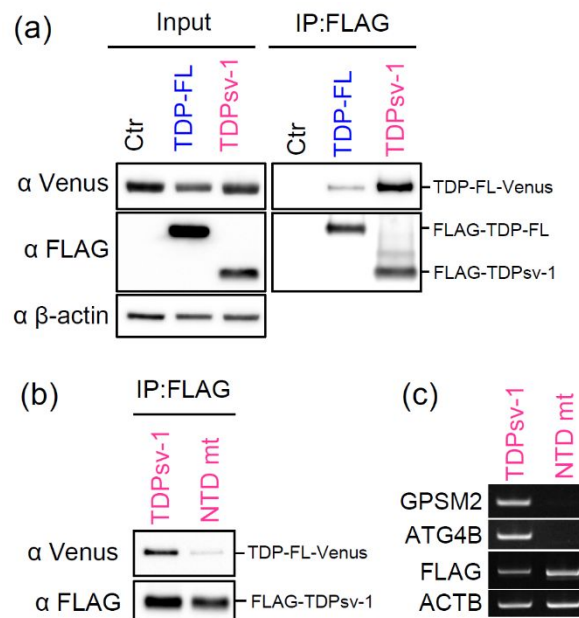


図3. TDP^{sv}-1のドミナントネガティブ活性とTDP-FLとの複合体形成能との相関

- (a) TDP^{sv}-1とTDP-FLのタンパク質相互作用。FLAG-TDP^{sv}-1とTDP-FL-VenusをHEK293Tに共発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降後、抗Venus抗体でウェスタンブロットを行った。
- (b) TDP^{sv}-1 NTD mtとTDP-FLのタンパク質相互作用。b)と同様の手法にて評価した。
- (c) GSPM2およびATG4Bの偽エクソン。FLAG-TDP^{sv}-1またはTDP^{sv}-1 NTD mtをHEK293Tに過剰発現させ、RT-PCRによりGSPM2とATG4Bの偽エクソンを検出した。

本研究により、生理的に発現する TDP-43 スプライスバリエーションの一つが翻訳されると細胞ストレスとして認識され、神経細胞死を引き起こすことが示唆された。また、この神経細胞死が起こるまでの過程には、TDP^{sv}-1 翻訳産物が正常型 TDP-43 のホモダイマー形成を競合的に阻害することによるスプライシング機能阻害が関与する可能性を示した。

ALS の病態として、一度運動障害を発症すると個体差はあるものの数年以内に急激な運動機能の悪化が認められることから、神経細胞環境が何らかのきっかけにより悪循環に陥ることが示唆されている。本研究で示した TDP^{sv}-1 のようなドミナントネガティブ活性を持つスプライスバリエーションの存在は、正常時は TDP-43 の機能を適正範囲に保つ生理的役割を担う可能性も考えられるものの、加齢等による TDP-43 の機能低下時にはさらなる TDP-43 の機能低下を招き、自己調節機構の破綻に関与することが考えられる。

今後は TDP-43 自己調節機構に影響する上流因子の解析や TDP-43 と相互調節を行う RNA 結合タンパク質の解析等、複合的な RNA 代謝調節機構の解明が期待される。

<引用文献>

- (1) Ling SC, Polymeridou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79: 416-438
- (2) Ling JP, Pletnikova O, Troncoso JC, Wong PC (2015) TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science* 349: 650-5
- (3) Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Konno T, Ishihara T, Onodera O (2018) Robustness and Vulnerability of the Autoregulatory System That Maintains Nuclear TDP-43 Levels: A Trade-off Hypothesis for ALS Pathology Based on in Silico Data. *Front Neurosci* 12: 28
- (4) Weskamp K, Tank EM, Miguez R, McBride JP, Gómez NB, White M, Lin Z, Gonzalez CM, Serio A, Sreedharan J, Barmada SJ (2020) Shortened TDP43 isoforms upregulated by neuronal hyperactivity drive TDP43 pathology in ALS. *J Clin Invest* 130: 1139–1155
- (5) Guo L, Giasson BI, Glavis-Bloom A, Brewer MD, Shorter J, Gitler AD, Yang X (2014) A cellular system that degrades misfolded proteins and protects against neurodegeneration. *Mol Cell* 55: 15-30
- (6) Mompeán M, Romano V, Pantoja-Uceda D, Stuani C, Baralle FE, Buratti E, Laurents DV (2017) Point mutations in the N-terminal domain of transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) compromise its stability, dimerization, and functions. *J Biol Chem* 292: 11992-12006

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 Minami Hasegawa-Ogawa, Hiroataka James Okano	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of the upstream and intron promoters of the gene encoding TAR DNA-binding protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88015-y	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Minami Hasegawa-Ogawa, Asako Onda-Ohto, Hiroataka James Okano
2. 発表標題 Functional segregation of neuronal ELAVL protein splicing isoforms in human cells and their involvement in ALS pathophysiology.
3. 学会等名 Neuro2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 核酸医薬とその使用	発明者 中村慎吾 森下えら 高田遼平 岡野J洋尚 長谷川実奈美 梨本正	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-121582	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------