

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450403

研究課題名(和文) マウス中枢神経系への遺伝子導入によるALS新規病態モデルの開発及び応用研究

研究課題名(英文) Analysis of ALS related gene products in the mouse central nerve system

研究代表者

守村 敏史 (Toshifumi, Morimura)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：20333338

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)：TDP-43は、孤発性ALS病巣部に封入体として蓄積し、細胞毒性を発揮する病原蛋白質である。ALSの標的細胞である運動ニューロンは、膜及び分泌蛋白質の成熟装置である小胞体に対する負荷(小胞体ストレス)に過敏である事が示唆されており、本研究ではALSにおける小胞体ストレスの関与に着目し解析を進めた。その結果、TDP-43の発現を抑制されたHeLa細胞では、小胞体ストレスに対する細胞応答が更新していた。網羅的遺伝子解析から、TDP-43の発現抑制により小胞体ストレスを制御し得る1つの蛋白質の発現の劇的な低下が明らかとなり、子宮内エレクトロポレーション法によりこの蛋白質の神経系での機能解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：A nuclear protein, TDP-43, accumulates in the cytoplasmic inclusions in the sporadic ALS lesions with post-transcriptional modifications, such as ubiquitination, phosphorylation and truncation, and it works as a pathologic protein of the disease. Motor neurons, target cells of ALS, are highly sensitive to stress in the ER, which is the specialized organelle for folding and maturation of membrane and secretory proteins. I observed that the integrated responses against ER stress is increased in the HeLa cells lacking TDP-43. Comprehensive analysis revealed that a protein, which may regulate ER homeostasis, is drastically down-regulated in the TDP-43-deficient cells. In addition, I performed immune histological examination using the cerebral cortices which was transfected with the TDP-43 regulated gene by in utero electroporation.

研究分野：神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症(ALS) 小胞体ストレス 子宮内エレクトロポレーション

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上部及び下部運動ニューロンの選択的な細胞死により引き起こされる疾患であり、人工呼吸器などの処置を施さない限り、診断後数年以内に死に至る難治性神経変性疾患の一つである。発症例の 5~10% が Superoxide dismutase 1 等の遺伝子変異に伴う家族性 (遺伝性) 例であるが、残りの殆どのケースが原因の不明な孤発性ケースである。孤発性神経変性疾患の原因蛋白質が次々と解明される中、核蛋白質であり RNA 修飾に関わる TAR-DNA binding protein of 43KDa (TDP-43) が孤発性 ALS と前頭側頭葉変性症の細胞質内封入体の主要成分である事が報告され (文献 1, 2) ほぼ同時期に TDP-43 の変異が家族性 ALS の原因となる事も報告された。更に患者病巣部では、本来核に存在する TDP-43 が封入体に引き込まれた結果、核での免疫染色性がほぼ完全に消失し、後に脊髄運動ニューロン特異的な TDP-43 遺伝子欠損マウスでも ALS の病態が再現できる事が報告され (文献 3, 4) 孤発性 ALS は封入体毒性と TDP-43 の機能不全により引き起こされていると理解されている。即ち、TDP-43 のミスフォールド化、核から細胞質への異所性局在及び封入体形成される過程の分子機構を、生きた動物を用いて解明する事は、孤発性 ALS の発症機構を解明する大きな手がかりとなる事が示された。

トランスジェニック (Tg) マウスの樹立は、変異蛋白質の機能解析に最も汎用されてきた技術である。しかし Tg マウスの樹立には膨大な時間と費用を必要とし、多くの変異蛋白質について検証する事は事実上不可能である。また、複数のスプライシングバリエーションが存在する場合、マウス間の交配などから更に多くの時間と経費が必要となる。これに対して、マウス胎仔脳室内への子宮内エレクトロポレーションによる遺伝子の一過性発強制現及びノックダウンは、多数の遺伝子産物の機能を解析する上で非常に有用な方法であり、遺伝子導入箇所が極めて限られている事から致死性の問題を回避できる。更に、一度に複数の遺伝子導入が可能である事から、複数のアイソフォームが存在する遺伝子について、内在性の全てのアイソフォームをノックダウンした細胞で、外来性蛋白質の効果を解析する事も可能である。このような事を背景に、*in vitro* で同定した ALS 関連蛋白質の機能を *in vivo* で解明する目的で、子宮内エレクトロポレーションを駆使した新たな ALS の病態解析モデルを構築し、病態解明及び治療に関わる基礎研究の計画を考案した。

2. 研究の目的

加齢に伴う神経変性疾患の多くは、遺伝性・

孤発性を問わず正常な構造を逸脱した蛋白質が細胞の外に蓄積する事により引き起こされる。蛋白質のミスフォールド化の結果、異常会合によるオリゴマーやフィブリル、封入体の形成、細胞内異所性局在、細胞外への放出、プリオン様の細胞間伝搬などを介して、病原蛋白質は毒性を獲得するものと考えられている。即ち、TDP-43 の病巣部における高度な蛋白修飾や、それに伴う機能不全、細胞におけるストレス応答を理解する事は、ALS 発症の病理機構の解明に不可欠である。本研究では、まず培養細胞レベルでこれらのプロセスを制御する分子機構の解明、並びに *in vivo* で応用可能な分子ツールの開発を、特に小胞体ストレスに着目して進めた。また、病原性 TDP-43 や TDP-43 関連蛋白質の *in vivo* での解析手法として、子宮内エレクトロポレーション法の利用を進め、これらの解析を通じ、最終的には動物モデルの存在しない疾患研究や高等哺乳動物へのツールとしての応用を目指した。

3. 研究の方法

(研究 1) TDP-43 結合蛋白質の機能解析: 患者病巣部ではユビキチン化、リン酸化、蛋白切断を受けた TDP-43 が封入体本体として存在し、細胞毒性を担っていると考えられている。封入体形成過程の分子機構の解明を目的に、*in vitro* ubiquitination 依存的に結合する蛋白質を質量解析により同定し、その機能を共同研究として解析した。

(研究 2) 小胞体ストレスプローブの開発応用研究: これまでに ALS の標的細胞である運動ニューロンは、小胞体ストレスに対し強い感受性を示す事が報告されている (文献 5, 6)。既存の小胞体ストレスを検出するプローブとして、XBP1 遺伝子のスプライシング等 (文献 7) 小胞体ストレスに伴う遺伝子変化をセンスするプローブがこれまでに報告されているが、これらプローブは、実際の小胞体内のミスフォールド蛋白質の量を必ずしも反映しない。この問題を克服する目的で、小胞体内でミスフォールドする基質をベースに新たな分子プローブを作出し、小胞体内でミスフォールドし、小胞体ストレスに起因する小児の代表的白質形成不全症である Pelizaeus-Merzbacher 病の原因となる変異型 Proteolipid protein 1 (PLP1) と co-transfection する事によりプローブの信頼性を検討した。

(研究 3) ALS の細胞病態における小胞体ストレスの関与: 封入体毒性と並び、TDP-43 の機能不全が ALS 発症に重要な役割を担っているものと理解されている。そこで、私は TDP-43 の発現を siRNA により抑制された HeLa 細胞における小胞体ストレスに応答する生体反応 (unfolded stress response [URP]) や関連遺伝子の発現変化について解

析を進めた。

(研究4) 子宮内エレクトロポレーションによるALS病態モデル系の構築: ALSの *in vivo* の病態モデル構築を目的に、子宮内エレクトロポレーション法を用い、ALS 関連遺伝子の胎仔大脳皮質における強制発現実験を行った。妊娠 13 日齢の ICR マウスの大脳皮質に各種発現ベクターを mCherry 遺伝子発現ベクターと co-transfection し、導入 3 日目(妊娠 16 日齢)及び導入 5 日目(妊娠 18 日齢)でその表現型を解析した。

4. 研究成果

(研究1) リストアップされたユビキチン化特異的に TDP-43 に結合する蛋白質の内、ユビキチンリガーゼ複合体の足場蛋白質として機能する CULLIN2 に注目し、TDP-43 の蛋白質ターンオーバーにおける CULLIN2 複合体の役割を共同で解析した。その結果、VHL を基質認識部位として、CULLIN2 複合体は、TDP-43 の分解に重要な役割を担っており、そのバランスの崩壊が、特に神経細胞を保護するオリゴドンドロサイトの封入体形成に促進的に働く事の発見に貢献した(文献8)。

(研究2) 作製したプローブを、小胞体内でミスフォールドし小胞体ストレスを惹起する代表的な変異蛋白質である PLP1 と HeLa 細胞に co-transfection し、プローブ評価を行った。その結果、小胞体ストレス誘導性変異 PLP1 を強制発現させた細胞では、濃度依存的にプローブ値は上昇した。また、小胞体ストレスを誘導しない野生型 PLP1 や、Charcot-Marie-Tooth 病の原因で小胞体には蓄積されるがミスフォールドせず UPR も惹起しない変異型 peripheral myelin protein of 22KDa(PMP22)を強制発現した場合でも、プローブ値に大きな変化が認められなかった事から(図1) このプローブ値は小胞体内のミスフォールド蛋白質の量を反映している事が示唆された。

(研究3) qPCR 法並びにウェスタンブロット法を用いた解析より、TDP-43 の発現を siRNA により抑制された HeLa 細胞では UPR が過剰に活性化する事が明らかとなった。この現象は最終的に異なる 5 種類の siRNA で観察された事から、off-targeting 効果を反映していない事が示唆された。次に、TDP-43 の発現抑制により 2 倍以上の発現変化を示し、その分子構造や過去の報告から小胞体ストレスに関連し得る遺伝子について Gene Chip 及び qPCR 解析を進め、最終的に TDP-43 の発現抑制により mRNA および蛋白質の発現レベルが劇的に低下する遺伝子、TDP-43 regulated gene (TRG、仮称)を同定した(図2)。TDP-43 の遺伝子発現抑制による TRG の発現低下は、siRNA により分解を受けない外来性 TDP-43 の強制発現によりレスキュー可能である事を

確認した。更に、免疫組織学的解析から、TRG は比較的広汎に発現されており、特に ALS の標的である脊髄運動ニューロンで強い発現が認められた(次頁図3)。これまでに、TRG 遺伝子の発現を HeLa 細胞で抑制した場合にも、過剰な UPR の活性化が確認でき、TDP-43 は運動ニューロンにおいて TRG の発現調節を介し、小胞体環境保持に重要な機能を担っている事が強く示唆された。

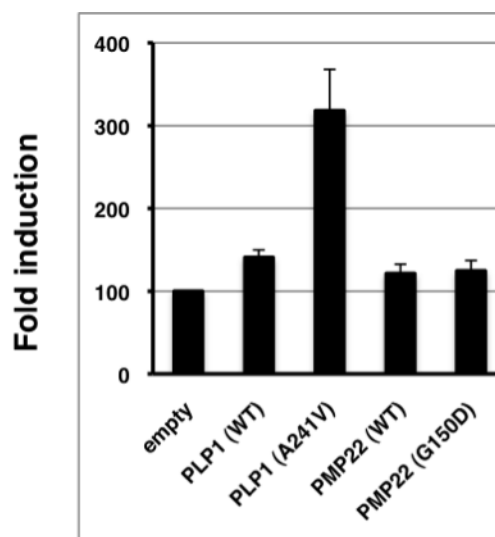


図1 新規小胞体ストレスプローブのPLP1及びPMP22を用いた評価(結果は平均±SE)。

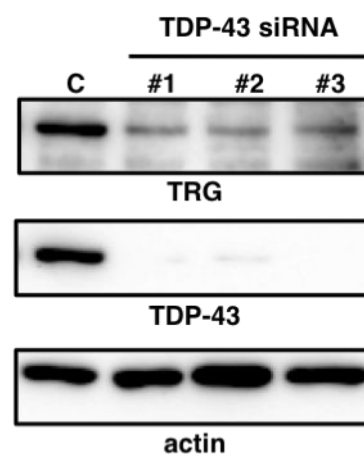


図2 TDP-43発現抑制HeLa細胞におけるTRG蛋白質の発現低下

内在性、外来性ともに TRG は核に強く染色されるが、核蛋白質に加え、細胞質の存在するオートファジーや神経栄養因子シグナルの下流分子に結合し、それらシグナル強度を制御する事が報告されている。TDP-43 遺伝子並びに TRG 遺伝子発現抑制による過剰な UPR の活性化も同様のメカニズムを想定し、これまでに小胞体膜上に存在する小胞体ストレス制御蛋白質の一つが、TRG の結合パートナ

一である事を見い出した。

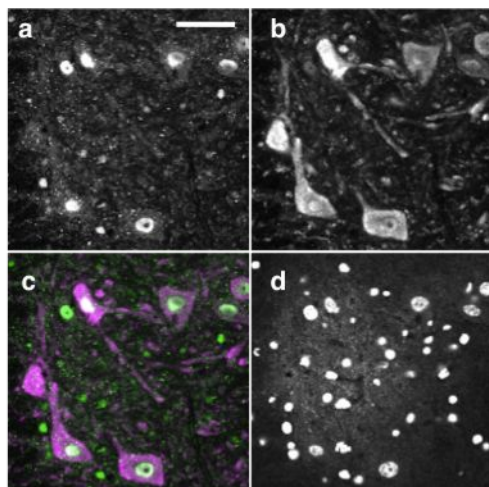


図3 脊髄運動ニューロンにおけるTRGの発現

a、TRG、b、NeuN（神経特異的マーカー）、c。緑はTRG、マジエンタはNeuN、d、DAPIによる核染色、スケールは50 μm。

(研究4) 大脳皮質を用いた免疫染色の結果より、TRGは脊髄同様大脳皮質錐体ニューロン及びその前駆体でも強く発現されている事を確認した。次いで、TRGの中樞神経系での機能を類推する目的で、野生型及び活性中心に変異を導入したドミナントネガティブ型TRG遺伝子を、子宮内エレクトロポレーション法によりマウス胎仔大脳皮質に一過性に発現させその表現型を解析した。しかし、現在までに神経細胞の移動や配置、突起伸展について対象のマウスと比較して、明確な差は見い出されていない。

引用文献

- (1) Neumann et al. (2006) Science 314:130.
- (2) Arai et al. BBRC 351:602.
- (3) Wu et al. (2012) JBC 287:27335.
- (4) Iguchi et al., (2013) Brain 136:1371.
- (5) de L' Etang et al. (2015) Nat. Neurosci
- (6) Israelson et al. (2015) Neuron 86:1.
- (7) Iwawaki et al., (2003) Nat. Med. 10:98.
- (8) Uchida et al., (2016) Sci. Rep. 6:19118

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 1件)

Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T, Shodai A, Kaji S, Morimura T, Banno Y, Nishitsuji K, Sakashita N, Maki T, Yamashita H, Ito H, Takahashi R, Urushitani M. CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. Scientific

Reports. 査読あり、6巻、2016年、19118-19136
DOI: 10.1038/srep19118.

[学会発表](計 6件)

小橋 修平、寺島 智也、中江 由希、櫻美和子、守村 敏史、小島 秀人、漆谷 真 骨髄単核球の細胞保護型ミクログリア細胞への分化誘導法の検討 ~神経変性疾患の治療応用を目指して 第16回日本再生医療学会総会 2017年3月7日、仙台国際センター(仙台市)

Inoue K, Li H, Mangalika PR, Nishizawa A, Numata Y, Nakamura S, Morimura T, Saya H, Goto Y. ER-Golgi transport may serve as a novel medicine for elizaeus-Merzbacher disease caused by PLP1 amino acid substitutions. 13th International Congress of Human Genetics. 2017.4.3-7, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

内田 司、小代 明美、玉木 良高、辰巳新水、守村 敏史、綾木 孝、伊藤 秀文、坂下 直美、高橋 良輔、漆谷 真 VHLとCUL2; TDP-43の凝集を促進するVHJLと分解を促進するCUL2 第56回日本神経学会 2015年5月20日~22日、朱鷺メッセ(新潟市)

井上 健、マンガリ・プリアンティ、沼田由里佳、中村 祥子、守村 敏史、佐谷 秀行、後藤 雄一 PLP1点変異の新規分子病態を標的としたドラッグ・リポジショニングによるPelizaeus-Merzbacher病の治療法開発 第59回日本人類遺伝学会 2014年11月19日~22日、タワーホール船堀(東京)

守村 敏史 子宮内エレクトロポレーションによる神経系での遺伝子解析 第39回組織化学講習会 2014年8月6日、ピアザ淡海(大津市)

Inoue K, Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Goto Y. PLP1 missense mutations impair subcellular organelle dynamics that impact clinical severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. 2014.7.19-24, Montreal (Canada)

[図書](計 1件)

守村 敏史 中西出版 組織化学講習会 2014 pp189-197

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守村 敏史 (MORIMURA Toshifumi)
滋賀医科大学・神経難病研究センター・助
教
研究者番号：20333338

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

漆谷 真 (URUSHITANI Makoto)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：60332326

(4) 研究協力者

()