

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461269

研究課題名(和文) 孤発性ALSマウスモデルによる家族性遺伝子の分子連関の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular link of amyotrophic lateral sclerosis associated genes in sporadic ALS model mice

研究代表者

山下 雄也 (Yamashita, Takenari)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：20431843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスであるRNA編集酵素ADAR2コンディショナルノックアウトマウスでADAR2免疫染色性のない脊髄運動ニューロンにおいてカルパインによって生じるTDP-43の断片化と局在異常が観察された。カルパインによるTDP-43の切断点を明らかにし、これらのTDP-43のカルパイン断片は全長TDP-43に比べ凝集性が高いこと、さらにTDP-43はリン酸化によりカルパイン切断に抵抗性を獲得することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that ADAR2-negative motor neurons in the spinal cord showed TDP-43 pathology, or subcellular mislocalization of TDP-43, in the conditional ADAR2 knockout (AR2) mice, a mechanistic ALS model in which the ADAR2 gene was targeted in cholinergic neurons including motor neurons. TDP-43 pathology in the ADAR2-lacking motor neurons in the AR2 mice was caused by abnormal activation of calpain, a Ca²⁺-dependent cysteine protease. We revealed several calpain-dependent cleavage sites in the C-terminal region of TDP-43. Moreover, we found that phosphorylated full-length TDP-43 and calpain-dependent TDP-43 fragments were more resistant to cleavage by calpain than endogenous full-length TDP-43 was.

研究分野：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 カルパイン RNA編集 カルシウム TDP-43 ADAR2 AMPA受容体 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄運動ニューロンにおいてグルタミン酸受容体である AMPA 受容体 GluA2 サブユニットの Q/R 部位の RNA 編集が低下し、この分子変化が ALS 運動ニューロン死に関係していることがわかってきた。この GluA2 Q/R 部位の RNA 編集は adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) という RNA 編集酵素によって特異的に触媒されることが知られ、更に孤発性 ALS 脊髄前角組織では ADAR2 mRNA の発現量が低下していることがわかった。これらのことからこの部位の RNA 編集が低下することが運動ニューロン死を導くのではないかと考え、この仮説を証明するために、我々は脊髄運動ニューロン選択的に ADAR2 をノックアウトした ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス (AR2 マウス) を作成し、この仮説を証明した。

また mRNA のスプライシングに関与することで知られていた TDP-43 (TAR DNA binding protein-43) というタンパク質が ALS 患者神経細胞内に蓄積していることが報告された。さらに TDP-43 遺伝子 (*TARDBP*) の変異により ALS を引き起こすことが報告され、孤発性と家族性 ALS のほとんどで過剰にリン酸化された TDP-43 陽性封入体があることが報告された。

我々は、RNA 編集酵素 ADAR2 の活性低下による AMPA 受容体サブユニット GluA2 Q/R 部位の RNA 編集低下、および TDP-43 陽性の細胞質封入体形成は孤発性 ALS 運動ニューロンに見られる疾患特異的分子変化であり、ADAR2 の発現低下が運動ニューロンにおいてカルパインの活性化を引き起こし、TDP-43 を切断すること、切断された TDP-43 は核から細胞質へと細胞内局在異常を引き起こし、細胞質での凝集体形成、核からの喪失に関与することがわかった。そのため、我々は、TDP-43 の凝集体が形成されるメカニズムを更に詳

しく調べ、ALS に引き起こされている神経細胞死カスケードの関与について調べた。また、家族性 ALS の責任遺伝子として報告されている Fused in sarcoma (FUS) についても、凝集体が形成されるメカニズムを調べるとともに、その形成過程にカルパインが関与するかどうかを調べ、異なる原因による ALS の細胞死に共通したメカニズムが存在するかどうかを検討した。

2. 研究の目的

ALS の病因を明らかにする目的で、家族性 ALS と孤発性 ALS に共通して見出される封入体形成と、大多数の孤発性 ALS に見られる RNA 編集異常との分子連関を解析する。我々は、孤発性 ALS の病理学的指標ともなっている TDP-43 病理には、Ca²⁺依存性プロテアーゼカルパインによる易凝集性断片の形成が関与することを発見したので、TDP-43 の凝集体が形成するメカニズムを更に詳しく調べ、FUS については凝集体が形成されるメカニズムを調べるとともに、その形成過程にカルパインが関与するかどうかを確認する。さらに ALS の発症に関与する TDP-43、FUS、RNA 編集がどの様に共通の神経細胞死カスケードをとるのかを解明し、治療法の開発に役立てる。

3. 研究の方法

) pCold 系のベクターに TDP-43 をクローニングし、リコンビナントの His タグ-TDP-43 を合成した。カルパインで切断後、MALDI-TOF mass を用いて切断点の解析を行った。さらにフラグメントの TDP-43 の N 端と C 端の断片を培養細胞に発現させ、GFP や TDP-43 抗体を用い凝集体の観察と死細胞の数を定量した。

) TDP-43 のリン酸化酵素である tau tubulin kinase 1, 2 (TTBK1, 2) をクローニングし、培養細胞に TDP-43 と共に過剰発現した。またリコンビナントカゼインキナーゼ 1, 2 と TDP-43 蛋白をインキュベートし、リン酸化させ、カルパインにより切断後、TDP-43 抗体によるウエスタンブロット解析を行った。ウエ

スタンプロットの結果からTDP-43フラグメントを定量することによりカルパイン活性への耐性を評価した。

)Flagタグを付けたFUSを過剰発現させた培養細胞、マウス脳、脊髄をカルパインによって切断し、FUSやFlag抗体を用いウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

ADAR2の発現が低下した運動ニューロンにおいてTDP-43の局在異常が観察され、TDP-43がカルパインにより切断され、N端領域が凝集体形成に参与することを報告したので、カルパインによるTDP-43の切断点の同定を行う為、リコンビナントTDP-43をpCold系(タカラ)を用いることで合成し、カルパインにより切断したフラグメントをMALDI-TOF massを用いて解析を行い、10の切断点を同定した。TDP-43フラグメントのウエスタンブロットの結果からメインの3つのN端フラグメントと1つのC端フラグメントを作成し、HeLa細胞に過剰発現後、凝集能と細胞死の検討を行った。プリオンドメインを含んだ2つの長いN端フラグメントは強い凝集性を示したが細胞死は見られなかった。一方短いN端フラグメント・C端フラグメントは凝集能・細胞死ともに観察されなかった。

我々が開発した孤発性ALSの分子病態モデルであるAR2マウスでは、ADAR2の発現が低下した運動ニューロンにおいてTDP-43の局在異常が観察され、ALSにおけるTDP-43病理形成のメカニズムが、活性化されたカルパインによりTDP-43が凝集性の高い断片に切断されることが引き金になること、その断片が全長TDP-43をも巻き込んだ封入体を形成しTDP-43病理として観察されることを見出した。さらに一旦形成された凝集体もカルパインにより非凝集性断片に細断されていくことが明らかになり、凝集体を形成したTDP-43はカルパインに耐性をもつことが想定され

た。封入体を形成するTDP-43は過剰にリン酸化されていることが報告されているため、リン酸化がTDP-43のカルパインによる切断に影響を及ぼす可能性が考えられるため、TDP-43のリン酸化酵素であるカゼインキナーゼ1、2とTTBK1、2の4種を用いTDP-43をリン酸化後、カルパインへの耐性を調べた。TDP-43はリン酸化によりカルパイン切断に抵抗性を獲得することがわかった。TDP-43のカルパイン断片が全長TDP-43に比べ凝集性が高いという結果を併せて考察すると、カルパインにより断片化されたTDP-43は凝集塊を形成し、それをシースとして核・細胞質をシャトリングしているTDP-43を巻き込み封入体を形成すると共にリン酸化を受ける。リン酸化によりカルパインへの抵抗性が高まり、凝集したTDP-43は非凝集性断片への更なる切断が阻害されるため封入体の増大、核からの全長TDP-43の喪失を促進することでTDP-43病理を形成することが示唆された。

次にFUSがカルパインにより切断されることを培養細胞、マウスの脳・脊髄の*in vitro*カルパインアッセイにより検討を行った。FlagタグをN端あるいはC端に付けたFUSをカルパインにより切断することにより断片化が観察された。

これらのことよりALS運動ニューロンではALS関連タンパクであるTDP-43、FUSともにカルパインにより切断されることがわかった。

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11件)

Aizawa H, Hideyama T, Yamashita T, Kimura T, Suzuki N, Aoki M, Kwak S: Deficient RNA-editing enzyme ADAR2 in an amyotrophic lateral sclerosis patient with a FUSP525L mutation. 査読有 *J Clin Neurosci in press*.
Yamashita T, Teramoto S, Kwak S: Phosphorylated TDP-43 becomes resistant to cleavage by calpain: a

regulatory role for phosphorylation in TDP-43 pathology of ALS/FTLD. 査読有 *Neurosci Res* 107:63-69, 2016. DOI: 10.1016/j.neures.2015.12.006. Sasaki S, Yamashita T, Kwak S: Autophagy in spinal motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice: an implication for a role of calcium in increased autophagy flux in ALS. 査読有 *Neurosci Lett* 598:79-84, 2015. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.05.025. Sasaki S, Yamashita T, Hideyama T, Kwak S: Unique nuclear vacuoles in the motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. 査読有 *Brain Res* 1550: 536-546, 2014. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.01.006. Yamashita T, Kwak S: The molecular link between inefficient GluA2 Q/R site-RNA editing and TDP-43 pathology in motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. 査読有 *Brain Res* 1584:28-38, 2014. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.12.011. 山下雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズムにおける TDP-43 のカルパイン依存性断片化の意義. 査読無 *臨床神経学*, 54 : 1151-1154, 2014. DOI: 10.5692/clinicalneuro.54.1151. 山下雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズム. 査読無 *Dementia Japan*, 28 : 307-318, 2014. Akamatsu M, Takuma H, Yamashita T, Okada T, Keino-Masu K, Kazuhiro Ishii K, Kwak S, Masu M, Tamaoka S: A unique mouse model for investigating the properties of amyotrophic lateral sclerosis-associated protein TDP-43, by in utero electroporation. 査読有 *Neurosci Res* 77:234-241, 2013. DOI: 10.1016/j.neures.2013.09.009. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S, Kwak S: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. 査読有 *EMBO Mol Med* 5:1710-19, 2013. DOI:10.1002/emmm.201302935 Umeda T, Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H: Neurodegenerative disorder FTDP-17-related tau intron 10 +16C T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. 査読有 *Am J Pathol*. 183: 211-25, 2013. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.03.015.

山下雄也, 郭 伸: RNA editing と筋萎縮性側索硬化症. *RNA Biology からみた神経変性疾患の病態機序*. 査読無 *医学のあゆみ*, 医歯薬出版, 東京, 247 : 412-420, 2013. <https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=924705&AC=13256>

[学会発表](計 24 件)

山下雄也, 廣瀬直己, 赤松恵, 寺本さやか, 蔡慧令, 郭 伸: AMPA 受容体アンタゴニストであるランパネルを用いた ALS 治療法の開発. 第 38 回日本神経科学大会. 神戸国際会議場. 神戸. July 28-31, 2015. ポスター

郭 伸, 山下雄也, 寺本さやか: Mechanism-based gene therapy for sporadic ALS. 第 56 回日本神経学会学術大会 Hot Topics 18 "Gene Therapy for Neurological disorders. 朱鷺メッセ(新潟コンベンションセンター). 新潟, May 20-23, 2015. (口演)

郭 伸, 山下雄也, 蔡 慧玲, 寺本さやか, 辻省次, 島崎久仁子, 村松慎一: 分子病態に基づいた孤発性 ALS の遺伝子治療法の開発. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡国際会議場, 福岡, May 21-24, 2014. (口演)

詫間 浩, 赤松 恵, 山下雄也, Hartmut Oehring, 岡田拓也, 枡 和子, 石井一弘, Gustav Jirikowsk, 郭 伸, 枡 正幸, 玉岡 晃: 子宮内電気穿孔法 TDP-43 遺伝子導入による in vivo 形成封入体の微細形態の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡国際会議場, 福岡, May 21-24, 2014.

澤田 潤, 相澤仁志, 浅野目明日香, 高橋佳恵, 斎藤 司, 片山隆行, 山下雄也, 郭 伸, 長谷部直幸: AMPA 受容体サブユニット GluA2 の Q/R 部位 RNA 編集率に対する薬剤の効果. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡国際会議場, 福岡, May 21-24, 2014.

肥田あゆみ, 井上真奈美, 前田明子, 山下雄也, 郭 伸, 辻 省次, 清水

潤：筋炎と悪性腫瘍との関連に関する疫学的検討。 **第55回日本神経学会学術大会**，福岡国際会議場，福岡，May 21-24, 2014.

山下雄也，郭 伸：TDP-43 病理形成メカニズムにおける TDP-43 のカルパイン依存性断片化の意義。シンポジウム「TDP43 の新展開」**第55回日本神経学会学術大会**，福岡国際会議場，福岡，May 21-24, 2014. (招待講演)

Kwak S, Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Muramatsu S-I: Development of a gene therapy for sporadic ALS by normalizing ADAR2 activity in the motor neurons using a vascular type AAV vector. *The 24th Meeting of the European Neurological Society*, Istanbul, Turkey, May 31-June 3, 2014. (口演)

Akamatsu M, Takuma H, Yamashita T, Okada T, Masu-Keino K, Oehring H, Kwak S, Masu M, Jirikowski FG: Electron microscopic observation of intranuclear aggregation of TDP-43 in mouse cerebral cortex produced by in utero electroporation. **第37回日本神経科学大会 Neuro2014**，パシフィコ横浜，横浜，September 11-13, 2014.

山下雄也，蔡 慧玲，寺本さやか，辻省次，島崎久仁子，村松慎一，郭 伸：孤発性 ALS モデルマウスを用いた ALS の遺伝子治療法開発の試み。 **第37回日本神経科学大会 Neuro2014**，パシフィコ横浜，横浜，September 11-13, 2014.

蔡 慧玲，郭 伸，山下雄也：ペランパネルは ALS モデルマウス運動ニューロンの TDP-43 病理を軽減する。 **第37回日本神経科学大会 Neuro2014**，パシフィコ横浜，横浜，September 11-13, 2014.

Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S-I, Kwak S: Mechanism-based gene therapy for ALS using sporadic ALS model mice .

The 45th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November 15-19, 2014.

Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Muramatsu S, Kwak S: Gene therapy for sporadic ALS using an intravenous injection of AAV vector. *The 25th International Symposium on MND/ALS*, Brussels, Belgium, December 5-7, 2014.

Kwak S, Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S: Molecular mechanism generating TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) motor neurones. *The 23rd Meeting of the European Neurological Society*. Balcerona, Spain, 8-11 June, 2013.

Kwak S, Yamashita T, Teramoto S, Chai HL: ADAR2-dependent death and TDP-43 mislocalization in motor neurons. *8th Brain Research conference "RNA binding proteins in neurological disease"* San Diego, 7-8 Nov, 2013.

Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saido TC, Kwak S: Calpain-dependent cleavage of TDP-43 plays a crucial role in ALS pathology. *8th Brain Research conference "RNA binding proteins in neurological disease"* San Diego, 7-8 Nov, 2013.

Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saido TC, Kwak S: Calpain-dependent cleavage of TDP-43 plays a crucial role in ALS pathology. *The 44th Annual Meeting Society for Neuroscience* San Diego, 9-13 Nov, 2013.

Yamashita T, Teramoto S, Chai HL, Muramatsu SI, Kwak S: ADAR2 plays a key

role for death and TDP-43 mislocalization in ALS motor neurons.

The 24th International Symposium on MND/ALS, Milan, 6-8 Dec 2013

澤田準、相澤仁志、淺野目明日香、高橋佳恵、斉藤司、片山隆行、長谷部直幸、山下雄也、郭伸：AMPA受容体サブユニットGluA2のQ/R部位RNA編集率に対する薬剤の効果。第54回日本神経学会学術大会、東京、30 May-1 June, 2013.

山下雄也、日出山拓人、寺本さやか、高野二郎、岩田修永、西道隆臣、郭伸：ClapainがALSのTDP-43病理形成に重要な役割を果たす。第36回日本神経科学大会 Neuro2013、京都、20-23、June 2013.

- 21 山下雄也、日出山拓人、寺本さやか、高野二郎、岩田修永、西道隆臣、郭伸：ClapainがALSのTDP-43病理形成に果たす役割。第35回神経組織培養研究会、大阪、29-30、June 2013.

- 22 Akamatsu M, Takuma H, Yamashita T, Okada T, Ishii K, Keino-Masu K, Kwak S, Masu M, Tamaoka A: TDP-43 aggregation produced by In utero electroporation and its properties in the mouse motor neurons. *The 44th Annual Meeting Society for Neuroscience* San Diego, 9-13 Nov, 2013.

- 23 赤松恵、詫間浩、山下雄也、岡田拓也、石井一弘、榊和子、郭伸、榊正幸、玉岡晃：筋萎縮性側索硬化症関連タンパク質：TDP-43封入体の形成—マウス胎仔電気穿孔法による大脳皮質運動野への疾患関連遺伝子の導入。第36回日本神経科学大会 Neuro2013、20-23、June 2013、京都

- 24 詫間浩、赤松恵、山下雄也、岡田拓也、石井一弘、榊和子、郭伸、榊正幸、玉岡晃：マウス胎仔電気穿孔法による in vivo TDP-43 遺伝子導入と封入体形成の検。第54回日本神経学会学術大会、30 May-1 June, 2013、東京

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院医学系研究科・郭研究室

<http://square.umin.ac.jp/teamkwak/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 雄也 (YAMASHITA, Takenari)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：20431843

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

郭伸 (KWAK, Shin)

東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員

研究者番号：40160981