

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250017

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症とTDP-43：その始まりと広がり方の分子神経病理学的解明

研究課題名(英文) Amyotrophic Lateral Sclerosis and TDP-43: Elucidation of molecular neuropathology in terms of spread from its beginning

研究代表者

高橋 均 (Takahashi, Hitoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：90206839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,600,000円

研究成果の概要(和文)：TDP-43がエクソン6内で複数の選択的スプライシングを行い、その量を自己調節していることを見出した。ALS患者脊髄では、この自己調節に関するTDP-43 mRNAの比率が増加していることを突き止め、このバリエーションがTDP-43陽性の封入体と共局在することを確認した。このことから、この異常蛋白がALS病変のはじまりとなる可能性が示唆された。また、新たなALS側頭葉皮質におけるTDP-43病理像の検討では、3つのタイプ(1, 2a and 2b)の存在が示された。タイプ2bには臨床病理学的特徴が認められ、これらの個々の群は独立したサブタイプであり、かつ、その病理像の間に移行はないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found that TDP-43 regulates the level of-its-own protein by alternative splicing within exon 6. Surprisingly, we found that the proportion of TDP-43 mRNA associated with this autoregulation increases in the spinal cord of ALS patients. It was confirmed that this mutant co-localized with TDP-43 immuno-positive inclusion body in anterior horn cells of ALS patients. This suggested that this abnormal protein may be the beginning of ALS lesion.
We reevaluated the cortical TDP-43 pathology in cases of sporadic ALS, using semi-quantitative estimation of pTDP-43-positive dystrophic neurite in the temporal neocortex, the case were divided into three groups, types 1, 2a and 2b. Type 2b has characteristic clinicopathological features. Considering the patient survival time and severity of motor neuron loss, each group was regarded as independent subtype, indicating that transition from type 1 to type 2a, or from type 2a to type 2b during the disease course appeared unlikely.

研究分野：神経病理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 神経病理学 脳神経疾患 神経変性疾患 TDP-43

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は、致死的な神経変性疾患である。2006 年、ユビキチン陽性、タウ陰性の神経細胞封入体の出現を特徴とする孤発性あるいは家族性前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal lobar degeneration; FTLD) 及び孤発性 ALS において、その神経細胞封入体の構成成分として TDP-43 が同定された (Neumann et al., 2006)。この発見は、我々の臨床病理からの“ALS とはしばしば FTLD に繋がる病態である”とする洞察 (Piao et al., 2003) の正しさを証明してくれた。我々は TDP-43 について、いち早く検討し、TDP-43 陽性の封入体が、孤発性および SOD1 変異を伴わない家族性 ALS に特徴的な所見であること (Tan et al., 2007); 孤発性 ALS の TDP-43 病理を大脳、小脳、脳幹、脊髄、末梢神経にわたり詳細に検討し、ALS が運動神経細胞にほぼ限局する型と FTLD 病変を伴う型の 2 型に大別され、これは人工呼吸器による延命の影響を受けないこと (Nishihira et al., 2008); 世界に先駆けて孤発性と同一の病理所見を示す家族性 ALS にて TDP-43 遺伝子変異を認めることを報告してきた (Yokoseki et al., 2008)。とくに TDP-43 遺伝子変異の発見は ALS の病態において TDP-43 が一次的な意義を持つことを強く示唆し、TDP-43 遺伝子変異を有する ALS は ALS10 と命名された。しかし孤発性 ALS および ALS10 の病態機序は未だ明らかとはなっていない。

国際的には、多くの TDP-43 遺伝子過剰発現動物モデルで、神経変性をきたすことが報告された。しかし ALS と同様の病理所見、いわゆる細胞質内凝集体と核からの TDP-43 の消失は正確に再現されていない。封入体形成については TDP-43 の断片化の重要性が説かれているが、確定的証拠は無い。また、封入体を構成する TDP-43 に認められる異常リン酸化やユビキチン化についても、その一次的な意義を示す結果は得られていない。細胞死の機序としては、核蛋白である TDP-43

が核から消失することから、TDP-43 の機能喪失とする立場と、封入体が毒性を獲得する機序が唱えられているが結論に至っていない。従って、現在、TDP-43 が封入体を形成する機序、神経細胞機能障害をきたす機序、さらに ALS10 関連変異が疾患を引き起こす機序については全く不明といっても過言ではなく、これらの解明が急務とされている。つまり、ALS の病理の特徴である「TDP-43 の細胞レベルにおける核からの消失と細胞質での凝集体形成およびそれが引き起こす細胞死の系統 (運動神経系) 選択性」については未だに全くの謎である。

2. 研究の目的

神経変性疾患において、不溶性封入体の形成・成長には、はじめに何らかの“種”が形成されることが重要とされる (シード仮説)。しかし、現在、ALS では、この最初のシードが明らかでない。我々は、TDP-43 がエクソン 6 内で複数の選択的スプライシング (splicing: Sp) を行い、その量を自己調節していることを見出した。

本研究では、この機構を免疫組織化学及び in situ hybridization 法で詳細に検討し、ALS 病態に於ける役割を明らかとする。また、我々は TDP-43 細胞内封入体の中枢神経内の広がりから、ALS が運動神経系にほぼ限局する脳幹・脊髄型と、前側頭葉への広がりを見せる広範型 (いわゆる FTLD 型) の 2 型に分類されることを示してきた (Nishihira et al., 2008)。しかし、この系統選択性の解明は十分ではなかった。これを更に詳細に検討を加え、病理学的な広がり意義を明確とする。

3. 研究の方法

本研究は、神経病理学 (高橋・豊島・他田・清水)、分子神経生物学・神経内科学 (小野寺) を専門とする研究代表者、分担者、並びに、その指導下にあるポスドク・大学院生に加え、人体病理学的資源の的確な保存・管理 (柿田)、遺伝子工学 (崎村)、さらに遺伝子解

析学(池内)を専門とする連携研究者の協同を得て行なわれるものであり、その研究体制は、先に述べた研究テーマである「明らかにする点」の同時並行的展開を可能とするものである。

本計画では、免疫組織化学、分子生化学的解析、in situ hybridization 法で検討する：単一細胞で、mRNA と TDP-43 陽性封入体の 2 重免疫により、両者の関係を明確にする。次に、患者剖検組織において、一細胞レベルでの TDP-43 異常 Sp 産物の mRNA と TDP-43 病理像との関連を検討する。方法として免疫組織化学法、レーザーマイクロダイセクション法と Droplet digital PCR 法を用いる。具体的には、抗 TDP-43 抗体にて免疫し、病理所見毎に細胞を分類し、各々の細胞をレーザーマイクロダイセクション法にて取り出す。単一細胞の解析のためには、従来は増幅を行うか、多数の細胞を必要とし、一細胞単位での定量解析は困難であった。近年開発された Droplet digital PCR 法は、この問題を解決し、一細胞単位での mRNA の絶対定量評価を可能とした。本法を用いて、TDP-43 の Sp バリエーションの絶対定量を行い、その変化が封入体形成に先行することを一細胞あたりで明確にする。さらに QunatiGene® ViewRNA 法を用い、Sp バリエーションを特異的に認識する in situ hybridization probe とその定量方法の開発を試み、TDP-43 陽性封入体と本バリエーション mRNA との関連を可視化して提示し、mRNA レベルでの変化が TDP-43 病理像に先行するかを検討する。

TDP-43 細胞内封入体の中枢神経内の広がりから、ALS は、運動神経系にほぼ限局する脳幹・脊髄型(古典型)及び前側頭葉への広がりを見せる FTLD 型の 2 型に分かれることを示してきた。しかし、何故、このような系統選択性が醸成されるのか、その原因は解っていない。そこで、病理学的検索を加え、より詳細に、その特徴を抽出した。この目的のために、我々は、リン酸化 TDP-43(pTDP-43)に特異的な抗体を用いて、孤発性 ALS(n = 96)の皮

質および皮質下の TDP-43 病態を明らかにしようと試みた。

4. 研究成果

まず、患者剖検組織における TDP-43 の病理学的意義の検証を行った。皮質の TDP-43 病理は FTLD-TDP において詳細に分析されているが、ALS の場合には依然として不明であった。病理面から、海馬歯状回の顆粒細胞に pTDP-43 陽性ニューロン細胞質封入物をふくまないタイプ 1(n = 63)もしくは含むタイプ 2(n = 33)の 2 つのグループに分けた。さらに、タイプ 2 の症例は、側頭葉新皮質での pTDP-43 陽性ジストロフィー神経突起(DN)の半定量的評価に基づいて 2 つのサブグループに分類した。すなわち DN が少ないタイプ 2a(n = 22)、もしくは豊富な DN を伴うタイプ 2b (n = 11)である。

臨床症状では、タイプ 2a およびタイプ 2b の患者では認知障害が特徴であった。タイプ 2b は、予後不良である点、下位運動ニューロンの変性が軽い点、皮質のグリアでの pTDP-43 病理が目立つ点が特徴であった。

以上から、疾患経過中の 1 型から 2 型への移行、または 2a 型から 2b への移行は起こりにくい、つまり、これらの 3 つのグループはそれぞれ独立したサブタイプと考えられた。

この事実は、ALS の TDP-43 病態がある一定のルールに従って広がっていくこと、病態の間に移行が無いことを示している。

次に生化学的に、TDP-43 の細胞内代謝について検討した。TDP-43 は、最後のエクソソ内に 3 つのポリアデニル化シグナル(PAS)および 3 つのイントロンを有する。これらを用いて TARDBP mRNA の量と細胞内の局在を調節することによって自己の蛋白量を調節する。しかし、自己調節機構がどのように機能するのか、および核の TDP-43 を失った ALS 運動ニューロンにおいて自己調節の状態がどのようになっているかは不明であった。我々は、TDP-43 が最も近位の PAS の選択を阻害し、複数のイントロンの Sp を誘導し、ナンセンススレ

存性 mRNA 分解機構によって細胞質の TARDBP mRNA の量を減少させることを明らかとした。一方、TDP-43 が枯渇すると、TARDBP mRNA は最も近位の PAS を使用し、TARDBP mRNA は細胞質において増加した。

最後に、我々は、ALS の運動ニューロンにおいて、TARDBP mRNA の量が細胞質において増加することを示した。これらの事実は、核 TDP-43 が自己調節に寄与し、核 TDP-43 の消失が異常な自己調節を誘導し、TARDBP mRNA の量を増加させることを示唆している。このような悪循環が ALS の病気の進行を加速させる可能性があることを明らかとした。

さらに、ALS 患者では、この自己調節に係する、TDP-43 mRNA の Sp 多様体の比率が増加していることを突き止めた。このバリエーション由来の産物が ALS 患者前角細胞にて TDP-43 陽性の封入体と共局在することを確認した。このことから、この異常蛋白が ALS 病変のはじまりとなる可能性が示唆された。

<引用文献>

1 Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-133

2 Piao YS, Wakabayashi K, Kakita A, Yamada M, Hayashi S, Morita T, Ikuta F, Oyanagi K, Takahashi H (2003) Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain Pathol* 13: 10-22

3 Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O,

Iwasaki T, Tsujino A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2007) TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathol* 113: 535-542

4 Nishihira Y, Tan CF, Onodera O, Toyoshima Y, Yamada M, Morita T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2008) Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* 116: 169-182

5 Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O (2008) TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 63: 538-542

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 9 件)

1 Jiang H, Shimizu H, Shiga A, Tanaka M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H (2017) Familial amyotrophic lateral sclerosis with an I104F mutation in the SOD1 gene: multisystem degeneration with neurofilamentous aggregates and SOD1 inclusions. *Neuropathology* 37: 69-77 (査読有) DOI: 10.1111/neup

2 Takeuchi R, Tada M, Shiga A, Toyoshima Y, Konno T, Sato T, Nozaki H, Kato T, Horie M, Shimizu H, Takebayashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H (2016) Heterogeneity of cerebral TDP-43 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for clinico-pathologic subtypes.

Acta Neuropathol Commu 4: 61 (査読有) DOI: 10.1186/s40478-016-0335-2

3 Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O (2016) Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. Nucleic Acids Res 44: 5820-5836 (査読有) DOI: 10.1093/nar/gkw499

4 Hayashi K, Mochizuki Y, Takeuchi R, Shimizu T, Nagao M, Watabe K, Arai N, Oyanagi K, Onodera O, Hayashi M, Takahashi H, Kakita A, Isozaki E (2016) Clinicopathological characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis resulting in a totally locked-in state (communication Stage V). Acta Neuropathol Commu 4: 107 (査読有) DOI: 10.1186/s40478-016-0379-3

5 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 (2016) Globular glial mixed four repeat tau and TDP-43 proteinopathy with motor neuron disease and frontotemporal dementia. Brain Pathol 26: 82–94 (査読有) DOI: 10.1111/bpa.12262

6 Mori F, Miki Y, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K (2015) Sortilin-related receptor CNS expressed 2 (SorCS2) is localized to Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci Lett 608: 6–11 (査読有) DOI: 10.1016/j.neulet

7 Toyoshima Y, Takahashi H (2014) TDP-43 pathology in polyglutamine diseases: with

reference to amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathology 34: 77-82 (査読有) DOI: 10.1111/neup

8 Kimura T, Jiang H, Konno T, Seto M, Iwanaga K, Tsujihata M, Satoh A, Onodera O, Kakita A, Takahashi H (2014) Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. Neuropathology 34: 329-397 (査読有) DOI: 10.1111/neup

9 Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. (2014) C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. Neuropathol Appl Neurobiol 40: 783-786 (査読有) DOI: 10.1111/nan.12157

(学会発表) (計 7 件)

1 Takahashi H. Cerebral TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. The 10th Congress of Asia Pacific International Academy of Pathology (招待講演), April 24-27, 2017, Bali (Indonesia)

2 Sugai A, Onodera O. A trade-off theory for TDP-43 proteinopathy "robust yet fragile" nature of the autoregulation. The 4th Symposium on RNA Metabolism in Neurological Disease, November 10-11, 2016, San Diego (USA)

3 Kato T, Koyama A, Sugai A, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O. Analysis of intracellular distribution of TDP-43 mRNA in affected spinal motor neuron with ALS. Key stone symposium:

Common Mechanisms of Neurodegeneration,
June 12-16, 2016, Keystone, Colorado (USA)

4 Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Shiga A, Miura T, Aoki K, 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. The 26th International Symposium on ALS/MND, December 11-13, 2015, Orlando (USA)

5 Takahashi H. Amyotrophic lateral sclerosis: discovery of TDP-43 and subsequent development. The 3rd Congress of Asian Society of Neuropathology (招待講演), November 6-8, 2014, Seoul (Korea)

6 Onodera O, Nishizawa M, Takahashi H. Update in amyotrophic lateral sclerosis. The XVIII International Congress of Neuropathology (招待講演), September 14-18, 2014, Rio de Janeiro (Brazil)

7 Takeuchi R, Tada M, Shiga A, Konno T, Toyoshima Y, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Clinicopathologic analysis of TDP-43 expression in the cerebral cortex in ALS. The 66th Annual Meeting of American Academy of Neurology, April 26-May 3, 2014, Philadelphia (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

HP

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/result/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 均 (TAKAHASHI, Hitoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 90206839

(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

豊島 靖子 (TOYOSHIMA, Yasuko)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号: 20334675

他田 真理 (TADA, Mari)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号: 30646394

清水 宏 (SHIMIZU, Hiroshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号: 40608767

(3)連携研究者

柿田 明美 (KAKITA, Akiyoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 80281012

崎村 建司 (SAKIMURA, Kenji)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 40162325

池内 健 (IKEUCHI, Takeshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 20372469

(4)研究協力者

なし