

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26117006

研究課題名(和文) 核酸代謝の乱れからみた蛋白質の老化基盤とその排除機構

研究課題名(英文) Mechanism of protein aging from the point of turbulence of nucleic acid metabolism or its exclusion mechanism.

研究代表者

小野寺 理 (Onodera, Osamu)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20303167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 92,200,000円

研究成果の概要(和文)：認知症を引き起こすタンパク質は、老化と共に“特定の神経システム”において“病原性をもったタンパク質へと変遷し蓄積”する。この課程には、“タンパク質の量的、質的な変化”を伴う。タンパク質の量は、産生と分解により制御され、産生はmRNAにより、また分解は細胞内の分解機構と、細胞外への排出機構により制御される。我々は、加齢性神経変性疾患を引き起こすTDP-43のRNA代謝機構が乱れていることを見出した。さらに、*vivo* モデルにてRNA代謝を乱すことで、TDP-43の断片化を引き起こし、かつアポトーシスを誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、TDP-43その物が持つ生理的な制御機構が、ある種の擾乱に対して極めて脆弱であり、それ故に疾患を引き起こすことを示した。この概念は、工学的なロバスト性の概念に類似している。ロバスト性と、その破綻による疾病機序は、老化に伴う疾病を包括する概念である可能性がある。今後は、このロバスト性を生かして、再び秩序を回復する治療方法を模索しうる。このような視点に立った治療方法の開発は新しく、その影響は大きい。

研究成果の概要(英文)：Proteins that cause dementia are "transformed into pathogenic proteins and accumulated" in "selected nervous systems" with aging. This process is accompanied by "quantitative and qualitative alterations in proteins." The amount of protein is controlled by production and degradation, production is controlled by mRNA, and degradation is controlled by intracellular degradation systems and extracellular efflux mechanisms. We found that the RNA metabolism mechanism of TDP-43 causing age-related neurodegenerative diseases is disturbed. Furthermore, by disrupting RNA metabolism *in vivo*, we succeeded in causing fragmentation of TDP-43 and inducing apoptosis.

研究分野：神経内科学

キーワード：認知症 筋萎縮性側索硬化症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

加齢性神経変性疾患は、特定のタンパク質が特定の神経システムに蓄積して引き起こされる。これらの原因となるタンパク質は、老化と共に“病原性をもったタンパク質へと変遷”し蓄積する。この過程には、“タンパク質の量的、質的な変化”を伴う。蛋白質の量は、産生と分解により制御され、産生は mRNA により、また分解は細胞内の分解機構と、細胞外への排出機構により制御される。また質は翻訳後修飾や、スプライシング多様体により形成される。老化は、この産生、分解の両者を変遷させ、病原性を持つ蛋白質への引き金を引くと考えた。また“システムの選択性”という命題を解決するには、システムの特異性を理解する必要がある。その特異性は、タンパク質の、量的、質的多様性により形成される。そこで、その背景にある RNA の量と、質の制御機構に鍵があると考えた。実際、近年、RNA 制御異常と神経疾患の関わりが明らかとなってきている。前頭側頭葉変性症(Frontotemporal lobar degeneration; FTL)及び筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)への RNA 結合タンパクである TDP-43 の関与や (Neumann et al. Science, 2006) 本症での C9ORF72 遺伝子の非翻訳領域の繰り返し配列の増大と、そこへのスプライシング因子の結合が見出された(DeJesus-Hernandez et al., Neuron 2011; Mori et al. Acta Neuropathol 2013)。さらに、RNA 制御に深く関わる遺伝子異常による神経疾患が報告された(Kwiatkowski et al., Science 2009; Kim et al. Nature 2013)。これらの事実は RNA 制御の乱れという共通の分子基盤の存在を示唆する。元々、生物は、様々な RNA のエラーを想定し、その分解機構を有している。この事実は、我々の RNA 産生システムが脆弱であることを示唆している。さらに発達に伴い RNA の多様性が変化するように、老化によっても、これは変化しそのエラーも増大すると推定される。これら異常 mRNA 由来のタンパク質が、病原性を持つと考えた。しかし、この RNA 制御のゆらぎ、乱れは、ほとんど検討されていない。

我々は ALS にて TDP-43 遺伝子変異を報告した(Yokoseki et al. Ann Neurol, 2008)。さらに ALS が運動システム限局型と FTL 型に大別されることを示した (Nishihira et al. Acta Neuropathol, 2008)。加えて TDP-43 がヒト脊髄運動神経細胞にて核内小体に局在し、ALS 患者では核内小体が減少することを見いだした (Ishihara et al. Hum Mol Genet, 2013)。核内小体の減少は FUS 変異 ALS 症例でも報告された (Yamazaki et al. Cell Rep. 2012)。核内小体はスプライシングに関連する U snRNA の成熟に関与し、遺伝性運動神経疾患である脊髄性筋萎縮症でも、核内小体、U snRNA の減少を認める(Zhang et al. Cell. 2008; Lotti et al. Cell. 2012)。我々も ALS にて U snRNA の減少、(Ishihara et al. Hum Mol Genet 2013)、mRNA のスプライシング異常を指摘した (Shiga et al. PLoS One. 2012)。さらに TDP-43 の自身の mRNA を介した自己タンパク質量の調節機構、ALS 患者での TDP-43 mRNA のスプライシング多様体の構成比率の変化と細胞内局在の異常を見出した (revise 中)。これらの事実は ALS にて TDP-43 mRNA 制御異常が存在することを示唆する。選択的スプライシングや、選択的 polyA 結合部位による細胞内局在調節等の RNA 制御機構の破綻による病態仮説は、システム選択性という最大の謎を説明しうる。また、脳が、加齢による異常タンパク質の蓄積に脆弱な理由として、その排除機構の特異性という側面がある。この排除機構には脳微小循環系が関与するが、その詳細はわかっていない。そこでこの脳微小循環系の病態機構も検討し、産生と排除の面から老化性脳神経疾患を解明する。

### 2. 研究の目的

FTLD および ALS の病因タンパク質の病的変化のシステム特異的な始まりとその蓄積機構を、産生と排除機構の老化から明らかとする。まず、産生面では、神経システム特異的な、病因タンパク質の RNA 制御機構の破綻、ゆらぎ (老化) の面から明らかとする。特にシステム特異的な RNA 制御機構と、その年齢、疾病による変化、破綻を、一細胞レベルで明らかにする。これにより RNA 制御を標的とした病態の解明と治療法の開発を目的とする。排除機構については、脳特異的な微小循環による排除機構と、その老化を明らかとする。

### 3. 研究の方法

モルフォリノアンチセンスオリゴは、オクタゲアニジンデンドリマーを結合させたモルフォリノアンチセンス核酸 (Vivo-Morpholinos; Gene tools) を用いた。Vivo-Morpholinos の配列は、TDP-43 エクソン 6 内の選択的イントロン 6A の 5'-スプライス部位より近位配列 (#1)、5'-スプライス部位 (#2)、3'-スプライス部位 (#3)、選択的イントロン B の 3'-スプライス部位 (#4) をそれぞれ標的にし、Gene tools 社が設計した (右図)。コントロールに Standard Control Morpholino Oligo (Gene tools) を用いた。Neuro2a 細胞を 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 10%FBS を含む Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) で培養した。Vivo-Morpholinos を DMEM 中に添加した。48 時間後に細胞を回収した。

C57BL/6N (CRJ) マウス (雄、11-12 週齢) に抱水クロラル 0.35 mg/g 体重、キシラジン 0.01 mg/g 体重を腹腔内注射し全身麻酔をかけた。Vivo-Morpholinos を人工脳脊髄液 (Na 150 mM, K 3.0 mM, Ca 1.4 mM, Mg 0.8 mM, P 1.0 mM, Cl 155 mM) を用いて 0.2 ug/ul または 0.4 ug/ul に希

釈した。ハミルトンシリンジに接続した約 15cm のカテーテル (PE-10 Intramedic polyethylene tubing, Becton Dickinson) を 32G 針に接続し, Vivo-Morpholinos をカテーテル内に吸引した。腰背部正中の皮膚を切開し, L5/6 間隙に約 45 度の角度で針を挿入した。ハミルトンシリンジで軽く陰圧をかけ無色透明の脳脊髄液の逆流を確認することにより, 針先が髄腔内に到達したものと判断した。血性の液体の逆流を確認したときは, 外傷性穿刺と判断し, 解析の対象から除外した。シリンジポンプを使用し Vivo-Morpholinos 0.1 ul/分の速度で 7.5 u $\mu$ l (1.5 ug または 3.0 ug) 注入した。7 日後にマウスを解剖し, 腰髄を摘出した。片側を RNA 抽出, 反対側を蛋白抽出に用いた。新潟大学動物実験倫理委員会による承認を得て行った。

RNA 抽出と逆転写 PCR, 定量 PCR 解析は次の様に行った。Total RNA を Nucleospin RNAII (Takara) を用いて抽出した。ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写をさせ相補的 DNA を構築した。逆転写 PCR は, TaKaRa LA Taq (Takara) を用いて行った。TDP-43 mRNA 選択的スプライシングの解析には, F5 5'-CAGAGCTTTTGCCTTCGTCA-3', R6-1 5'-CAAAGACGCAGCCTGTGC-3', F6 5'-TTTCAAATGTTTATGGAAGAAGCA-3', R6-2 5'-AGTTCCATCTCAAAAAGGGTC-3'のプライマー配列をそれぞれ用いた(図)。PCR 条件は, 94 1 分の初期変性後, 94 30 秒, 55 30 秒, 72 2 分を 35 サイクル, 72 5 分の追加伸長反応とした。Pdp1 mRNA の選択的スプライシングの解析には, フォワードプライマー 5'-GTGCTGAGTGAGGGAAGGAC-3', リバースプライマー 5'-TGCAGTGCCATAGATTCTGC-3' を用いた。PCR 条件は, 94 1 分の初期変性後, 94 30 秒, 55 30 秒, 72 1 分を 40 サイクル, 72 5 分の追加伸長反応とした。増幅産物を 2% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。定量 PCR は, SYBR Premix EX TaqTM (Takara) を用いて Thermal Cycler Dice® Real Time System (TP850, Takara) で行った。TDP-43 mRNA の発現解析には, primer 6A のフォワードプライマーに 5'-AGCTGGCTTGGGAAATAACC-3', リバースプライマーに 5'-CTGGCTAACATGCCCATCAT-3' を用い, primer 6B のフォワードプライマーに 5'-TGGACTGAGCTTGTGGTGTG-3', リバースプライマーに 5'-CAGAAGTGCAGCAAACAGCA-3'を用いた(図)。

蛋白抽出は, Protease inhibitor cocktail (Sigma) および phosphatase inhibitor cocktail-2 (Sigma) を含む RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) 400ul に組織を浸し破碎した。超音波処理をした後, 100,000g で 30 分間 4 下で超遠心を行い, 上清を RIPA 可溶性画分とした。Urea 画分抽出のために, 同様な操作を 2 回繰り返すことにより RIPA 可溶性画分の持ち込みを排除した。この RIPA 不溶性のペレットに Protease inhibitor cocktail (Sigma) および phosphatase inhibitor cocktail-2 (Sigma) を含む Urea buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, pH 8.5) 100ul を加えた。超音波処理した後, 100,000g で 30 分間 22 下で超遠心を行い, 上清を Urea 画分とした。RIPA 可溶性画分に対し, BCA Protein Assay kit (Thermo) を用い蛋白濃度を測定した。Urea 画分の蛋白濃度は RIPA 可溶性画分と同じ比率であると仮定し, 解析を行った。

ウェスタンブロッティングは Laemmli Sample Buffer (BioRad) を加え, 96 で 5 分間処理した。10% ポリアクリルアミドゲル Super SepTM Ac (Wako) を用いた SDS-PAGE により分離し, PVDF 膜 (Millipore) に転写した。抗 TDP-43 (260-414) 抗体 (Proteintech, 12892-1-AP) または抗 TDP-43 (1-260) 抗体 (Proteintech, 10782-2-AP) を 1 次抗体として用いた。内在性コントロールとして抗 GAPDH 抗体 (MBL) を用いた。HRP を標識した二次抗体を Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いて検出した。ImageQuantTM LAS4000 biomolecular imager (GE Healthcare) を用いてバンドを定量解析した。

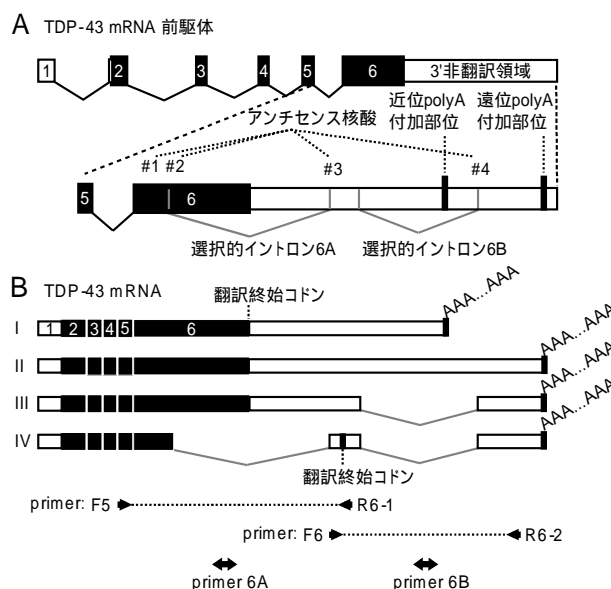
#### 4. 研究成果

前頭側頭葉変性症 (FTLD), 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) で観察される封入体の主要構成タンパク質の一つである TDP-43 は, 核内の TDP-43 タンパク質の増加時には TDP-43 タンパク質が TDP-43 mRNA の polyA 結合部位の選択を変化させ, 遠位部の polyA 結合部位を選択するようになり, その結果, TDP-43 タンパク質との結合部位が現れ, 核内の TDP-43 タンパク質と TDP-43 mRNA が結合することにより, RNA が核内に貯留することを見出した。この機序により産生を抑制する。また一部は遠位部の polyA 結合部位を選択するためにスプライシング部位が露呈し, スプライシングが惹起され, ナンセンス依存性 mRNA 分解機構感受性の mRNA となり分解される。この 2 重の経路より調整される。一方 TDP-43 減少時は, 近位部の polyA 結合部位を選択し, 速やかに細胞質に移動し TDP-43 タンパク質を産生する。また核内に貯留していた TDP-43 mRNA も細胞質に移動する。その為に核内 TDP-43 mRNA は減少し, 細胞質内での TDP-43 mRNA の増加を引き起こすことを明らかとした。

解明された結果から, 核内の TDP-43 タンパク質を失っている FTLD や ALS の病的な神経細胞では, TDP-43 タンパク質が細胞質に移動しているために, TDP-43 が足りない状態と誤り, TDP-43 タンパク質の合成が持続的に亢進状態に傾いていると推察した。この事は TDP-43 タン

パク質の細胞質内での持続的な増加に繋がり、凝集体産生を促進する悪循環に陥っている。しかし、レーザーマイクロセクションで ALS 運動神経数個あたりの mRNA 定量を試みた報告では、TDP-43 mRNA の量の増加は認めていない。この理由は、細胞内局在の変化を伴うため、細胞全体での量では変化を認めにくいと考えた。これを明らかとするためには、核内の TDP-43 mRNA の減少と、細胞質内の TDP-43 mRNA の増加を示す必要がある。この目的のために、近年開発された定量的 *in situ* hybridization 法を用いた。本方法は 1 細胞あたりで、このような解析を可能とする。その結果 ALS 運動神経細胞では、コントロール群と比較して、細胞質の mRNA 比率が有意に高いことを明らかとした。

次に、TDP-43 mRNA の制御機構の破綻が ALS 類似病態を引き起こすかを *in vivo* で検証した。まず TDP-43 mRNA エクソン 6 内の選択的イントロンのスプライシングをスプライシング部位特異的なアンチセンス核酸により抑制することを試みた。ヒト TDP-43 の最終エクソン (エクソン 6) 内には自己蛋白量調節に関わる 2 つの選択的イントロンが存在する (図: 選択的イントロン 6A, 6B)。この選択的イントロンの 5'-スプライス部位および 3'-スプライス部位近傍の配列は、ヒトとマウスにおいて極めて相関性が高い。マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を用い、ヒトと同じ選択的イントロンのスプライシングを受けることを確認した。次に、選択的イントロン 6A, 6B の 5'-スプライス部位および 3'-スプライス部位を標的としたモルフォリノアンチセンス核酸 (図) を Neuro2a 細胞に投与し、選択的イントロン 6A または 6B のスプライシングへの影響を、検討した。さらに、選択的イントロン 6A または 6B を保持した mRNA の定量的解析を行った。

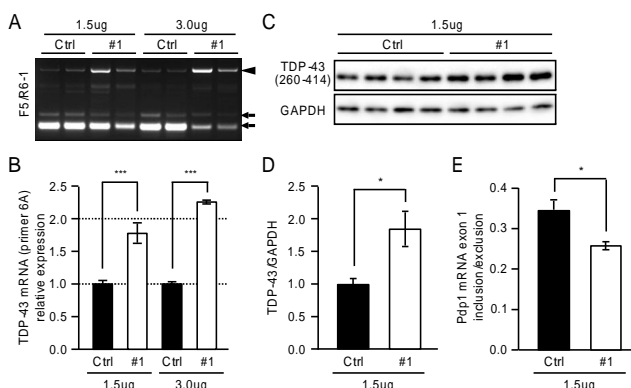


選択的イントロン 6A の 5'-スプライス部位の近位部、もしくは 5'-スプライス部位を標的としたアンチセンス核酸 #1 #2 は、容量依存性に選択的イントロン 6A のスプライシングを抑制し、非スプライシング産物を増加させた。一方、アンチセンス核酸 #1, #2 により選択的イントロン 6B を保持した mRNA は減少した。すなわち、アンチセンス核酸 #1 または #2 の投与により、選択的イントロン 6A のスプライシングが抑制され、選択的イントロン 6B のスプライシングが亢進した TDP-43 mRNA が増加した。

次に、TDP-43 選択的スプライシングの抑制が TDP-43 蛋白量を増加させるかをウエスタンブロッティング法により検討した。これまでの解析から、アンチセンス核酸 #1 を用いた Neuro2a 細胞にアンチセンス核酸 #1 を投与し 48 時間後に完全長の 43kDa の TDP-43 蛋白量は約 2 倍に増加した。以上より、アンチセンス核酸 #1 により選択的イントロン 6A のスプライシングが抑制され、完全長の TDP-43 が増加することが示された。

次に、選択的スプライシングの抑制による TDP-43 の機能的過剰を検証した。TDP-43 はスプライシング関連因子であり、TDP-43 の減少により、Pdp1 mRNA のエクソン 1 の保持が増加する。逆転写 PCR 法による半定量的な解析では、アンチセンス核酸 #1 の投与により Pdp1 のエクソン 1 の保持が有意に減少した。この結果は、TDP-43 の配列に特異的なアンチセンス核酸により、TDP-43 の過剰状態が質的にも引き起こされていることを示した。

最後に、マウス脊髄組織における TDP-43 選択的スプライシングの抑制と TDP-43 過剰発現について検討した。11-12 週齢の雄のマウスに対し、アンチセンス核酸を腰椎穿刺により髄腔内に注入し、その 7 日後に脊髄組織を解析した。逆転写 PCR 法による解析では、アンチセンス核酸 #1 の投与により、選択的イントロン 6A のスプライシング産物の減少と非スプライシング産物の増加を



認められた。定量 PCR 法による解析では、アンチセンス核酸#1 により TDP-43 mRNA の非スプライシング産物は平均 1.7 倍～2.3 倍に有意に増加した。さらに、ウエスタンブロッティング法による解析では、アンチセンス核酸#1 を投与することにより、TDP-43 蛋白質量は平均 1.9 倍に有意に増加した（前項図）。また、TDP-43 の標的 RNA である Pdp1 エクソン 1 の保持は有意に減少した。以上の結果により、マウス脊髄組織においても TDP-43 選択的イントロン 6A のスプライシングが TDP-43 の量調節に重要であること、またこの抑制により、個体レベルで中枢神経系における内在性 TDP-43 を増加させることが可能であることが示された。

アンチセンス核酸投与下で、35kDa の TDP-43 が、RIPA 可溶性画分、Urea 画分ともに増加した。このバンドは TDP-43 C 末断片であることが示唆された。そこで、この組織において、細胞障害性を検討するために、プロアポトーシス蛋白である BIM の発現を検討した。アンチセンス核酸#1 の投与により BIM mRNA は有意に増加した。さらに、この BIM mRNA 量は、Urea 画分の 35kDa TDP-43 C 末断片の増加と有意な正の相関を示した。これらの結果は、選択的スプライシングの抑制により、TDP-43 の断片化と神経細胞障害が一連の機序により惹起されていることを示唆する。

生物学的パスウェイモデル作成ツールである CellDesigner<sup>TM</sup> を使用し TDP-43 の細胞内動態をモデル化し、シミュレーションを行った。TDP-43 タンパク質の量に関する各種パラメータを変動させたときの核内 TDP-43 タンパク質の量は、その多くに対し頑健性を示した。一方で、TDP-43 タンパク質の易凝集性、断片化の亢進、核輸送の障害、自己制御機構の破綻には脆弱性を示した。これらの障害により、核内 TDP-43 タンパク質量の減少、凝集・断片化の増加、mRNA の異常増加といった病的状態が持続的に引き起こされる事が示された。さらに、この異常状態が TDP-43 mRNA の発現量を抑制することにより、正常化しうる事が示された。この *in silico* モデルは、我々の患者脊髄前角細胞での結果を支持し、TDP-43 病理の形成と維持には、TDP-43 の頑健な自己制御機構の背後に潜む脆弱性が関与していることが予測された。

これらの結果は、この内在性 TDP-43 過剰発現モデルが、ALS 病態を模倣している可能性を示す。TDP-43 の断片化は ALS 罹患組織で観察される重要な生化学的指標であり、これを遺伝子に改変を加えないマウスで再現したことは極めて重要である。今後、より長期に観察し、運動神経症状、核内 TDP-43 の消失と細胞質内の封入体形成、運動神経細胞死の有無を検証し、モデルとしての適正を検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 45 件)

1. Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Suzuki Y, Sugano S, Qu W, Ichikawa K, Yurino H, Higasa K, Shibata S, Mitsue A, Tanaka M, Ichikawa Y, Takahashi Y, Date H, Matsukawa T, Kanda J, Nakamoto FK, Higashihara M, Abe K, Koike R, Sasagawa M, Kuroha Y, Hasegawa N, Kanosawa N, Kondo T, Hitomi T, Tada M, Takano H, Saito Y, Sanpei K, Onodera O, Nishizawa M, Nakamura M, Yasuda T, Sakiyama Y, Otsuka M, Ueki A, Kaida KI, Shimizu J, Hanajima R, Hayashi T, Terao Y, Inomata-Terada S, Hamada M, Shiota Y, Kubota A, Ugawa Y, Koh K, Takiyama Y, Ohsawa-Yoshida N, Ishiura S, Yamasaki R, Tamaoka A, Akiyama H, Otsuki T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S. Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2018 Apr;50(4):581-590. doi: 10.1038/s41588-018-0067-2. Epub 2018 Mar 5. PubMed PMID: 29507423.
2. Sugai A, Kato T, Koyama A, Koike Y, Kasahara S, Konno T, Ishihara T, Onodera O. Robustness and Vulnerability of the Autoregulatory System That Maintains Nuclear TDP-43 Levels: A Trade-off Hypothesis for ALS Pathology Based on *in Silico* Data. *Front Neurosci.* 2018 Feb 1;12:28. doi: 10.3389/fnins.2018.00028. eCollection 2018. PubMed PMID: 29449800; PubMed Central PMCID: PMC5799296.
3. Tohnai G, Nakamura R, Sone J, Nakatochi M, Yokoi D, Katsuno M, Watanabe H, Watanabe H, Ito M, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Onodera O, Naruse H, Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Ishiura H, Morishita S, Yoshimura J, Doi K, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Atsuta N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2018 Apr;64:158.e15-158.e19.
4. Konno T, Yoshida K, Mizuta I, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda SI, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Diagnostic criteria for adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia due to CSF1R mutation. *Eur J Neurol.* 2018 Jan;25(1):142-147.
5. 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. Clinicopathological characteristics of

patients with amyotrophic lateral sclerosis resulting in a totally locked-in state (communication Stage V). Acta Neuropathol Commun. 2016 Sep 30;4(1):107.

6. Jiang H, Shimizu H, Shiga A, Tanaka M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Familial amyotrophic lateral sclerosis with an I104F mutation in the SOD1 gene: Multisystem degeneration with neurofilamentous aggregates and SOD1 inclusions. Neuropathology. 2017 Feb;37(1):69-77.
7. 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. Heterogeneity of cerebral TDP-43 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for clinico-pathologic subtypes. Acta Neuropathol Commun. 2016 Jun 23;4(1):61.
8. 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. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. Nucleic Acids Res. 2016 Jul 8;44(12):5820-36.
9. Nozaki H, Kato T, Nihonmatsu M, Saito Y, Mizuta I, Noda T, Koike R, Miyazaki K, Kaito M, Ito S, Makino M, Koyama A, Shiga A, Uemura M, Sekine Y, Murakami A, Moritani S, Hara K, Yokoseki A, Kuwano R, Endo N, Momotsu T, Yoshida M, Nishizawa M, Mizuno T, Onodera O. Distinct molecular mechanisms of HTRA1 mutants in manifesting heterozygotes with CARASIL. Neurology. 2016 May 24;86(21):1964-74.
10. Nozaki H, Sekine Y, Fukutake T, Nishimoto Y, Shimoe Y, Shirata A, Yanagawa S, Hirayama M, Tamura M, Nishizawa M, Onodera O. Characteristic features and progression of abnormalities on MRI for CARASIL. Neurology. 2015 Aug 4;85(5):459-63. doi: 10.1212/WNL.0000000000001803.

〔学会発表〕(計 57 件)

1. 須貝章弘 小野寺理ら TARDBP pre-mRNA with a mutation causes disturbance of TDP-43 autoregulation via altered interaction with ALS-related splicing factors 29th International Symposium on ALS/MND(国際学会) 2018 年
2. 小池 佑佳 小野寺理ら The DNA methylation status of TARDBP 3' -UTR affects its alternative splicing. Advances in Neurodegenerative Disease Research and Therapy(国際学会) 2018 年
3. 小野寺理 Promoting excellence in ALS registry and research. Hot topics: Molecular mechanism. ALS registry and research in Japan “PACTALS” and “Brain Protein Aging and Dementia Control” Project Joint Meeting(招待講演)(国際学会) 2017 年
4. 小野寺理 How are neurovascular units maintained in aging? From a study of HSCVD. Brain Protein Aging and Dementia Control, 2nd International Symposium(招待講演)(国際学会) 2017 年
5. Ishihara T, Toyoda S, Koyama A, Tada , Atsuta N, Nakamura R, Tohno G, Sone J, Izumi Y, Kaji R, Morita M, Taniguchi A, Kakita A, Sobue G, Nishizawa M, Onodera O. Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). The SMN2 gene copy number states can affect the onset risk and survival time in Japanese ALS. 28th international symposium on ALS/MND(国際学会). 2017 年
6. Yuka Koike, Akihiro Sugai, Akio Yokoseki, Osamu Onodera. The alternative splicing of TARDBP mRNA is affected by the methylation status. 28th international symposium on ALS/MND(国際学会). 2017 年
7. Akihiro Sugai, Genri Tohyama, Taisuke Kato, Tomohiko Ishihara, Osamu Onodera. A non-genetically modified iPSC-derived neuron model with an increased expression of intrinsic TDP-43. Amyotrophic lateral sclerosis & Related Motor Neuron Disease (Gordon Research Conference)(国際学会) 2017 年
8. Yuka Koike, Akihiro Sugai, Takuya Konno, Akihide Koyama, Misaki Koyama, Taisuke Kato, Tomohiko Ishihara, Akio Yokoseki, Osamu Onodera. The alternative splicing of TARDBP mRNA is affected by the ALS10 associated mutations and methylation status. Amyotrophic lateral sclerosis & Related Motor Neuron Disease (Gordon Research Conference)(国際学会). 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ <https://www.neurology-bri.jp/study/als/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：柿田 明美

ローマ字氏名： Kakita Akiyoshi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。