

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15081

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症の運動ニューロン選択的脆弱性と緩徐進行性の分子的基盤

研究課題名(英文) Molecular bases of selective vulnerability of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

田辺 康人 (Tanabe, Yasuto)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10311309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：運動ニューロン(MN)に認められる筋萎縮性側索硬化症(ALS)における選択的な脆弱性の分子的基盤を明らかにする目的で、MNの中でも特に早期からALS脆弱性を示すFF-MNに着目し、FF-MNとしての細胞特異性獲得に関与するNotchシグナルがALS脆弱性を潜在的に賦与しているのかどうか解析した。Notchシグナル促進及び抑制のバランスによりTDP-43タンパク質の恒常性が維持されていること、またその破綻により核内TDP-43凝集体形成が促進されることが示された。さらに、両者のうちNotchシグナル促進によりその破綻がよりもたされやすく核内TDP-43凝集体形成に結びつくことが示された。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative diseases can be characterized by their unique distinct set of neuronal subtypes that exhibit progressive and selective vulnerability. In ALS, progressive and selective degeneration with the accumulation of pathological aggregates, including TDP-43, is observed in motor neurons (MNs), especially those that innervate fast muscles (FF-MN) in the spinal cord. Our study using cultured cells in vitro showed that Notch signals involved in the specification of FF-MN appeared to be also involved in the acquisition of vulnerability against TDP-43 full-length protein expression and resulted in the formation TDP-43 aggregates mostly located within the nucleus. Although we were not able to show cytoplasmic re-distribution of TDP-43 aggregates even in the presence of a proteasome inhibitor, our results may add to the emerging view that nuclear TDP-43 proteinopathy may take place prior to the onset of cytoplasmic event and underlie the selective vulnerability of MNs in ALS.

研究分野：神経病理 神経発生

キーワード：神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病、アルツハイマー病、脊髄小脳変性症や筋萎縮性側索硬化症 (以下、ALS) などの神経変性疾患においては、個々の疾患に特徴的な神経細胞が選択的な脆弱性を示し異常タンパク質蓄積による神経細胞死が時間経過とともに確実に伝播・進行する。TDP-43 は大多数の孤発性 ALS 患者の脳脊髄において見出される細胞質凝集体の構成成分として同定された RNA 結合タンパク質である (Arai et al. 2006, Neumann et al., 2006)。ALS 発症機序を理解するうえで TDP-43 を介した RNA/タンパク質代謝異常の理解が重要であると考えられているが、どのような分子メカニズムにより選択的な脆弱性ならびに病態の確実な進行性が賦与されているのかといった観点からの研究は乏しい。

ALS においては中枢神経系の神経細胞のうち、皮質および脳幹・脊髄レベルの運動ニューロン(MN)が障害を受ける。脳幹・脊髄レベルの MN は、支配する骨格筋の収縮速度や疲労性に従って、S-MN (遅筋支配、疲労抵抗性)、FR-MN(速筋支配、疲労抵抗性)、FF-MN (速筋支配、易疲労性) に分類されるが、それらすべての MN が病初期から同様に障害を受けるのではなく、FF-MN がより障害受けやすく S-MN は疾病の最終段階まで残るものが多いことが知られている (Saxena et al., 2009; Kanning et al., 2010)。これはすなわち FF-MN と FR/S-MN の細胞内因的な特異性の違いに ALS に対する脆弱性および抵抗性の謎を解く鍵があることを示唆する。FF-MN の特異性を賦与する分子実体として Dkl1(delta-like 1 homologue)が明らかにされた (Muller et al., 2014)。Dkl1 は生後発達期において FF-MN に特異的に発現され Notch シグナリングを抑制することで、FF-MN に特徴的な細胞内因的な特異性を賦与することが示された。

2. 研究の目的

本研究では、FF-MN としての細胞特異性そのものが ALS 脆弱性を賦与していると仮定し、生後発達期において FF-MN としての細胞特異性を与える Dkl1 シグナルに着目し、Dkl1 を介した Notch シグナル抑制が ALS 脆弱性を賦与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ALS 脆弱性獲得の指標として TDP-43 凝集体形成を評価系とした。ALS の *in vitro* 再構築系として全長 TDP-43 タンパク質を培養細胞に発現させ、Notch シグナル抑制または Notch シグナル促進の細胞内環境下において TDP-43 凝集体形成の有無を免疫組織学的に評価した。

