

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06857

研究課題名（和文）ALSの分子病態解明と治療法開発を目指した直鎖ユビキチンの新規特性解析

研究課題名（英文）Characterization of linear ubiquitin chain for the elucidation of the molecular pathogenesis of ALS and the development of therapeutic strategies.

研究代表者

寺脇 正剛 (Terawaki, Seigo)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：60437217

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）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニューロンの細胞死により、筋萎縮と運動麻痺が惹き起こされ、呼吸不全などにより発症から数年で死に到る難病である。ALS原因遺伝子のひとつである変異型TDP-43は、細胞内で凝集体を形成することで、神経細胞死を誘導していると考えられている。本研究では、断片化したTDP-43が細胞質内において直鎖ユビキチン化されていること、直鎖ユビキチン化を担う酵素LUBACを欠損させた細胞では変異型TDP-43の凝集が劇的に抑制されること、我々が開発したLUBAC特異的阻害剤であるHOIPIN-8がTDP-43の凝集を抑制できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSではこれまでに複数の原因遺伝子が同定され、発症メカニズムも明らかにされつつあるが、根本的な治療法は未だ開発されていない。ALS患者の神経細胞内に形成され神経細胞死の原因とされているタンパク質凝集体成分のひとつとしてTDP-43が知られている。今回の研究により凝集体形成にはTDP-43の直鎖ユビキチン化が重要であることが明らかとなった。細胞内で直鎖状のユビキチンを付加する酵素はLUBACのみである。すなわち我々が開発したLUBAC阻害剤であるHOIPIN-8はTDP-43の凝集形成を阻害し、ALSの発症や進行を抑える薬剤となりうることを示された。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an intractable disease that causes muscle atrophy and motor paralysis due to motor neuron cell death, leading to death within a few years of onset by respiratory failure. Mutant TDP-43, one of the causative genes of ALS, is thought to induce neuronal cell death by forming aggregates in cytosol. The mutant TDP-43 is thought to induce neuronal cell death by forming intracellular aggregates. In this study, we have shown that fragmented TDP-43 is highly modified with linear ubiquitin chain in the cytoplasm, aggregation of mutant TDP-43 is dramatically suppressed in cells lacking the E3 enzyme responsible for linear ubiquitination, LUBAC, and the LUBAC-specific inhibitor we developed, HOIPIN-8 can suppress the TDP-43 aggregation.

研究分野：分子細胞生物学，免疫学

キーワード：神経変性疾患 神経炎症 ユビキチン プロテノパチー

1. 研究開始当初の背景

遺伝性筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位および下位運動ニューロンが侵される進行性の神経変性疾患であり、致死的な転帰をたどるが、いまだに有効な治療法が確立されていない。最初に責任遺伝子として SOD1 が同定されたが、2006 年には孤発性 ALS 患者の神経細胞でユビキチン化された封入体の主要なタンパク質として別の原因遺伝子 TAR DNA-Binding Protein 43 (TDP-43)が同定された。その後家族性 ALS においても TDP-43 の変異が次々と発見され、TDP-43 による ALS の病態解明は新たなステージに入った。TDP-43 は核内移行シグナルと核外移行シグナルを同時にもつ RNA 結合因子であり、RNA スプライシングやノンコーディング RNA を介した遺伝子の発現制御、リボソームタンパク mRNA の軸索輸送や、ストレス顆粒の形成によるストレス応答を担っていると考えられている。しかしながら TDP-43 がどのような機序によって凝集体を形成するのか、またその凝集によってどのように細胞死が惹起されるのか、詳細が明らかになっていなかった。TDP-43 プロテオパチーに起因する ALS の治療法開発にはこれらの分子機序の解明とそれに対応する薬剤の開発が必要である。

2. 研究の目的

TDP-43 の遺伝的変異はほぼ ALS の発症と相関するため、TDP-43 は一部の ALS 症例の直接的な原因となっていると考えられる。また非 SOD1 遺伝子変異型の ALS においても、TDP-43 の変異の有無にかかわらず神経細胞内において TDP-43 の凝集体が観察される TDP-43 プロテオパチーが認められることから、TDP-43 の凝集、および機能異常が ALS 発症の原因であると考えられるが、TDP-43 の凝集メカニズムやそれによる ALS の発症メカニズムはまだ完全には解明されていない。

われわれはこれまでに炎症性応答を担う転写因子 NF- κ B の活性化にかかわる E3 リガーゼ複合体 LUBAC とそれによって形成される直鎖型のポリユビキチン鎖が関わる疾患について研究を行ってきた。その過程で ALS 患者に認められる神経細胞内封入体に直鎖ユビキチン鎖が認められること、また *in vitro* の実験系では筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子の一つとされる TDP-43 タンパクの神経細胞における凝集が LUBAC の活性化により亢進し、逆に LUBAC の特異的阻害剤によって減弱することを見出した。本研究では TDP-43 の異常による ALS 発症メカニズムにおける LUBAC の寄与、および動物モデルを用いた LUBAC 阻害剤による ALS の発症抑制や根本的治療の可能性について検討することを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 直鎖ユビキチン鎖が TDP-43 凝集に与える生化学的影響の検討

TDP-43 を過剰発現させると一部の細胞内にユビキチン陽性の凝集体が形成されることが知られている。われわれは、ALS で報告がある TDP-43 変異体 (G298S, A315T, M337V, Q343R)、および切断型 TDP-43 を GFP で標識した発現ベクターを作製し、マウス神経細胞株である Neuro2A に発現させて、TDP-43 の凝集体形成に与える影響や、付加されるユビキチン鎖の種類についてウェスタンブロッティングによる生化学的解析、および共焦点蛍光顕微鏡による画像解析を行った。また CRISPR-Cas9 法により直鎖ユビキチン化を担う E3 酵素 LUBAC の活性中心を持つ HOIP を欠失させた Neuro2A 細胞を作製し、TDP-43 の凝集体形成における直鎖ユビキチンの寄与を検討した。同様にわれわれが開発した LUBAC の特異的阻害剤である HOIPIN-8 が TDP-43 の凝集体形成に与える影響についても検討を行った。

(2) TDP-43 がもたらす LUBAC 活性の亢進による神経炎症応答と ALS 病態への関与

神経変性疾患においては、神経炎症がもたらす細胞死が原因である可能性も指摘されている。直鎖ユビキチン化された凝集 TDP-43 と NF- κ B を介した炎症性シグナル経路との間にクロストークがあるか検討するため、Neuro2A 細胞において NF- κ B レポーターアッセイ系を構築するとともに、LUBAC 阻害剤が NF- κ B を介した炎症応答に与える影響について評価を行った。

(3) ALS マウスモデルに対する LUBAC 阻害剤による治療効果の検討

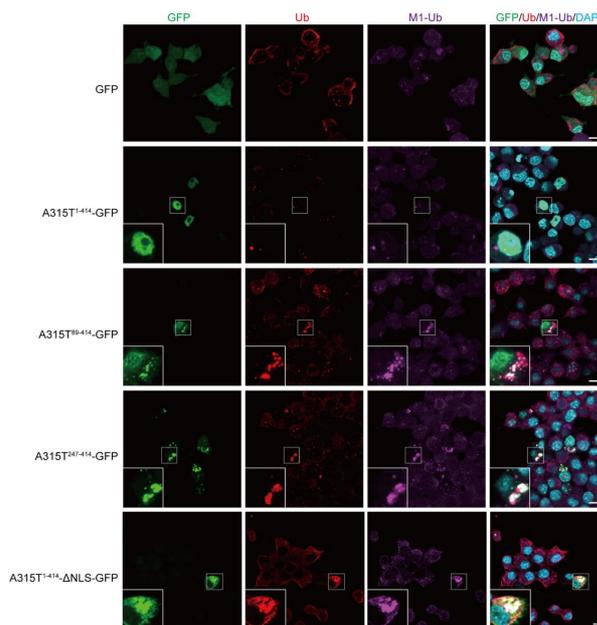
培養細胞を用いた *in vitro* 実験系により直鎖ユビキチン化が TDP-43 の凝集体形成に与える影響、および神経炎症シグナルに対する影響を評価したのち、ALS モデルマウスである変異型ヒト TDP-43(A315T)トランスジェニックマウスを用いて、LUBAC 阻害剤による治療実験を行った。ALS 発症前後のマウスにマイクロポンプを用いて LUBAC 阻害剤を継続的に投与し、生存曲線の比較を行った。またインバーテッドグリッドテストやワイヤハンギングテストなどの運動機能試験を行い運動機能の治療効果を評価するとともに、脳や脊髄の組織染色による病理組織解析を行った。

