

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240049

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症とTDP-43：スプライシング異常の発見からその病態の解明へ

研究課題名(英文) ALS and TDP-43: Dose the splicing failure underlie the pathogenesis of ALS?

研究代表者

高橋 均 (Hitoshi, Takahashi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：90206839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円、(間接経費) 10,590,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は壮年期に発症する神経難病である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療方法を開発するために、その病的機序の解明を目的とした。我々は病的タンパクであるTDP-43に注目した。遺伝子はスプライシングによって一つの遺伝子から様々な種類が作られるが、我々は、TDP-43のスプライシングによる多様体に注目し、それを解析し、病態との関係について検討した。また、このスプライシングを制御する機構について詳細に検討を加えた。その結果、TDP-43の遺伝子異常によってALSを引き起こすことがあるが、一部の遺伝子異常は、TDP-43の自己スプライシングを変化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is fatal neurodegenerative disease. For a development of therapeutic methods for this disease, we investigated the splicing variants of TDP-43, and its own function associated with splicing for other genes. We found that TDP-43 has multiple splicing variants, and investigate the mechanism how splicing factors influence this splicing. In addition, we found some of the mutation with ALS10, which is caused by a mutation in TDP-43, affects the efficiency of its own splicing. These findings may open new avenue for the investigation of the pathogenesis of ALS.

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：脳神経疾患 神経病理学 神経変性疾患 筋萎縮性側索硬化症 TDP-43

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、加齢によりその発症頻度が増加する疾患であり、高齢化社会を迎えた今日、益々その重要性が高まってきている。我々は 100 例を超す剖検例(1962-2000)を対象とした臨床病理学的研究から、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は近年増加傾向にあり、それは高齢発症、予後不良、球症状・下位運動ニューロン障害優位、そして、しばしば側頭葉病変 (ユビキチン陽性封入体の形成) を介して前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal lobar degeneration; FTLD) にリンクする病態として特徴づけられることを報告してきた (Pioa *et al. Brain Pathol*, 2003)。近年、ユビキチン陽性、タウ及びシヌクレイン陰性の神経細胞封入体の出現を特徴とする孤発性あるいは家族性 FTLD 及び孤発性 ALS において、その神経細胞封入体の構成成分として 43-kDa TAR DNA-binding protein (TDP-43) が同定された (Neumann *et al. Science*, 2006; Arai *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2006)。この発見は、これまでの我々の臨床病理からの “ALS とはどのような疾患か” の洞察の正しさを証明してくれた。TDP-43 についても、いち早く TDP-43 陽性の封入体が孤発性および SOD1 変異を伴わない家族性 ALS に特徴的な所見であること (Tan *et al. Acta Neuropathol*, 2007; Zhang *et al. Acta Neuropathol*, 2008); 孤発性 ALS の大脳、小脳、脳幹、脊髄、さらに末梢神経の TDP-43 病理の分布をクラスター解析することにより運動神経細胞にほぼ限局する型の ALS と FTLD 病変を伴う型の ALS とに大別され、また、人工呼吸器装着により呼吸不全を超えて長期生存し得た例の検討から、運動神経領域に限局していた病態が長期経過することで、より広い領域に進展するものではないこと (Nishihira *et al. Acta Neuropathol*, 2008); 世界に先駆けて、孤発性と同一の病理所見を示す家族性 ALS に TDP-43 の遺伝子変異の存在すること (Yokoseki *et al. Ann Neurol*, 2008) を報告してきた。とくに TDP-43 遺伝子異常の発見は、ALS の病態において TDP-43 が一次的な意義を持つことを強く示唆することとなり、この遺伝子異常を有する ALS は ALS10 と命名された。しかし、その孤発性 ALS および家族性 ALS10 の病態機序は未だ明らかとはなっていない。

国際的には、多くの TDP-43 遺伝子導入モデルで神経変性をきたすことが報告された。しかし、ALS と同様の病理所見、いわゆる細胞質内凝集体と核からの TDP-43 の消失は再現されていない。一方、核蛋白である TDP-43 が核から消失することから、TDP-43 の機能喪失が病態に関わっていると見る立場もある。また、封入体形成については、初期には TDP-43 の断片化の重要性が説かれた。しかし、それを強く示唆する傍証は乏しい。また、封入体を構成する TDP-43 に認められる異常リ

ン酸化やユビキチン化についても、その一次的な意義を示す結果は未だ得られていない。従って、現在、TDP-43 が封入体を形成する機序、神経細胞機能障害をきたす機序、TDP-43 での ALS10 関連変異が疾患を引き起こす機序については全く不明といっても過言ではなく、これらの解明が急務とされている。

### 2. 研究の目的

ALS は、成人を侵す原因不明の神経変性疾患である。病理学的には、下位および上位運動ニューロンが (ほぼ) 選択的に侵され、臨床的には、その患者の多くは発病後 2-3 年のうちに呼吸不全による死の転帰を余儀なくされる。残存下位運動ニューロンの胞体内に出現する好酸性構造物である Bunina 小体、及びスケイン様あるいは円形のユビキチン陽性封入体が病因に直結する最も重要な所見とされてきた。近年、後者の構成成分として TDP-43 が同定された。我々は、当教室が保有する多数の孤発性及び家族性 ALS にて、TDP-43 を免疫組織化学的に検証し、ALS の病態に TDP-43 が根本的に関わっていることを次の 2 点から示した。(1) TDP-43 陽性胞体内封入体は、下位運動ニューロン以外にも、同部位のグリア細胞、さらには、組織学的に健常と見なせる非運動ニューロン諸核の神経細胞及びグリア細胞にも出現する (multi-system neuronal-glia proteinopathy of TDP-43: Tan *et al. Acta Neuropathol*, 2007; Nishihira *et al. Acta Neuropathol*, 2008)。(2) 孤発性 ALS と全く同様の病理組織像を示し、SOD1 変異を認めない家族性 ALS にて、孤発性 ALS と全く同様の TDP-43 免疫組織化学的所見の存在を提示し (Tan *et al. Acta Neuropathol*, 2007)、その 1 家系においては、TDP-43 の遺伝子変異を見出した (ALS10 と命名された) (Yokoseki *et al. Ann Neurol*, 2008)。本症では核蛋白質である TDP-43 の細胞質内封入体形成と核からの消失が特徴的な所見であるが、その凝集体形成機序やその TDP-43 の異常が神経細胞機能障害を起こす機序は未だ不明である。

本研究では、本症の病態を (1) TDP-43 の機能としての他の遺伝子に対する選択的スプライシングの異常、あるいは (2) TDP-43 自身への選択的スプライシングの異常によるとする仮説を立て、これを立証する。

### 3. 研究の方法

研究計画を遂行するための研究体制については次の様に整えた。神経病理学 (高橋・豊島)、分子神経生物学 (小野寺) を専門とする研究代表者、分担者、並びに、その指導下にあるポスドク・医員に加え、人体病理学的資源的確な保存・管理 (柿田教授)、遺伝子解析学 (桑野教授)、さらに遺伝子工学 (崎村教授) 及び実験動物学 (横山教授) を専門とする連携研究者の共同を得て行なわれるものであり、その研究体制は、先に述べ

た研究テーマである「明らかにする点」の同時並行的展開を可能とするようにした。

計画・方法につき、以下 (1)-(6)の項目について述べる。

#### (1) 神経系における TDP-43 スプライシングバリエーションの解析

TDP-43 のエクソン内でのスプライシングは、このエクソン内に、2カ所にイントロンを形成することで制御されている。我々は患者脊髄由来 cDNA にてこれら TDP-43 由来のスプライシングバリエーションを検討した。さらに ALS 患者剖検組織にて、TDP-43 封入体との関連を明らかにするめに、in situ hybridization、レーザマイクロダイセクション法を用い、細胞レベルで TDP-43 スプライシングバリエーションの mRNA および蛋白レベルでの定量的解析を行い、本症の運動神経細胞において、TDP-43 自身のスプライシングの寄与を検討した。

#### (2) TDP-43 のスプライシングを制御する因子の検討

mRNA 前駆体のスプライシングは mRNA 前駆体への抑制因子と促進因子の結合のバランスで制御されている。促進因子の代表的なものとして SC35、抑制因子としては hnRNP が挙げられる。TDP-43 のエクソン 6 はこれらの因子の結合領域を多く含む。元来 TDP-43 は hnRNP 結合蛋白であり、スプライシング抑制因子としての役割が推定されている。そこで我々は、TDP-43 そのものが TDP-43 のスプライシングに寄与すると考えた。スプライシング関連蛋白では、このような自身のスプライシングによる自己調節機序は広く知られており、その周辺塩基配列は齧歯類と比較しても広く保存されていることが報告されている (Lareau *et al.* *Nature*, 2007)。TDP-43 もエクソン 6 内に齧歯類と広範囲にわたり完全に塩基配列の一致する領域を有しており、同様の機序で制御されている可能性が示唆される。実際、KO マウスのヘテロ結合体にて TDP-43 の mRNA 量が減少していないこと、このマウスの線維芽細胞でスプライシングバリエーションの構成が変化していることを既に確認しており、我々の仮説を支持する結果を得ている。この仮説を検証するために、TDP-43 エクソン 6 のミニジーンを作製し、これらのスプライシング因子存在、非存在下でのスプライシングを検証する。また患者剖検組織での、これらスプライシング関連因子の量的及び質的解析を加え、ヒト運動神経での TDP-43 のスプライシング管理機構を検討した。

#### (3) ALS10 変異の TDP-43 スプライシングに与える影響の検討

ALS10 関連変異はエクソン 6 に集中しており、その多くが mRNA 上でのスプライシング抑制因子結合部位に集中している。従って、

我々は ALS10 の変異がこれらのスプライシング関連配列に影響し、エクソン 6 のスプライシング異常を引き起こす可能性を推察し、これを検討する。先ず、ALS10 変異を有するミニジーンを作製し、スプライシングに与える影響を検討した。さらに、我々はすでに、マウスにおいて我々が見出した ALS10 変異 Q343R の KI マウスを作製している。同マウス、および Q343R 変異を有する患者脊髄を用い、ALS10 関連変異がスプライシングパターンに及ぼす影響について検討した。

#### (4) TDP-43 の蛋白質特性の検討

ALS における TDP-43 病態の最大の特徴は、細胞質内の封入体の形成と核からの消失である。核からの消失に関しては、TDP-43 由来の細胞質内封入体に巻き込まれるという考え方があり、今までの生化学的実験でも、それを示唆する知見がある。しかし、その最初のきっかけとなる細胞質内封入体の形成機序は未解明である。変異型 TDP-43 が細胞質内に局在し、封入体形成に寄与すれば、本症の病態機序に深く関わると推察される。培養細胞系での発現実験を行い、細胞分画毎のウエスタンブロットング法、共焦点レーザー顕微鏡によりこれを検証する。また、形成された封入体が内在性の TDP-43 に与える影響を検討した。

#### (5) TDP-43 により制御される遺伝子産物のスプライシング異常の検討

(1)-(4) は TDP-43 自身のスプライシングに関する検討であるが、その異常をきっかけとして TDP-43 の機能喪失により神経障害が起こると推察している。実際、我々が作製した TDP-43 の KO マウスは胎生致死であり、また NSE-cre マウスと交配させた神経細胞での選択的 KO マウスも 2 週までに死亡する。このことは TDP-43 が神経細胞の維持に重要な役割を担っていることを示している。これらのスプライシング異常を明らかにする。

#### (6) 家族性 ALS の原因遺伝子の同定

我々は、すでに ALS10 と診断した家系以外に、孤発性と同一の病理組織及び TDP-43 免疫所見を示す常染色体劣性家族性 ALS の 2 家系 3 剖検例を経験している (Nishinaka *et al.* *Neuropathology (abstract)*, 2006; Tan *et al.* *Acta Neuropathol*, 2007)。これらの家系における疾患原因遺伝子の同定は TDP-43 機能異常の解明に、あるいは広く ALS 研究に全く新たな視点を提供するに違いない。この 2 家系について、原因遺伝子を同定する。

## 4. 研究成果

本研究は ALS の分子病態を解明するために 6 項目の検討事項を設けて研究にあたった。以下、これらの項目ごとに述べる。

(1) 神経系における TDP-43 スプライシングバリエーションの解析については、患者脊髄由

来 cDNA を検討し、TDP-43 スプライシングバリエーションの検討を行い、その TDP-43 封入体との関連を明らかとした。

(2) TDP-43 のスプライシングを制御する因子の検討については、TDP-43 エクソン 6 のミニジーンを作製し、TDP-43 mRNA に結合する複数のスプライシング因子存在、非存在下でのスプライシングを検証し、TDP-43 のスプライシング管理機構を明らかとした。

(3) ALS10 変異が TDP-43 スプライシングに与える影響の検討については、一部の ALS10 変異によって自己のスプライシングが影響をうけるという知見を得た。

(4) TDP-43 スプライシングバリエーションの蛋白質特性の検討については、本バリエーションが易凝集性を持つことを示した。

(5) TDP-43 により制御される SKAR, U12 依存性遺伝子産物のスプライシング異常の検討については、我々は TDP-43 の喪失によりスプライシング異常がおこる遺伝子として SKAR を単離した。さらに、今までの解析で ALS 患者では、核内小体である Cajal 小体(CB)が減少していること、同部で成熟が促進される snRNA のうち U12 snRNA の減少が認められることを免疫組織化学的、分子生物学的に明らかにした。

(6) 家族性 ALS の原因遺伝子の同定については、孤発性と同一の病理組織及び TDP-43 免疫染色を示す家族性 ALS の 2 家系 3 剖検例の一家系から C9ORF72 の G4C2 リピートの異常伸張を、本邦で初めて見出した。以上、当初の 6 項目の検討事案について、それぞれ成果を得た。

## 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 15 件)

1. Toyoshima Y, Takahashi H (2014) TDP-43 pathology in polyglutamine diseases: with reference to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 査読有 34: 77-82
2. Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, Kato T, Tan CF, Sato T, Miki Y, Yokoo M, Fujino T, Koyama A, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O (2013) Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 査読有 22: 4136-4147
3. Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, Yokoseki A, Arakawa K, Sekine Y, Shimohata T, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Onodera O, Takahashi H (2013) Sporadic ALS with compound heterozygous mutation in the *SQSTM1* gene. *Acta Neuropathol* 査読有 126: 453-459
4. Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Shiga A, Tanaka H, Shimohata M, Kimura K, Morita T, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H (2013) Transportin 1 accumulates in FUS inclusions in adult-onset ALS without *FUS* mutation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 査読有 39: 580-584
5. Uemura M, Kosaka T, Shimohata T, Ishikawa M, Nishihira Y, Toyoshima Y, Yanagawa K, Kawachi I, Takahashi H, Nishizawa M (2013) Dropped head syndrome in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 査読有 14: 232-233
6. Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O (2013) Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 査読有 84: 398-401
7. Kosaka T, Kuroha Y, Tada M, Hasegawa A, Tani T, Matsubara N, Koike R, Toyoshima Y, Takahashi H (2013) A fatal neuromuscular disease in an adult patient after poliomyelitis in early childhood: consideration of the pathology of post-polio syndrome. *Neuropathology* 査読有 33: 93-101
8. Tada M, Coon EA, Osmand AP, Kirby PA, Martin W, Wieler M, Shiga A, Shirasaki H, Tada M, Makifuchi T, Yamada M, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Paulson HL (2012) Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. *Acta Neuropathol* 査読有 124: 749-760
9. Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kato T, Watanabe N, Yamahira A, Kondo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O (2012) Alteration of *POLDIP3* splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. *PLoS One* 査読有 7: e43120
10. Kosaka T, Fu YJ, Shiga A, Ishidaira H, Tan CF, Tani T, Koike R, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2012) Primary lateral sclerosis: upper-motor-predominant amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobar degeneration - immunohistochemical and biochemical analyses of TDP-43. *Neuropathology* 査読有 32: 373-384

11. Soma K, Fu YJ, Wakabayashi K, Onodera O, Kakita A, Takahashi H (2012) Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 査読有 38: 54-60
12. Ince PG, Highley JR, Kirby J, Wharton SB, Takahashi H, Strong MJ, Shaw PJ (2011) Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. *Acta Neuropathol* 査読有 122: 657-671
13. Toyoshima Y, Tanaka H, Shimohata M, Kimura K, Morita T, Kakita A, Takahashi H (2011) Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is associated with TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* 査読有 122: 375-378
14. Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2011) Enhancement of native and phosphorylated TDP-43 immunoreactivity by proteinase K treatment following autoclave heating. *Neuropathology* 査読有 31: 401-404
15. Piao Y, Hashimoto T, Takahama S, Kakita A, Komori T, Morita T, Takahashi H, Mizutani T, Oyanagi K (2011) Survival motor neuron (SMN) protein in the spinal anterior horn cells of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 査読有 1372: 152-159

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 木村正志, 瀬戸牧子, 岩永圭介, 辻畑光宏, 佐藤 聡, 柿田明美, 高橋 均. 多系統に変性をきたした孤発性 ALS の人工呼吸管理による長期生存例. 第 54 回日本神経病理学会, 2013, 4, 26, 東京
2. 竹内亮子, 志賀 篤, 他田真理, 今野卓也, 豊島靖子, 柿田明美, 小野寺理, 西澤正豊, 高橋 均. 筋萎縮性側索硬化症の大脳皮質における TDP-43 の組織学および生化学的解析. 第 54 回日本神経病理学会, 2013, 4, 25, 東京
3. 他田真理, 柿田明美, 志賀 篤, 黒羽泰子, 小池亮子, 樋口真也, 森 茂, 付永娟, 豊島靖子, 小柳清光, 西澤正豊, 高橋 均. 上位運動ニューロンの組織変性が下位のそれに比し高度であった ALS 剖検例の検討. 第 53 回日本神経病理学会, 2012, 6, 30, 新潟
4. 清水 宏, 豊島靖子, 荒川恵子, 関根有美, 横尾明男, 下畑享良, 池内 健, 志賀 篤, 西澤正豊, 高橋 均. 下位運動神経細胞に p62 陽性/TDP-43 陰性の胞体内封入体を認めた ALS の一例. 第 53 回日本神経病理学会, 2012, 6, 30, 新潟

5. 竹内亮子, 豊島靖子, 田中 一, 遠藤耕太郎, 森田 俊, 志賀 篤, 西澤正豊, 高橋 均. 比較的長期に経過した ALS-FUS の一部検例. 第 53 回日本神経病理学会, 2012, 6, 30, 新潟
6. 石原智彦, 志賀篤, 横尾麻衣子, 有泉優子, 横関明男, 譚春鳳, 柿田明美, 西澤正豊, 高橋 均, 小野寺理. ALS 患者神経組織ではスプライシング関連機能性 RNA が低下する. 第 53 回日本神経学会総会 2012, 5, 23, 東京
7. Kosaka T, Fu YJ, Shiga A, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Primary lateral sclerosis: an immunohistochemical and biochemical study of pathological TDP-43 in two cases: The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, 5-7 September 2012, Manchester, UK
8. Takahashi H. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis - Discovery of TDP-43 and after that -. Seoul Neuropathology Forum - The Neuropathology Study Group of the Korean Society of Pathologists, 8 December 2012, Seoul, Korea (招待講演)
9. Ishihara T, Shiga A, Yokoseki A, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. 'Reduction of U12 snRNAs in nervous tissues with TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis'. Society For Neuroscience 2012, 17 October 2012, New Orleans, USA
10. 相馬健一, 付 永娟, 若林孝一, 小野寺理, 柿田明美, 高橋 均. 筋萎縮性側索硬化症における嗜銀顆粒性認知症の共存について. 第 52 回日本神経病理学会京都, 2011, 6, 4, 京都
11. Takahashi H. ALS: a multisystem neuronal-glia proteinopathy of TDP43. The 7th Asia Pacific IAP (APIAP 2011), May 24, 2011, Taipei, Taiwan (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 均 (Takahashi Hitoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 90206839

(2)研究分担者

豊島 靖子 (Toyoshima Yasuko)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：20334675

小野寺 理 (Onodera Osamu)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：20334675

(3)連携研究者

桑野 良三 (Kuwano Ryozo)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20111734

崎村 建司 (Sakimura Kenji)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40162325

柿田 明美 (Kakita Akiyoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80281012

横山 峯介 (Yokoyama Minesuke)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：40090930