

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 24 年 12 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659171

研究課題名（和文）TDP-43 分子の構造的ゆらぎに着目した筋萎縮性側索硬化症の新たな病態探索

研究課題名（英文）A novel approach to ALS pathogenesis by investigating conformational equilibrium of TDP-43

研究代表者

漆谷 真 (URUSHITANI MAKOTO)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・准教授

研究者番号：60332326

研究成果の概要（和文）：TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43)は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の主要な病原タンパク質であるがそれが引き起こす病態機序は不明である。我々は（以下特許申請中に付き公開不可）TDP-43 のミスフォールディングにおける初期病的中間体のモデルである可能性を提示した。さらに凝集体形成の際に不可逆的な局所構造変化を起こす部位を同定し、当該部位に対する抗体が細胞質の異所性局在をした TDP-43 を認識することを発見した。

研究成果の概要（英文）：TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43) is implicated in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, the molecular basis of which underlying ALS pathogenesis is yet to be clarified. We have several residues showing irreversible structural change in TDP-43 proteins. Furthermore, antibodies raised against these residues recognized cytoplasmic TDP-43, typical signatures for ALS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学、TDP-43

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、原因不明の致死性麻痺性神経変性疾患である。近年、患者の 9 割を占める孤発性 ALS において機能不明の核タンパク質 TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43) が、病巣部の異所性局在と細胞質のユビキチン陽性の異常凝集体を呈することが明らかとなった。しかしながら、TDP-43 による凝集体の形成の詳細な機序は不明で

あり、これを解明することは、ALS の病態解明につながるが、凝集体の形成機序や分解系をさらに明らかにするためには、分子レベルの構造解析が不可欠である。研究分担者はタンパク質溶液に圧力をかけることで、通常は分布率が低く観測困難なタンパク質の変性中間体（ゆらぎ構造）を誘導できることを示し、世界で初めてその立体構造解析にも成功した。TDP-43 においても周囲の環境変化に基づく局所構造の異常がタンパクミスフ

オールディングの初期変化である可能性がある。さらに申請者は、細胞質の TDP-43 の分解にはオートファジーが主に関与しており、プロテアソームとの協調が障害されると細胞質にアグリゲート形成がなされることを報告した。両者の阻害は共にユビキチン化 TDP-43 の蓄積を促し、TDP-43 のユビキチン化の関連分子を同定することは治療法の開発に直結する。

2. 研究の目的

本研究では、幅広い圧力と温度環境における核磁気共鳴 (NMR) 測定に基づき、TDP-43 のコンフォメーション平衡の全容解明を行う。さらに、コンフォメーション平衡内で存在が想定される変性中間体 (ゆらぎ構造) からミスフォールド TDP-43 分子モデルを構築し、*in vitro* の ALS モデル開発や特異抗体作出による ALS の分子病理の解明と共に、ユビキチンリガーゼの同定とタンパク凝集と分解メカニズムを解明する。さらにミスフォールド体の最終形態である凝集体ではなく、構造変化の初期構造を変性中間体として同定し、それに対する抗体を精製することによって、病初期の変性 TDP-43 の分子モデルの確立と新たな診断、治療法の創生を目指す。

3. 研究の方法

特許申請集につき公開不可

4. 研究成果

特許申請中につき公開不可

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 14 件)

- ① Ido A, Fukuyama H, Urushitani M. Protein misdirection inside and outside motor neurons in ALS: a possible clue for therapeutic strategies. *Int J Mol Sci* 2011, 12, 6980-7003 (査読有)
- ② Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto A, Takahashi R, Ito H. An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology*, 2011, 77, 1995-1997 (査読有)
- ③ Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, Urushitani M, Oono M, Kawamoto Y, Yamashita H, Shimohama S, Kato S, Hirano A, Tomimoto H, Ito H, Takahashi R. Colocalization of 14-3-3 Proteins with SOD1 in Lewy Body-Like Hyaline Inclusions in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Cases and the Animal Model. *PLoS ONE* 2011, 6, e20427 (査読有)
- ④ Yanagisawa D, Amatsubo T, Morikawa S, Taguchi H, Urushitani M, Shirai N, Hirao K, Shiino A, Inubushi T, Tooyama I. In vivo detection of amyloid β deposition using $(19)F$ magnetic resonance imaging with a $(19)F$ -containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2011, 16, 184:120-127 (査読有)
- ⑤ Takeuchi S, Fujiwara N, Ido A, Oono M, Takeuchi Y, Tateno M, Suzuki K, Takahashi R, Tooyama I, Taniguchi N, Julien JP, Urushitani M. Induction of protective immunity by vaccination with wild-type apo SOD1 in the mutant SOD1 transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010, 69, 1044-1056 (査読有)
- ⑥ Ezzi SA, Larivière R, Urushitani M, Julien JP. Neuronal overexpression of chromogranin A accelerates disease onset in a mouse model of ALS. *J Neurochem* 2010, 115:1102-1111 (査読有)
- ⑦ Urushitani M, Sato T, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I. Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of poly-ubiquitinated TDP-43. *J Neurosci Res* 2010, 88:784-797. (査読有)
- ⑧ Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel SH. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 2010, 58, 231-43. (査読有)
- ⑨ Yanagisawa D, Shirai N, Amatsubo T, Taguchi H, Hirao K, Urushitani M, Morikawa S, Inubushi T, Kato M, Kato F, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida C, Okada T, Sano M, Wada Y, Wada KN, Yamamoto A, Tooyama I. Relationship between the tautomeric structures of curcumin derivatives and their Abeta-binding activities in the context of therapies for Alzheimer's disease. *Biomaterials*. 2010, 31:4179-4185 (査読有)
- ⑩ 漆谷 真. 変異 SOD1 タンパク質による

ALS の病態機序. 脳 21 「筋萎縮性側索硬化症(ALS)の基礎研究」. 2012, 15; 9-15 (査読無)

- ⑪ 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症の免疫療法. 炎症と免疫「神経免疫の新展開」. 11月号, 2011, 19; 557-563 (査読無)
- ⑫ 大野美樹、漆谷 真. 神経変性疾患に対する免疫療法の現状 細胞工学「脳内免疫システム」. 10月号, 2011, 30; 1054-1059 (査読無)
- ⑬ 漆谷 真. 免疫療法による ALS の分子標的治療. 医学のあゆみ「ALS Update」 2010, 235; 255-260 (査読無)
- ⑭ 漆谷 真. TDP-43 の異所性局在機構. 最新医学「神経変性疾患における TDP-43」 2010, 65; 1588-1596 (査読無)
- ⑮ 漆谷 真. 家族性 ALS マウスモデルの免疫療法. 実験医学増刊号「脳神経系の情報伝達と疾患」 2010, 28, 799-807 (査読無)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 大野 美樹, 井戸 明美, 松本 紋子, 谷口直之, 高橋 良輔, 漆谷 真. ALS モデルマウスにおけるトランスグルタミナーゼ 2 の誘導. 第 34 回日本神経科学大会. 2011 年 9 月 15 日 横浜
- ② Ohta Y, Audet JN, Phaneuf D, Urushitani M, Julien JP. Variant forms of human chromogranin B fail to interact with mutant SOD1. Annual Meeting of Neuroscience. 2011 年 11 月 12 日, ワシントン D.C. (米国)
- ③ Makoto Urushitani. 7th ALS Research Forum, ALS Society of Canada, "Molecular targeting strategies against misfolded proteins in ALS". 2011 年 5 月 1 日 トロント (カナダ)
- ④ 漆谷 真. 「筋萎縮性側索硬化症の抗体療法」第 52 回 日本神経学会学術集会シンポジウム; 神経変性疾患における抗体療法 2011 年 5 月 20 日 名古屋
- ⑤ 漆谷 真、佐藤尚志. TDP-43 の異所性局在と ALS の病理現象との関連について」第 51 回 日本神経学会総会 2010 年 5 月 21 日 東京
- ⑥ 漆谷 真. 「ALS の免疫療法」 Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会) シンポジウム 「若手研究者が展開する筋萎縮性側索硬化症研究の将来展望」 (兼シンポジウムオーガナイザー) 2010 年 9 月 13 日 神戸

[図書] (計 1 件)

- ① 漆谷 真. 認知症診療ハンドブック. 宇高不可思 編. 医歯薬ジャーナル 2012, 大阪、 (印刷中)

[産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)

名称: TDP-43 の凝集体が蓄積する疾患の発症リスクを予測する方法、診断薬及び治療薬
発明者: 漆谷真、藤原範子、伊東秀文
権利者: 滋賀医科大学、兵庫医科大学、京都大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-028737
出願年月日: 平成 24 年 2 月 13 日
国内外の別: 日本

名称: IMAGING DIAGNOSTIC AGENT AND EXTRACORPOREAL DIAGNOSTIC AGENT FOR INCURABLE NEUROLOGICAL DISEASES
発明者: 遠山育夫、漆谷 真、田口弘康、森川茂弘、柳沢大二郎、雨坪知音、白井伸明、平尾浩一、加藤雅也、木村博彦、岡田隆史
権利者: 滋賀医科大学、滋賀県、石原産業、JST
種類: 特許
番号: WO/2010/098502
出願年月日: 平成 22 年 2 月 26 日
国内外の別: WIPO (米国)

取得状況 (計 件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.shiga-med.ac.jp/~uru/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表
漆谷 真 (URUSHITANI MAKOTO)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・准教授
研究者番号: 60332326

(2) 研究分担者
北原 亮 (KITAHARA RYO)
立命館大学・薬学部・准教授
研究者番号: 70512284

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: