

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04195

研究課題名(和文) 運動ニューロン疾患における神経コミュニケーション異常の分子病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of defective neural communication in motor neuron diseases

研究代表者

勝野 雅央 (Katsuno, Masahisa)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50402566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：運動ニューロン疾患は筋力低下や筋萎縮などの症状が進行する神経変性疾患であり、成人では筋萎縮性側索硬化症(ALS)と球脊髄性筋萎縮症(SBMA)とがそのほとんどを占める。本研究では、ALSの病因分子であるTDP-43が膵beta細胞においてインスリン分泌を調整する作用を有することを明らかにした。SBMAについては、原因蛋白質である変異アンドロゲン受容体がDNAメチル化酵素の発現を増加させることおよびSrcのリン酸化を亢進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ニューロンが細胞外分泌などを介して行っている他の細胞との情報・分子伝達の異常が運動ニューロン疾患における神経・筋システム変性の基盤であるとの仮説に基づき、従来にはない画期的な視点で運動ニューロン疾患の病態の本質を明らかにした。この成果は運動ニューロン疾患の進行メカニズムの解明と、それに基づく予後予測や治療法の開発に直結するだけでなく、認知症を含む他の多くの神経変性疾患や筋疾患などの病態メカニズム研究に応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：Nuclear depletion of TDP-43 is the histopathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis. In this research, we showed that loss of TDP-43 inhibited exocytosis by down-regulating CaV1.2 calcium channels, thereby reducing early-phase insulin secretion. Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is a neuromuscular disease caused by a CAG repeat expansion in the androgen receptor (AR) gene. In this research, we showed that DNA methyltransferase 1 is highly expressed in the motor neurons of an SBMA mouse model, and in patients with SBMA. Treatment with RG108, a DNA methylation inhibitor, ameliorated the viability of SBMA model cells and the motor function of SBMA mice. We also found that the level of phosphorylated Src was markedly increased in the spinal cords and skeletal muscles of SBMA mice prior to the onset, by utilizing a phosphoprotein assay. Intraperitoneal administration of a Src kinase inhibitor improved the behavioral and histopathological phenotypes of SBMA mice.

研究分野：神経内科学

キーワード：運動ニューロン疾患 エクソサイトーシス インスリン DNAメチル化 Src TDP-43 アンドロゲン受容体 カルシウムチャンネル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動ニューロン疾患は上位および下位運動ニューロンの両者もしくはいずれかが選択的変性に陥る進行性・難治性の神経変性疾患であり、成人における筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) および小児の脊髄性筋萎縮症 (SMA) などが代表的である。運動ニューロン疾患を含む神経変性疾患の研究はこれまで、家族例および一部の孤発例における遺伝子変異の発見と、動物モデル・ヒト剖検組織における異常蛋白質の蓄積を軸に進められてきた。その成果として蛋白質恒常性維持や RNA 代謝異常など、ニューロン変性に寄与する分子機構が明らかとなってきたものの、それらに基づいて開発された治療法のほとんどが、患者では明らかな効果を示していない。その主な要因として、神経症状の発症前に分子レベルでの病態が進行しているという時間的側面や、ニューロンのみならずそれをとりまく細胞ネットワークがシステムとして変性するという空間的側面があり、これらを解決することが治療法開発にとって極めて重要と考えられる。

2. 研究の目的

運動ニューロンと他の細胞とのコミュニケーションを制御する分子機構の詳細は不明であり、その異常がどのように神経変性の時間的・空間的变化に寄与しているのかも明らかにされていない。そこで、運動ニューロンと他のニューロン、グリア、骨格筋などの細胞間ネットワークの基盤となるエクソサイトーシス・exosome 分泌の分子機序や、神経活動の変化や神経間コミュニケーションが運動ニューロン・筋システム変性に与える影響などを解明するとともに、それらの分子機構と患者生体内における変化との関連を明らかにすることで、運動ニューロン変性の時空間病態を解明し、治療法開発に繋げることを目的として、本研究を立案した。

3. 研究の方法

ALS の病因分子である TDP-43 によるエクソサイトーシス制御機構を解明するため、膵細胞の培養細胞株である MIN6 や膵細胞特異的 TDP-43 ノックアウトマウスを用いて、インスリン小胞分泌機構における TDP-43 の役割を解析した。SBMA における運動ニューロン変性の時空間病態に関しては、エピジェネティクスの異常を解析するため、モデル細胞や変異 AR を発現するトランスジェニックマウスを用い、運動ニューロンにおける DNA メチル化酵素の発現変化を解析するとともに、メチル化アレイを用い DNA メチル化異常をきたす遺伝子を同定した。また、SBMA マウス脊髄と骨格筋を用い、網羅的蛋白質リン酸化解析を行い、発症前からリン酸化が変化する分子経路を同定するとともに、それに介入する低分子化合物の効果解析した。

4. 研究成果

(1) TDP-43 によるインスリン分泌制御

ALS の病態を解明するため、我々は孤発性 ALS のバイオマーカーからのアプローチをとり、とくに糖代謝に注目した解析を行った。まず、健常コントロール群と孤発性 ALS 患者群における経口糖負荷試験 (75gOGTT) の血糖値とインスリン値を解析したところ、ALS 患者群では血糖上昇が認められ、糖負荷 15~30 分における初期インスリン分泌能が低下していた (図 1)。さらに、ALS 患者剖検膵臓の免疫組織化学では、TDP-43 の核内喪失が認められた。これらの患者バイオマーカー解析の結果から、孤発性 ALS では膵細胞の核における TDP-43 喪失をともなうインスリン分泌障害が存在することが明らかとなった。

膵細胞株 (MIN6 細胞) におけるインスリン分泌機能を評価したところ、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞でグルコース負荷による早期相のインスリン分泌低下を認めた。また、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF) イメージングにより直接単一インスリン顆粒を評価することにより、早期相のインスリン分泌が低下していることを検証した (図 2)。次に網羅的遺伝子解析としてマイクロアレイを行った。オフターゲットを考慮し 2 種類の siRNA を用いて解析した結果、2 種類の siRNA に共通するターゲットとして電位依存性 Ca チャネルサブユニット CaV1.2 (Cacna1c) を同定した。すなわち、TDP-43 をノック

ダウンした MIN6 細胞では Cacna1c の発現低下を認め、外因性の CaV1.2 を一過性強制発現で補充するとインスリン分泌能が回復した。また、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞において、Fura2 イメージングを行うと、Ca の細胞内流入の低下が確認され、さらにパッチクランプでは Ca チャネル電流の電流密度は明らかに減少していた。

図 1. ALS 患者における耐糖能異常

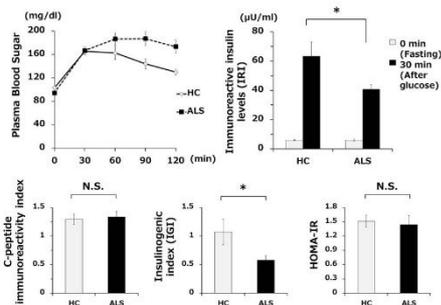
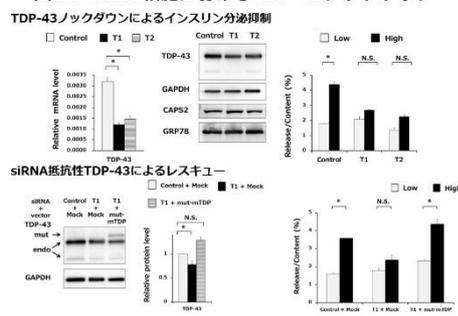


図 2. MIN6 細胞における TDP-43 ノックダウン



髄前角と骨格筋の双方で Src のリン酸化が亢進していた。さらに、神経細胞の培養細胞株である NSC34 と骨格筋の培養細胞株に変異 AR を強制発現させると、いずれの細胞においても Src のリン酸化亢進が認められ、変異 AR が Src をリン酸化することが明らかとなった (図 6)。

次に Src 阻害剤を上記の細胞モデルに投与したところ、いずれの細胞においても細胞活性の改善が認められた。この効果は複数の阻害剤によって検証され、そのうちのひとつである A419259 をマウスに腹腔内投与したところ、脊髄と骨格筋の双方で Src のリン酸化が抑制され、ニューロンや筋萎縮が改善した (図 7)。Src 阻害剤の薬効のターゲット分子を探索したところ、A419259 により p130-Cas の活性化が抑制されることが明らかとなった。このことから、変異 AR が Src の活性化を介して神経・筋システム変性を惹起すること、および Src 阻害剤が SBMA の新規治療薬となりうることが示された。

図 6. 変異ARはSrcを活性化する

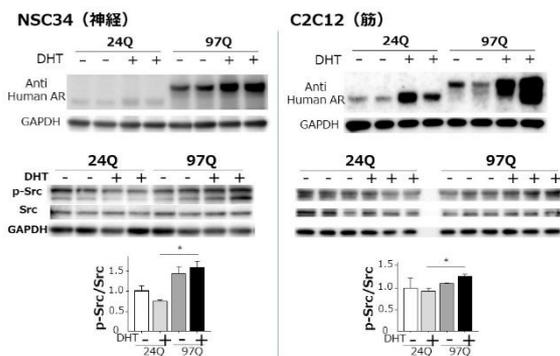
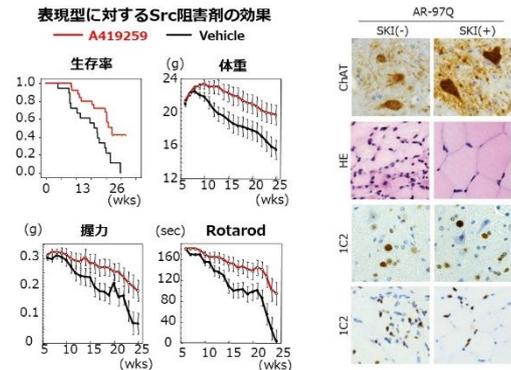


図 7. Src阻害剤はSBMAマウスの表現型を改善する



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kondo N, Tohnai G, Sahashi K, Iida M, Kataoka M, Nakatsuji H, Tsutsumi Y, Hashizume A, Adachi H, Koike H, Shinjo K, Kondo Y, Sobue G, Katsuno M.	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA methylation inhibitor attenuates polyglutamine-induced neurodegeneration by regulating Hes5.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Mol Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.15252/emmm.201708547. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Halievski K, Nath SR, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Breedlove SM, Lieberman AP, Jordan CL.	4. 巻 20
2. 論文標題 Disease Affects Bdnf Expression in Synaptic and Extrasynaptic Regions of Skeletal Muscle of Three SBMA Mouse Models.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/ijms20061314.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hashizume A, Katsuno M.	4. 巻 17
2. 論文標題 IGF-1 for spinal and bulbar muscular atrophy: hope and challenges.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lancet Neurol.	6. 最初と最後の頁 1026-1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/S1474-4422(18)30359-4.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Xu Y, Halievski K, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Breedlove SM, Jordan CL.	4. 巻 27
2. 論文標題 Pre-clinical symptoms of SBMA may not be androgen-dependent: implications from two SBMA mouse models.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet.	6. 最初と最後の頁 2425-2442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/hmg/ddy142.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hijikata Y, Hashizume A, Yamada S, Inagaki T, Ito D, Hirakawa A, Suzuki K, Atsuta N, Tsuboi T, Hattori M, Hori A, Banno H, Sobue G, Katsuno M.	4. 巻 90
2. 論文標題 Biomarker-based analysis of preclinical progression in spinal and bulbar muscular atrophy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e1501-e1509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000005360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoi S, Udagawa T, Fujioka Y, Honda D, Okado H, Watanabe H, Katsuno M, Ishigaki S, Sobue G.	4. 巻 20
2. 論文標題 3'UTR Length-Dependent Control of SynGAP Isoform 2 mRNA by FUS and ELAV-like Proteins Promotes Dendritic Spine Maturation and Cognitive Function.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 3071-3084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.08.100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishigaki S, Fujioka Y, Okada Y, Riku Y, Udagawa T, Honda D, Yokoi S, Endo K, Ikenaka K, Takagi S, Iguchi Y, Sahara N, Takashima A, Okano H, Yoshida M, Warita H, Aoki M, Watanabe H, Okado H, Katsuno M, Sobue G.	4. 巻 8
2. 論文標題 Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTL-like Phenotypes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 1118-1131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.01.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iida M, Sahashi K, Kondo N, Nakatsuji H, Tohna G, Tsutsumi Y, Onodera K, Okada Y, Okano H, Nakatochi M, Adachi H, Sobue G, Katsuno M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Src inhibition attenuates polyglutamine-mediated neuromuscular degeneration in spinal and bulbar muscular atrophy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 4262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12282-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito D, Hashizume A, Hijikata Y, Yamada S, Iguchi Y, Iida M, Kishimoto Y, Moriyoshi M, Hirakawa A, Katsuno M.	4. 巻 266
2. 論文標題 Elevated serum creatine kinase in the early stage of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurol.	6. 最初と最後の頁 2952-2961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-019-09507-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki K, Araki A, Honda D, Izumoto T, Hashizume A, Hijikata Y, Yamada S, Iguchi Y, Hara A, Ikumi K, Kawai K, Ishigaki S, Nakamichi Y, Tsunekawa S, Seino Y, Yamamoto A, Takayama Y, Hidaka S, Tominaga M, Ohara-Imaizumi M, Suzuki A, Ishiguro H, Enomoto A, Yoshida M, Arima H, Muramatsu S-I, Sobue G, Katsuno M.	4. 巻 130
2. 論文標題 TDP-43 regulates early-phase insulin secretion via CaV1.2-mediated exocytosis in islets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 3578-3593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI124481.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikenaka K, Tsukada Y, Giles AC, Arai T, Nakadera Y, Nakano S, Kawai K, Mochizuki H, Katsuno M, Sobue G, Mori I.	4. 巻 9
2. 論文標題 A behavior-based drug screening system using a Caenorhabditis elegans model of motor neuron disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46642-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 5件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Katsuno M.
2. 発表標題 TDP-43 regulates early-phase insulin secretion from pancreatic beta cells.
3. 学会等名 The 22nd US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference "Adeno-associated Virus-Mediated Gene Therapy Gene Therapy". (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝野雅央
2. 発表標題 リバーストランスレーションによるTDP-43の機能解明.
3. 学会等名 第6回日本難病医療ネットワーク学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 勝野雅央
2. 発表標題 球脊髄性筋萎縮症における神経筋システム変性病態
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yohei Iguchi
2. 発表標題 Emerging roles of exosomes in TDP-43 proteinopathy
3. 学会等名 第60回日本神経化学会大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yohei Iguchi
2. 発表標題 Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yohei Iguchi, Lara Eid, Martin Parent, Yuichi Riku, Kaori Kawai, Mari Yoshida, Masahisa Katsuno, Gen Sobue, Jean-Pierre Julien
2. 発表標題 THE ROLE OF TDP-43 SECRETION IN ASSOCIATION WITH EXOSOMES.
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Madoka Iida, Kentaro Sahashi, Naohide Kondo, Hideaki Nakatsuji, Genki Tohnai, Yutaka Tsutsumi, Hiroaki Adachi, Gen Sobue, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Akt signaling pathway is dysregulated in polyglutamine diseases.
3. 学会等名 第58回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Madoka Iida, Kentaro Sahashi, Naohide Kondo, Hideaki Nakatsuji, Genki Tohnai, Yutaka Tsutsumi, Hiroaki Adachi, Gen Sobue, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Akt signaling pathway is dysregulated in polyglutamine diseases.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Biomarker-based analysis of preclinical progression in motor neuron disease.
3. 学会等名 The 8th East Asia Neurological Forum (8th EANF). (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	橋詰 淳 (Hashizume Atsushi) (00637689)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	井口 洋平 (Iguchi Yohei) (80790659)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	
研究分担者	佐橋 健太郎 (Sahashi Kentaro) (90710103)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	