

## 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 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790814

研究課題名（和文）Cajal 小体に注目した ALS の病態メカニズムの解明

研究課題名（英文）analysis of the pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis -focusing on Cajal bodies

研究代表者

横関 明男 (YOKOSEKI AKIO)

新潟大学・医歯学系・特任准教授

研究者番号：90515719

研究成果の概要（和文）：

TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43)は、筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis、ALS)のグリアや運動神経細胞で認めるユビキチン化封入体の構成蛋白である。TDP-43は、Cajal 小体、GEM 小体、PML、SC35 などの核内小体との相互関係が報告されている。そのため、我々はCajal 小体に注目することにした。孤発性 ALS 群の Cajal 小体の平均値は、コントロール群より統計学的有意に低下していた。Cajal 小体は、small nuclear RNP や small nucleolar RNP の成熟に重要な役割を果たしている。以上のことから、ALS の運動神経では、転写の異常により神経細胞死が起こっている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) is a major protein of ubiquitinated cytoplasmic inclusions in glia and neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). TDP-43 has been reported to associate with nuclear bodies: Cajal bodies, GEM bodies, PML, and SC35. Therefore, we focused on Cajal bodies. The mean number of Cajal bodies in sporadic ALS cases was statistically decreased than that in controls. Cajal bodies play an important function as maturation of small nuclear and nucleolar ribonucleoproteins. Taken together, neuronal death may be caused by dysregulation of transcription in ALS motor neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：ALS, TDP-43, Cajal 小体, coilin

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は、未だ発症原因が不明で有効な治療法が提案されていない致死性の疾患である。本症は、選択的な運動ニューロン変性を特徴とし、数年で呼吸不全

から死に至る。病理学的には運動ニューロンの選択的脱落に加え、残存運動ニューロンの細胞質内にエオジン好性のブニナ小体やユビキチン陽性の skein-like 封入体を認める。ALS の多くは孤発性 ALS (sporadic ALS, SALS) であるが、約 10%が家族性 ALS

(familial ALS, FALS) である。FALS の中で最も頻度が高いのが Cu/Zn superoxide dismutase 1 (*SOD1*) の変異による ALS1 である。従来変異 *SOD1* からの解析は ALS 研究において大きな軸であった。しかし ALS1 は SALS の病理的特徴であるブニナ小体や skein-like 封入体を伴わないことから、発症メカニズムが SALS とは異なる可能性が指摘されてきた (Tan ら *Acta Neuropathol* 2004)。

2006 年秋 SALS に認められるユビキチン陽性の skein-like 封入体の構成蛋白が、ユビキチン化 Transactive response DNA binding protein-43 (TDP-43) であることが報告された (Neumann ら *Science* 2006, Arai ら *Biochem Biophys Res Commun* 2006)。SALS での TDP-43 の特徴は、1) 細胞質内にユビキチン化封入体形成をすると、核蛋白である TDP-43 の核への局在を消失するという、2) 剖検脊髄での生化学解析では、urea 分画の不溶性画分に ~25kDa の C 末断片化 TDP-43、~45kDa にリン酸化 TDP-43 を認めることが特徴である。この知見は、申請者の施設を含め多くの報告にて確認された。このことから、同様に TDP-43 陽性封入体を形成する疾患 Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions (FTLD-U) と共に TDP-43 陽性封入体を形成する一連の神経変性疾患 “TDP-43 proteinopathies” として認識されるにいたった (Kwong ら *Acta Neuropathol* 2007)。しかしながら、ユビキチン化 TDP-43 陽性封入体が、ALS 発症に直接関与しているのか、神経変性の結果として生じた二次的なものであるのか明らかになっていなかった。

2008 年申請者は、SALS と同様の病理所見を示す FALS 家系において TDP-43 をコードする遺伝子 *TARDBP* に遺伝子変異 (p. Gln343Arg) を見出し報告した。同症例では病理所見のみならず、SALS で認める TDP-43 の生化学的異常も伴っており、SALS 研究のモデルとしても重要な症例である (Yokoseki ら *Ann Neurol* 2008)。ほぼ同時期に世界中より *TARDBP* 変異の報告が相次ぎ、現在までに約 40 変異が認められている (Pesiridis ら *Hum Mol Genet* 2009)。これらの変異例の存在から ALS における TDP-43 の蓄積は神経変性の二次的な結果ではなく、原因そのものであることが示唆された。

我々は TDP-43 の ALS における発症メカニズムの仮説として、ユビキチン化 TDP-43 陽性封入体を形成した神経細胞では、核内の TDP-43 が消失するため、TDP-43 の機能の喪失が運動神経細胞死に大きく影響を与えているのではないかと考えた。TDP-43 の機能としては mRNA のスプライスへの関与 (Ayala ら *FEBS Lett* 2006)、各種核内小体

(PML, GEM, Cajal 小体) との関連 (Wang ら *Proc Natl Acad Sci USA* 2002) が報告されている。その中で、核内 TDP-43 の喪失により、TDP-43 と相互作用することが報告されている、核内小体の機能異常が生じている可能性を仮説として考えるに至った。

そこで、培養細胞の TDP-43 を siRNA で knock down し、代表的な核内小体である Cajal 小体の数を検討した。その結果、この細胞では Cajal 小体の数が減少することを見いだした。次に、ALS 患者剖検脊髄前角細胞でも同様の事象が生じているか否かを、免疫蛍光組織化学法と共焦点顕微鏡を用い検討した。その結果、control に比して ALS 患者の脊髄前角細胞では、Cajal 小体の数が減少していることが確認できた。そのため、Cajal 小体が神経細胞死に影響を与える可能性を考え、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

培養細胞および SALS 剖検脊髄での検討から、核内 TDP-43 の消失は Cajal 小体の減少を引き起こすことを確認した。このことから、Cajal 小体の機能異常が神経細胞の機能異常や細胞死を引き起こすという仮説を立てた。

一方、ALS 発症における TDP-43 の発症機序については、TDP-43 が神経細胞毒性を獲得する gain of toxic function と、核内 TDP-43 の機能の喪失による loss of function の 2 つの説があり、結論は出していない。我々の研究では、培養細胞で TDP-43 の発現を抑制すると、Cajal 小体数が減少することから、TDP-43 の機能喪失が神経細胞死に重要な役割をしているという仮説のもと、下記の目的を検討した。

- (1) 培養細胞中の TDP-43 の発現を抑制することにより、神経細胞死が誘導されるか否かを明らかにする。
- (2) 患者脊髄運動神経細胞での Cajal 小体の減少に関与する因子を明らかにする
- (3) TDP-43 と Cajal 小体のマーカー蛋白である coilin が結合するか否かを明らかとする。
- (4) TDP-43 の発現抑制により、mRNA のスプライシングに影響がでるか、また影響がある場合には、どの遺伝子に影響があるかを明らかにする。
- 5) ALS 以外の脊髄運動神経細胞脱落を来す疾患において、Cajal 小体の減少を認めるか否かを確認する。

## 3. 研究の方法

- (1) TDP-43 の発現抑制による細胞死の検討

HeLa, U87MG, SH-SY5Y 細胞の TDP-43 を siRNA で発現を抑制し、死細胞由来プロテアーゼ活性を測定する CytoTox-Glot™ Cytotoxicity

Assay (Promega)を用いて細胞死を解析した。

#### (2)Cajal 小体減少に関与する因子の解析

脊髄前角細胞のCajal小体の数の検討について、Cajal小体のマーカー蛋白であるCoilinの免疫染色を実施し、Cajal小体のカウントは、1細胞中、核小体を含む平面で2μm厚中に存在する数を計測した。解析は、孤発性ALS5例、コントロール5例で比較し、多重ロジスティック解析を用いて、前角細胞の大きさ、ALSの有無、性別、年齢の因子について解析した。

#### (3)TDP-43 と coilin の結合の検討

HeLa細胞と抗TDP-43抗体(10782-1-AP, ProteinTech), 抗coilin抗体(P delta, Sigma)を用いて、coilinとTDP-43との免疫沈降法によりTDP-43とCcilinの結合を検討した。

#### (4)TDP-43 の発現抑制によるスプライシングへの影響の解析

HeLa細胞中のTDP-43をsiRNAで発現抑制し、RNeasy plus mini kit(QIAGEN)でtotal RNAを抽出した。抽出したRNAを対象に、GeneChip Whole Transcript Sense Target Labeling Assay(Affimetrix)を用いてcDNAの作成、増幅、ビオチン化ラベルを行い、GeneChip Human Exon 1.0ST array(Affimetrix)にハイブリダイズした。染色、洗浄の後、GeneChip Operating Software(Affimetrix)でCEL fileを作成した。Genespring GX ver. 11(Agilent Technologies)を用いてexon array解析を実施した。

#### (5)ALS 以外の疾患における脊髄前角細胞のCajal 小体数の解析

孤発性ALSと同様の方法で、脊髄前角細胞の変性を来す他の疾患(ALS1(SOD1変異によるALS):3症例, ALS10(TARDBP変異によるALS, p. Gln343Arg変異例):1症例, Machado-Joseph disease (MJD):5症例)でのCajal小体数を検討した。

### 4. 研究成果

(1)TDP-43 の発現抑制による細胞死 siRNAによるTDP-43の発現抑制では、cytotoxicityに影響は認めなかった。またカスパーゼ活性を検出するCaspase-Glo™ Assay (Promega)を用いた解析でも、TDP-43の発現抑制によるアポトーシスの増加は確認できなかった。

(2)Cajal小体減少に関与する因子 孤発性ALS5症例とコントロール5症例のCajal小体の平均値±SEMは、孤発性ALS: 8.06±

1.97/1細胞, コントロール: 17.19±1.82/1細胞であった。多重ロジスティック解析では、ALS(odds ratio:0.041(P=0.033))と細胞面積(odds ratio:1.002(P=0.003))が、Cajal小体数に寄与する因子であり、ALSの存在はCajal小体数の負の因子であった。

(3)TDP-43 と coilin の結合 培養細胞での免疫沈降法では、TDP-43とcoilinの結合は証明できなかった。

#### (4) TDP-43 の発現抑制によるスプライシングへの影響

網羅的解析の結果、有意なスプライシング変化を示した遺伝子数は、全解析対象の5%(892遺伝子)に認めた。同様の検体を用いて、各遺伝子の発現量に有意な変化を認めた遺伝子は123遺伝子だった。スプライシングに有意な変化を示した遺伝子から、統計的に関連のある機能カテゴリーを検索するために、Gene Ontology(GO)解析を実施した。82のGO termが得られ、その内上位20の中で、「cytoplasm」「intracellular organelle」「membrane-bounded organelle」「organelle component organization and biogenesis」「Golgi apparatus」など細胞内小器官に関するtermが11含まれていた。一方、発現量に有意な変化を示した遺伝子群(123遺伝子)で、同様の解析を実施し、11のGO termが得られたが、それらの間に共通の機能カテゴリーは認められなかった。

#### (5)ALS1, ALS10, MJD の脊髄前角細胞のCajal 小体数

各疾患のCajal小体数の平均値±SEMは、ALS1: 12.17±1.97/1細胞, ALS10: 9.09±1.46/1細胞, MJD:10.09±2.29/1細胞 だった。コントロール5症例の平均が17.19±1.82であり、いずれの疾患でもコントロールと比較して減少していた。

### 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 Yokoseki A, Ishihara T, Koyama A, Shiga A, Yamada M, Suzuki C, Sekijima Y, Maruta K, Tsuchiya M, Date H, Sato T, Tada M, Ikeuchi T, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O, Genotype-phenotype correlations in early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia. Brain. 査読有, 134, 2011, 1387-1399

② Shiga A, Nozaki H, Yokoseki A, Nihonmatsu M, Kawata H, Kato T, Koyama A,

Arima K, Ikeda M, Katada S, Toyoshima Y, Takahashi H, Tanaka A, Nakano I, Ikeuchi T, Nishizawa M, Onodera O, Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF-beta1 via cleavage of proTGF-beta1. Hum Mol Genet. 査読有, 20, 2011, 1800-1810

③石原智彦, 横関明男, 西澤正豊, 高橋均, 小野寺理, 【神経変性疾患における TDP-43】家族性筋萎縮性側索硬化症と TDP-43. 最新医学 査読なし, 65, 2010, 1648-1653

[学会発表] (計 1 件)

①横関明男, 譚春鳳, 志賀篤, 石原智彦, 有泉優子, 佐藤達哉, 高橋均, 西澤正豊, 小野寺理, TDP-43 関連 ALS の脊髄前角細胞における Cajal 小体の減少, 神経変性疾患に関する調査研究班 平成 23 年度 班会議, 平成 23 年 12 月 17 日, 東京都

[図書] (計 1 件)

①横関明男, 石原智彦, 西澤正豊, 小野寺理. 新興医学出版社, 高次脳機能障害 Q&A 基礎編 「TDP-43 という言葉をよく聞きますが, これは何のことなのでしょうか?」, 2011 年, p216-221

[その他]

ホームページ等

[http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research\\_basic\\_002.html](http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research_basic_002.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横関 明男 (YOKOSEKI AKIO)  
新潟大学・医歯学系・特任准教授  
研究者番号: 90515719

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし