

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700370

研究課題名(和文) TDP-43による神経変性メカニズムの解明とTDP-43異常蓄積阻害薬の検索

研究課題名(英文) Distinct pathways leading to cellular dysfunction by TDP-43

研究代表者

山下 万貴子(YAMASHITA, Makiko)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：00380668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TDP-43凝集体形成による神経細胞毒性メカニズムについて検討した。その結果、全長TDP-43は、アポトーシスによる細胞死を誘導し、一方で、TDP-43凝集体形成細胞では、細胞増殖が著しく抑制され、また、RNAポリメラーゼIIやいくつかの基本転写因子が凝集体内に巻き込まれており、その転写活性も阻害されていた。さらに、実際にFTLD患者脳でもTDP-43陽性dystrophic neuritesにおけるRNAポリメラーゼIIの共局在が観察された。これらのことより、TDP-43は複数のメカニズムにより神経細胞機能の異常を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：TDP-43 is the major component protein of inclusions in brains of patients with a ALS and FTLD-TDP. Here we report distinct cytotoxic effects by TDP-43 or its C-terminal fragment (CTF) using SH-SY5Y cells. When cells were overexpressed with full-length TDP-43 using a lentiviral system, striking cell death, caspase activation and growth arrest at G2/M phase were observed in these cells without any aggregate formation. In cells expressing TDP-43 CTF transiently, its aggregates were observed but significant cell death was not. Immunohistochemical analyses revealed that RNA polymerase II, Sp1 and CREB were co-localized with CTF aggregates, suggesting that recruitment of these factors to these aggregates cause the transcriptional dysregulation. Accumulation of RNA polymerase II with TDP-43 inclusions was also detected in FTLD-TDP brain. These suggest that different pathways leading to cellular dysfunction by TDP-43 may contribute to degeneration cascades in the onset of ALS and FTLD-TDP.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経変性疾患 TDP-43 凝集体形成

1. 研究開始当初の背景

多くの神経疾患では、変性部位にその病気を特徴づける異常病理構造物の出現が認められ、近年の分子遺伝学および分子神経生物学の発展により、それらを構成するタンパク質としてアミロイドβ、タウ、α-シヌクレインなどが既に同定されている。しかし、一方で、依然それらでは説明できない細胞内異常構造物の存在が知られていたが、2006年、東京都医学総合研究所(旧精神医学総合研究所)の長谷川・新井らは、前頭側頭葉変性症(forntotemporal 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RNA結合タンパク質を同定した(Arai T. et al., *Biochem, Biophys. Res. Communi.*, 351: 602-611 (2006), 長谷川成人ら, *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である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質内に蓄積しており、さらに、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(Nonaka T. et al., *Human Molecular Genetics*, 18(18): 3353-3364 (2009))。しかし、その構造、凝集体形成・蓄積のメカニズムや神経変性とのつながり、疾患発症における凝集体形成の生理学的意義、疾患進行のメカニズムなど、詳細については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、TDP-43による神経毒性メカニズムを明らかにするとともに、TDP-43蓄積を伴う各種神経変性疾患の新規治療薬の開発を目指して、既存の薬剤ライブラリーを中心に、TDP-43凝集体阻害因子の検索を行う。

3. 研究の方法

1) TDP-43またはTDP-43凝集体による細胞毒性メカニズムの解明

本研究では、各種TDP-43発現細胞モデルを用い、細胞の性質や機能に及ぼす影響を検証する。またその作用機序を明らかにする。

2) TDP-43凝集体形成阻害因子の検索

一方で、新規治療薬あるいは予防薬の開発を目指して、既存の薬剤ライブラリーの中から異常TDP-43の蓄積を阻害する薬剤の検索を行う。

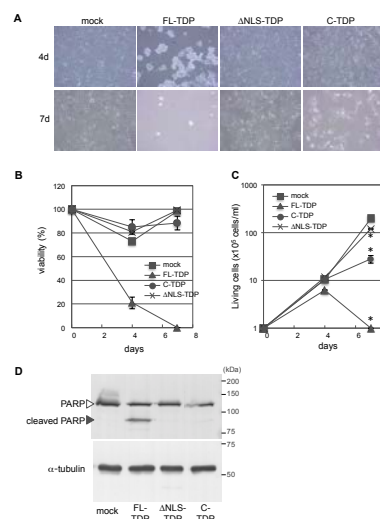
(i) これまでのスクリーニング法は、免疫染色により、サンプルを1つ1つ検鏡し、それを専用ソフトにて数値化することでその効果を判断していたため、多大な労力と時間が必要だった。そこで、本研究では、迅速かつ簡便に多数の化合物についてその効果を検証するために、flow cytometryを用いたハイスループットなスクリーニング系の構築を行う。

(ii) 上記方法によりピックアップした薬剤について、ウェスタンブロット法、生化学的解析の手法を用いて、その効果を判定する。

4. 研究成果

1) レンチウイルスの系を用いて、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞にTDP-43を発現させ、細胞への影響を調べた。その結果、全長TDP-43を発現させると、細胞数および生存率が著しく低下し、強い細胞毒性が早い段階から観察された。また、カスパーゼの活性化を示すPARPの断片化も観察されたことから、全長TDP-43の過剰発現ではアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

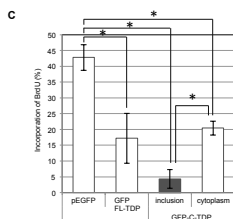
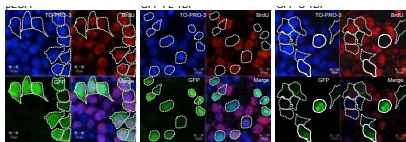
一方で、患者脳内に見られるC末端断片と同じ断片を発現させた細胞では、細胞増殖の弱い抑制は観察されたものの、生存率の低下やカスパーゼの活性化も観察されなかった。



レンチウイルスによる遺伝導入は、導入効率は高いものの、個々の細胞における発現が弱いため、次に、個々の細胞における発現量が高いtransient transfectionの系を用いてさらに検討を行った。

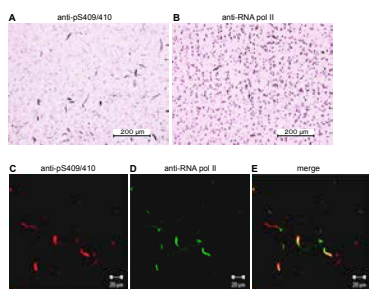
GFPタグのついた各種TDP-43発現コンストラクトをSH-SY5Y細胞に導入した後、TDP-43を発現している細胞1つ1つについて、BrdUの取り込み活性を測定した。その結果、全長TDP-43を発現させるとBrdUの取り込みが半分以下に減少しており、前述のレンチウイルス系の結果と一致した。一方、C末端断片を発現させた細胞では、その中で細胞内に凝集体を形成している細胞におけるBrdUの取り込みがほぼ完全に阻害されていることが明らかとなった。そこで、さらに細胞周期について検討したところ、全長TDP-43を発現させた細胞では、アポトーシス誘導時に典型的なG2/M期およびsubG1部分の細胞が増加しており、これも前述のレンチウイルス系の結果と一致した。一方で、C末端断片を発現させた細胞では、とくに細胞周期パターンの変化は観察されなかった。

これまでの結果より、全長 TDP-43 の過剰発現はアポトーシス誘導により強い細胞毒性を示す一方で、C 末断片発現により凝集体を形成させると、ゆるやかな増殖抑制と BrdU の取り込み活性がおちるものの、それは全長 TDP-43 の様な強い毒性ではないことから、異なる毒性メカニズムが存在していることが示唆された。



そこで、TDP-43 は本来 RNA 結合タンパク質であること、また、ポルグルタミン病という別の変性疾患において、脳内凝集体に転写因子が巻き込まれ、転写障害が起きているという報告があったことから、TDP-43 凝集体形成におけるそれらの関与について検討した。

その結果、転写活性の本体である RNA ポリメラーゼ II や、基本転写因子である Sp1 や CREB などが TDP-43 の C 末断片凝集体に巻き込まれることが明らかとなった。また、内在性 RNA ポリメラーゼが TDP-43 と相互作用をすること、凝集体形成細胞では Sp1 や CREB の転写活性が低下していることも明らかになった。さらに、実際に FTLD 患者脳内においても、海馬傍回付近に見られるリン酸化 TDP-43 陽性 dystrophic neurites と RNA ポリメラーゼ II が共局在を示すことを確認した。



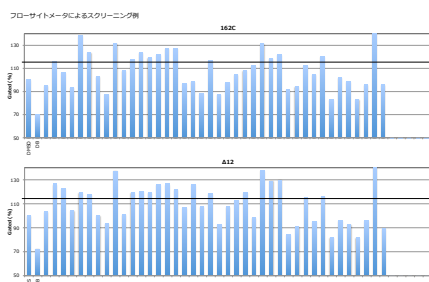
以上の結果より、TDP-43 あるいは TDP-43 からなる凝集体は神経細胞の細胞死あるいは増殖阻害および転写制御の異常を引き起こすことが明らかとなり、これらが TDP-43 proteinopathy の発症あるいは病態進行に関与している可能性が示唆された。今回、TDP-43 凝集体自身の神経細胞毒性を示したことは1つの進歩ではあるが、「本来核

内にある TDP-43 が、何故、細胞質に蓄積するのか」また、凝集体の形成に際して「断片化が先か、異所局在が先か、あるいはリン酸化が先か」など、依然不明な点が多い。また FTLD-TDP との関係や TDP proteinopathy の病態を再現できる動物モデルの開発など、克服すべき課題はまだ数多く残っている。今後のさらなる研究の進展が期待される。

2) 本研究では、約 1200 種類の市販薬ライブラリーから、TDP-43 凝集体形成を阻害する薬剤のスクリーニングを行った。

ヒト神経細胞株 SH-SY5Y 細胞に、細胞質内凝集体を形成する TDP-43 発現コンストラクト (162-414:162C あるいは Δ 78-84 & Δ 187-192: Δ 12) を導入し、6 時間後に各種低分子化合物を添加することにより薬剤処理を開始した。3 日後に細胞を回収し、フローサイトメーターを用いたハイスループットスクリーニング法を用いて、凝集体形成に及ぼす効果を検証した。

その結果、162C および Δ 12 の両方に対して凝集体形成抑制効果がある化合物を 15 種類同定した。



そこで、それらについて、ウエスタンブロット法および免疫染色法でそれぞれ効果を確認したところ、いずれの方法でも阻害効果を確認出来た。そのうち 6 種類については特許出願を行った。

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 1 件)

① Yamashita M., Nonaka T., Hirai S., Miwa A., Okado H., Arai T., Hosokawa M., Akiyama H., Hasegawa M., Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Hum. Mol. Genet.*, 査読有り, vol. 23, 2014, pp. 1-12

[学会発表] (計 4 件)

① 山下万貴子、野中隆、秋山治彦、長谷川成人、全長 TDP-43 あるいは TDP-43C 末断片凝集体による神経細胞毒性メカニズムの解

明、第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、2014 年 6 月 5～7 日、東京

② 山下万貴子、野中隆、全長 TDP-43 あるいは C 末断片凝集体により誘導される異なる神経毒性メカニズムの解明、脳内環境 H25 年度冬の班会議、2014 年 1 月 8 日、東京

③ Makiko YAMASHITA, Takashi NONAKA, Haruhiko AKIYAMA, Masato HASEGAWA, TDP-43 inclusions suppress proliferation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and interfere with transcriptional regulation. 2012. 12. 11-15, 第 35 回日本分子生物学会, 福岡

④ Makiko YAMASHITA, Takashi NONAKA, Haruhiko AKIYAMA, Masato HASEGAWA. TDP-43 inclusions suppress proliferation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and interfere with transcriptional regularion. 2012. 09. 05-07, The 8th International Conference on Frontotemporal Dementia (FID2012), Manchester, UK

〔図書〕(計 1 件)

① 山下万貴子、長谷川成人、中山書店、すべてがわかる ALS (筋萎縮性側索硬化症)・運動ニューロン疾患、2013、中山書店

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 6 件)

名称：フルベストラントを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物
発明者：山下万貴子、野中隆、秋山治彦、長谷川成人
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-72977
出願年月日：2013 年 3 月 29 日
国内外の別：国内

名称：アモジアキンを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物
発明者：山下万貴子、野中隆、秋山治彦、長谷川成人
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-72983
出願年月日：2013 年 3 月 29 日
国内外の別：国内

名称：ミトタンを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物
発明者：山下万貴子、野中隆、秋山治彦、長谷川成人
権利者：同上
種類：特許

番号：特願 2013-72989

出願年月日：2013 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

名称：ニフェジピン等を含む神経変性疾患の治療及び／又は予防用医薬組成物
発明者：山下万貴子、野中隆、秋山治彦、長谷川成人
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-74065
出願年月日：2013 年 3 月 29 日
国内外の別：国内

名称：レチノイン酸等を含む神経変性疾患の治療及び／又は予防用医薬組成物
発明者：山下万貴子、野中隆、秋山治彦、長谷川成人
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-74114
出願年月日：2013 年 3 月 29 日
国内外の別：国内

名称：ブロムヘキシン塩酸塩等を含む神経変性疾患の治療及び／又は予防用医薬組成物
発明者：山下万貴子、野中隆、秋山治彦、長谷川成人
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-74155
出願年月日：2013 年 3 月 29 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下万貴子 (YAMASHITA Makiko)
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・臨床薬理部門・特任研究員
研究者番号：00380668

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :