

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 25日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500345

研究課題名（和文） 細胞内 TDP-43 蓄積細胞および動物モデルの構築とその応用

研究課題名（英文） Cellular and animal models for intracellular TDP-43 aggregates

研究代表者

野中 隆（NONAKA TAKASHI）

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・副参事研究員

研究者番号：30356258

研究成果の概要（和文）：

我々が開発した細胞内 TDP-43 蓄積細胞モデルを利用して、これらの凝集体形成を抑制する低分子化合物の探索を行った。その結果、植物由来のポリフェノールであるゴシペチンを含む数種類の化合物に、細胞内 TDP-43 蓄積を抑制する効果があることを見だし、これらの特許申請を行った。これらの化合物は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）や前頭側頭葉変性症（FTLD-TDP）の新たな治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We established a new cellular model for intracellular TDP-43 aggregate formation and screened small molecules which inhibit the formation of TDP-43 aggregates using this model. These compounds may be possible new drugs for the treatment of ALS and FTLD-TDP.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症，TDP-43

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭葉変性症（FTLD）患者に認められるユビキチン陽性の細胞内封入体の主要な構成タンパク質として、TAR DNA-binding protein of 43 kDa（TDP-43）が同定された。また家族性および孤発性 ALS 患者の遺伝子解析により TDP-43 遺伝子において多数のミスセンス変異が同定され、TDP-43 の異常と発症との関連が遺伝学的に明らかとなった。したがって、TDP-43 の異常な細胞内凝集体形成を抑

制することは、これらの疾患の治療のターゲットとなることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、まず培養細胞内に TDP-43 が蓄積する系の確立を行い、このモデルを利用して TDP-43 の細胞内凝集体形成を抑制する低分子化合物の探索を試み、ALS や FTLD の新たな治療薬の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

我々は以前、TDP-43の核移行シグナルおよびその類似配列(187-192残基)を欠損した変異体や、患者脳に蓄積するTDP-43のC末端断片(219-414残基)とGreen fluorescent protein(GFP)の融合体を培養細胞(SH-SY5Y)に発現すると、リン酸化TDP-43抗体およびユビキチン抗体に陽性な細胞質凝集体が出現することを報告した(Yamashita M et al, FEBS Lett. 2009)。この細胞内TDP-43蓄積モデルを用いて、TDP-43の細胞内凝集を抑制する低分子化合物の探索を行った。具体的には、SH-SY5Y細胞にpcDNA3-TDP43-deltaNLS&187-192あるいはpEGFP-TDP43-219-414を一過性に発現し、その後、種々の低分子化合物を添加した。3日間培養を行った後に、蛍光顕微鏡による観察およびイムノブロット解析を行った。

4. 研究成果

結果

今回試験した化合物は、我々が開発した上記細胞モデルの実施許諾契約を締結した国内製薬企業から提供された7化合物(化合物A~G)および我々が所有する化合物ライブラリーのディメボンあるいはポリフェノール化合物であるプルプロガリン(2L)およびゴシペチン(1B)である。これらを用いて、TDP-43の欠損変異体(deltaNLS&187-192)およびC末端断片(GFP219-414)の発現による細胞内凝集体形成の抑制効果について試験した。

まず、プラスミド発現に対する化合物の影響について検討した。GFPの空ベクター(pEGFP-c1)を化合物存在下において細胞に発現させ、3日間培養を行い、GFPの発現量をイムノブロットにて調べた。その結果、今回用いたいずれの化合物においても、GFPの発現量を低下させる効果はなく、プラスミド発現に対する抑制作用は全く認められなかった。

次に、GFP219-414の凝集体形成に関して化合物の効果を調べたところ、ポジティブコントロールとして使用したディメボンは、GFP219-414発現による凝集体形成を効率よく阻害したが、化合物A, B, C, 2Lおよび1Bには、いずれもC末端断片の凝集体形成を抑制しなかった。その他の化合物に関しては、化合物Dには顕著な細胞死誘導効果あるいは細胞増殖抑制効果が見られたため、その後の試験には用いず、また化合物EおよびFについては、試験していない。

また、核移行シグナルおよびその周辺配列の欠損変異体(deltaNLS&187-192)の発現による細胞内凝集体形成に対する化合物の効果について検討した。その結果、ポジティブコントロールとして使用したディメボンで

は、約80%の凝集体形成の抑制効果が認められた。一方、化合物A, B, E, Fおよび1Bにおいても、ディメボンと同様に、40~50%程度の阻害効果が認められた。また、化合物Cおよび2Lには、そのような抑制効果は認められなかった。

さらに、これらの蓄積細胞モデルを利用して、市販されている化合物ライブラリー(約1500種類の化合物)を検索したところ、フルベストラント、アモジアキン、ミトタン、レチノイン酸、ブロムヘキシン塩酸塩、ニフェジピンの6化合物を新たに見いだした。これら6化合物については現在特許申請している。

考察

今回、製薬企業から提供を受けた化合物については名称や構造などの情報は開示されていないが、化合物C以外の化合物はTDP-43と相互作用する活性を有する。本試験の終了後にその情報を提供されたため、試験中はどの化合物にTDP-43の細胞内凝集体形成に対する抑制効果があるのかは全く予想できなかった。しかしながら、化合物の活性と欠損変異体の発現による細胞内凝集体形成の抑制効果が見事に一致した。この結果は、我々の細胞内TDP-43蓄積モデルが、低分子化合物によるTDP-43の細胞内蓄積の抑制を調べる上で、極めて有用なスクリーニングツールとして用いることができることを示している。また今回、細胞内TDP-43の蓄積を抑制した化合物はいずれも、TDP-43のC末端断片の発現による凝集体形成は抑制せず、全長TDP-43に近いNLS欠損変異体の発現による細胞内凝集体の形成を抑制した。これらの結果により、化合物の作用点がTDP-43のN末端側にある、あるいはC末端断片による凝集体と欠損変異体による凝集体では構造が異なるため、化合物の効果に相違が生じたのではないかと考えられる。いずれにしても、今回見いだされた化合物は、ALSやFTLDの新たな治療薬として、今後さらに動物レベルでの基礎的な試験などを積み重ね、さらに開発されていくことが大いに期待される。

結論

本試験において新たに見いだされた、TDP-43の細胞内蓄積を抑制する化合物A, B, E, F, ゴシペチン, フルベストラント, アモジアキン, ミトタン, レチノイン酸, ブロムヘキシン塩酸塩, およびニフェジピンは、ALSやFTLDの新たな治療薬となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計13件)

全て査読有り

1. Masato Hosokawa, Tetsuaki Arai, Masami Masuda-Suzukake, Takashi Nonaka, Makiko Yamashita, Haruhiko Akiyama, Masato Hasegawa (2012) Methylene Blue Reduced Abnormal Tau Accumulation in P301L Tau Transgenic Mice. *PLoS ONE*, e52389.
 2. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A. (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain*, 135: 3380-3391.
 3. Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Lim S, Paterson BM, Donnelly PS, Crouch PJ, White AR (2012) Inhibition of TDP-43 Accumulation by Bis(thiosemicarbazono)-Copper Complexes. *PLoS One*. 7(8):e42277.
 4. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H (2012) Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Transl. Med.* 4(145):145ra104.
 5. Takahashi M, Tin Y, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, and Arai T (2012) Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 510: 48-52
 6. Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A, Hasegawa M (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 417: 116-121
 7. Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng DC, Price KA, Liddell JR, Caragounis A, Li QX, Masters CL, Nonaka T, Hasegawa M, Bogoyevitch MA, Kanninen KM, Crouch PJ, White AR (2011) C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol. Neurodegener.* 6: 57
 8. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci.* 45: 480-485
 9. Nonaka T* and Hasegawa M* (2011) In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases: New cellular models of neurodegenerative diseases. *Communicative & Integrative Biology* 4: 501-502 (*: corresponding author)
 10. Tanaka S, Kodama T, Nonaka T, Toyoda H, Arai M, Fukazawa M, Honda Y, Honda M, Mignot E (2010) Transcriptional regulation of the hypocretin/orexin gene by NR6A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403:178-183
 11. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M (2010) Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* 285: 34885-34898
 12. Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Fujishiro H and Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30: 372-380
 13. Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga S, Kato K, Hasegawa M (2010) Characterization of Inhibitor-Bound alpha-Synuclein Dimer: Role of alpha-Synuclein N-Terminal Region in Dimerization and Inhibitor Binding. *J. Mol. Biol.* 395: 445-456
- [学会発表] (計 23 件)
1. 野中隆, 鈴掛 (増田) 雅美, 新井哲明, 吉田真理, 村山繁雄, Mann David, 秋山治彦, 長谷川成人 患者脳に蓄積した TDP-43 のプリオン様性質 第 85 回日本生化学会大会, 2012. 12. 15 福岡

2. 野中隆, 鈴掛 (増田) 雅美, 新井哲明, 吉田眞理, 村山繁雄, Mann David, 秋山治彦, 長谷川成人 シード依存的な細胞内 TDP-43 蓄積による細胞死の誘導 第 31 回日本認知症学会学術集会, 2012. 10. 27 筑波
3. Takashi Nonaka, Masami Masuda-Suzukake, Yoko Hasegawa, Mari Yoshida, Shigeo Murayama, David Mann, Haruhiko Akiyama and Masato Hasegawa; Intracellular seeding model reproduces characteristic features of affected neurons in TDP-43 proteinopathy. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias; 2012. 9. 5-7. Manchester, UK
4. Takashi Nonaka, Masami Masuda-Suzukake, Makiko Yamashita, Masato Hosokawa, Haruhiko Akiyama and Masato Hasegawa; Intracellular seeded aggregation and cytotoxic model of TDP-43. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2012; 2012. 7. 16. Vancouver, Canada
5. 野中隆, 長谷川成人 TDP-43 のシード依存性細胞内凝集体形成 第 53 回日本神経学会学術大会、シンポジウム 2012. 5. 24 東京
6. 細川雅人, 新井哲明, 野中隆, 山下万貴子, 鈴掛雅美, 辻浩史, 長谷川成人, 秋山治彦; メチレンブルーによるリン酸化タウ蓄積抑制効果の検討; 第 132 回日本薬学会; 2012. 3. 29 札幌
7. Muneaki Takahashi, Takashi Nonaka, Masato Hasegawa, Nobuo Watanabe, Takao Arai Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells. SOCIETY FOR FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE SFRBM's 18th Annual Meeting; 2011. 11. 16 - 20. Atlanta, USA
8. M. HOSOKAWA; T. ARAI; T. NONAKA; M. YAMASHITA; M. SUZUKAKE; T. MATSUWAKI; M. NISHIHARA; M. HASEGAWA; H. AKIYAMA. Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. Neuroscience 2011; 2011. 11. 13. Washington DC, USA
9. E. NAGATA; T. NONAKA; Y. MORIYA; A. SAIARDI; Y. OKADA; H. TSUKAMOTO; J. ITOH; T. SATOH; T. ARAI; S. TAKIZAWA; F. YOSHII; M. HASEGAWA; S. TAKAGI. Heat shock protein 90 (HSP90) suppresses cell death induced by cytoplasmic TDP-43 and inositol hexakisphosphate kinase 2. Neuroscience 2011; 2011. 11. 13. Washington DC, USA
10. 辻浩史, 野中隆, 新井哲明, 山下万喜子, 亀谷富由樹, 細川雅人, 初田裕幸, 高尾昌樹, 村山繁雄, 斉藤祐子, 長谷川成人, 秋山治彦, David Mann, 詫間浩, 玉岡晃; FTLD-TDP および ALS に蓄積する TDP-43 蛋白の凝集体構造に関する解析; 第 30 回日本認知症学会学術集会; 2011. 11. 12 東京
11. 長谷川成人, 野中隆, 辻浩史, 山下万喜子, 増田雅美, 玉岡晃, Mann David, 村山繁雄, 新井哲明, 秋山治彦; 細胞内異常蛋白質の伝播の可能性; 第 30 回日本認知症学会学術集会、シンポジウム; 2011. 11. 11 東京
12. 細川雅人, 新井哲明, 野中隆, 山下万喜子, 鈴掛雅美, 辻浩史, 長谷川成人, 秋山治彦; メチレンブルーによるリン酸化タウ蓄積抑制効果の検討; 第 30 回日本認知症学会学術集会; 2011. 11. 11 東京
13. 大垣光太郎, 李元哲, 高梨雅史, 石川景一, 小林智則, 中西淳, 野中隆, 長谷川成人, 岸 雅彦, 吉野浩代, 船山学, 塩屋敬一, 横地正之, 佐々木良元, 小久保康昌, 葛原茂樹, 本井ゆみ子, 富山弘幸, 服部信孝; FTDP-17 が疑われた日本人患者 75 症例における *PGRN* と *MAPT* 遺伝子解析; 第 5 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres; 2011. 10. 7 東京
14. Muneaki Takahashi, Takashi Nonaka, Masato Hasegawa, Nobuo Watanabe, Takao Arai; Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia) 2011; 2011. 8. 31 - 9. 4. Kagoshima, Japan
15. Takashi Nonaka, Sayuri T. Watanabe, Takeshi Iwatsubo, Masato Hasegawa; Cellular models of seeded aggregation of alpha-synuclein and tau. International conference on Alzheimer's disease and related disorders (ICAD) 2011; 2011. 7. 17. Paris, France
16. Tetsuaki Arai, Katsuyoshi Mizukami, Masugi Nishihara, Masato Hosokawa, Takashi Nonaka, Masato Hasegawa, Haruhiko Akiyama, Takashi Matsuwaki, Sho Takahashi, Takashi Asada; Histopathological Analysis of Progranulin Knockout Mice. International conference on Alzheimer's disease and related

