

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19442

研究課題名（和文）細胞老化から解く、真のTDP-43プロテノパチー分子機構への挑戦

研究課題名（英文）Challenges to the true molecular mechanism of TDP-43 proteinopathy from the aspect of cellular senescence.

研究代表者

加藤 泰介（Kato, Taisuke）

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：30598496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：TDP-43細胞質封入体はTDP-43プロテノパチーにおける神経変性の原因であると推定されているが、未だにその機構が明らかになっていない。本研究はTDP-43細胞質封入体の形成メカニズムとして細胞老化の関与を疑い、細胞老化に伴って生じる細胞質漏出核酸が封入体形成のシードとなる可能性を探った。本研究の成果として、TDP-43封入体形成は細胞老化誘導法選択的に誘導され、放射線照射法によって強く誘導されること、細胞質二本鎖DNA分子がTDP-43封入体と高度に共局在すること、そして、細胞老化に伴う反復配列を含む漏出DNA分子とTDP-43封入体形成との関連を示唆するデータを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TDP-43がALS・FTLDなどの封入体構成成分であることが2006年に同定されて以降、未だにTDP-43細胞質封入体の形成機構が不明のままである。理由は、人為的発現操作なしでこれを再現できるモデルがなかったためである。申請者が解析に用いた本研究のモデルでは、外部からの遺伝子導入を介さずに、内在性因子の変動のみでTDP-43プロテノパチーが再現されている。この現象のメカニズムの解明は、これまで世界中で用いられてきた古典的な人工モデル体型を再編する可能性があり、その制御はTDP-43プロテノパチーの画期的な治療標的の提案に繋がることとなる。

研究成果の概要（英文）：TDP-43 cytoplasmic inclusion in TDP-43-proteinopathy is suspected to be involved in neurodegeneration, but the mechanism remains unclear. In this study, we suspected the involvement of cellular senescence as a mechanism of TDP-43 cytoplasmic inclusion formation and explored the possibility that cytoplasmic leaky nucleic acids generated during cellular senescence may serve as a seed for inclusion body formation. The results of this study showed that the formation of TDP-43 inclusions is selective by cellular senescence induction methods and is particularly strongly induced by irradiation, that cytoplasmic double-stranded DNA molecules are highly co-localized with TDP-43 inclusion bodies, and that leaky DNA containing repetitive sequences may be involved.

研究分野：分子病態学

キーワード：TDP-43プロテノパチー 細胞質封入体 封入体シード 細胞質核酸 細胞老化 DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

核内タンパク質である TDP-43 が細胞質内で封入体を形成する TDP-43 プロテノパチーは、前頭側頭葉変性症 (FTLD-TDP)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を始めとする多様な疾患群で認められるが、これら疾患は全て、中年期以降の一定年齢を超えて発症することから加齢の関与が強く疑われていた。近年 80 歳代以降の高齢者に TDP-43 封入体を認める LATE (Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy) と呼ばれる新たな疾患群が発見されたことにより、本症に老化が関与するエビデンスがさらに高まった (Brain, 2019)。

これまでの TDP-43 プロテノパチー研究の、大きな問題点は生理的には存在しない変異体の過剰発現系モデルによって、その多くが構築されており、このモデルで起こる分子機序が、真に疾患で起こる細胞質封入体の形成機序と同一であるかどうかは不明であり、このモデルを用いた研究の先に、真の TDP-43 プロテノパチー機序の解明、さらには疾患治療法の樹立がなされるかは不透明であるという点が存在していた。また、誘導される封入体の形態も、実際の患者封入体の形態とは解離しており、これまでモデルとして扱われてきた細胞質封入体産物が、患者封入体と同じ性質から成る構成物であるかも不明であった。

In vitro で細胞は老化する。いくつかの手法はあるが、いずれにおいても細胞老化の主要な要因は DNA 損傷である。従来考えられていたよりもはるかに細胞老化が個体老化に関与することが近年、明らかとなりつつある。さらに、TDP-43 プロテノパチーの遺伝的リスクが DNA 損傷と関係するというエビデンスが蓄積されつつある (Cell Mol Life Sci, 2021)。申請者は、これらの点と点をから、in vitro の老化細胞に TDP-43 プロテノパチーが再現される可能性があるとして着想し、DNA 損傷誘導性老化細胞の長期観察を行った。その結果、老化細胞群の中に、TDP-43 封入体を形成する細胞が現れることを発見した。この実験系の画期的な重要性は次の 3 点に集約される。(1) 内在性物質動態のみで再現されたこと、(2) 既報の実験系では乖離していた実際の患者封入体形態が再現されていること、(3) 加齢が明らかに関与する本症のメルクマールが細胞老化という現象から再現されたこと。以上のことから、この分子メカニズムを解き明かすことは、真の TDP-43 プロテノパチーメカニズムの一端を解き明かすことに繋がる可能性を示唆していた。

TDP-43 は、RNA 結合タンパク質としての研究が盛んであるが、元来 HIV の TAR-DNA 結合タンパク質として同定された DNA/RNA 結合タンパク質である。老化細胞では、本来、細胞質には存在しないはずの自己ジャンク DNA が漏出することが明らかになりつつある。申請者は、これらの細胞老化に伴う、細胞質における不純物質が TDP-43 封入体のシードとして機能しているのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで、人為的発現操作を加えることでしか報告されてこなかった TDP-43 封入体が、内在性物質動態のみで形成されるその分子メカニズムを解明することである。申請者が見出した細胞老化に伴う TDP-43 封入体は外来性物質の供与は一切行っておらず、細胞老化に伴う、内在性の生理的細胞内変化によって引き起こされた。TDP-43 プロテノパチーは、強く加齢に依存した病態であり、加齢に伴う変化がこの分子的疾患メルクマールと関連している可能性が高い。申請者は、この TDP-43 プロテノパチーに繋がる加齢性細胞内変化には細胞老化で起こる細胞質へのシーズ物質、特に核酸因子の関与を疑い、この機序の解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

・細胞

本研究では、細胞老化を誘導するモデル構築のためにヒト胎児肺線維芽細胞である IMR-90 を用いた。IMR-90 は ATCC より購入し、複製限界老化モデル以外では、継代数を 10 回以下の細胞を使用した。培養液には 10% FBS 添加 DMEM 培地を用いた。

・細胞老化誘導法毎の TDP-43 プロテノパチー誘導比率比較

細胞老化の誘導法には、大きくテロメアの短縮が原因として起こる細胞増殖限界 (ヘイフリック限界) による細胞老化誘導法と、DNA 損傷を用いたテロメアの短縮を待たずに起こる早期細胞老化法が存在する。早期細胞老化も DNA 損傷誘導法によって起こる、遺伝子発現プロファイリング変化に違いが報告されていることから、DNA 損傷誘導法として放射線照射モデル、薬剤 DNA 損傷誘導法 (ドキシソルピシン、エトポシド) を使用した。各細胞老化誘導法による細胞老化の誘導は、細胞増殖の停止、細胞の形態変化によって確定した。

・細胞放射線照射

細胞への放射線照射は、MBR-1605RA（日立パワーソリューションズ）を用いて行った。80%コンフルエントに播種した IMR-90 細胞に対して、総照射量 10Gy の放射線照射を行った。放射線照射後、細胞を 1/3 細胞数になるように継代した。放射線照射 40-45 日後に細胞を実験に用いた。

・DNA 損傷薬処理

薬剤誘導性の DNA 損傷を誘発するため、エトポシドを 100 μ M、ドキソルビシンを 50 nM の濃度で 48 時間処理した。その後、30%コンフルエントに細胞を継代し、処理後 40-45 日後に細胞を実験に用いた。

・増殖限界細胞老化誘導

テロメア短縮による細胞増殖限界を用いた細胞老化を誘導するため、IMR-90 細胞を 1/5 希釈継代を増殖が完全に停止するまで、繰り返し実施した。老化細胞形態と細胞増殖の停止を確認後、30%コンフルエント程度の状態で 40-45 日間維持し実験に用いた。

