

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790875

研究課題名(和文) GEM小体に着目した運動神経細胞死の機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of association between GEM body and motor neuron death

研究代表者

横関 明男 (Yokoseki, Akio)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：90515719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：核内蛋白であるTDP-43は、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)発症に大きく関与している。TDP-43は、Cajal小体、GEM小体、PMLなど種々の核内小体と共局在することが報告されている。本研究では、ALS症例の脊髄運動神経内のGEM小体が、正常コントロールより減少しているが、GEM小体の容積は変化していないことを明らかとした。また、ALS症例において核内TDP-43の有無にかかわらず、GEM小体数に違いはなかった。このことから、ALSでは、TDP-43の機能異常によりGEM小体の形成異常を引き起こしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) is a nuclear protein and plays an important role for onset of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). TDP-43 has been reported to associate with some nuclear bodies: Cajal body, GEM body, and PML. Therefore, I studied association between TDP-43 and GEM body in ALS pathology. The number of GEM bodies decreased in spinal motor neurons with ALS than those with normal; the volume of GEM bodies was not different between spinal motor neurons with ALS and normals. Moreover, the number of GEM bodies was similar between spinal motor neurons with and without nuclear TDP-43. These results suggest that decreased number of GEM bodies may be caused by dysfunction of TDP-43 in ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS TDP-43 GEM SMN

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は、発症原因が不明であり、有効な治療法が確立していない致死性の神経変性疾患である。ALS 病理で特徴とされる運動神経内のユビキチン陽性封入体の構成蛋白が Transactive response DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) であることが、2006 年に明らかとなった (Neumannら Science 2006, Araiら Biochem Biophys Res Commun 2006)。これ以降、ALS の病態研究は飛躍的に進んでいる。

TDP-43 は核内蛋白であり、正常細胞においては核小体や Cajal 小体などの核内小体と共存している (Proc Natl Acad Sci USA 2002)。一方、ALS 患者において、細胞質内に TDP-43 陽性封入体を形成した運動神経細胞では、正常細胞で認める核内 TDP-43 が消失している (Neumannら Science 2006, Araiら Biochem Biophys Res Commun 2006)。このことから、ALS 発症の機序の仮説として、TDP-43 の機能の喪失が TDP-43 と相互作用する核内小体に何らかの影響を与え、それが運動神経細胞死に繋がっている可能性がある。

申請者は上記仮説のもと、平成 22 年、23 年の科学研究費補助金事業で「Cajal 小体に着目した ALS 病態メカニズムの解明」のテーマで研究を実施し、ALS の脊髄前角細胞において核内小体のうち Cajal 小体がコントロールと比較して減少していることを明らかにした。そのため、ALS 病理において他の核内小体にも影響が及んでいる可能性がある。そこで今回は、GEM 小体に注目した。

GEM 小体は、SMN (survival motor neuron) 蛋白、および Gemin 蛋白と複合体を形成し、mRNA のスプライシングに必要な small nuclear RNA の成熟に必須の場となっている。また SMN をコードする遺伝子変異には、ALS と類似する運動神経疾患を起こす spinal muscular atrophy の原因遺伝子でもある。

今回は、ALS 病理において GEM 小体の数、容積に影響が出ているか否かを明らかにするため、培養細胞およびヒト脊髄剖検検体を用いて研究を実施した。

2. 研究の目的

ALS 症例の運動神経細胞内では核内 TDP-43 の機能喪失により、核内小体の一つである GEM 小体に何らかの機能異常が起きていることを証明し、ALS の運動神経死の機序を明らかにする

(1) 培養細胞で TDP-43 の発現抑制を行い、GEM 小体数が変化するかを明らかにする。

(2) ALS の脊髄前角細胞の GEM 小体数や容積に異常が起きているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TDP-43 発現抑制細胞における GEM 小体数の解析

核内小体の解析で広く使用されている

HeLa 細胞を使用した。TDP-43 遺伝子の siRNA を LipofectamineRNAiMAX (Life Technologies) を用いて 2 回トランスフェクションして、TDP-43 の発現を抑制した。細胞を固定後、抗体 TDP-43 抗体 (10782-1-AP, ProteinTech) および抗体 SMN 抗体 (610646, BD Transduction Laboratories) を 1 次抗体として、Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG (Life Technologies) および Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG を 2 次抗体として 2 重免疫染色をした。TDP-43 蛋白の発現抑制は、TDP-43 の免疫染色で確認した。コントロール 200 細胞、TDP-43 発現抑制細胞 200 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で検鏡し、1 細胞当たりの GEM 小体数をカウントした。

(2) TDP-43 発現抑制細胞における SMN 蛋白量の解析

前述の通り TDP-43 発現を抑制した細胞を RIPA バッファー (25mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% デオキシコール酸, 0.1% ドデシル硫酸塩) とプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) を用いて回収し、上清をアガロースゲル電気泳動し、前述の抗 TDP-43 抗体、抗 SMN 抗体を用いて蛋白を検出した。蛋白量は、抗アクチン抗体 (Santa Cruz) で補正した。

(3) ALS 症例の脊髄前角細胞中の GEM 小体数および体積の解析

孤発性 ALS5 症例、*TARDBP* 変異 (p.Gln343Arg) の家族性 ALS1 症例、*SOD1* 変異 (p.Asp101Tyr) の家族性 ALS1 症例、およびコントロール 5 症例の脊髄 (腰髄)、6 μ m 厚切片を抗 TDP-43 抗体、抗体 SMN 抗体で二重免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で検鏡した。それぞれで 1 細胞中の GEM 小体の数をカウントした。また画像を解析ソフト Imaris (BitPlane) で 3 次元再構成を行い、GEM 小体の容積を計測し、それぞれ比較した。

(4) 統計解析

ALS とコントロールとの比較は、Mann-Whitney's U test で比較した。統計解析は、IBM SPSS Statistics version 22 を用いて解析し、 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

4. 研究成果

(1) TDP-43 発現抑制による GEM 小体の影響

TDP-43 の発現抑制の有無により、細胞中の GEM 小体数が変化するか否かを明らかにするため HeLa 細胞および *TARDBP* 遺伝子の siRNA を用いて、1 細胞中の GEM 小体数を比較した。TDP-43 抑制細胞は、 1.54 ± 0.93 (平均 \pm 標準偏差) / 細胞、コントロールは、 2.97 ± 0.12 / 細胞であり、TDP-43 の発現が低下すると、GEM 小体数が減少した ($p < 0.01$)。

(2)TDP-43 発現抑制による SMN 蛋白質量の検討
前述の培養細胞を用いて、TDP-43 発現抑制による SMN 蛋白質量の変化を検討した。ウェスタンブロットでは、TDP-43 の発現抑制を行うと、SMN 蛋白質量が著明に減少した。

(3)ALS 脊髄前角中の GEM 小体数の検討

ALS 病理で最も変性が起こる脊髄前角細胞中の GEM 小体の変化を検討するため、孤発性 ALS5 症例、およびコントロール 5 症例の脊髄前角細胞の GEM 小体数および容積を比較した。ALS5 症例での GEM 小体数は、 3.25 ± 1.40 /細胞、コントロールは 11.05 ± 2.14 /細胞であり、ALS では明らかに減少していた ($p < 0.05$)。

また、*TARDBP* 変異 ALS においても、 2.67 ± 0.50 と GEM 小体数は減少していたが、*SOD1* 変異症例では、 14.33 ± 1.90 と GEM 小体の減少を認めなかった。

ALS 病理において、核内 TDP-43 の有無による GEM 小体数に変化があるか否かを明らかにするため、TDP-43 陽性細胞質内封入体の有無で、GEM 小体数を比較した。GEM 小体数は、TDP-43 陽性細胞質内封入体ありは 3.03 ± 1.40 /1 細胞、細胞質内封入体なしは 3.02 ± 1.99 /1 細胞であり、細胞質内封入体の有無による GEM 小体数に有意差を認めなかった。

ALS とコントロールで、GEM 小体の容積に違いがあるか否かを明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡で得られた画像を 3 次元再構成し、1 GEM 小体あたりの容積を比較した。ALS 症例は、 $0.60 \pm 0.20 / \mu\text{m}^3$ 、コントロール症例は $0.67 \pm 0.32 / \mu\text{m}^3$ であり、容積に変化はなかった。

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 4 件)

(1)Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 査読有, 84(4), 2013, 398-401. doi: 10.1136/jnnp-2012-302272.

(2)Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, Yokoseki A, Arakawa K, Sekina Y, Shimohata T, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Onodera O, Takahashi H. Sporadic ALS with compound heterozygous mutations in the SQSTM1 gene. *Acta Neuropathol*. 査読有, 126(3), 2013, 453-9. doi: 10.1007/s00401-013-1150-5

(3) 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. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 査読有, 22(20), 2013, 4136-47. doi: 10.1093/hmg/ddt262.

(4) 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. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. *PLoS One*. 査読有, 7(8), 2012, e43120. doi: 10.1371/journal.pone.0043120.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)横関明男, 石原智彦, 志賀篤, 小山哲秀, 西澤正豊, 譚春鳳, 高橋均, 佐藤達哉, 小野寺理. 筋萎縮性側索硬化症の脊髄前角細胞における Cajal 小体の減少. 第 54 回日本神経学会 学術大会, 2013 年 5 月, 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計 1 件)

(1)横関明男, 西澤正豊, 小野寺理. 別冊日本臨床 神経症候群 第 2 版 眼球運動失調と低アルブミン血症を伴う早発型失調症 日本臨床社, 2013: 385-388

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 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
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・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：90515719

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：