

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 5 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700383

研究課題名（和文） 神経細胞内 TDP-43 封入体形成メカニズムの解明

研究課題名（英文） The aggregation mechanisms of TDP-43 inclusion in neuronal cell

研究代表者

山下 万貴子（YAMASHITA MAKIKO）

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・研究員

研究者番号：00380668

研究成果の概要（和文）：

本研究により、TDP-43 あるいはその凝集体形成による神経細胞毒性の誘導メカニズムについて新たな知見を得ることができた。とくに、凝集体自身の神経細胞毒性を示したことは一つの大きな進歩であったとおもわれる。また、一方で、Flowcytometry を使ったハイスループットな薬剤スクリーニング法を確立した。そして実際に、FTLD や ALS に対する新規治療薬の開発を目指した低分子化合物の検索を行い、いくつかの候補化合物をピックアップできた。

研究成果の概要（英文）：

TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) is the major component of neuronal and glial inclusions aggregates characteristic of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration with TDP-43-positive inclusions (FTLD-TDP). However, it remains to be clarified whether or not TDP-43 aggregates are toxic, and how abnormalities of TDP-43, such as aggregation, ubiquitination, hyperphosphorylation, fragmentation and loss of nuclear localization, lead to neuronal degeneration. We report here that proliferation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y with TDP-43 inclusions is strongly suppressed, compared to that of cells without the inclusions. Growth inhibition was especially strong in cells expressing a C-terminal fragment of TDP-43. Interestingly, the mechanism of cell growth inhibition by full-length TDP-43 involved arrest at the G2/M phase, whereas that by C-terminal fragment of TDP-43 did not. In TDP-43-expressing cells, RNA polymerase II and several transcription factors were found to be co-localized with TDP-43 aggregates. Furthermore, accumulation of RNA polymerase II in phosphorylated TDP-43 inclusions was detected in FTLD-TDP brains. These results suggest that abnormal TDP-43 inclusions itself is cytotoxic and lead to cellular dysfunction by recruiting normal transcription factors, resulting in growth arrest. Such transcriptional dysregulation may contribute to neuronal degeneration in TDP-43 proteinopathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：TDP-43、神経変性疾患、凝集体形成阻害薬

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患では変性神経細胞内に特定のタンパク質の凝集体が認められ、例えば、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) ではタウ、パーキンソン病 (Parkinson's disease : PD) では α -シヌクレインがそれぞれの疾患に特徴的な細胞内凝集体の主要な構成タンパク質として知られている。2006年、精神研長谷川・新井らは、65歳以下ではアルツハイマーに次いで発症頻度が高い認知症である前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration : FTL) や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) などにおいて出現するユビキチン陽性封入体の主要構成成分として TDP-43 という核タンパク質を同定した (Arai T. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 351 : 602-611 (2006), 長谷川成人、新井哲明 : 実験医学, 25 : 1947-1955 (2007))。この第3の細胞内凝集体構成タンパク質 TDP-43 もまたタウや α -シヌクレインと同様、種々の翻訳後修飾を受けて細胞内に蓄積していることも明らかとし、また、N末端の核移行シグナルを欠損した TDP-43 は核への移行が阻害され、細胞質において凝集体を形成することも明らかとした (Winton, M. J. et al. : J. Biol. Chem., 283 : 13302-13309 (2008))。しかし、その構造、凝集体形成・蓄積のメカニズム、そこへのリン酸化の寄与、疾患発症における凝集体形成の生理学的意義、など詳細については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

(1) TDP-43 凝集体形成メカニズムの解明
本研究では、TDP-43 の部分欠損変異体を導入することにより培養細胞株内において TDP-43 凝集体を形成する細胞モデルを用いて、TDP-43 凝集体形成と神経変性の関係について検討した。FTL や ALS をはじめとする TDP-43 蓄積を伴う各種神経変性疾患では、その病変局所において著しい神経変性・脱落が見られることから、凝集体形成は神経毒性を発揮し、それがさらに凝集体形成の促進および病気の進行を亢進していくのではないかと仮定した。そこで、本研究では、まずは TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性について検討した。

(2) TDP-43 凝集体形成阻害因子の検索
一方で、我々はこれまでに、アルツハイマー

病の根本的治療薬の開発を目指して β タンパク質やタウの重合を阻害する因子のスクリーニングを行い、実際に、阻害因子としてメチレンブルーを同定している (Biochemistry 45;6085-94 (2006))。TDP-43 においても、FTL や ALS などの TDP-43 凝集体蓄積を伴う神経変性疾患治療薬の開発を目指して、動物細胞株を用いた細胞内 TDP-43 凝集体形成システムを用いて、それを阻害する化合物のスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

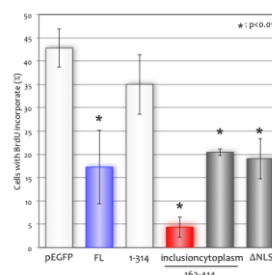
(1) TDP-43 凝集体形成メカニズムの解明
ヒト神経細胞株 SH-SY5Y に患者脳においてその蓄積が確認されている TDP-43 の C 末断片発現コンストラクト、あるいは全長部分欠損変異体を導入し、細胞内において TDP-43 凝集体形成を誘導した。遺伝子導入から3日後の細胞において、BrdU 取り込み能を測定することにより細胞増殖能を評価し、また共焦点レーザー生物顕微鏡にて凝集体と共局在する因子の検索を行った。

(2) TDP-43 凝集体形成阻害因子の検索
動物細胞株を用いた細胞内 TDP-43 凝集体形成システムを用いて、それを阻害する化合物のスクリーニングを行った。WB および免疫染色法の他に、ハイスループットな第一次スクリーニング法として flow cytometry 法によるスクリーニング系を確立し、実際に、既存薬物ライブラリーを材料としたスクリーニングを行った。

4. 研究成果

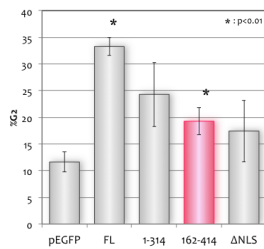
(1) TDP-43 凝集体形成メカニズムの解析
TDP-43 による神経細胞毒性を調べるため、BrdU 取り込み能を指標として細胞増殖への影響を検討した。TDP-43 凝集体形成細胞では BrdU の取り込みが完全に抑制されていた。

Figure 1. TDP-43 による神経細胞の増殖抑制



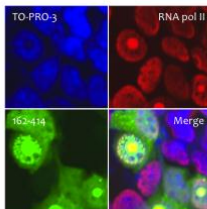
また、同時に細胞周期の異常も一部観察された。ここで興味深いことに、全長の WT TDP-43 を発現させても神経細胞への毒性を示し、さらに細胞周期の著しい異常が観察された。この結果は、TDP-43 トランスジェニックマウスにおいて運動機能の異常が見られるものの、脳内への TDP-43 の蓄積が観察されない現象をよく再現しており、それを説明する重要な実験結果ではないかと考えている。この点に関しては、今後、さらに詳しく解析していく予定である。

Figure 2. TDP-43 による神経細胞の細胞周期異常



一方、TDP-43 凝集体を形成する細胞では、その凝集体部分に、遺伝子の転写に関与する RNA ポリメラーゼ II やその他いくつかの基本転写因子が凝集体中に巻き込まれている様子が観察され、また実際に、これら転写因子の転写活性が抑制されていることも確認できた。

Figure 3. TDP-43 凝集体と RNA ポリメラーゼ II の共局在



さらに、患者脳においても細胞モデルと同様に、上記転写因子が TDP-43 封入体中に共局在している様子が観察された。このことより、TDP-43 凝集体形成は細胞増殖の停止あるいは遺伝子転写の抑制を通じて、神経細胞の変性を引き起こしている可能性が示唆された。

TDP-43 凝集体の神経細胞に対する毒性は、そのものの蓄積にも大きく関わっていることが考えられるため、そのメカニズムを解明する上で重要な知見が得られた。また、一方で、神経細胞への毒性を軽減させることは神経変性・脱落の軽減にもつながり、ここは1つの治療ターゲットとなりうる。したがって、

今後さらに詳細な解析を進め、新たな治療法・治療薬の開発へとつなげていきたい。また同時に、加齢との関係を明らかにし、病気の進行だけでなく発症のメカニズムについても検討していきたいと考えている。

(2) TDP-43 凝集体形成阻害因子の検索
Flowcytometry を使ったハイスループットな薬剤スクリーニング法を確立した。そして実際に、FTLD や ALS に対する新規治療薬の開発を目指した低分子化合物の検索を行い、いくつかの候補化合物をピックアップできた。

今後は、今回ピックアップした治療薬候補化合物について、より正確に疾患をモデル化した細胞モデルあるいは動物モデルを使って詳細な検討を行い、臨床応用への可能性を随時検討していく。

Figure 4. Flowcytometry による阻害薬のスクリーニング (一部抜粋)

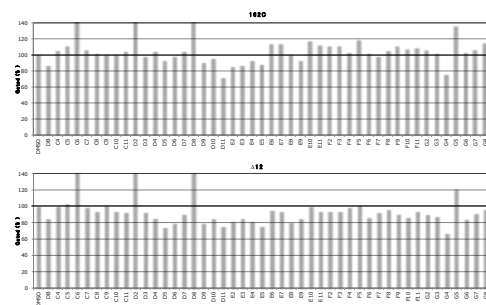
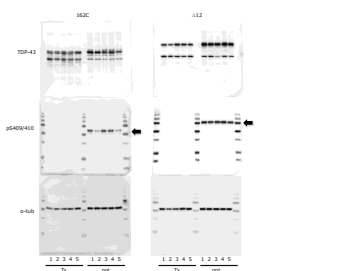


Figure 5. TDP-43 凝集体と RNA ポリメラーゼ II の共局在



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 3 件)

- ① 山下万貴子、長谷川成人、家族性 ALS～TDP-43 の機能と ALS における病態、Clinical Neuroscience、査読無、29、2011、1022-1023
- ② 山下万貴子、野中隆、長谷川成人、TDP-43

凝集体形成阻害化合物の検索、最新医学、
査読無、65、2010、53-58

- ③ 山下万貴子、長谷川成人、シナプスの病態～TDP-43 proteinopathy、Clinical Neuroscience、28、2010、904-905

〔学会発表〕(計3件)

- ① Makiko YAMASHITA, Takashi NONAKA, Haruhiko AKIYAMA, Masato HASEGAWA, C-terminal TDP-43 inclusion suppress proliferation mediated by transcriptional dysregulation、Alzheimer's Association International Conference (Paris, France), 2011.07.17
- ② 山下万貴子、野中隆、亀谷富由樹、細川雅人、秋山治彦、長谷川成人、TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導、第33回日本分子生物学会(神戸) 2010, 12, 08
- ③ 山下万貴子、野中隆、亀谷富由樹、細川雅人、秋山治彦、長谷川成人、TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導、第29回認知症学会(名古屋) 2010, 11, 05

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 万貴子 (YAMASHITA MAKIKO)
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・研究員
研究者番号：00380668