

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09753

研究課題名（和文）神経特異的polysome解析によるALS/FTLD病態解明と分子標的療法の開発

研究課題名（英文）Discovery of novel target and disease modifying therapy for ALS/FTLD using neuro-specific transcriptome analysis

研究代表者

井口 洋平（IGUCHI, YOHEI）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80790659

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ALSとFTLDは神経細胞が選択的に変性する原因不明の神経変性疾患である。TDP-43やTBK1はALS/FTLDの神経細胞において、その機能喪失が神経細胞死に関連していると考えられている分子であるがその変性メカニズムはよくわかっていない。研究代表者らは新たに神経細胞特異的synapsinプロモーター下にGFPという特別に標識したリボソーム蛋白“GFP-RPL10a(GRP)”とCreを共発現するSyn-GRP-Creマウスを作成し、このマウスを用いてTDP-43やTBK1の機能喪失が生体内神経細胞の変性をおこす病態を神経細胞特異的な網羅的遺伝子解析により解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSとFTLDは上位・下位運動ニューロンや前頭側頭葉皮質のニューロンが選択的に変性する原因不明の神経変性疾患である。これらの疾患における神経変性病態を解明するにはニューロン特異的な解析が必須であるが、モデル動物において変性過程にあるニューロンの単離は非常に困難である。この問題を解決するために、Syn-Ribotag-Creマウスを作成した。このマウスと各floxマウスを交配することで特定の遺伝子をノックアウトしたニューロン特異的な遺伝子発現解析が可能となった。今後多くの神経変性疾患の病態解明に利用することができるため研究を進展させていきたい。

研究成果の概要（英文）：ALS and FTLD are progressive neurodegenerative diseases and the causes are unknown. The genetic and neuropathological studies suggest that loss of functions of TDP-43 or TBK1 are related to the neurodegeneration. We established a novel transgenic mouse, in which GFP-tagged ribosomal protein (RPL10a) and Cre are expressed under synapsin promoter. This mouse allows us to perform neuron-specific polysome (mRNA-ribosome complex) in the conditional TDP-43/TBK1 knockout mice. We validated the expression profile of GFP-RPL10a of the transgenic mouse and analyzed the neuron-specific transcriptome data of the conditional knockout mice.

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS FTLD TDP-43 TBK1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

孤発性 ALS は成人発症で上位と下位運動ニューロンの選択的変性により進行性の運動機能障害をきたす神経変性疾患である。特別な環境的要因、遺伝的背景を持たない健康な成人の運動ニューロンが突如として変性していく様はまさに“奇異”であり、近年の科学技術の進歩にも拘らず、今なお原因は不明のままである。しかし、2006年に TDP-43 が孤発性 ALS とユビキチン封入体をともなう前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) 患者の変性部位におけるユビキチン化細胞質内封入体 (NCI) の主要構成蛋白質として同定されて以降病態解明が進んできている。TDP-43 は RNA 結合蛋白質で mRNA の代謝、安定化や alternative splicing に重要な役割を果たしていること、NCI を認める細胞内では核蛋白質である TDP-43 の核内染色性が著しく低下していることから ALS/FTLD の病態として TDP-43 の loss-of-function (LOF) が想定されている (図 1)。我々は世界に先駆けて TDP-43 が神経系細胞の恒常性維持に必要不可欠であることを報告した (Iguchi et al., J Biol Chem 2009)。次に Cre/Loxp システムにより運動ニューロン特異的 TDP-43 ノックアウト (TDP CKO) マウスを作成した。TDP CKO マウスは約 50 週齢までは無症状だが、その後年齢依存性に運動機能障害を来し、病理学的にも進行性の筋萎縮や脱神経所見、運動ニューロン内のリン酸化ニューロフィラメントやオートファゴソムの蓄積など ALS 患者に見られる特徴を有していた (Iguchi et al., Brain 2013, 図 2)。また、このマウスでは明確な運動機能障害を呈する 100 週齢においても運動ニューロン死は観察されなかった。この研究により TDP-43 の機能喪失は一次的に運動ニューロン変性を引き起こす、しかし機能的 TDP-43 を失ったニューロンは一定期間機能を維持し、その後軸索終末から変性して行くことが判明した。この結果は ALS 患者の剖検組織像において多くのニューロンが核内 TDP-43 を喪失してもなお残存していることや、ALS の初期病態は “distal axonopathy” と想定されている (Fisher et al., Exp Neurol 2004) ことと一致している。そこで、我々は機能的 TDP-43 を失った後のニューロンの変性病態を解明することにより、ALS/FTLD 発症後の残存ニューロンの変性阻止治療に結びつきたいと考えた。

2. 研究の目的

近年 OPTN, VCP, SQSTM1/p62, UBQN2, TBK1 などユビキチンプロテアソーム系やオートファジーによる蛋白分解系に関わる分子が新規家族性 ALS/FTLD の原因遺伝子として相次いで報告されている。中でも TBK1 は OPTN や SQSTM1/p62 のリン酸化を介して選択的オートファジー分解を促進することが報告されており (Matsumoto et al., HMG 2015; Richter et al., PNAS 2016) 分解系の上流に位置づけられている分子である。さらに TBK1 の LOF 変異を有する家系は ALS/FTLD (FTDALS4) を発症し、変性ニューロンには孤発性 ALS/FTLD に特徴的に見られる TDP-43 陽性の NCI が認められるため、TBK1 の LOF が孤発性 ALS/FTLD 発症病態に類似した病態を引き起こしていることが想定される。全身性 TBK1 ノックアウトマウスは胎生致死であるため、ニューロン特異的 TBK1 ノックアウトマウスの解析を通じて ALS/FTLD 発症のメカニズムの解明が期待される。以上を踏まえて、我々はニューロン特異的に GFPtag で標識した Ribosomal protein L10a (GRP) を発現させたマウスからリボソーム/mRNA 複合体を精製する技術を使って、生体内の TDP-43/TBK1 ノックアウトニューロン特異的な transcriptome 解析を行い、ALS/FTLD 病態の解明、さらに病態に基づいた分子標的治療につなげたいと考え本研究を提案した。

3. 研究の方法

ニューロン特異的 synapsin プロモーター下に GFP で標識した Ribosomal protein (GRP) と Cre を共発現するコンストラクト、Syn-GRP-Cre を作成した。このプラスミドを NSC34 細胞に Cre レポータープラスミド (Cre 依存性に DsRed が発現する) とともに発現させると、GFP 陽性の細胞に DsRed が発現しているため GFP-RPL10a と Cre が共発現していることが確認された (図 3)。このコンストラクトを用いて C57BL/6J 胚へのマイクロインジェクションを行い、トランスジェニックマウスを得た。このマウスの病理学的解析を行い、GFP 染色にて GRP (GFP-RPL10a) の脳脊髄内ニューロン特異的な発現と、Cre レポーターマウス ROSA27 との交配により Cre タンパクの発現パターンを解析した。さらに神経細胞特異的 TDP-43/TBK1 ノックアウトマウスを作成するため、Syn-GRP-Cre マウスと TDP-43 flox マウス/TBK1 flox マウスの交配を行った。交配により得られる予定の Syn-GRP-Cre^{+/+}, TDP-43 flox/flox マウス内のニューロンでは Cre が発現するため TDP-43 がノックアウトされ、さらに GRP も同時に発現するため TDP-43 ノックアウトニューロンの mRNA を容易に精製することができる。ニューロン特異的リボソーム/mRNA 複合体を抽出するためにマウス大脳と脊髄ホモジェネートから抗 GFP 抗体 beads を用いた免疫沈降法を用いた。精製された RNA を使用して Affymetrix 社 GeneChip Mouse Exon 1.0 ST exon array を用いて transcriptome 解析を行った。

4. 研究成果

8 週齢の Syn-GRP-Cre マウスを解剖し免疫染色を行い GRP の発現パターンを確認した。全脳、脊髄の広範なニューロンに GRP の発現が確認された。ニューロン特異的なマーカーである NeuN との蛍光二重染色では GFP と NeuN の共存がみられ GRP はニューロン特異的な発現であることが判明した (図 4)。また、Syn-GRP-Cre マウスを Cre レポーターマウス ROSA27 と交配し、Syn-GRP-Cre,

ROSA27 マウスの X-gal 染色を行い Cre タンパクの発現を確認すると GFP 染色よりも高頻度に脳、脊髄ニューロンにおける Cre タンパクの発現が確認できた (図4)。GFP 染色と X-gal 染色の違いは X-gal 染色の感度が免疫染色に比べ高いことが原因と考えられた。