- disorders (ICAD) 2011; 2011. 7. 17. Paris, France
17. Makiko Yamashita, Takashi Nonaka, Masato Hasegawa, Haruhiko Akiyama; C-terminal TDP-43 Inclusion Suppress Proliferation Mediated by Transcriptional Dysregulation. International conference on Alzheimer's disease and related disorders (ICAD) 2011; 2011. 7. 17. Paris, France
18. Masato Hosokawa, Haruhiko Akiyama, Tetsuaki Arai, Hiroshi Tsuji, Takashi Nonaka, Makiko Yamashita, Masato Hasegawa; Quantitative Determination of TDP-43 in Cerebrospinal Fluid of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Neurodegenerative Disorders. International conference on Alzheimer's disease and related disorders (ICAD) 2011; 2011. 7. 17. Paris, France
19. 野中隆、長谷川成人 TDP-43 による運動ニューロン変性の分子病態 第 52 回日本神経学会学術大会、シンポジウム 2011. 5. 20 名古屋
20. 長谷川成人、野中隆、辻浩史、山下万喜子、増田雅美、玉岡晃、村山繁雄、新井哲明、秋山治彦; 神経変性疾患における蛋白癌仮説; 第 52 回日本神経学会学術大会、シンポジウム; 2011. 5. 20 名古屋
21. 辻浩史、長谷川成人、野中隆、亀谷富由樹、山下万喜子、増田雅美、細川雅人、秋山治彦、David Mann、初田裕幸、高尾昌樹、村山繁雄、斉藤祐子、詫間浩、富所康志、中馬越清隆、石井亜紀子、石井一弘、渡邊雅彦、新井哲明、玉岡晃; ALS および FTLTDP に蓄積するリン酸化 TDP-43 蛋白コンフォメーションに関する解析; 第 52 回日本神経学会学術大会; 2011. 5. 19 名古屋
22. 永田栄一郎、野中隆、森谷祐介、岡田義則、佐藤忠之、塚本秀雄、新井哲明、長谷川成人、瀧澤俊也、高木繁治; 細胞質内 TDP-43 凝集体形成細胞でのイノシトール 6 リン酸キナーゼ 2 の役割; 第 52 回日本神経学会学術大会; 2011. 5. 19 名古屋
23. 大垣光太郎、李元哲、高梨雅史、石川景一、小林智則、中西淳、野中隆、長谷川成人、岸雅彦、吉野浩代、船山学、塩谷敬一、横地正之、佐々木良元、小久保康昌、葛原茂樹、本井ゆみ子、富山弘幸、服部信孝; FTDP-17 が疑われた日本人 75 症例における PGRN と MAPT 遺伝子解析;

第 52 回日本神経学会学術大会; 2011. 5. 18 名古屋

[産業財産権]
○出願状況 (計 6 件)

名称: フルベストラントを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物
発明者: 山下 万貴子; 長谷川 成人; 秋山治彦; 野中 隆
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類: 特許
番号: 2013- 72977
出願年月日: 2013/3/29
国内外の別: 国内

名称: アモジアキンを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物
発明者: 山下 万貴子; 長谷川 成人; 秋山治彦; 野中 隆
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類: 特許
番号: 2013- 72983
出願年月日: 2013/3/29
国内外の別: 国内

名称: ミトタンを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物
発明者: 山下 万貴子; 長谷川 成人; 秋山治彦; 野中 隆
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類: 特許
番号: 2013- 72989
出願年月日: 2013/3/29
国内外の別: 国内

名称: レチノイン酸等を含む神経変性疾患の治療及び/又は予防用医薬組成物
発明者: 山下 万貴子; 長谷川 成人; 秋山治彦; 野中 隆
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類: 特許
番号: 2013- 74114
出願年月日: 2013/3/29
国内外の別: 国内

名称: ブロムヘキシン塩酸塩等を含む神経変性疾患の治療及び/又は予防用医薬組成物
発明者: 山下 万貴子; 長谷川 成人; 秋山治彦; 野中 隆
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類: 特許
番号: 2013- 74155
出願年月日: 2013/3/29
国内外の別: 国内

名称: ニフェジピン等を含む神経変性疾患の

治療及び／又は予防用医薬組成物
発明者：山下 万貴子；長谷川 成人；秋山
治彦；野中 隆
権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所
種類：特許
番号：2013- 74065
出願年月日：2013/3/29
国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：神経変性疾患治療用物質のスクリー
ニング方法
発明者：野中 隆，長谷川成人，増田雅美
権利者：財団法人東京都医学総合研究所
種類：特許
番号：特許第 4948845 号
取得年月日：2012/3/16
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 隆 (NONAKA TAKASHI)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知
症・高次脳機能研究分野・副参事研究員
研究者番号：30356258

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし