

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06205

研究課題名(和文) 神経細胞が軸索を1本だけ持つ仕組みの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying dynein-dynactin-mediated axon specification

研究代表者

河田 純一 (Kawada, Junichi)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：00312207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Perry病は、TDP-43病理、パーキンソニズム、抑うつ等を示す希少性神経難病である。原因遺伝子産物DCTN1は、ダイニンモータを制御するダイナクチン複合体の最大サブユニットである。Perry病モデルとして変異型Dctn1ノックインマウスを作成したが、初代培養神経細胞が、軸索を複数持つことを発見した。TDP-43病理が変異型DCTN1により惹起される機構を調べると共に、軸索を1本に限局する仕組みの解明を目指している。Perryマウスで、パーキンソニズムと衝動制御障害を再現し、神経細胞形態・回路に顕著な異常を見出した。軸索維持の要となるTDP-43の局在・凝集制御機構を明らかにしつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軸索と樹状突起からなる神経極性は、神経機能に必要である。個々の神経細胞で、複数の樹状突起で受容・統合された情報を軸索1本へ伝達し、シナプス後細胞に出力するという、一方向性の情報伝達は、神経科学の基本原則である。何故、そしていかにして神経細胞は軸索を1本だけ持つのか、という問題は、基本的ながら手つかずのままである。今回、Perryマウスと患者脳内で、神経細胞が軸索を複数持つ可能性が浮上した。神経細胞が軸索を複数持つ場合、Perry病患者の知性は低いのでは、と予想されるが、実際は逆であり、発症までは、高い知性を保っている。認知症等への新規治療戦略として、軸索機能の制御技術を将来提供したいと考える。

研究成果の概要(英文)：Perry disease is a rare hereditary neurodegenerative disease, characterized symptomatically by parkinsonism and depression/apathy, and pathologically by TDP-43 proteinopathy. The causative gene DCTN1 encodes the largest subunit of the dynein complex. Dynein binds to dynein and regulates dynein-mediated retrograde transport. Although Perry disease-linked missense mutations impair microtubule-binding abilities of DCTN1, it remains unclear how DCTN1 mutations cause TDP-43 proteinopathy. We found that DCTN1 bound to TDP-43 and that Perry disease-linked mutations affected TDP-43-interacting ability of DCTN1 and induced TDP-43 aggregation. We have also established a mouse model of Perry disease. Interestingly, Perry mice revealed parkinsonism and a type of impulse control disorder. Furthermore, primary cortical and hippocampal neurons prepared from Perry mice had multiple axons. We have been analyzing how dynein and dynactin regulate single-axon specification in vitro and in vivo.

研究分野：神経科学

キーワード：神経極性 軸索 モデルマウス ダイナクチン ダイニン TDP-43 Perry病 タンパク凝集体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表者は、発生期の神経回路形成の分子機構に関して、軸索ガイダンス受容体 Roundabout (Robo)の細胞内輸送系に関する研究を行ってきた。一連の研究で、軸索先端から核方向に向かう逆行性輸送の重要性を認識し、その要となるダイニンモータ系に関連する神経変性疾患、Perry病に興味を持った。Perry病は、パーキンソン病様の臨床症状、抑うつ・アパシーと呼吸障害を特徴とする常染色体顕性の希少疾患である(現時点では、世界で約30家系)。残念ながら、致死率は事実上100%で、有効な治療法はまだ存在しない。

病理解析によれば、ほぼ全ての剖検脳で、中脳黒質を中心に TDP-43 異常凝集体が見られる。すなわち、Perry病は、臨床的にはパーキンソン病に相似ながら、病勢と分子病理は筋萎縮性側索硬化症(ALS)に類似しており、パーキンソン病とALSを結びつける立ち位置にある。主要なRNA結合タンパク質、TDP-43は、正常下では、細胞質核間を往復しながら、主に核内でRNAスプライシング制御と転写抑制を司るが、病的ストレス下では、核外に凝集体を形成する。その機構の解明が、新たな治療戦略の開発に必須と認識されている。

代表者のグループを含めた国際共同研究チームにより、原因遺伝子が dynactin subunit 1 (DCTN1)と特定された(2009)。DCTN1は、ダイニンモータを制御するアダプタ、ダイナクチン複合体の最大サブユニットである。Perry病の変異部位の近傍における別の変異により、筋萎縮性側索硬化症(ALS)に類似した運動ニューロン疾患が生じること、またDCTN1がALSのリスク因子でもあることから、DCTN1は、複数の神経変性疾患の発症機構に関与する可能性がある。従って、Perry病は希少疾患ながら、その発症機序の解明が孤発性の多くの疾患原因の特定に繋がるようなモデル疾患となりうるとも期待されて来た。Perry病患者は極少数であり、病態解明にはモデル動物確立が急務とされ、代表者グループが日本で最初にPerry病を報告した際の病因、p.G71A ミスセンス変異を導入したノックインマウスを作成した。

2. 研究の目的

本研究は、希少性神経変性疾患であるPerry病の研究を出発点として、神経変性機構と神経極性形成機構に迫るものである。まず、Perry型変異DCTN1がTDP-43病理を惹起する分子機序の解明を目指して、DCTN1がTDP-43間の相互作用を証明したいと考えた。さらに、細胞内のDCTN1とTDP-43の局在、動態、凝集体形成過程を免疫染色とライブイメージングにより解析した。また、Perry病のモデルマウス樹立を目指して、長らく研究努力を続けてきたが、今回、Dctn1 (G71A)ノックインマウス系統を作成し、その神経病理と動物行動的特性を解析した。

意外なことに、このマウスから調製した初代培養神経細胞が、軸索を複数持つことを見出した。そこで、Perry変異型DCTN1がTDP-43凝集体形成を惹起する分子構造基盤を明ら

かにすると共に、Perry マウスにおける神経回路異常を確認し、さらに何故、いかにして軸索が複数生じるのか、分子機序の解明を目指した。

3 . 研究の方法

モデル細胞であるヒト骨肉腫 U2OS 細胞とサル線維芽細胞 COS-7 さらに iPS 細胞への遺伝子導入を行い、DCTN1-TDP-43 結合の生化学的、細胞生物学的、ライブイメージング解析を行った。

また、世界で約 30 家系しか存在しない Perry 病の発症機構解明に向けて、マウスモデルの確立が急がれていた。我々の先行研究では、ヒト DCTN1 (G71A) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成したものの、動物モデルとしては不完全なレベルに留まった。本研究では、Perry 病患者により近い Dctn1 (G71A) ノックインマウス系統を作成して、モデル動物としての特性を現在も検討中である。

代表者の専門分野である神経発生的解析を行う過程で、Perry 変異型 Dctn1 (G71A) knock-in マウス (Perry マウス) から調製した初代培養神経細胞の多数が、軸索を複数持つことを見出した。このマウスモデルを用い、軸索を 1 本に限定する仕組みを解明すると共に、このマウスでは、行動がいかに変化し、神経変性が生じるかという観点から解析を進めた。

4 . 研究の成果

まず、DCTN1 が直接的かつ多価的な様式で TDP-43 に結合し、TDP-43 細胞質-核輸送と凝集体形成を制御することを証明した。Perry 病等の病的条件下では、DCTN1-TDP43 結合が異常強化され、TDP-43 細胞内輸送の破綻と同時に TDP-43 異常凝集体形成の促進効果が生じると判明した。iPS 細胞から分化させた興奮性ニューロンにおいても、DCTN1 変異体と野生型 TDP-43 の共発現で、TDP-43 の細胞質内への異所分布と凝集体形成を再現できた。DCTN1 凝集体形成と TDP-43 凝集体形成には直接的な因果関係はなく、DCTN1 凝集体形成後、2 次的に TDP-43 凝集が生じる、と長らく予想されてきたが、実際には密接な関連があり、Perry 変異型 DCTN1 により、TDP-43 凝集化が惹起されると、今回初めて判明した。以上の成果は、2021 年に報告した (International Journal of Molecular Sciences 誌)。

続いて、Dctn1 (G71A) ノックインマウス (ヘテロ接合体) の神経病理学・動物行動解析を行い、本モデルが Perry 病の初期過程を再現することが判った。まず、行動解析を行い、Dctn1 (G71A) マウスモデルが統計学的に有意な運動障害と抑うつを示した。また、免疫組織化学染色実験により、中脳黒質におけるチロシンヒドロゲナーゼ免疫反応性が減少し、ドパミンニューロンの機能低下、もしくは数の低下が伺えた。しかしながら、呼吸障害から生じる突然死と体重減少は起こらず、Perry 病の後期過程は見られないと考えられた。これらの成果を Neuroscience Letters 誌にて発表した。

更に、胚性致死とも予想されていた Dctn1 (G71A) ホモ接合体マウスの作出によろやく成

功し、解析プラットフォームとしての有用性が高まった。肉眼レベルの脳形態の変化、パーキンソニズムと衝動制御障害等の精神症状、といった Perry 病の臨床症状に相似の表現型を検出できた。また、Perry マウス脳について Golgi 染色を行い、神経細胞の形態と神経回路パターン、そして層構造に顕著な異常を見出した。一方、Dctn1(G71A)神経細胞が軸索を複数持つ現象の厳密な証明として、初代培養系で、軸索マーカーTau1 抗体と SIM312 抗体、樹状突起マーカーMAP2 抗体を用いて免疫染色を行った。1 個の神経細胞が、軸索を複数持つ上に、軸索と樹状突起の存在様式が特徴的であったが、これらの表現型には、発生時期に特異性があることが判明した。こうして、かなり意外な発見だったと言える、Perry 型神経細胞が確かに軸索を複数持つ現象を確認することができた (図 1)。

DCTN1(G71A)と TDP-43 の化学・構造的変化が TDP-43 凝集化に繋がる分子機序を調べる一方、ダイニン調節因子で細胞極性に関係すると指摘されてきた分子群(DCTNs, BICD2, PAFAH1B1/LIS1)のダイニン機能制御に関する解析と、軸索維持の要となる主要 RNA 結合タンパク質としての TDP-43 の機能・凝集制御に関する解析を進めている。今後、軸索を複数持つ神経細胞から成る脳では、回路パターンと動作機構と個体レベルの行動がいかに連動して変化し、神経変性が生じるか、という観点から解析を続けたい。関連テーマについて、総説論文 2 報を発表した。

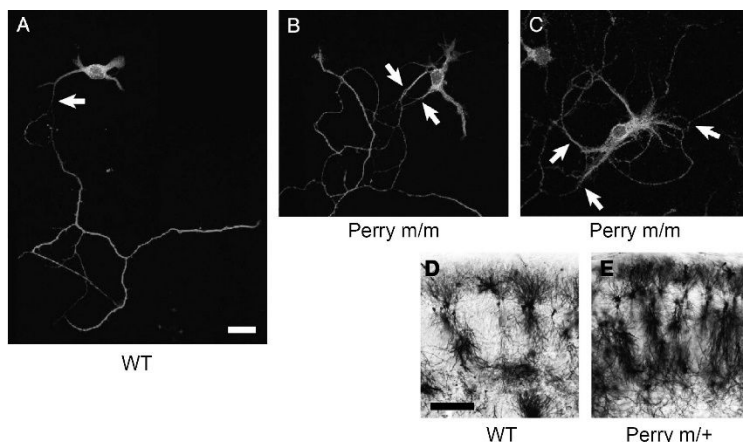


図 1 (右) Perry マウスの神経極性と形態の異常。(A-C) 野生型(WT)と Perry マウスホモ接合体(m/m)由来の大脳皮質神経細胞の Tau1/MAP2 免疫染色(実際はカラー)。軸索を矢印で示す。

(D, E)ゴルジ染色。野生型と Perry ヘテロ接合体の海馬 CA1 の神経細胞形態。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuasa-Kawada, J., Konoshita-Kawada, M., Tsuboi, Y., and Wu, J. Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Neuronal guidance genes in health and diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Protein & Cell	6. 最初と最後の頁 238-261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/procel/pwac030.	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 該当する
1. 著者名 Deshimaru, M., Kinoshita-Kawada, M. Kubota, K., Watanabe, T., Tanaka, Y., Hirano, S., Ishidate, F., Hiramoto, M., Ishikawa, M., Uehara, Y., Okano, H., Hirose, S., Fujioka, S., Iwasaki, K., Yuasa-Kawada, J., Mishima, T. and Tsuboi, Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 DCTN1 binds to TDP-43 and regulates TDP-43 aggregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22083985.	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 該当する
1. 著者名 Deshimaru M, Mishima T, Watanabe T, Kubota K, Hosoi M, Kinoshita-Kawada M, Yuasa-Kawada J, Ikeda M, Mori M, Murata Y, Abe T, Enjoji M, Kiyonari H, Kodama S, Fujioka S, Iwasaki K, Tsuboi Y.	4. 巻 764
2. 論文標題 Behavioral profile in a Dctn1G71A knock-in mouse model of Perry disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136234.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mishima T, Yuasa-Kawada J, Fujioka S, and Tsuboi Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Perry disease: bench to bedside circulation and a team approach.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines12010113.	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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshio Tsuboi, Takayasu Mishima, Junichi Kawada
2. 発表標題 Unveiling link between TDP-43 and dynactin: lessons from Perry disease
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河田純一
2. 発表標題 Perry病の発症機構解明に向けて
3. 学会等名 第24回七隈ADPD研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三嶋崇靖, 河田純一, 坪井義夫
2. 発表標題 Perry病におけるダイナクチンおよびTDP-43凝集機構解明に向けて
3. 学会等名 カテコールアミンと神経疾患研究会2024（招待講演）
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			
米国	Northwestern University			
米国	The Scripps Research Institute			