4. 研究成果

ALS 関連変異のうち A315T、G298S、M337V、Q343R の各変異を導入したヒト TDP-43 の発現ベクターを構築し、マウス神経芽細胞株である Neuro2A 細胞に導入して、凝集体の形成を免疫蛍光染色により評価した。その結果、全長型の TDP-43 はおもに核内に局在し、ユビキチン陰性で目立った凝集体形成は認められなかった一方、カルパインやカスパーゼにより部分切断されて生じるとされている切断型 TDP-43 では顕著な細胞内凝集体が形成され、それらは直鎖ユビキチン陽性であった。さらに核移行シグナルを破壊した TDP-43 は全長でも細胞内に局在して直鎖ユビキチン陽性の凝集体を形成することが明らかとなった。これらの事は TDP-43 の切断による核移行シグナルの喪失が C 末端側の細胞質局在と凝集体形成の起因となっていることを示唆している (図 1)。

【図 1】

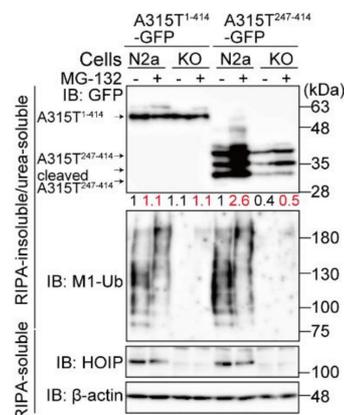
Neuro2A 細胞に発現させた切断型 TDP43(A315T)は直鎖ユビキチン(M1-Ub)陽性の細胞内凝集体を形成する。(スケールバー 10 μ m)



Neuro2A に変異型 TDP-43 (A315T) を発現させ、可溶性画分および不要性画分のそれぞれについて TDP-43 の直鎖ユビキチン化をウェスタンブロッティングにより検討したところ、直鎖ユビキチン化は断片型の変異 TDP-43 においてより顕著であり、大部分が界面活性剤不溶性画分において認められた。ゲノム編集により直鎖ユビキチンを生成する E3 リガーゼ複合体 LUBAC の活性中心である HOIP を欠損したマウス神経芽細胞株 Neuro2A を作製し、この細胞に TDP-43 を発現させたところ、野生型の Neuro2A 細胞に発現させた場合と比較して有意に細胞内の凝集体が減少した。これは直鎖ユビキチン鎖が TDP-43 の凝集体形成に関わっていることを強く示唆している。(図 2) さらにわれわれが開発した LUBAC の特異的阻害剤 HOIPIN-8 で細胞を処理すると、濃度依存的に TDP-43 の凝集体形成が抑制された。

【図 2】

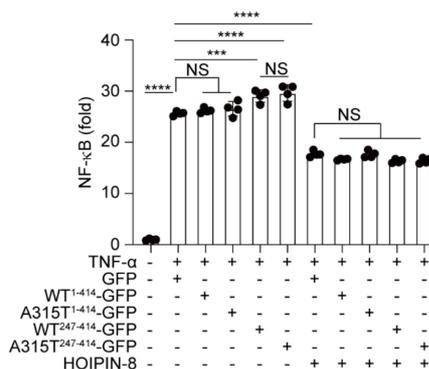
Neuro2A(N2a)細胞に TDP-43 を発現させ、可溶性画分(RIPA-soluble)と不溶性画分(RIPA-insoluble/urea-soluble)それぞれについて GFP(=TDP-43)と直鎖ユビキチン(M1-Ub)についてプロットした。不要性画分には断片化が進み、高度に直鎖ユビキチン化された TDP-43 が多く含まれているが、HOIP 欠損細胞(KO)では凝集タンパクが著しく減少している。



Neuro2A 細胞を用いたレポーターアッセイの結果、TDP-43 の凝集体形成は TNF- α で刺激した Neuro2A 細胞における NF- κ B の活性化を亢進させ、この効果も HOIPIN-8 が抑制しうることを NF- κ B の活性測定から明らかとなった。(図 3) これらの結果は TDP-43 の直鎖ユビキチン依存的な凝集体形成が神経細胞における炎症に関与しており、LUBAC の活性阻害が TDP-43 の凝集体形成や神経炎症を抑制することによって ALS の治療に応用できる可能性を示唆している。

【図 3】

Neuro2A 細胞における NF- κ B レポーター活性。凝集体を形成しやすい TDP-43 ほど TNF- α によって誘導された NF- κ B の活性をより強く促進する傾向がある。LUBAC 阻害剤である HOIPIN-8 は TDP-43 による炎症性 NF- κ B 促進効果を完全に抑制した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sato Yusuke, Terawaki Seigo, Oikawa Daisuke, Shimizu Kouhei, Okina Yoshinori, Ito Hidefumi, Tokunaga Fuminori	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of heterologous ubiquitination including linear ubiquitination in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2023.1089213	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 -
1. 著者名 Zhang Qiang, Terawaki Seigo, Oikawa Daisuke, Okina Yoshinori, Usuki Yoshinosuke, Ito Hidefumi, Tokunaga Fuminori	4. 巻 11
2. 論文標題 Suppression of Linear Ubiquitination Ameliorates Cytoplasmic Aggregation of Truncated TDP-43	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2398 ~ 2398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11152398	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 -
1. 著者名 Oe Yukako, Kakuda Keita, Yoshimura Shin-ichiro, Hara Naohiro, Hasegawa Junya, Terawaki Seigo, Kimura Yasuyoshi, Ikenaka Kensuke, Suetsugu Shiro, Mochizuki Hideki, Yoshimori Tamotsu, Nakamura Shuhei	4. 巻 18
2. 論文標題 PACSLN1 is indispensable for amphisome-lysosome fusion during basal autophagy and subsets of selective autophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1010264	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 -
1. 著者名 Vale?ka Jan, Camosseto Voahirana, McEwan David G., Terawaki Seigo, Liu Zhuangzhuang, Strock Eva, Almeida Catarina R., Su Bing, Dikic Ivan, Liang Yinming, Gatti Evelina, Pierre Philippe	4. 巻 8
2. 論文標題 RUFY4 exists as two translationally regulated isoforms, that localize to the mitochondrion in activated macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 202333 ~ 202333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsos.202333	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 Miyashita Hirohisa, Oikawa Daisuke, Terawaki Seigo, Kabata Daijiro, Shintani Ayumi, Tokunaga Fuminori	4. 巻 12
2. 論文標題 Crosstalk Between NDP52 and LUBAC in Innate Immune Responses, Cell Death, and Xenophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.635475	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 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 及川大輔, 張強, 寺脇正剛, 翁良徳, 臼杵克之助, 徳永文稔
2. 発表標題 直鎖状ユビキチン鎖生成酵素を標的とした阻害剤開発と疾患治療薬としての基礎検討
3. 学会等名 第74回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張強, 寺脇正剛, 及川大輔, 翁良徳, 臼杵克之助, 徳永文稔
2. 発表標題 The inhibition of LUBAC mitigates amyotrophic lateral sclerosis-associated TDP-43 aggregation
3. 学会等名 第95回 生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qiang Zhang, Seigo Terawaki, and Fuminori Tokunaga
2. 発表標題 H01PIN-8, a chemical inhibitor for linear ubiquitination, suppresses ALS-related TDP-43 aggregation and inflammatory responses in neuronal cells
3. 学会等名 第15回 日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seigo Terawaki, Qiang Zhang, Daisuke Oikawa, Bangzhong Lin, Kazuto Nunomura, Shinsuke Komagawa, Yoshinosuke Usuki, Fuminori Tokunaga
2. 発表標題 LUBAC ubiquitin ligase complex and linear ubiquitination facilitate cytoplasmic aggregation of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated TDP-43
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.omu.ac.jp/med/medbiochem/research/index.html https://www.omu.ac.jp/med/medbiochem/result/result.html
--

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
---------	---------