次に野生型と Syn-GRP-Cre マウス脊髄のホモジェネートからリボソーム/mRNA 複合体を抽出、RNA を精製し RT-qPCR を行った。グリア細胞のマーカーとして GFAP をニューロンマーカーとして MAP2 を増幅したところ、Syn-GRP-Cre マウスにおいて MAP2 特異的に反応がみられた (図5)。この結果により簡便な免疫沈降法により、脳脊髄ホモジェネートからニューロン特異的 mRNA が抽出できることが確認できた。

次に Syn-GRP-Cre マウスと TDP-43 flox マウスを交配しニューロン特異的 TDP-43 ノックアウトマウスの作成を試みたが Syn-GRP-Cre+/-; TDP-43 flox/flox マウスは周産期致死となることが判明した。このため Syn-GRP-Cre+/-; TDP-43 flox/flox 胎児脳からリボソーム/mRNA 複合体を抽出し transcriptome 解析を行った。Syn-GRP-Cre+/-; TDP-43+/+胎児脳をコントロールとした。現在そのデータ解析を行っており論文投稿を予定している。

また、TBK1 flox マウスとの交配も行い Syn-GRP-Cre+/-; TBK1 flox/flox マウスを得た。現在 24 週齢まで観察しているが運動機能、高次脳機能に異常を認めていない。さらに野生型 hTDP-43 トランスジェニックマウスを掛け合わせ hTDP-43+/-; Syn-GRP-Cre+/-; TBK1 flox/flox を作成し解析を行う予定である。

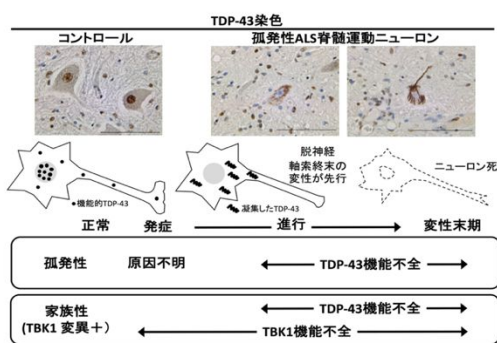


図1. ALSにおけるTDP-43の病理学的変化とニューロン変性

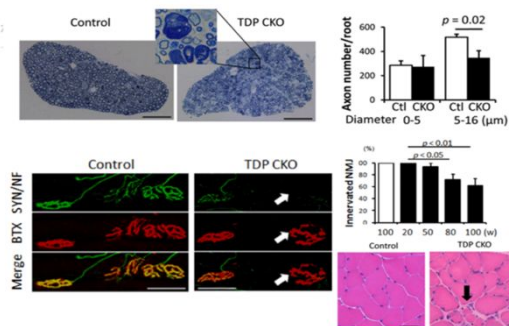


図2. 運動ニューロン特異的TDP-43ノックアウトマウスは50週以降に進行性の運動ニューロン変性を呈する

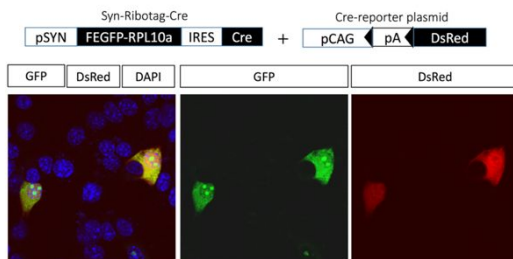


図3. NSC34細胞にCreレポータープラスミドとSyn-Ribotag-Creプラスミドをトランスフェクションし、FEGFP-RPL10aとCreの発現を確認した

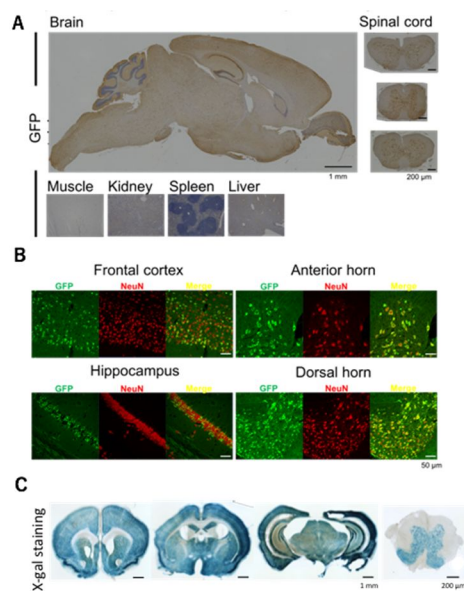


図4. GRP (GFP-RPL10a)とCreの発現パターン
A. Syn-GRP-Creマウス GFP染色 (脳、脊髄、一般臓器)
B. Syn-GRP-Creマウス GFP, NeuN蛍光二重染色
C. Syn-GRP-Cre, ROSA27マウス X-gal染色

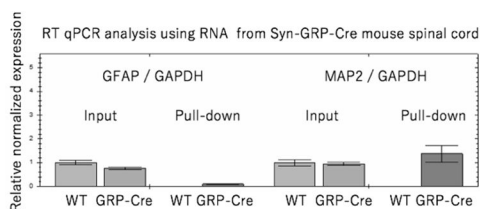


図5. GFP beads免疫沈降により精製したRNAサンプルを使用したRT-qPCR Pull-down後のRNAサンプルではSyn-GRP-Creマウスにおいて、ニューロンマーカーであるMAP2が特異的に増幅され、グリア細胞のマーカーであるGFAPは増幅されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katsuno M, Sahashi K, Iguchi Y, Hashizume A	4. 巻 80
2. 論文標題 Preclinical progression of neurodegenerative diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci	6. 最初と最後の頁 289-298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shinsuke, Fujioka Yusuke, Okada Yohei, Riku Yuichi, Udagawa Tsuyoshi, Honda Daiyu, Yokoi Satoshi, Endo Kuniyuki, Ikenaka Kensuke, Iguchi Yohei, Sahara Naruhiko, Takashima Akihiko, Okano Hideyuki, Yoshida Mari, Warita Hitoshi, Aoki Masashi, Watanabe Hirohisa, Okado Haruo, Katsuno Masahisa, Sobue Gen	4. 巻 18
2. 論文標題 Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTLD-like Phenotypes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Report	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Araki Kunihiko, Araki Amane, Honda Daiyu, Izumoto Takako, Hashizume Atsushi, Hijikata Yasuhiro, Yamada Shinichiro, Iguchi Yohei, Hara Akitoshi, Ikumi Kazuhiro, Enomoto Atsushi, Yoshida Mari, Arima Hiroshi, Muramatsu Shin-ichi, Sobue Gen, Katsuno Masahisa	4. 巻 129
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 Journal of Clinical Investigation	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 Daisuke Ito, Atsushi Hashizume, Yasuhiro Hijikata, Shinichiro Yamada, Yohei Iguchi, Madoka Iida, Yoshiyuki Kishimoto, Hideyuki Moriyoshi, Akihiro Hirakawa, Masahisa Katsuno	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 Journal of Neurology	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 Ikenaka Kensuke, Ishigaki Shinsuke, Iguchi Yohei, Kawai Kaori, Fujioka Yusuke, Yokoi Satoshi, Abdelhamid Rehab F, Nagano Seiichi, Mochizuki Hideki, Katsuno Masahisa, Sobue Gen	4. 巻 79
2. 論文標題 Characteristic Features of FUS Inclusions in Spinal Motor Neurons of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 370 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa003	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yohei Iguchi
2. 発表標題 Exosome pathway: a key for clearance of pathological TDP-43
3. 学会等名 第59回日本神経学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井口 洋平, 熱田 直樹, 勝野 雅央
2. 発表標題 Hereditary leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement
3. 学会等名 第59回日本神経学会総会
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（国際学会）
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 井口洋平、高橋裕平、李佳益、荒木邦彦、井汲一尋、勝野雅央
2. 発表標題 TDP-43凝集におけるエンドソームの関わり
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会 第60回日本神経学会学術大会 2. 発表標題 2.（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Ito, Atsushi Hashizume, Yasuhiro Hijikata, Shinichiro Yamada, Yoshiyuki Kishimoto, Hideyuki Moriyoshi, Yohei Iguchi, Madoka Iida, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Elevation of serum creatine kinase before the disease onset of amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuhei Takahshi, Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Role of end-some in the formation of TDP-43 cytoplasmic aggregation
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koyo Tsujikawa, Kohei Hamanaka, Mari Yoshida, Kentaro Sahashi, Satoko Miyatake, Satomi Mihashi, Yohei Iguchi, Yuichi Riku, Shinsuke Ishigaki, Gen Sobue, Naomichi Matsumoto, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Filamin-A as a novel driver for progressive supra nuclear palsy
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019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	勝野 雅央 (Katsuno Masahisa) (50402566)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (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)	