・細胞免疫染色

各細胞老化誘導法で作製された老化細胞における TDP-43 細胞質封入体の形成率を解析するため、4-Well Culture Slide (CORNING) を内に、細胞を播種した。0.2 % Triton X-100 で 15 分細胞を処理し、膜の透過処理を行った。ブロッキング剤は 5% BSA を PBS を用いて調整し、室温で 1 時間反応させた。その後、ブロッキング剤で希釈した一次抗体液中で一晩反応を行った。一次抗体に rabbit anti-TDP-43 antibody (10782-2-AP, Proteintech) と mouse anti-dsDNA antibody (sc-58749, Santa Cruz Bio.)、rabbit anti-Single Stranded DNA (ssDNA) antibody (IBL) を用いた。二次抗体は anti-mouse IgG antibody Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific), anti-rabbit IgG antibody Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific) を用い、室温で一時間反応させた。核染色には Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) を用い、prolong Gold (Thermo Fisher Scientific) で封入を行った。観察は共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss LCM710) もしくは KEYENCE BZ-X700 で行った。

・細胞分画

培養細胞からの細胞質・核分画の調整は、Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher) を用いて行った。

・レーザーキャプチャーマイクロダイセクション

細胞老化誘導後の TDP-43 細胞質封入体陰性・陽性細胞の分離を Leica LMD6 を用いたレーザーマイクロダイセクションによって行った。

・細胞質 1 本鎖 DNA 核酸成分のクローニング

サンプル細胞質分画より、1 本鎖 DNA 成分の精製を ssDNA / RNA Clean & Concentrator (Zymo Research) を用いて行った。RNA 成分は RNase 処理により除去した。精製 1 本鎖 DNA 核酸 (ssDNA) の 3' 末端に対して、Td-transferase を用いて polyA 配列を付加し、その後オリゴ(dT)プライマーを用いて平滑末端 2 本鎖 DNA 化を行った後、Zero Blunt クローニングキットを用いたクローニングを行った。

・細胞質 2 本鎖 DNA 核酸成分のクローニング

細胞質分画より、2 本鎖 DNA 成分の精製を NucleoSpin Tissue XS (Takara) を用いて行った。精製 DNA を T4 DNA Polymerase を用いて平滑末端化後、Zero Blunt クローニングキットを用いたクローニングを行った。

4. 研究成果

・細胞老化誘導法に依存した TDP-43 封入体形成率の比較

テロメア短縮に依存した増殖限界細胞老化法、放射線照射 DNA 損傷による早期細胞老化誘導法、DNA 損傷薬誘導性早期細胞老化誘導法を用いて、細胞老化を誘導後 40 日後における細胞質 TDP-43 封入体形成率の比較を行った。各条件において 500 ~ 600 個程度の細胞の観察を行った。

その結果、テロメア短縮に依存した増殖限界細胞老化法、ドキソルビシンを用いた早期細胞老化誘導法では、TDP-43 細胞質封入体の形成は認められなかった。またエトポシドを用いた細胞老化誘導法では、0.3%程度の細胞において、非常に低頻度な細胞質 TDP-43 封入体の形成が認められた。一方で、放射線照射を用いた細胞老化誘導法では、3.5%程度の細胞で封入体の形成を認め、老化細胞における TDP-43 封入体の形成効率は、細胞老化誘導法に依存することが明らかとなった。この結果を基に、以降の解析を放射線照射誘導性の老化細胞を用いて解析を行った。

・細胞質核酸成分と TDP-43 細胞質封入体の局在解析

2重免疫染色法を用いて、細胞質 1 本鎖または 2 本鎖 DNA 核酸と TDP-43 封入体との局在の関連解析を行った。解析の結果、細胞質における 1 本鎖 DNA 由来のシグナルに、老化細胞において顕著な増加は認められず、TDP-43 細胞質封入体との明らかな共局在性は観察されなかった。

一方で、2 本鎖 DNA 成分由来の細胞質シグナルは、高頻度に細胞質 TDP-43 封入体との共局在性を認め、これらの結果は、細胞老化によって細胞質に漏出した 2 本鎖 DNA 分子が老化細胞における細胞質 TDP-43 封入体形成に關与する可能性を示唆するものであった(図 1)。

・老化細胞における細胞質漏出 DNA 種の解析

TDP-43 細胞質封入体のシードとなりうる老化細胞における細胞質 DNA の由来配列の特定を試みた。まず、TDP-43 細胞質封入体を有する細胞における細胞質 DNA の配列決定を行う目的で、5 分短期固定細胞を用いた TDP-43 染色を行った後、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて、細胞質 TDP-43 シグナルを認める細胞を約 500 個回収した。回収された細胞より細胞質分画を調製し、細胞質分画に含まれる 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA のクローニングを行った。

1 本鎖 DNA のクローニングにおいては、得られたクローンは非常に少なく、シーケンスによるクローン配列もヒトゲノム DNA 配列にマッチする配列は得られなかった。次に 2 本鎖 DNA 調製サンプルよりクローン化された配列をシーケンス解析によって決定し、ヒトゲノム DNA とマッチする配列の探索を行った。こちらの解析においても、得られたクローンの多くが、ヒトゲノム配列とはマッチしない配列であったが、少数のクローンにおいてヒト配列由来と考えられるクローンが採取された。これらの配列の特徴を解析した結果、その多くが LINE (Long Interspersed Nuclear Element)、SINE (Short Interspersed Nuclear Element)、もしくはテロメア領域に由来する配列であった。

このデータを補完する目的で、次に、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法ではなく、トータル細胞サンプルとしての細胞質分画を用いた、老化細胞由来細胞質分画 DNA 分子の配列決定を試みた。その結果、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法の結果と同様の、LINE、SINE、テロメア、またはセントロメア由来配列と考えられる配列が採取された。一方で、反復配列を含まない、exon、intron、intergenic 配列に頻度は低いという結果が得られた(表 1)。

これらの結果から、老化細胞における漏出 DNA 分子として、反復配列を有する DNA 分子の細胞質漏出が TDP-43 のシードとなっている可能性が示唆された。

(参考文献)

JR Kok et al, DNA damage as a mechanism of neurodegeneration in ALS and a contributor to astrocyte toxicity. Cell Mol Life Sci. 2021;78(15):5707-5729.

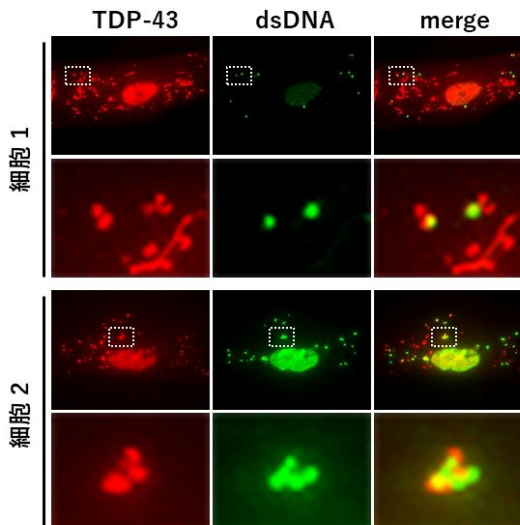


図1. 放射線照射40日後のIMR-90細胞をTDP-43と2本鎖DNA(dsDNA)抗体を用いて染色を行った。老化細胞細胞質TDP-43は、高頻度に細胞質に漏出したdsDNAと共局在を示した。2例の細胞染色像を代表的な画像として示す。

表1. 放射線照射誘導老化細胞における細胞質漏出DNA種の特異とその比率

配列タイプ	比率 (%)
Telomere (satellite)	12.0
SINE	28.9
LINE	22.9
Centromere (satellite)	19.3
Intron	6.0
Exon	2.4
Intergenic	8.4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------