

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500424

研究課題名(和文) TDP43プロテインパチ - におけるRNA代謝異常：ストレス顆粒形成機構の解明

研究課題名(英文) Dysfunction of RNA metabolism in TDP-43 proteinopathies: Elucidation of mechanism in stress granule formation

研究代表者

森 文秋 (Mori, Fumiaki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60200383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス顆粒は、ストレス環境下で、RNAとRNA結合タンパク質によって細胞質に形成され、異常なタンパク質の集積を防ぐ。本研究では、タウオパチー、シヌクレイノパチー、TDP-43プロテインパチー、ポリグルタミン病などの蛋白蓄積病の脳におけるストレス顆粒の組織分布ならびに細胞内局在を調べることにより、ストレス顆粒の形成機構とその意義を解明しようとした。さらに、TDP-43プロテインパチーのひとつである家族性ALSの関連蛋白もまた、種々の頻度と組み合わせで上記の神経変性疾患の細胞内封入体に存在することを示した。ストレス顆粒とともに家族性ALS関連蛋白も標的として治療法開発に役立つ可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Stress granules are dense aggregations in the cytosol composed of RNAs and RNA binding proteins that appear when the cell is under stress. To elucidate the significance of stress granule formation in the disease process of neurodegenerative diseases, we examined immunoreactivity for stress granule marker proteins in tauopathies, synucleinopathies, TDP-43 proteinopathies and polyglutamine diseases. Cytoplasmic and nuclear inclusions proved to be immunopositive for stress granule marker proteins, leading to the hypothesis that stress granules play important roles for disease mechanisms in the development of neurodegenerative diseases. These inclusions were also immunopositive for some proteins associated with familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS), one of TDP-43 proteinopathies. These results suggested that stress granules marker proteins and fALS-associated proteins may be therapeutic targets to prevent neurodegenerative diseases.

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：神経変性疾患 ストレス顆粒 筋萎縮性側索硬化症 TDP-43 FUS

1. 研究開始当初の背景

TDP-43 は、ユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) でみられるユビキチン陽性封入体の主要構成成分であり、TDP-43 の蓄積がみられる疾患は TDP-43 プロテノパチーと呼ばれている。蓄積した TDP-43 には、断片化、ユビキチン化、リン酸化などの多様な翻訳後修飾が加わっている [Neumann 2006]。RNA 結合タンパク質である TDP-43 は、転写、スプライシング、運搬および突起内での翻訳などの RNA プロセッシングに関与している。RNA の代謝異常に起因する疾患群は「RNA 病」と呼ばれるが、TDP-43 プロテノパチーも「RNA 病」の一つと考えられている。

ストレス顆粒は、ある一定のストレス環境下で RNA と RNA 結合タンパク質によって細胞質内に形成され、膜に囲まれることなく小胞体に随伴する構造体であり、RNA を酸化ストレスなどの異常状態から防御する [Kayali 2005]。最近、酸化ストレス下で、内在性 TDP-43 がストレス顆粒に取り込まれることが報告された [Colombrita 2009; Nishimoto 2009]。

上記の TDP-43 とストレス顆粒の関連についての報告と同時期に、我々は ALS の脊髄前角において TDP-43 封入体の形成過程を観察し、“linear wisp”が封入体の初期像であり、その段階で既に TDP-43 の核染色性の消失がみられることを報告した [Zhang 2008; Mori 2008]。ALS の運動ニューロンでは、TDP-43 封入体に加えてプニナ小体という好酸性封入体の特異的に出現する。ALS 下位運動ニューロンにおいて、プニナ小体の周囲には、cysteine protease inhibitor である Cystatin C が存在する。しかしながら、細胞質全体の Cystatin C の発現は低下しており、TDP-43 封入体を持つ運動ニューロンでは、高頻度に Cystatin C 陰性を示す [Mori 2009]。一方、プニナ小体を持つ前角ニューロンは、持たない前角ニューロンよりも高頻度に TDP-43 封入体を形成しており、電顕的にプニナ小体と TDP-43 封入体の共存が認められる [Mori 2010]。これらの所見から、ALS 下位運動ニューロンにおける TDP-43 プロテノパチーの病態カスケードが考えられた。しかしながら、この病態カスケードにおけるストレス顆粒の位置づけは明らかではない。そこで、TDP-43 プロテノパチーのヒト剖検組織におけるストレス顆粒の動態に関する検討を行うこととした。

2. 研究の目的

(1) ヒト剖検組織におけるストレス顆粒の組織分布および細胞内局在を明らかにする。

(2) ALS の運動ニューロンにおけるプニナ小体、TDP-43 封入体、Cystatin C 免疫染色性とストレス顆粒の関連性を検討する。

(3) ALS 以外の神経変性疾患におけるストレス顆粒ならびに家族性 ALS 関連蛋白の発

現パターンを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト剖検組織におけるストレス顆粒の組織分布および細胞内局在を明らかにするために、ALS および FTLD-TDP 並びに正常対照の剖検組織を用いた。脳幹並びに脊髄から薄切したパラフィン切片を用い HE 染色を行った。この時点で、バーチャルスライドシステム (VS110-L100, オリンパス) で各標本を取り込む。脱色後、ストレス顆粒タンパク質マーカー (TIAR, TIA-1, eIF3 η , HuR) 免疫染色 (DAB 発色) を行い、再度、バーチャルスライドシステムで各標本を取り込み、同期化した。TDP-43 封入体およびプニナ小体をもった神経細胞毎に、ストレス顆粒タンパク質マーカーの免疫染色性を評価した。

(2) TDP-43 プロテノパチーのひとつである ALS は通常孤発性であるが、fALS では 15 種の原因遺伝子が同定されており、そのコード蛋白 (fALS 関連蛋白) は fALS の神経細胞に封入体として蓄積している。これらのうち、FUS などいくつかの fALS 関連蛋白は、ALS 以外の神経変性疾患の封入体にも認められる。アルツハイマー病、ピック病、PSP、CBD、嗜銀顆粒性認知症、パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、孤発性 ALS、前頭側頭葉変性症、ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、SCA1、SCA2、SCA3、核内封入体病および正常対照のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製。fALS 関連蛋白 (SOD1、ALS2、Senataxin、FUS、VAPB、Angiogenin、TDP-43、FIG4、Optineurin、Ataxin-2、VCP、Ubiquilin-2、SIGMAR1、CHMP2B、Profilin1) に対する抗体 (15 種) を用いて免疫組織化学的に検討した。

(3) 2 症例に認められたエオジン好性封入体 (症例 1, Mori et al. Neuropathology 2010; 30: 648-53; 症例 2, Kojima et al. Acta Pathol Jpn 1990; 40: 785-91) の構成蛋白を調べるため、上記 2 症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製。細胞骨格、ユビキチン・プロテアソーム系、オートファジー・リソソーム経路 (ALP) ならびにストレス顆粒 (SG) に関連する蛋白に対する抗体を用いて免疫染色を施し光顕観察した。

4. 研究成果

(1) 平成 23 年度：ヒト剖検組織におけるストレス顆粒の組織分布および細胞内局在を明らかにするために、ALS 患者の下位運動ニューロンにおけるプニナ小体、TDP-43 封入体とストレス顆粒の関連性を検討した。その結果、ストレス顆粒マーカータンパク質の発現が、ALS 患者の脊髄前角ニューロンでは、正常コントロールのそれよりも減弱していること、ストレス顆粒マーカータンパク質は、プニナ小体の近傍に存在していること、TDP-43 封入体の約 10% がストレス顆粒マーカータンパク質の免疫染色性を示すこと

などがわかった。これらの所見は、ALS の病態メカニズムにおいてストレス顆粒が重要な役割を果たしていることを示している。また、家族性 ALS (fALS) の原因遺伝子がコードするタンパク質である FUS ならびに optineurin がハンチントン病を含むポリグルタミン病および核内封入体病の核内封入体に局在することと合わせて考えると、ALS 以外の神経変性疾患においても、ストレス顆粒が関与する病態メカニズムが想定される。ストレス顆粒の関与する病態メカニズムの解明が、ALS および ALS 以外の神経変性疾患の治療法開発に役立つ可能性がある。

(2) 平成 24 年度：TDP-43 プロテノパチーのひとつである ALS は通常孤発性であるが、fALS では 15 種の原因遺伝子が同定されており、そのコード蛋白 (fALS 関連蛋白) は fALS の神経細胞に封入体として蓄積している。これらのうち、FUS などいくつかの fALS 関連蛋白は、ALS 以外の神経変性疾患の封入体にも認められる。そこで、種々の神経変性疾患の剖検脳組織における fALS 関連蛋白の免疫反応性について検討した。15 種中 8 種の fALS 関連蛋白 (FUS、TDP-43、FIG4、Optineurin、VCP、Ubiquilin-2、SIGMAR1、CHMP2B) が種々の頻度と組み合わせで神経変性疾患の細胞内封入体に存在していた。これら fALS 関連蛋白は、ストレス顆粒の形成に関連し、DNA/RNA 代謝、細胞内蛋白分解、細胞内輸送などの機能を有する。fALS 関連蛋白の細胞内封入体への局在は、本来、果たすべき機能が障害されていることを示唆している。fALS 関連蛋白は、ストレス顆粒と同様に、ALS 以外の神経変性疾患の病理発生機序にも関与している可能性があり、fALS 関連蛋白を標的とした治療法開発に役立つ可能性がある。

(3) 平成 25 年度：全く異なる 2 症例のコピキチン並びに p62 陰性の封入体におけるストレス顆粒の関与を検討した。症例 1 の封入体は、neurofilament (2.8%)、phosphorylated neurofilament (2.9%)、non-phosphorylated neurofilament (3.3%)、LC3(73.5%)、GABARAP (100%)、GATE16 (1.9%)、NBR1 (16.5%)、VCP (25.6%)、EIF3 (48.7%) が陽性を示した。一方、症例 2 では Tubulin-beta-III (50.0%)、MAP2 (58.7%)、HuR (100%)、VCP (59.9%) が陽性であった。症例 1 の封入体は、ストレス顆粒関連蛋白 EIF3、症例 2 の封入体は、ストレス顆粒関連蛋白 HuR に陽性であった。両封入体は、いずれも ALS 関連蛋白である VCP 陽性であった。ストレス顆粒はオートファジーライソゾーム経路と VCP 蛋白の働きにより除去される [Buchan, 2013] ことから、この除去過程が、二種のエオジン封入体の形成機序に関与していることが示唆される。以上の研究から、TDP-43 プロテノパチーにおけるストレス顆粒の形成は、TDP-43 プロテノパチー特異的な封入体の形成/分解に関与することが支持され、ストレス顆粒の形成を標的とした

治療法開発に役立つ可能性を示唆している。

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 26 件)

1. Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. ALS-associated protein FIG4 is localized in Pick and Lewy bodies, and also neuronal nuclear inclusions, in polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. *Neuropathology* 34: 19-26, 2014. 査読有 10.1111/neup.12056
2. Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 34: 148-158, 2014. 査読有 10.1111/neup.12080
3. Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Co-localization of Bunina bodies and TDP-43 inclusions in lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 34: 71-76, 2014. 査読有 10.1111/neup.12044
4. Mori F, Toyoshima Y, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. FUS colocalizes with polyglutamine, but not with TDP-43 in neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40: 351-355, 2014. 査読有 10.1111/nan.12075
5. Mori F, Watanabe Y, Miki Y, Tanji K, Odagiri S, Eto K, Wakabayashi K. Ubiquitin-negative, eosinophilic neuronal cytoplasmic inclusions associated with stress granules and autophagy: an immunohistochemical investigation of two cases. *Neuropathology* 34: 140-147, 2014. 査読有 PMID 24812700
6. Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Wakabayashi K. An autopsy case of preclinical multiple system atrophy (MSA-C). *Neuropathology* 33: 667-672, 2013. 査読有 10.1111/neup.12037
7. Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Valosin-containing protein immunoreactivity in tauopathies, synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. *Neuropathology* 33: 637-644, 2013. 査読有 10.1111/neup.12050
8. Odagiri S, Tanji K, Mori F, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Brain expression level and activity of HDAC6 protein in neurodegenerative dementia. *Biochem Biophys Res Commun* 430: 394-399, 2013. 査読有 10.1016/j.bbrc.2012.11.034
9. Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, Mori F, Itoh

- K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 72: 18-28, 2013. 査読有 10.1097/NEN.0b013e31827b5713
10. Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Tomiyama M, Baba M, Umehara Y, Kurotaki H, Wakabayashi K. Abnormal tau deposition in neurons, but not in glial cells in the cerebral tissue surrounding arteriovenous malformation. *Neuropathology* 32: 267-271, 2012. 査読有 10.1111/j.1440-1789.2011.01249.x
 11. Mori F, Tanji K, Kon T, Odagiri S, Hattori M, Hoshikawa Y, Kono C, Yasui K, Yokoi S, Hasegawa Y, Yoshida M, Wakabayashi K. FUS immunoreactivity of neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 322-328, 2012. 査読有 10.1111/j.1365-2990.2011.01217.x
 12. Mori F, Tanji K, Miki Y, Nishijima H, Baba M, Kurotaki H, Wakabayashi K. Status epilepticus associated with extensive axonal swelling in the unilateral cerebral cortex and hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 387-390, 2012. 査読有 10.1111/j.1365-2990.2011.01223.x
 13. Mori F, Tanji K, Odagiri S, Hattori M, Hoshikawa Y, Kono C, Yasui K, Yokoi S, Hasegawa Y, Kamitani T, Yoshida M, Wakabayashi K. Ubiquitin-related proteins in neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease. *Pathol Int* 62: 407-411, 2012. 査読有 10.1111/j.1440-1827.2012.02812.x
 14. Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Ikeda T, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. *Acta Neuropathol* 124: 149-151, 2012. 査読有 10.1007/s00401-012-0999-z
 15. Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Autophagy-related proteins (p62, NBR1 and LC3) in intranuclear inclusions in neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett* 522: 134-138, 2012. 査読有 10.1016/j.neulet.2012.06.026
 16. Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Optineurin immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions of polyglutamine diseases (Huntington's, DRPLA, SCA2, SCA3) and intranuclear inclusion body disease. *Acta Neuropathol* 123: 747-749, 2012. 査読有 10.1007/s00401-012-0956-x
 17. Nishijima H, Tomiyama M, Suzuki C, Kon T, Funamizu Y, Ueno T, Haga R, Miki Y, Arai A, Kimura T, Mori F, Wakabayashi K, Baba M. Amyotrophic lateral sclerosis with demyelinating neuropathy. *Intern Med* 51: 1917-1921, 2012. 査読有 DN/JST.JSTAGE/internalmedicine/51.7246 [pii]
 18. Odagiri S, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Kamitani T, Wakabayashi K. Immunohistochemical analysis of Marinesco bodies, using antibodies against proteins implicated in the ubiquitin-proteasome system, autophagy and aggresome formation. *Neuropathology* 32: 261-266, 2012. 査読有 10.1111/j.1440-1789.2011.01267.x
 19. Odagiri S, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in alpha-synucleinopathy. *Acta Neuropathol* 124: 173-186, 2012. 査読有 10.1007/s00401-012-0975-7
 20. Tanikawa S, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Endosomal sorting related protein CHMP2B is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions in alpha-synucleinopathy. *Neurosci Lett* 527: 16-21, 2012. 査読有 10.1016/j.neulet.2012.08.035
 21. Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol Dis* 49C: 190-198, 2012. 査読有 10.1016/j.nbd.2012.08.017
 22. Tanji K, Zhang HX, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. p62/sequestosome 1 binds to TDP-43 in brains with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *J Neurosci Res* 90: 2034-2042, 2012. 査読有 10.1002/jnr.23081
 23. Zhu G, Yoshida S, Migita K, Yamada J, Mori F, Tomiyama M, Wakabayashi K, Kanematsu T, Hirata M, Kaneko S, Ueno S, Okada M. Dysfunction of extrasynaptic GABAergic transmission in phospholipase C-related, but catalytically inactive protein 1 knockout mice is associated with an epilepsy phenotype. *J Pharmacol Exp Ther* 340: 520-528, 2012. 査読有 10.1124/jpet.111.182386
 24. Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A. The AAA-ATPase VPS4 Regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of alpha-Synuclein. *PLoS One* 6: e29460, 2011. 査読有 10.1371/journal.pone.0029460
 25. Odagiri S, Mori F, Tanji K, Kuroda N,

- Wakabayashi K. Immunohistochemical study of microscopic globular bodies of normal human brain. *Biomed Res* 32: 337-342, 2011. 査読有 JST.JSTAGE/biomedres/32.337 [pii]
26. Tanji K, Mori F, Kito K, Kakita A, Mimura J, Itoh K, Takahashi H, Kamitani T, Wakabayashi K. Synphilin-1-Binding Protein NUB1 is Colocalized With Nonfibrillar, Proteinase K-Resistant alpha-Synuclein in Presynapses in Lewy Body Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 879-889, 2011. 査読有 10.1097/NEN.0b013e3182303745

〔学会発表〕(計9件)

1. 森 文秋、丹治邦和、豊島靖子、佐々木秀直、吉田真理、柿田明美、高橋 均、若林孝一. 神経変性疾患におけるユビキリンの免疫組織化学的検討. [第54回日本神経病理学会] (2013年04月24日 - 2013年04月26日, 東京)
2. 森 文秋、丹治邦和、豊島靖子、佐々木秀直、吉田真理、柿田明美、高橋均、若林孝一. 神経変性疾患における valosin-containing protein の免疫組織化学的検討. [第54回日本神経病理学会] (2013年04月24日 - 2013年04月26日, 東京)
3. 森 文秋、柿田 明美、高橋 均、若林孝一. 筋萎縮性側索硬化症における TDP43 と Bunina 小体との関わり. [第53回日本神経病理学会] (2012年06月28日 - 2012年06月30日, 新潟)
4. 森 文秋、丹治邦和、小田桐紗織、豊島靖子、柿田明美、吉田真理、高橋 均、若林孝一. ポリグルタミン病と核内封入体病におけるオートファジー関連蛋白の発現. [第53回日本神経病理学会] (2012年06月28日 - 2012年06月30日, 新潟)
5. 森 文秋、丹治邦和、豊島靖子、柿田明美、吉田真理、高橋 均、若林孝一. ポリグルタミン病と核内封入体病における optineurin の発現. [第53回日本神経病理学会] (2012年06月28日 - 2012年06月30日, 新潟)
6. 森 文秋、丹治邦和、小田桐紗織、服部 学、星川恭子、河野親夫、安井敬三、横井聡、長谷川康博、神谷 哲、吉田真理、若林孝一. 核内封入体病におけるユビキチン関連蛋白の免疫組織化学的検討. [第53回日本神経病理学会] (2012年06月28日 - 2012年06月30日, 新潟)
7. Fumiaki Mori, Kunikazu Tanji, Saori Odagiri, Manabu Hattori, Yasuko Hoshikawa, Chikao Kono, Keizo Yasui, Satoshi Yokoi, Yasuhiro Hasegawa, Mari Yoshida, and Koichi Wakabayashi. Immunoreactivity of ubiquitin-related proteins in neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease. [The 2nd Congress of Asian Society of Neuropathology] (2011年11月04日 - 2011年11月06日, Bejin, China)

8. 森 文秋、丹治邦和、三木 康生、西嶋 春生、馬場 正之、黒滝 日出一、若林孝一. 軸索腫脹を伴う層状壊死を左大脳半球優位に認めた痙攣重積の1剖検例. [第52回日本神経病理学会] (2011年06月02日 - 2011年06月04日, 京都)
9. 森 文秋、丹治邦和、今 智矢、小田桐紗織、服部 学、星川恭子、河野親夫、安井敬三、横井聡、長谷川康博、吉田真理、若林孝一. 核内封入体病における FUS の免疫組織化学的検討. [第52回日本神経病理学会] (2011年06月02日 - 2011年06月04日, 京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 文秋 (MORI FUMIAKI)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60200383

(2)研究分担者

丹治 邦和 (TANJI KUNIKAZU)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10271800

若林 孝一 (WAKABAYASHI KOICHI)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50240768