

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 16 日現在

機関番号：13101
研究種目：基盤研究(A) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25253065
研究課題名(和文) TDP43の自己調節機能に注目したALSの病態機序の解明

研究課題名(英文) Autoregulation of TDP-43 in ALS

研究代表者
西澤 正豊 (Nishizawa, Masatoyo)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80198457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：TDP-43はALSの病態の主体であるが、その機序の詳細は不明である。我々は、TDP-43の機能障害説に立ち、その機能について解析し、ALSの脊髄運動神経細胞では、TDP-43の異常に伴い、核内小体が減少し、その機能障害によりU snRNAが減少することを示した。しかし、TDP-43が異常をきたす機序については解明できていない。本研究にてTDP-43の自己制御機構について検討し、TDP-43が自身のpolyadenylation signalを抑制し、その結果として、自己のスプライシングを誘導し、その量的制御を行っていること。患者運動神経細胞では、その制御が亢進していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal motor neuron disorder. In motor neurons of ALS, TAR DNA binding protein-43 (TDP-43), a nuclear protein encoded by TARDBP, is absent from the nucleus and forms cytoplasmic inclusions. TDP-43 auto-regulates the amount by regulating the TARDBP mRNA, which has three polyadenylation signals (PASs) and three additional alternative introns within the last exon. We show that TDP-43 inhibits the selection of the most proximal PAS and induces splicing of multiple alternative introns in TARDBP mRNA to decrease the amount of cytoplasmic TARDBP mRNA by nonsense-mediated mRNA decay. When TDP-43 is depleted, the TARDBP mRNA uses the most proximal PAS and is increased in the cytoplasm. Finally, we have demonstrated that in ALS motor neurons; especially neurons with mislocalized TDP-43; the amount of TARDBP mRNA is increased in the cytoplasm. Our observations suggests that the absence of nuclear TDP-43 induces an abnormal autoregulation.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態研究は、孤発性 ALS (SALS) に認められるユビキチン陽性 skein-like inclusion の構成蛋白が TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) であることが発見され、大きく進展した。しかし TDP-43 の蓄積は他の孤発性、遺伝性神経変性疾患でも認められ、TDP-43 の蓄積は SALS の原因ではなく結果であるとする見解もあった。我々は SOD1 変異による家族性 ALS (FALS) では TDP-43 陽性 skein-like inclusion を認めないことから、TDP-43 の蓄積が結果ではないことを示した。さらに、SALS と同様の TDP-43 陽性 skein-like inclusion を認める FALS にて、TDP-43 遺伝子にミスセンス変異、さらに本患者脊髄の生化学的解析で SALS と同様の変化を見いだした。時期を同じくして、複数のグループから TDP-43 変異を伴う FALS, SALS が報告され、TDP-43 が ALS の原因であることが明確となった。

ALS における TDP-43 変化の特徴として、細胞質内封入体の形成と核からの消失がある。我々は“TDP-43 の核からの消失による TDP-43 の核内での生理機能の消失”が重要と考えた。TDP-43 は核内小体に共局在する。この核内小体の構成蛋白質の一つである SMN の消失は劣性遺伝性運動神経疾患である脊髄性筋萎縮症 (SMA) の原因となり、SMA では核内小体が減少する。我々は TDP-43 の核内小体への影響を検討し、TDP-43 がヒト運動神経細胞において核内小体に局在すること、さらに ALS 患者 (SALS および TDP-43 変異を有する FALS) の脊髄運動神経細胞にて核内小体が減少していることを見いだした。また ALS 関連遺伝子である FUS, TDP-43 の変異を有する線維芽細胞でも、核内小体の減少が報告された。これらの事実は、運動神経細胞死に核内小体を介する共通の分子基盤の存在を示唆する。

SMA では、核内小体で成熟される U snRNA, 特に U11 snRNA が減少する。我々も SALS の罹患組織において、U12 snRNA の減少を明らかにした。特筆すべきことに本年、U12 snRNA が運動神経系の維持に特に重要であることが報告された。U snRNA の異常はスプライシングの異常や mRNA 量の減少をきたす。我々は TDP-43 の減少で mRNA のスプライシング異常、量的異常が生じることを指摘している。これらの一部は TDP-43 の直接作用と考えるが、U snRNA の異常も背景にあると考える。これらの知見から、我々は、運動神経病の共通の分子基盤として、核内小体の異常による U12 snRNA 異常を提唱するに至った。しかし、根本にある TDP-43 の核からの消失と封入体の形成機序について

は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

ALS では TDP-43 mRNA の調節機構に異常があると考え。次のような仮説を立て、これを検証する。TDP-43 mRNA の一部は、遠位部の polyA サイトを利用し、TDP-43 と結合し核内にとどまる。TDP-43 の核内量が減少すると、緊急に核外に放出され、その量の調節に寄与する。しかし、ALS では、この核内 TDP-43 mRNA が消失している。この所見の病態への関与を明らかとする。

3. 研究の方法

TDP-43 myc 安定発現細胞は Flp-in Expression system (Invitrogen) を用いて構築した。HEK293T 細胞は、37°C/5%CO₂ 条件下で 10%FBS を含む Dulbecco's modified Eagle Medium で培養した。トランスフェクションは Lipofectamine™2000 (Invitrogen) を使用し、細胞は 72 時間後に回収した。回収した細胞は核質と細胞質に分離し、RNeasy plus mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出し、polyA(+)RNA を精製し、ノザンブロットティング法により解析を行った。また Superscript® VILO™ cDNA synthesis kit を用いて cDNA を構築し、mRNA の定量を行った。定量リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq™ (Takara) を用い、Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (Takara TP850) により解析した。内在性コントロールは GAPDH (Takara 社より購入) を用いた。PCR 条件は、95°C 30 秒の初期変性後、95°C 5 秒、60°C 30 秒を 40 サイクルとした。ΔΔCT 法により解析した。

蛋白は Protease inhibitor cocktail (Sigma) および phosphatase inhibitor cocktail-2 (Sigma) を含む RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) に組織を浸し破碎した。超音波処理をした後、100,000g で 30 分間 4°C 下で超遠心を行い、上清を RIPA 可溶性画分とした。

ウエスタンブロットティングは Laemmli Sample Buffer (BioRad) を加え、96°C で 5 分間処理した。10%ポリアクリルアミドゲル Super Sep™ Ace (Wako) を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。抗 TDP-43 (260-414) 抗体 (Proteintech, 12892-1-AP) または抗 TDP-43 (1-260) 抗体 (Proteintech, 10782-2-AP) を 1 次抗体として用いた (図 3A)。内在性コントロールとして抗 GAPDH 抗体 (MBL) を用いた。HRP を標識した二次抗体を Immobilon Western

Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いて検出した。ImageQuant™ LAS4000 biomolecular imager (GE Healthcare) を用いてバンドを定量解析した。

TDP-43 mRNA の細胞内局在については、孤発性 ALS10 例、非神経変性疾患コントロール 7 例、ALS1 (SOD1 変異) 2 例を用いた。ヒト脊髄 FFPE 切片の *in situ hybridization* は、affymetrix 社の QuantiGene ViewRNA ISH assay を用いて行った。プローブは TDP-43 の Exon3-5 のコーディング領域に設計した。組織は全て、*in situ hybridization* 後にヘマトキシリンによるカウンター染色を行い、脊髄運動神経細胞の核・細胞質を弁別した。TDP-43 の免疫染色は、*in situ hybridization* の隣接切片を用いて行った。抗原不活化は、クエン酸バッファー中でオートクレーブにより行った。免疫染色もヘマトキシリンによる核のカウンター染色を行い、核・細胞質の弁別を行った。

QuantiGene ViewRNA ISH assay により検出された TDP-43 mRNA のドット数計測は、imaris (Bitplan) ソフトを用いて行った。ヘマトキシリン染色画像と重ねることにより、核・細胞質領域を弁別し、各々に局在するドット数を計測し、1 細胞当たりの細胞質 mRNA 数比率を算出した。

組換え DNA 実験安全管理規則に従い、学長許可を受けて実施した。ヒト剖検サンプルの取り扱いには、人権・プライバシーの保護に努め、本学倫理委員会の許可を受け行った。

4. 研究成果

TDP-43 mRNA は、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構を阻害する CHX にて処理することにより増加した。この CHX 処理により増加する産物は、TDP-43 のエクソン 6 内で 2 つのイントロン (ie6-1, ie6-2) がスプライシングされていた。この産物は、本来の終止コドンを使い、新たな最終エクソンと新たな終止コドンを作り出す。これは、最終エクソンから、50 塩基以上に終止コドンが存在するというナンセンス依存性 mRNA 分解機構を惹起する条件を満たす。実際、同機構の阻害剤により、この産物の増加を認めた。さらにこの機構では、まず ie6-1 のスプライシングが行われることが重要であり、その後 ie6-2 のスプライシングがおこることを示した。これらの結果から、TDP-43 は、エクソン 6 内のスプライシングを介したナンセンス依存性 mRNA 分解機構によって mRNA 量を調整すると結論した。さらに過剰な TDP-43 は polyA 結合部位の使い方を変化させ、遠位部の polyA 結合部位を利用する長い 3'-UTR を持つ mRNA を産生した。この mRNA は核

内に貯留する傾向を認めた。mRNA の翻訳には、細胞質への移動が必要であり、この機構も、TDP-43 の自己調節機能の一端を担っていると想定された。

加えて、TDP-43 は polyA 結合部位の使用状況を変化させることを示した。外来性の TDP-43 存在下では、より遠位の polyA 結合部位を使用するようになった。さらに、TDP-43 の mRNA は核内に蓄積する傾向があり、特にそれは遠位の polyA 結合部位を利用する物に強かった。

つぎに TDP-43 mRNA 局在を比較する目的で、脊髄運動神経における TDP-43 mRNA の定量を行った。核・細胞質のドット数の絶対量評価では、有意差は得られなかったものの、孤発性 ALS で細胞質での TDP-43 mRNA の増加が示唆された。そこで各細胞で細胞質に存在する TDP-43 mRNA の比率を算出した。この TDP-43 mRNA 細胞質比率を比較した結果、孤発性 ALS においてコントロール群との間に有意な増加を認めた。一方で、ALS1 群はコントロール群と同様の細胞質比率を示した。さらに重回帰分析により、核・細胞質・1 細胞当たり存在する TDP-43 mRNA のコピー数に与える要因の影響度の強さを分析した結果、孤発性 ALS であるか否かの要因が細胞質 TDP-43 mRNA 数に最も強い作用を持つことが示された。

最後に孤発性 ALS における核内 TDP-43 タンパク質の局在との関連について、孤発性 ALS 運動神経細胞を免疫染色によって、細胞内 TDP-43 タンパク質の有無で 2 群に分け、この 2 群間で細胞内 TDP-43 mRNA 局在を比較した。その結果、核内に TDP-43 タンパク質を欠く、運動神経細胞群では、TDP-43 タンパク質を核内に保つ群と比較して、細胞質 TDP-43 mRNA の比率の増加を見出した。この結果は、孤発性 ALS の運動神経細胞では TDP-43 の産生が上昇していることを示唆している。TDP-43 病理を示さない ALS1 では、この所見が見られないことから、孤発性 ALS の TDP-43 核外移行の病態との関連が強く示唆される。さらに、孤発性 ALS の運動神経細胞でも TDP-43 タンパク質を核内から欠いた運動神経細胞で、細胞質 TDP-43 mRNA の増加を認めた。これらの細胞では、産生された TDP-43 タンパク質は核外封入体にトラップされるなどして、核内に移行できない状態にあると考えられることから、核内 TDP-43 タンパク質は常に不足状態となり、恒常的に TDP-43 自己量調節機構は、発現の亢進に傾き続ける。この悪循環は、さらなる封入体形成を増悪させ続け、病態を悪化させると考えられる。

本研究結果によって、孤発性 ALS には、TDP-43 の自己量調節機構の異常が病態背景

に存在することが示唆された。我々はこれまでに、TDP-43 の自己量調節メカニズムを明らかにしている。従って、この機構の制御が、孤発性 ALS の有効な治療標的になりうると期待される。

TDP-43 は現在まで 30 種類以上の変異が報告されているが、そのほとんどすべてがエクソン 6 に集中している。本研究を通じて、我々は TDP-43 のエクソン 6 が自己蛋白量調節機構において重要な役割を担っていることを明らかとした。今後、ALS で見いだされた変異が、この自己蛋白量調節機構にどのような影響を与えるかを明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 12 件) 全て査読有り

1. Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Tanaka H, Shimizu H, Shiga A, Miura T, Aoki K, Aikawa A, Ishizawa S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Globular Glial Mixed Four Repeat Tau and TDP-43 Proteinopathy with Motor Neuron Disease and Frontotemporal Dementia. *Brain Pathol.* 2016;26(1):82-94.
2. Koike Y, Kanazawa M, Terajima K, Watanabe K, Ohashi M, Endo N, Shimohata T, Nishizawa M. Apparent diffusion coefficients distinguish amyotrophic lateral sclerosis from cervical spondylotic myelopathy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2015;132:33-6.
3. Onodera O, Ishihara T, Shiga A, Ariizumi Y, Yokoseki A, Nishizawa M. Minor splicing pathway is not minor any more: implications for the pathogenesis of motor neuron diseases. *Neuropathology.* 2014;34(1):99-107.
4. Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M, Tanaka A, Ito C, Toshimori K, Ogawa N, Terashima T, Maegawa H, Yanagisawa D, Tooyama I, Tada M, Onodera O, Hayasaka K. A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet.* 2014 ;95(3):294-300.
5. Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(6):783-8.
6. Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S, Camu W, Neitzel B, Onodera O, van Rheenen W, Pinto S, Weber M, Smith B, Proven M, Talbot K, Keagle P, Chesi A, Ratti A, van der Zee J, Alstermark H, Birve A, Calini D, Nordin A, Tradowsky DC, Just W, Daoud H, Angerbauer S, DeJesus-Hernandez M, Konno T, Lloyd-Jani A, de Carvalho M, Mouzat K, Landers JE, Veldink JH, Silani V, Gitler AD, Shaw CE, Rouleau GA, van den Berg LH, Van Broeckhoven C, Rademakers R, Andersen PM, Kubisch C. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. *J Med Genet.* 2014;51(6):419-24.
7. Kimura T, Jiang H, Konno T, Seto M, Iwanaga K, Tsujihata M, Satoh A, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology.* 2014;34(4):392-7.
8. Fu YJ, Aida I, Tada M, Tada M, Toyoshima Y, Takeda S, Nakajima T, Naito H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Progressive myoclonus epilepsy: extraneuronal brown pigment deposition and system neurodegeneration in the brains of Japanese patients with novel SCARB2 mutations. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(5):551-63.
9. Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, Yokoseki A, Arakawa K, Sekine 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.* 2013;126(3):453-9.
10. 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. 2013;22(20)
11. Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Shiga A, Tanaka H, Shimohata M, Kimura K, Morita T, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H. Transportin 1 accumulates in FUS inclusions in adult-onset ALS without FUS mutation. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013;39(5):580-4.
 12. 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. 2013;84(4):398-401.
- [学会発表] (計 8 件)
1. T.Ishihara, S.Toyoda, A.Koyama, R.Nakamura, G. Tohnai, N.Atсутa, G.Sobue, M.Nishizawa, O. Onodera. The SMN gene copy number states in Japanese ALS patients. 10th Brain Research Conference: RNA Metabolism in Neurological Disease 15-16 October 2015 Chicago.
 2. Siga A, Onodera O. Detection of CRISPR/Cas9 induced-rare genome editing events by droplet-digital PCR. 10th Brain Research Conference: RNA Metabolism in Neurological Disease 15-16 October 2015 Chicago.
 3. Gaku Ito, Akihito Koyama, Atsushi Shiga, Sachiko Hirokawa, Yasuko Toyoshima, Akiyoshi Kakita, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Depletion of TDP-43 induces mitochondrial fragmentation. Neuroscience 2015 October 17-21 Chicago.
 4. Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Overexpression of intrinsic TDP-43 by disruption of the autoregulation in vivo. EMBO | EMBL Symposia Mechanisms of Neurodegeneration EMBL Heidelberg, Germany Sunday 14 June - Wednesday 17 June 2015.
 5. Ito G, Koyama A, Shiga A, Hirokawa S, Toyoshima Y, Kakita A, Nishizawa M, Onodera O. Depletion of TDP-43 induces mitochondrial fragmentation. ALS MND 2015 26th International Symposium on ALS/MND 11 - 13 December 2015 / U.S.A, Orlando, FL
 6. Osamu Onodera, Masatoyo Nishizawa, Hitoshi Takahashi. Update in amyotrophic lateral sclerosis XVII International congress of Neuropathology
 7. Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Akihito Koyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera : Endogenous TDP-43 over-expression model with disrupted auto-regulation : 10th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. October 12 - 15, 2014 Hilton San Diego Resort & Spa, San Diego, California
 8. Atsushi Shiga, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. digital-droplet PCR system facilitates to clone the genome-edited iPSC cells.Tr-Conference 2015 San Francisco.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
西澤 正豊 (NISHIZAWA, Masatoyo)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号 : 80198457
- (2)研究分担者
小野寺 理 (ONODERA Osamu)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号 : 20303167
- 石原 智彦 (ISHIHARA Tomohiko)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号 : 70612232
- 柿田 明美 (KAKITA Akiyoshi)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号 : 80281012
- 佐藤 俊哉 (SATO Toshiya)
北里大学・医学部・助教
研究者番号 : 90359703