

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460342

研究課題名(和文) TDP-43およびFUS関連筋萎縮性側索硬化症の病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular pathomechanism of TDP-43 and FUS-linked ALS

研究代表者

鈴木 宏昌 (Suzuki, Hiroaki)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10424178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位下位両運動神経が変性脱落する運動神経変性疾患である。これまで様々な病態仮説が提唱されているものの定説はなく、根本的治療薬もない。

本研究では、ALS発症に密接に関与していると考えられているRNA結合タンパク質(RBP)であるTDP-43、FUS、hnRNPA1に着目し、それぞれが導く神経細胞死機序の一端を明らかにした。

今後はこれらRBPに共通した細胞死誘導機序を創薬標的とし、RBPによる運動神経細胞死を抑制可能な治療薬開発を目指していきたい。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable adult-onset motor neuron degenerative disease, characterized by loss of both upper and lower motor neurons.

In this study, we focused on RNA-binding proteins (RBPs) including TDP-43, FUS, and hnRNPA1 that are thought to be closely linked to the pathogenesis of ALS. We elucidated the molecular pathomechanisms underlying RBPs-induced neuronal cell death.

We have plans to develop therapeutic drugs for ALS that target RBPs-related neuronal cell death.

研究分野：神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 神経細胞死 TDP-43 FUS hnRNP

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位下位両運動神経が変性・脱落する進行性の運動神経変性疾患である。主に中年期以降に発症し、人工呼吸器を装着しなければ発症から 2～5 年で死に至る。高次脳機能は障害されないため、患者、その家族および介護者は非常な苦痛を味わう。

ALS の約 10% は家族性に、残り約 90% は孤発性に発症し、世界的には家族性 ALS を中心に研究がなされているが、ALS の病態機序解明は十分でなく、根本的治療薬も存在しない。

2. 研究の目的

2006 年、TDP-43 (Transactive response DNA-binding protein-43) が、ほとんどの ALS で認められるユビキチン陽性封入体の主要構成成分であることが報告され、さらに家族性孤発性両 ALS において TDP-43 遺伝子に変異が認められることから、TDP-43 の機能異常が ALS の発症に密接に関与していることが示唆されている。これまで我々は、TDP-43 の発現が ALS において上昇していることに着目し、TDP-43 の高発現が神経細胞に与える影響を検討し、以下のことを明らかにしてきた。

- (1) TDP-43 は内在性の 2～5 倍の高発現によりカスパーゼ依存性の神経細胞死を誘導する。
- (2) TDP-43 は JNK、CHOP、Bim を介し、神経細胞死を導く。
- (3) TDP-43 は活性化カスパーゼにより切断され、C 末端断片を生じる。
- (4) ALS 患者で認められる TDP-43 の C 末端断片は、高リン酸化、凝集体化などの病理学的特徴を有するが、神経細胞死を誘導せず、むしろ全長 TDP-43 による神経細胞死を抑制する。

以上の結果から、TDP-43 が何らかのメカニズムにより発現が上昇し、神経細胞死を誘導

することで ALS 発症に至る可能性が示唆された。一方で、TDP-43 の病理学的特徴は、神経細胞死の原因ではなく、結果である可能性が示唆された。

以上の研究から、本研究ではさらに TDP-43 の詳細な神経細胞死誘導メカニズムを解析すること、さらに TDP-43 と同じファミリーに属し、TDP-43 と同様に ALS の発症に密接に関与していると考えられている Fused in sarcoma (FUS) および heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) について、それらの神経毒性発揮メカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

運動神経細胞株 NSC34 細胞および初代培養大脳皮質神経細胞を用い、それらの神経細胞に TDP-43、FUS、hnRNPA1、あるいはそれらの変異体・誘導体を高発現させ、神経細胞に与える影響を検討した。具体的には、細胞死アッセイ (LDH リリースアッセイ)、細胞生存アッセイ (WST-8 アッセイ)、ウェスタンブロットティング、定量的リアルタイム PCR 解析等を行った。さらに、TDP-43 の結合タンパク質を同定することを目的として、GST プルダウンアッセイおよび質量分析による解析を行った。

4. 研究成果

(1) TDP-43 誘導性神経細胞死のより詳細なメカニズム解析

TDP-43 は核内に局在することによって細胞死を誘導する。

TDP-43 の核移行シグナルを改変した TDP-43 を神経細胞に高発現させ、細胞死アッセイを行った結果、核内に局在する TDP-43 は顕著な細胞死誘導が認められるが、細胞質に局在する TDP-43 は細胞死誘導活性が有意に減少することが明らかとなった。この結果から、TDP-43 の神経細胞死誘導には核内局在

が重要であることが明らかとなった。

TDP-43 の神経細胞死誘導には、TDP-43 の RNA 結合活性および二量体形成活性が必須である。

TDP-43 の RNA 結合欠損変異体および二量体形成欠損変異体は細胞死誘導が全く認められなかった。この結果から、TDP-43 による神経細胞死誘導には TDP-43 の RNA 結合活性および二量体形成活性が必須であることが明らかとなった。

TDP-43 誘導性神経細胞死は hnRNP ファミリータンパク質である hnRNP-U および hnRNP-A2 により抑制される。

より詳細な TDP-43 誘導性神経細胞死のメカニズムを解析することを目的として、TDP-43 の結合タンパク質の同定を試みた。組換え GST タグ TDP-43 タンパク質と運動神経細胞株の細胞溶解液を混合し、GST プルダウンアッセイを行い、TDP-43 に特異的に結合するタンパク質を SDS-PAGE/CBB 染色により分離した。その後、結合タンパク質を質量分析により同定したところ、複数の TDP-43 結合タンパク質の同定に成功した。本研究では核内に局在し、TDP-43 と機能的に関連するタンパク質として hnRNP ファミリー分子である hnRNP-U および hnRNP-A2 の着目し、その後の解析を進めた。その結果、TDP-43 はそれらの分子に RNA 依存性に核内において結合し、さらに、TDP-43 が誘導する神経細胞死を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、TDP-43 は生理的状況下では hnRNP-U あるいは hnRNP-A2 が結合し、その機能が抑制的に制御されているが、TDP-43 の発現上昇あるいは hnRNP-U、hnRNP-A2 の機能低下によって、TDP-43 が神経細胞死を誘導することが考えられた。

(2) FUS 誘導性神経細胞死メカニズム解析

TDP-43 と構造的、機能的に類似しており、ALS において遺伝子変異、細胞内凝集体化が認められている FUS について、FUS による神

経細胞死誘導機構の解明を試みた。

FUS は核内における毒性機能獲得により神経細胞死を誘導する。

FUS は、TDP-43 と同様に、核内における高発現により神経細胞死を誘導することが明らかとなった。次に、FUS は核内で TDP-43 に結合することが明らかになっていることから、FUS 誘導性神経細胞死が TDP-43 依存性か否か検討した。TDP-43 を高発現あるいはノックダウンし、FUS による細胞死が影響を受けるか検討した結果、いずれも影響は認められなかった。以上より、FUS 誘導性神経細胞死は TDP-43 非依存性であることが明らかとなった。

(3) hnRNPA1 誘導性細胞死メカニズム解析

2013年、hnRNP ファミリーに属する hnRNPA1 が新規 ALS 原因遺伝子であることが報告された。本研究では hnRNPA1 変異体が如何に運動神経変性を導くのか検討し、その結果以下のことが明らかになった。

hnRNPA1 の高発現は神経細胞死を誘導する。

hnRNPA1 の高発現は、TDP-43 や FUS と同様に、内在性の 1.5 倍以下の高発現により神経細胞死を誘導することが明らかになった。またそのメカニズムとして JNK を含むミトコンドリアアポトーシス経路を経由することが明らかとなった。

hnRNPA1 は自身の mRNA を抑制的に制御する。

TDP-43 や FUS などいくつかの hnRNP ファミリータンパク質は、自身の mRNA を抑制的に制御することによって細胞内発現量を一定に保つ自己発現制御機構が存在することが知られている。この機能に関して hnRNPA1 についても検討したところ、hnRNPA1 も自身の mRNA の発現を抑制的に制御することによって、発現レベルを一定に保つ機能を有することが明らかになった。

hnRNPA1 の疾患変異体はタンパク質として安定であり、かつ自己発現制御機能が十分に機能しない。

hnRNPA1 の疾患変異体が如何に神経毒性を示すのか検討した結果、hnRNPA1 の疾患変異体はタンパク質そのものが安定であり、かつ、自己発現制御機能が野生型に比べ十分に機能しないことが明らかになった。以上から、hnRNPA1 の ALS 変異は、これら 2 つの機能不全により発現が上昇する傾向になり、最終的に神経細胞死が誘導されることが考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Suzuki H and Matsuoka M

Overexpression of nuclear FUS induces neuronal cell death. *Neuroscience* 査読有 Vol. 287, 113-124, 2015, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.12.007.

Suzuki H, Shibagaki Y, Hattori S, Matsuoka M

Nuclear TDP-43 causes neuronal toxicity by escaping from the inhibitory regulation by hnRNPs. *Hum. Mol. Genet.* 査読有 Vol. 24, 1513-1527, 2015, DOI: 10.1093/hmg/ddu563.

[学会発表] (計 3 件)

Suzuki H and Matsuoka M

Dysregulation of hnRNPA1 expression induces ALS- and MSP-linked cytotoxicity. 第 89 回日本薬理学会年会、2016.3.10、横浜

Suzuki H, Shibagaki Y, Hattori S, Matsuoka M

Nuclear TDP-43 causes neuronal toxicity by overcoming the intrinsic cell death-preventing mechanism mediated by hnRNPs. 第 88 回日本薬理学会年会、2015.3.20、名古屋

Suzuki H and Matsuoka M

Nuclear TDP-43 induces neuronal cell death by associating with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-U. Society for Neuroscience 2014, 2014.11.17, Washington, DC

[その他]

研究室ホームページ：
<http://www.tokyo-med.ac.jp/pharmacol/top.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 宏昌 (SUZUKI, Hiroaki)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：10424178