

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07284

研究課題名（和文）TDP-43リン酸化に着目した神経細胞死機構解明とALS/FTD治療戦略の構築

研究課題名（英文）Analysis of cell death mechanisms of ALS/FTD via phosphorylation of TDP-43

研究代表者

名和 幹朗（Nawa, Mikiro）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10398620

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）：本研究では、新規に同定したTDP-43リン酸化部位に着目し、リン酸化の制御機構の解析と、培養細胞やマウスを用いて新規リン酸化部位でのリン酸化の意義を解析した。新規リン酸化部位におけるリン酸化はTDP-43の細胞毒性に必須であることを明らかにした。さらに、新規リン酸化部位をAlaに置換したTDP-43変異体を発現するマウスは運動機能異常が認められないことを明らかとした。また、新規リン酸化部位のリン酸化酵素の同定をキナーゼ阻害剤ライブラリーのスクリーニングにより試みたが、TDP-43誘導性細胞死を抑制可能なキナーゼを複数同定出来たものの、新規リン酸化部位のリン酸化酵素の特定には至らなかった。

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や前頭側頭型認知症では細胞内にTDP-43がリン酸化された状態で蓄積することが知られているが、TDP-43のリン酸化と細胞死の直接的な関連性については不明な点が多かった。本研究では、TDP-43が誘導する細胞死に必須な新規リン酸化部位を同定した。また、TDP-43誘導性の細胞死を抑制する複数のキナーゼの同定にも成功し、TDP-43のリン酸化をターゲットとした筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭型認知症の治療法につながる知見を得た。

研究成果の概要（英文）：We focused on and investigated the mechanism(s) of independently identified phosphorylation sites of TDP-43 using cell lines and animal models. We have shown that the novel phosphorylation sites of TDP-43 were essential for TDP-43-induced cell death. Next, we generated a series of substitution mutant mice in which phosphorylation sites were replaced by Ala, and the mutant mice showed no abnormalities in motor function. We also attempted to identify the kinase of the new phosphorylation sites by screening a kinase inhibitor library. Although we obtained several kinases that could inhibit TDP-43-induced cell death, we could not identify the kinase at the sites.

研究分野：神経細胞死

キーワード：リン酸化 TDP-43 筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭型認知症

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は進行性に運動神経細胞が変性・脱落することにより身体中の筋肉が動かせなくなる神経変性疾患である。前頭側頭型認知症(FTD)もまた神経変性疾患のひとつであるが、前頭葉や側頭葉が萎縮することにより、認知機能の低下や、人格変化や行動異常を示す。ALSとFTDでは神経の変性部位や病態などが大きく異なるが、両疾患を併発する患者が存在し、さらには原因遺伝子の一部や疾患に関わるとされる細胞内封入体の構成成分が一致するなど、高い共通性が見られる。両疾患に共通する原因因子の一つである TAR DNA binding protein 43 kDa(TDP-43)は、本来ならば核で RNA のスプライシング等の機能を発揮するが、ALS や FTD の神経細胞では、細胞質に高度にリン酸化を受けた状態で蓄積することが知られており、TDP-43 のリン酸化と疾患発症との関連性が示唆されている。しかし、TDP-43 のリン酸化と神経細胞死との直接的な関係性は不明であった。研究代表者らは、TDP-43 が細胞死を誘導する条件下で、リン酸化される TDP-43 のモチーフ探索を行い、複数の TDP-43 の新規リン酸化部位の同定に成功した。さらに、これら新規リン酸化部位をアミノ酸置換により欠損させた TDP-43 変異体では細胞死誘導がほぼ完全に抑制されることを明らかとしてきた。しかし、新規リン酸化部位のリン酸化制御機構と、ALS や FTD 発症機序への関与は未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、1)同定した新規リン酸化部位の制御機構を分子レベルで検討し、両疾患の発症・病態との関連性の解明と、2)ALS/FTD 治療薬確立を目指して、細胞死誘導に関わる TDP-43 リン酸化を抑制する薬剤や化合物の探索を目的とする。

3. 研究の方法

(1)新規リン酸化部位での TDP-43 リン酸化メカニズムの解明

新規リン酸化部位周囲のアミノ酸配列を元に候補キナーゼを絞り込み、TDP-43 の直接的な相互作用を確認した。これに加え、キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いて、TDP-43 が誘導する細胞死を抑制するキナーゼ阻害剤について、TDP-43 のリン酸化を抑制するか検討した。また、野生型とリン酸化欠損変異体間で異なる結合分子の中からリン酸化制御に関与するキナーゼの同定を質量分析により行なった。