(1) 細胞培養、遺伝子導入および免疫細胞学的解析

細胞培養 (宿主細胞 HEK293T)、遺伝子導入および免疫細胞学的解析は通常の方法で行った。HEK293T 細胞は 10% ウシ胎児血清入

り DMEM (Invitrogen) を増殖培地として培養した。遺伝子導入は遺伝子導入試薬 (Virofectin, VIOGENE) のプロトコールに従った。すなわち、宿主細胞をガラスプレート (Matsunami) 入りの 24 穴プレート (Nunc) に遺伝子導入 24 時間前に継代しておき、1 穴当たりプラスミド DNA (合計 1 μ g) を導入した。遺伝子導入 48 時間後に免疫組織学的解析を行った。MG132 (ペプチド研) 処理を行う実験においては、MG132 (最終濃度 0.5 μ M) /DMSO または DMSO のみを添加しておいた増殖培地をあらかじめ用意し遺伝子導入 24 時間後に置換し、培地置換後さらに 24 時間培養し免疫組織学的解析を行った。免疫細胞学的解析においては、先ず培養した 24 穴プレートを氷上に移し 4% パラホルムアルデヒド溶液にて 30 分間固定し、次に一次抗体として TDP-43 抗体 (ウサギポリクローナル抗体、Proteintech、1/500 希釈)、二次抗体として Alexa Flour488-ロバ抗ウサギ抗体 (Molecular Probes, Life technologies、1/200 希釈) を用いて解析した。ブロッキングは 10% 正常ヤギ血清 (invitrogen, Life technologies) /0.2% Triton-X/PBS で行った。抗体染色完了後には DAPI (同仁化学) 入り PBS にて室温 30 分間放置したのちに PBS に置換した。

(2) 顕微鏡的解析

蛍光顕微鏡 (DP80 Olympus) により 40 倍の対物レンズを用いて観察し Olympus cellSens standard にて蛍光画像を撮影した。撮影した写真は photoshop を用いて明度などの編集を行った。

(3) プラスミド DNA

ヒト由来全長 Tdp-43 発現ベクター (pCAGGs-Tdp-43-Full-length stop) は wtTDP-43tdTOMATOHA (Yang et al., 2010, Addgene #28205)、以下 pCAGGS-TDP-43-tdTomato) を KpnI 制限酵素にて切断し平滑末端処理を行った後に self-ligation させることで人工的に終止コドン挿入することで用意した。これにより TDP-43 下流に配置されていた tdTomato を TDP-43 からフレームシフトアウトさせた。従って本研究で用いた全長 TDP-43 のアミノ酸配列は野生型のものとは比べて C 末端配列に 7 アミノ酸 (GWGMAWHQCRS; 下線アミノ酸) を余分に持つ。pCAGGS-NICD (Dang et al., 2006, Addgene #26891)、Dkl1-bio-His (Sun et al., 2015, Addgene #51876)、pCAGGs-tdTomato (Hagimoto et al., 2017) を使用した。pGa981.6-d2EGFP は pGa981.6 (Kurooka et al., 1998) に d2EGFP (Takara, Clontech) を挿入して作成した。

4. 研究成果

過去の研究において TDP-43 タンパク質の凝集体形成の *in vitro* 再構築系として様々な培養細胞を用いた実験系が確立されている (Nonaka et al., 2009, Liu-Yesucevitz et al., 2010, Yang et al., 2010, Eersel et al., 2011, Scotter et al., 2013)。本研究では、宿主とし

て HEK293T 細胞を対象とし、TDP-43 タンパク質の発現系としてはポリカチオンを用いた遺伝子導入による一過性遺伝子発現系を採用した。

(1) NICD および Dik1 による HEK293T 細胞における Notch シグナル促進および抑制

今回、ALS 脆弱性を賦与する因子として前述の議論のとおり、生後発達期において FF-MN としての細胞特異性を賦与する Dik1 シグナルを想定した。過去の研究から Dik1 シグナルは Notch シグナルを抑制することが示されており、生後発達期における FF-MN 細胞特異性獲得の場においても Notch シグナルを促進した場合には FF-MN ではなく ALS 抵抗性を示す S-MN の特異性が獲得されることが示されている (Muller et al., 2014)。そこで Dik1 ならびにそのコントロールとして NICD を用いてそれら Notch シグナル抑制および促進因子が ALS 脆弱性すなわち TDP-43 凝集体形成に関与しているのかどうかを解析することとした。

まず、はたして今回用意した実験系において外来性に遺伝子導入する NICD および Dik1 分子により細胞内環境としての Notch シグナルがそれぞれ促進および抑制されるのかどうか、Notch シグナルのモニター系として確立されている RBP-J 結合配列をプロモーターとして (Kurooka et al., 1998) その下流に PEST 配列をもつ EGFP (d2EGFP; Takara Clontech) を組み込んだ発現ベクター (pGa981.6-d2EGFP) を作成し、今回用意した NICD 発現ベクター (pCAGGs-NICD) もしくは Dik1 発現ベクター (Dik1-bio-His) もしくはコントロールベクター (pCAGGs) ならびにトランスフェクション効率のモニターのための pCAGGs-tdTomato を加えて HEK293T 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入後 48 時間経過した時点で、蛍光顕微鏡にて EGFP 強度を観察したところ、結果は示さないが、期待した通り、NICD を遺伝子導入した細胞においてはベクターのみを遺伝子導入した場合と比べて強い EGFP 蛍光シグナルを認め、また Dik1 を導入した細胞ではベクターのみを遺伝子導入した場合と比べて弱い EGFP 蛍光を認めた。これらの結果は HEK293T 細胞においては通常の増殖培地での培養条件下ではある一定の Notch シグナルが恒常的に働いていることを示すと同時に、今回用意した NICD ならびに Dik1 遺伝子発現系がそれぞれ Notch シグナルを促進または抑制させることに有効であることを示した。

(2) NICD および Dik1 による HEK293T 細胞における TDP-43 凝集体形成

次に、NICD または Dik1 分子を TDP-43 分子と HEK293T 細胞に共発現させることで、果たして TDP-43 凝集体形成に対して Notch シグナルが関与しているのかどうかを明らかにすることを試みた。

この目的のために、TDP-43 と共に NICD (図 1A-C)、Dik1 (図 1D-F)、コントロール (図 1G-I)

のそれぞれ二者の組み合わせで遺伝子発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし 48 時間後に TDP-43 タンパク質の細胞内分布を免疫組織学的に解析した (図 1)。過去の報告と一致して HEK293T 細胞においては TDP-43 全長タンパク質のみを発現させた場合には、遺伝子導入後 48 時間の時点においても TDP-43 タンパク質の細胞内分布は核標識色素である DAPI とほぼ一致しており、TDP-43 は核内に一様に分布して凝集体形成を示す細胞はほとんど検出されなかった (図 1G-I)。一方、NICD および Dik1 を発現させた場合には TDP-43 凝集体形成を認めた (図 1A-F, 矢印)。TDP-43 凝集体の細胞内分布を DAPI と比較したところ TDP-43 凝集体の大多数はほぼ核内に存在する事、そして少数の細胞には核内のみならず核に隣接する細胞質に TDP-43 凝集体が分布することが示された (図 1A, D 矢印)。このような核を主体とした TDP-43 凝集体の細胞内分布パターンは NICD および Dik1 存在下においてほぼ同様であった。この結果は、Notch シグナルの恒常性が崩れ促進または抑制された場合には TDP-43 凝集体が形成される方向に働くことを示唆した。TDP-43 凝集体を認めた HEK293T 細胞の割合を定量的に解析したところ、NICD 存在下の場合が Dik1 存在下の場合と比べて有意に高く、NICD によって Dik1 と比較してより強く TDP-43 凝集体形成が促進されることが示された (TDP-43 凝集体陽性細胞の全 TDP-43 遺伝子導入細胞中の割合; NICD $29.6 \pm 15.8\%$ (平均値 \pm 標準偏差, $n=455$)、Dik1 $18.0 \pm 11.0\%$ (平均値 \pm 標準偏差, $n=357$)、 $p < 0.01$ Mann-Whitney)。

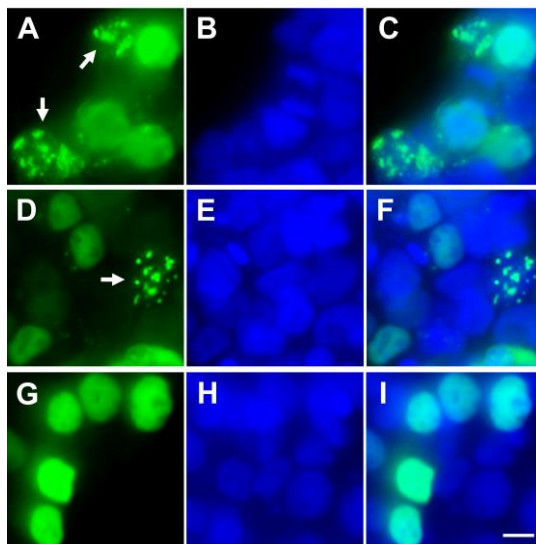


図 1. HEK293T 細胞を用いた全長型ヒト TDP-43 タンパク質凝集体形成の免疫組織学的解析. (A-C) TDP-43 および NICD、(D-F) TDP-43 および Dik1、(G-I) TDP-43 および pCAGGs vector のそれぞれの発現ベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し 48 時間後に TDP43 タンパク質の細胞内分布を免疫組織学的に解析した。緑色; 抗 TDP43 抗体による TDP43 染色像。青色; DAPI 染色。詳細本文参照。Scale bar; 10 μ m.

(3) プロテアソーム阻害条件下での NICD および Dlk1 による HEK293T 細胞における TDP-43 凝集体形成

ALS 剖検脳において TDP-43 凝集体は主に細胞質に存在する (Neurmann et al., 2006)。過去の研究から ALS においては RNA 結合タンパク質である TDP-43 が核から細胞質へ移行し、細胞質においてその他の RNA 結合タンパク質とストレス顆粒や P-body を形成し、さらには TDP-43 やその他の RNA 結合タンパク質のプリオン様ドメインを介して不可逆的に凝集体が形成され RNA 代謝異常が引き起こされることが、ALS 病態機序の一つと考えられている (Ramaswami et al., 2013, Salta & De Strooper 2017, Benarroch 2018)。この不可逆的な変化の過程において、細胞内タンパク分解系の一つであるユビキチン・プロテアソーム系の異常が関与することが示されている (Tashiro et al., 2012)。本研究のこれまでの結果において主に Notch シグナル促進により TDP-43 凝集体形成が促進されることが示されたが、これら TDP-43 タンパク質凝集体は主に核内に存在していた。また TDP-43 タンパク質凝集体を認めた細胞は、遺伝子導入された細胞全体の中の比較的少数の細胞のみ (TDP-43 遺伝子導入細胞のうち約 2-3 割) であった。そこで次に、果たしてユビキチン・プロテアソーム系酵素を阻害することにより、今回の実験系で認められる TDP-43 凝集体が核内ではなく細胞質へと分布し、より剖検脳において認められる細胞内分布のパターンに近いものにならないかどうか、またより数多くの細胞において TDP-43 凝集体形成を認めることにならないかどうかを明らかにすることを試みた。

この目的のため、TDP-43 と共に NICD (図 2A-C)、Dlk1 (図 2D-F)、コントロール (図 2G-I) のそれぞれ二者の組み合わせで遺伝子発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に MG132(最終濃度 0.5 μ M)/DMSO (ならびにコントロールとして、DMSO のみのもの) を添加しておいた増殖培地に置換し、最終的に遺伝子導入 48 時間後に TDP-43 タンパク質の細胞内分布を免疫組織学的に解析した(図 2)。過去からの報告に一致して MG132 存在下においては全長 TDP-43 タンパク質のみを発現させた場合には、TDP-43 タンパク質は細胞質にも分布するようになり、さらにはその一部の細胞質において比較的大きな凝集体を形成した (図 2G-I, 矢頭、図 1G-I と比較) (Scotter et al., 2013)。一方、NICD を発現させた場合には MG132 存在下においても TDP-43 凝集体は主に核内に分布し (図 2A-C, 矢印)、図 2G のように細胞質に凝集体形成を示すものは稀であった。これら核内に分布する TDP-43 凝集体を示す細胞の割合を MG132 非存在下の場合と比べたところ、有意に高い結果となった (59.5 \pm 12.4%; 平均値 \pm 標準偏差, n=302、

p<0.001 Mann-Whitney)。対照的に Dlk1 を発現させた場合には一部の細胞においては TDP-43 凝集体は核内に主に分布したが (図 2D 矢印)、一部は TDP-43 のみを発現させた場合 (図 2G 矢頭) と同様に主に細胞質に分布し比較的大きな凝集体を形成していた (図 2D 矢頭)。定量的な解析では、全体としては TDP-43 凝集体 (核内及び細胞質に分布する凝集体) を示す細胞の割合は MG132 非存在下のもの比べて MG132 存在下のものほうが有意に高い結果となった (31.1 \pm 18.0%; 平均値 \pm 標準偏差, n=149, p<0.05 Mann-Whitney)。また MG132 存在下においても MG132 非存在下と同様に、NICD により Dlk1 と比較してより強く TDP-43 凝集体形成が促進されることが示された (p<0.001 Mann-Whitney)。これらの結果は Notch シグナル促進によって、プロテアソーム阻害の環境下においては TDP-43 凝集体形成を示す細胞の割合が増加する一方、プロテアソーム阻害の有無に関わらずそれら凝集体は細胞質ではなく主に核内に分布することを示した。

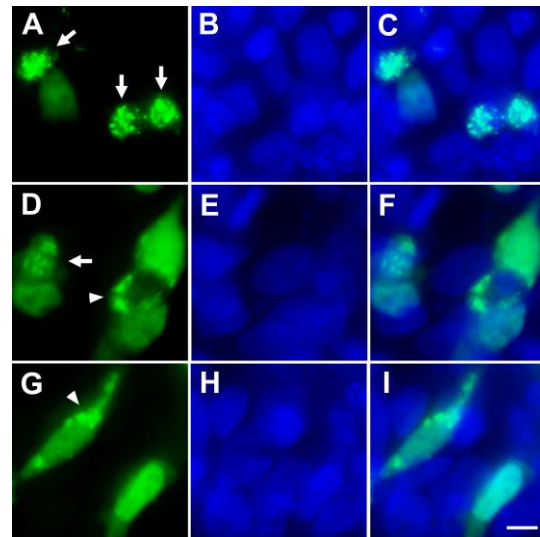


図 2. プロテアソーム阻害薬存在下での HEK293T 細胞を用いた全長型ヒト TDP-43 タンパク質凝集体形成の免疫組織学的解析。(A-C) TDP-43 および NICD、(D-F) TDP-43 および Dlk1、(G-I) TDP-43 および pCAGGs vector のそれぞれの発現ベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入し 24 時間後に MG132 (0.5 μ M)/DMSO を添加した。その後、遺伝子導入から 48 時間後に TDP-43 タンパク質の細胞内分布を免疫組織学的に解析した。緑色; 抗 TDP-43 抗体による TDP-43 染色像、青色; DAPI 染色。詳細本文参照。Scale bar; 10 μ m

(4) 考察

ALS をはじめとする様々な神経変性疾患においては、異常タンパク質の蓄積が神経病理学的にそれぞれの疾患に特徴的であるとされ、脳内での組織・細胞レベルでの特徴的な蓄積パターンや形態がそれぞれの疾患の病理診断に必須の所見とされてきた (Braak et al., 1991, 2006, Skovronsky et al., 2006)。個々の疾患において数多くの原因遺伝子が家族

性神経変性疾患での解析から明らかになると、それら原因遺伝子がコードするタンパク質がそれら異常タンパク質の本態であることが明らかにされ、異常タンパク質の蓄積がそれぞれの疾患における神経細胞死の指標となるだけではなく原因となりうることが示唆されてきた。また、異常タンパク質凝集体を構成するタンパク質そのものの解析からその構成遺伝子が同定された場合においても、当該神経変性疾患の家族性のもの一部および孤発性のものにおいてその遺伝子の変異が明らかにされたことから、それら疾患においても異常タンパク質凝集体がやはり発症の原因であることが示唆されてきた。

TDP-43 は、孤発性 ALS ならびに前頭側頭型認知症の剖検脳において認められる異常タンパク質凝集体を構成するタンパク質として同定された RNA 結合タンパク質である (Arai et al., 2006, Neumann et al., 2006)。TDP-43 は家族性 ALS の原因遺伝子でもあったこと、孤発性 ALS の一部においても TDP-43 遺伝子変異が同定されたこと (Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009)、孤発性 ALS の約 9 割の剖検脳において TDP-43 蓄積が同定されたことなどから、TDP-43 蓄積が ALS における神経細胞死の原因となりうることが示唆された。さらに実際にトランスジェニックマウスを用いた個体レベルでの動物実験における神経細胞死の十分性を問うた幾つかの実験からも神経細胞死を引き起こしうるということが示された。培養細胞を用いた TDP-43 タンパク質発現系においては、家族性 ALS で見られる遺伝子変異を持った変異 TDP-43 タンパク質の発現がより強く細胞質での凝集体形成を促すこと (Johnson et al., 2009)、また凝集体形成に伴い神経細胞死のみならず剖検脳において認められた TDP-43 断片化およびリン酸化が認められたこと、さらには TDP-43-C 末端断片と全長 TDP-43 を発現させた場合には細胞質での凝集体形成が素促進されたことから、TDP-43 断片化ならびにリン酸化に伴う細胞質での TDP-43 凝集体形成が ALS における神経細胞死の原因となるとする考えが支持されてきた。これらの解析から、TDP-43 が自ら内包するプリオン様ドメインを介してその他の RNA/タンパク質と病的凝集体を形成しストレス顆粒や P body へ異常蓄積することが ALS における神経細胞死につながると考えられている (Ramaswami et al., 2013)。しかしながら一方では、TDP-43 タンパク質が細胞質において凝集体を形成するにしても、それらはユビキチン化、異常リン酸化、断片化などの修飾を経たものであり、TDP-43 の断片化ならびに C 末端断片を含む細胞質凝集体形成のタイミングは神経細胞死開始のタイミングと比較して時間的に遅れていること、断片化のプロセスを阻害させた場合には TDP-43 異常タンパク質のクリアランスが阻害され逆に細胞死が促進されることが示され (Li et al., 2015)、細胞質における TDP-43

凝集体形成は ALS の病態機序のより後期の段階を見ている可能性、または病態発現を抑制しようとする TDP-43 に対する生体の別の代謝経路を見ている可能性 (Li et al., 2011) も残されている。

本研究においては、ALS において認められる運動ニューロン選択的な脆弱性の分子基盤を明らかにする目的で、運動ニューロンの中でも特に早期から ALS において神経細胞死が誘導される FF-MN に着目し、FF-MN としての細胞特異性そのものが ALS 脆弱性を付与しているのではないかと仮定した。生後発達期において FF-MN としての細胞特異性を付与する Dlk1 (Notch シグナル抑制因子) に着目し、果たして Dlk1 が ALS 脆弱性を与えるのかどうかを明らかにすることとした。ALS 脆弱性獲得の評価系としては過去の研究から ALS 脆弱性を与えるに十分であるとされている TDP-43 凝集体形成を対象として実験系を確立した。過去の研究からすでに確立されている実験系である HEK293T 細胞に対して全長 TDP-43 タンパク質を発現させ TDP-43 凝集体形成を免疫組織学的に解析した。Dlk1 の対照として NICD (Notch シグナル促進因子) を用意した。以下の結果を得た。

- ① TDP-43 凝集体形成は Notch シグナル促進ならびに抑制の両者によって誘導された。
- ② TDP-43 凝集体形成の効率を比較したところ Notch シグナル促進によるものほうが Notch シグナル抑制のものより有意に高かった。
- ③ Notch シグナル促進または抑制によってもたらされる TDP-43 凝集体は主に核内に分布していた。
- ④ 従来 ALS 剖検脳においては細胞質での TDP-43 凝集体形成が報告されていたため、果たして今回認めた核内 TDP-43 凝集体形成がどのような意義をもつのか、細胞質 TDP-43 凝集体形成の前段階として存在するのかどうか、TDP-43 凝集体形成に促進作用があるプロテアソーム阻害剤を加えて果たして核内から細胞質への細胞内分布の変化などを認めるのかどうかを解析したが核内にとどまったままであった。
- ⑤ プロテアソーム阻害剤存在下においてもプロテアソーム非存在下と同様に、TDP-43 凝集体形成の効率は Notch シグナル促進によるものほうが Notch シグナル抑制のものより有意に高かった。Notch シグナル促進においては全体の約 6 割の細胞において核内凝集体を認めた。

以上の結果からは、Notch シグナル促進及び抑制のバランスにより TDP-43 タンパク質の恒常性が維持されること、さらにはその破綻により核内での TDP-43 凝集体形成が促進されることが示唆された。Notch シグナルと Dlk1 のバランスが生体内の反応系において重要であるといった原理は脂肪細胞の分化系においても示されている (Falix et al., 2012)。

今後、さらに本研究で示された核内 TDP-43 凝集体形成の場においてもどのような Notch および Dik1 の下流の因子が関与しているのか詳細な解析が待たれる。本研究ではさらに、両者のバランスのうち Notch シグナル促進によりその破綻がもたされやすく、核内での TDP-43 凝集体形成に結びつくことが示唆された。運動ニューロンの中でも最も脆弱な FF-MN は生後発達期において Dik1 を介した Notch 抑制によりその特異性を獲得することから、Notch 抑制こそが ALS 脆弱性を賦与すると当初考えた。本研究において、むしろ Notch 促進が TDP-43 凝集体形成を促進するといった当初の考えとは逆の結果を得ることとなったが、成体においては既に Notch 活性を抑制する Dik1 の発現は消失していること、Notch は mTOR シグナルを介して細胞体の大きさ調節に関与しうること(Chan et al., 2007)を考え合わせると、中枢神経系の中でも比較的大きな細胞体を有する FF-MN では成体においては Notch シグナルはむしろ亢進しており、Notch 促進により成体 FF-MN としての細胞特異性を獲得していると同時に ALS 脆弱性を潜在的に獲得している可能性はまだ残ると考えられ、今後、個々の神経細胞がもつ細胞特異性が個々の神経変性疾患における脆弱性を賦与するといった考えをさらに検証する将来的な解析が待たれる。

本研究において示された核内 TDP-43 凝集体形成が ALS 発症メカニズムの中でどのような意義をもつのかは不明である。上述のとおり、今回の実験では核内 TDP-43 凝集体形成を細胞質 TDP-43 凝集体形成の前段階として位置づける根拠は得られなかった。さらに厳密には、核内 TDP-43 凝集体形成は培養細胞において(のみ)示される TDP-43 タンパク質の代謝調節過程の一つであり、ALS 病態機序の中において位置づけることは困難であるといった可能性も残る。過去の ALS および FTLD 剖検脳においては通常は核内に存在する TDP-43 タンパク質が細胞質へと移行し細胞質内において凝集体を作ることが TDP-43 プロテインパチーの病態機序を担うと解釈されてきた(Neumann et al., 2006)。しかしながら ALS/FTLD 剖検脳の最初の TDP-43 凝集体形成の報告においても、従来から強調されてきた細胞質内での凝集体形成のみならず、核内での TDP-43 凝集体が lentiform または round の形態を持った TDP-43 陽性核内封入体として記述されている (Neumann et al., 2006)。さらには VCP 遺伝子変異を持つ FTLU-U においては細胞質での TDP-43 凝集体形成はむしろ稀であり、核内でのものが大多数を占めることが示されている(Neumann et al., 2007)。この文脈において、過去の培養細胞を用いた実験として、核移行シグナルを強制的に不活化または欠失させた核外移行型 TDP-43 変異体は主に細胞質に分布するとともに神経細胞死はそれほど強く引き起こさない事、また逆に強制的に核移行シグナル

を挿入した核移行型 TDP-43 は神経細胞死を野生型 TDP-43 と同様に引き起こす事が報告されており (Suzuki et al., 2015) 興味深い。これは即ち ALS 剖検脳において認められてきた細胞質 TDP-43 凝集体形成はむしろ ALS 病態機序の中では一つの結果であり、神経細胞死はまずは核内において誘導される可能性が浮かびあがってくる。さらには、本研究において示された核内 TDP-43 凝集体形成は ALS 病態機序のもっとも最初期過程を見ている可能性が浮かび上がってくる。この観点からは、核内 TDP-43 凝集体形成を引き起こす Notch シグナルは ALS 脆弱性を与え神経細胞死の誘導を開始させる因子として位置づけられることとなるのではないか。もちろん、これらは培養細胞での解析であり、今後は核内 TDP-43 凝集体が細胞質 TDP-43 凝集体形成の前段階であるのか、または両者は TDP-43 の異なる二つの代謝経路であるのか、また核内 TDP-43 凝集体形成がいかに普遍的なものであるのかどうかといった観点からの解析が待たれる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

田辺 康人 (TANABE, Yasuto)

京都大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号: 10311309

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者