(2)新規リン酸化部位でのリン酸化が TDP-43 分子の機能にどのような影響を与えるかの検討

リン酸化 TDP-43 の細胞内凝集体は、神経細胞死を誘導することが示唆されている。そこで、同定したリン酸化部位を欠損する TDP-43 変異体と野生型とで凝集能の差異を検討した。

(3)個体レベルでの TDP-43 リン酸化と疾患の発症や病態との関連性解明

家族性 ALS に関連する A315T 変異を持つ TDP-43 トランスジェニックマウスは ALS/FTD 病態を模倣することから、広く病態モデルとして使用されている。そこで、新規リン酸化部位が疾患の発症や進行に与える影響を明らかとするため、A315T 変異に加え、新規リン酸化部位を Ala に置換した変異体のトランスジェニックマウスを作製し、運動機能異常や寿命の観察を行った。

4. 研究成果

(1)新規リン酸化部位での TDP-43 リン酸化メカニズムの解明

新規リン酸化部位周囲のアミノ酸配列からキナーゼを絞り込み、候補キナーゼの阻害剤を用いて TDP-43 のリン酸化を抑制するか検討した結果、新規リン酸化部位のリン酸化を制御するキナーゼの特定には至らなかった。新規リン酸化部位でのリン酸化は、細胞死に必須であることから、TDP-43 が誘導する細胞死を抑制する化合物の探索を 200 化合物からなるキナーゼ阻害剤ライブラリーを用いて行なった。その結果、19 の化合物が TDP-43 の細胞死を抑制した。19 のヒット化合物はそれぞれが複数のキナーゼを抑制可能であることから、複数の化合物に共通するターゲットキナーゼを絞り込み、IC50 の高いキナーゼから順に、キナーゼ特異的な阻害剤を用いて TDP-43 のリン酸化を抑制するか検討した。その結果、新規リン酸化部位におけるリン酸化を抑制可能なキナーゼの特定には至らなかった。今後は、IC50 の低いものについても解析を行う予定である。一方で、TDP-43 の細胞死を抑制可能なキナーゼの同定は、今後 ALS や FTD における TDP-43 誘導性の神経細胞死をターゲットにした治療薬開発に応用可能であると考えられる。

(2)新規リン酸化部位でのリン酸化が TDP-43 分子の機能にどのような影響を与えるかの検討
研究代表者が所属する研究室で構築済みの小化合物による TDP-43 相分離誘導技術 (Yamanaka *et al.*, *Lab. Invest.*, 2021) を用いて TDP-43 の凝集性に新規リン酸化部位でのリン酸化が与える影響を観察した。具体的には、DmrB ドメインを結合した野生型あるいは、新規リン酸化部位を Ala に置換し欠損させた Ala-TDP-43 を細胞に発現させ、AP20187 処理後、FRAP アッセイを行なった。その結果、野生型 TDP-43 は AP20187 処理により、核から細胞質へ移行した。また、FRAP アッセイの結果、野生型 TDP-43 は退色部位の蛍光の回復度合いが低下したことから、分子の流動性が低下していることが示唆された。一方で、Ala-TDP-43 は AP20187 処理で核から細胞質への移行は認められたが、野生型の様な分子の流動性の低下は認められなかった。このことから、新規リン酸化部位でのリン酸化が TDP-43 の細胞内での分子挙動に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

(3)個体レベルでの TDP-43 リン酸化と疾患の発症や病態との関連性解明

家族性関連 A315T 変異 TDP-43 は培養神経細胞に発現させると細胞死を引き起こす。一方で、A315T 変異に加えて新規リン酸化部位を Ala に置換した A315T-Ala-TDP-43 は細胞死を惹起しなかった。また、mouse Thy-1 プロモーターで TDP-43 を過剰発現させると ALS/FTD 病態を再現可能であることが以前に報告されている (Scherz *et al.*, *PLoS One*, 2018)。そこで、新規リン酸化部位におけるリン酸化が発症や症状進行に寄与するか検討するため、mouse Thy-1 プロモーターを用いて A315T-TDP-43 と A315T-Ala-TDP-43 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。A315T-TDP-43 発現マウスは生後数週齢で下肢の振戦が認められたが、A315T-Ala-TDP-43 マウスは 40 週齢時点でも下肢の異常は認められなかった。このようなことから、新規リン酸化部位におけるリン酸化は *in vitro* での神経細胞毒性のみならず、*in vivo* における神経変性にも重要な役割を果たしていることが考えられた。

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 Shinya Kusakari, Mikiro Nawa, Yuichi Hashimoto, Masaaki Matsuoka	4. 巻 13
2. 論文標題 CLSPCOL rescues Alzheimer's disease mouse models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Neuroscience	6. 最初と最後の頁 11-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/tnci-2022-0209	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0件

〔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
---------	---------