

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07845

研究課題名(和文) 孤発性ALS病態形成におけるDEAD box RNA helicaseの役割解明

研究課題名(英文) DEAD box RNA helicases are involved in sporadic ALS pathology

研究代表者

多田 美紀子(TADA, Mikiko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30722467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：RNAプロセッシングに関わるDDX5/17がALS病態に関与していると仮説し研究を行った。ALS剖検組織を用いた免疫染色でDDX5はALS例の22%で脊髄前角細胞に細胞質内封入体がみられTDP-43との共局在を確認した。DDX17はALS全例で細胞質に顆粒状構造物を豊富に認め、小胞体マーカーであるGRP78と共局在した。変異型TDP-43を過剰発現した細胞では細胞質でTDP-43とDDX5の共局在が見られたがDDX17に変化はなかった。ERストレスを加えると細胞質内にDDX17陽性の顆粒状構造物が認められた。以上の結果はDDX5/17がそれぞれALS病態に関連していることを示唆するものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA転写後調節に関わるDDX5/17がALS病態に関与していると仮説し研究を行った。ALS剖検組織を用いた免疫染色でDDX5は一部のALS症例で脊髄前角細胞に細胞質内封入体がみられTDP-43との共局在を確認した。DDX17はALS全例で細胞質に顆粒状構造物を豊富に認め、小胞体マーカーであるGRP78と共局在した。培養細胞を用いた実験ではヒト組織病理に一致する所見を呈した。以上の結果はDDX5/17がALS病態に関連していることを示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：DEAD box RNA helicases are known to be involved in multiple aspects of RNA processing. We hypothesized that DDX5 and its paralogue DDX17 are implicated in pathomechanism of ALS. We evaluated the involvement of DDX5 and DDX17 in sporadic ALS tissues and in cultured cells. The motor neurons of SALS showed DDX5-immunoreactive (ir) neurocytoplasmic inclusions (NCIs) in 22% of cases. DDX5-ir NCIs were coincident with round inclusion of TDP-43. Overexpressed mutant TDP-43 were also co-localized with DDX5 in cytoplasm of Neuro2a cells. The SALS motor neurons showed DDX17-ir small granules in the cytoplasm. These granules were found to be co-localized with endoplasmic reticulum markers. Overexpression of mutant TDP-43 did not change cellular distribution of DDX17 in Neuro2A cells. Our results suggest that the RNA helicase DDX5 and DDX17 are differentially but significantly implicated in SALS pathology.

研究分野：神経病理

キーワード：ALS TDP-43 DEAD box protein

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭型認知症 (FTLD) 患者において、これまで TDP-43、FUS/TLS、VCP、ubiquilin2、optineurin、C9ORF72、matrin3、TUBA4A、TBK1などをコードする遺伝子の変異が次々と判明してきた。これらのうち、ユビキチン結合タンパク質である ubiquilin2 や RNA 結合タンパク質である FUS/TLS、EWS、TAF15、matrin3 は、ポリグルタミン病の核内凝集タンパク質 (PAIP) として同定していたものである<sup>1)</sup>。すなわち PAIP と、ALS/FTLD の責任遺伝子がコードする封入体構成タンパク質には複数の共通するものが存在し、それらは両疾患群の病態形成にとって極めて重要な共通機能分子であることが明らかとなってきた。そこで我々は、未発表 PAIP のうち転写から翻訳まで遺伝子発現過程のほとんどのステップに関与するとされている DDX5/DDX17<sup>2)</sup>をはじめとする DEAD-box RNA helicases に着目し、孤発性 ALS の病態への関与を明らかにしたいと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では DDX17 のパラログである DDX5 を解析対象とし、ALS 研究の新展開を目指す。DDX5 と DDX17 は機能的にオーバーラップしており構造的にも相同性を認めるが、細胞内での役割には異なる部分があるとされている<sup>3)</sup>。本研究は、DDX5、DDX17 が、ALS/FTLD の病態にどのように関わっているのかについて、病理学的側面、分子細胞生物学的側面から明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では申請者らが収集している多数例 (30 例) の孤発性 ALS 連続剖検例において、DDX5/DDX17 蛋白の凝集の局在、特徴、重要性を明らかにする。また培養細胞 (Neuro2a 細胞、NSC34、HEK293T 細胞) を用いて、ALS 疾患病因タンパク質である TDP-43 の野生型・変異型の過剰発現、DDX5/DDX17 の過剰発現を行い、DDX5/DDX17 の細胞内分布、小胞体蓄積に与える影響を蛍光顕微鏡で観察・定量し、孤発性 ALS ヒト組織で見られる DDX5/DDX17 の病的分布が再現可能かを検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) DDX5

孤発性 ALS30 症例 (病理学的に TDP-43 病理を確認している)、コントロール症例 14 例 (病理学的に ALS の所見はないこと、TDP-43 陽性所見が見られないことを確認している) の腰髄のパラフィン包埋切片を、抗 DDX5 抗体を用いて免疫染色を行った。コントロール症例の脊髄前角細胞では、細胞質にびまん性の染色性を示し、核の染色の程度は細胞によって多様であった。一方、孤発性 ALS 症例では 22% (30 例中 7 例) で細胞質に類円形の封入体をみとめた。この DDX5 陽性細胞質内封入体は、TDP-43 と共局在していることを確認した。(図 1)

さらに変異型 TDP-43 をトランスフェクトした Neuro2a 細胞での実験では、野生型では見られなかった、DDX5 陽性の細胞質内封入体が TDP-43 と共に細胞質に観察された。(図 2) また、DDX5 を過剰発現させた HEK293T 細胞では、DDX5 は核から細胞質に局在変化し、その動態は TDP-43 と一致していた。(図 3)

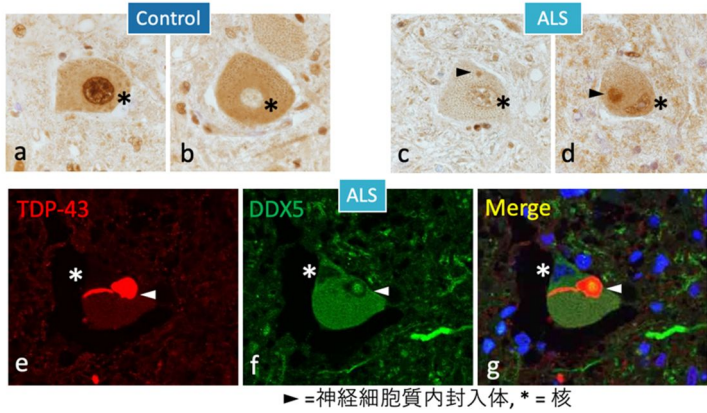


図 1. 脊髄前角細胞における DDX5 の局在  
 a, b コントロール症例では DDX5 は細胞質にびまん性に染色される。  
 c, d 孤発性 ALS 症例では、細胞質に類円型の封入体を認める細胞がみられた。  
 e-f DDX5 陽性の細胞質内封入体は TDP-43 との共局在がみられる

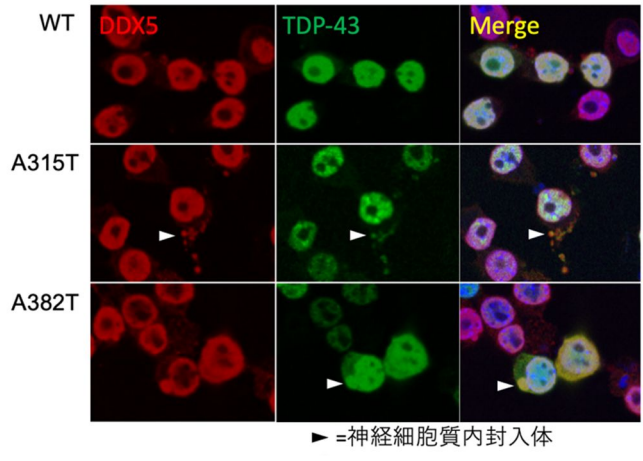


図 2. 野生型 / 変異型 TDP-43 過剰発現による DDX5 の細胞内動態変化  
 野生型では細胞質に封入体は見られなかったが、変異型 TDP-43 をトランスフェクトした細胞では細胞質に TDP-43 と共に DDX5 の封入体を認める。

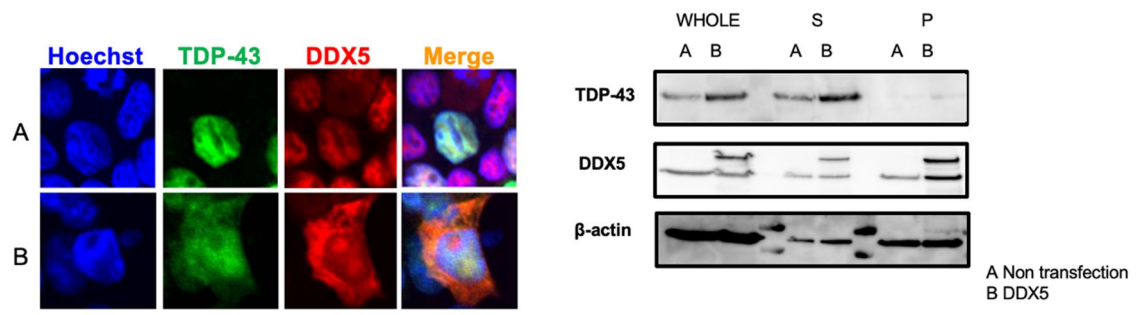


図 3. DDX5 過剰発現による細胞内動態の変化  
 HEK293T 細胞で DDX5 を過剰発現させると、DDX5 は TDP-43 と一致して核内から細胞質へ局在変化を示した

(2) DDX17

孤発性 ALS 22 例、コントロール症例 14 例の腰髄パラフィン包埋切片を抗 DDX17 抗体で免疫組織化学的検討を行った。コントロール症例では、細胞質にびまん性に染色され、核には染色性は確認されなかった。孤発性 ALS 症例では、全例で一部の前角細胞の細胞質に DDX17 陽性の微細顆粒状の構造物を多数認めた。核には染色性が見られなかった。DDX17 陽性の細胞質内微細顆粒状構造物は、形態的に小胞体と類似しており、小胞体マーカーである抗 GRP78 抗体、抗 PDI 抗体と二重染色を行ったところ、共局在が認められ、DDX17 が孤発性 ALS では小胞体に蓄積している可能性が示唆された。TDP-43 との共局在は見られなかった。(図 4)

培養細胞実験では、TARDBP の野生型および変異型を過剰発現させた HEK293T 細胞で DDX17 の細胞内局在の変化を確認した。TDP-43 は野生型 TARDBP の過剰発現で細胞質に凝集体形成を認めたが、野生型、変異型いずれも DDX17 の細胞内局在に変化は見られなかった。一方、Tunicamycin を加えて小胞体ストレスをかけると、DDX17 は細胞質に顆粒状構造物を形成し、小

胞体マーカーである CHOP、PDI と共局在を示した。(図 5) なお、NSC34 細胞で DDX17 を過剰発現させたが、TDP-43 の細胞内動態に変化は見られなかった。

DDX5 および DDX17 は孤発性 ALS のヒト組織で特徴的な細胞質内凝集を呈することが判明し、培養細胞実験においても、同様の変化を確認することができた。以上の結果は、RNA ヘリカーゼである DDX5 および DDX17 が孤発性 ALS の病態メカニズムにそれぞれの側面で関与している可能性を示唆していると考えられる。

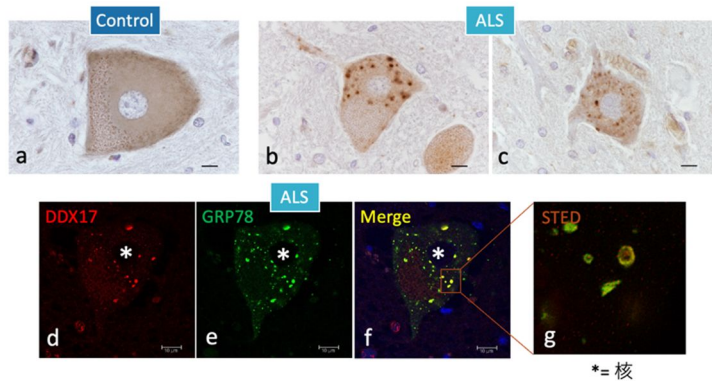


図 4. 脊髄前角細胞における DDX17 の局在

- a. コントロール症例では核に染色性はなく、細胞質にびまん性に染色される。
- b, c 孤発性 ALS 症例では、細胞質に微細顆粒状の染色性が見られる
- d-g DDX17 陽性の微細顆粒状構造物は小胞体マーカー (GRP78) と共局在を認める

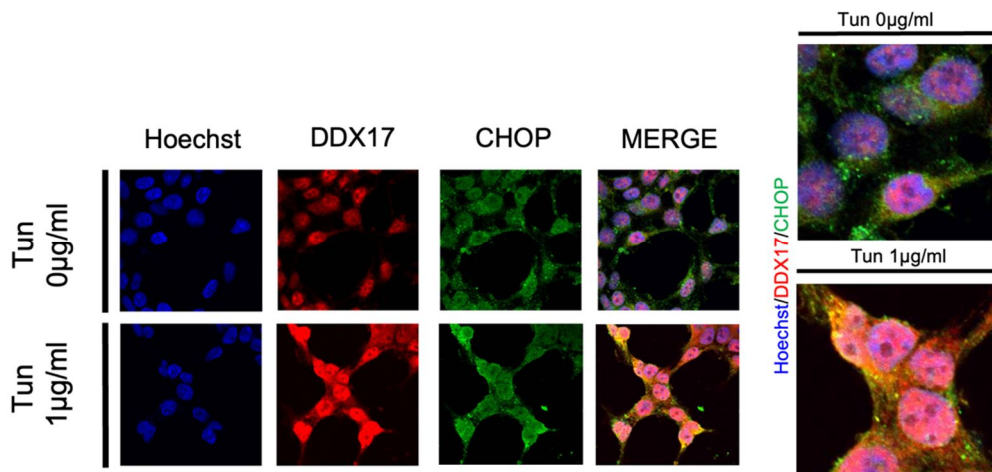


図 5. 培養細胞における DDX17 の局在変化

Tunicamycin 投与下では、DDX17 陽性の微細顆粒状構造物が細胞質に出現し、小胞体マーカーである CHOP との共局在を確認した

#### 引用文献

1. Doi H, et al., RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *J Biol Chem.* 2008 Mar 7;283(10):6489-500.
2. Linder P, et al., From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Jul 22;12(8):505-16.
3. Fuller-Pace FV., The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): multi-tasking transcriptional regulators. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Aug;1829(8):756-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mikiko Tada, Hiroshi Doi, Shingo Ikeda, Shunta Hashiguchi, Keita Takahashi, Misako Kunii, Kenichi Tanaka, Shigeru Koyano, Hideyuki Takeuchi, Fumiaki Tanaka
2. 発表標題 RNA helicases DDX5 and DDX17 are involved in sporadic ALS pathology.
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of Japanese Society of Neurology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikiko Tada, Hiroshi Doi, Shingo Ikeda, Shunta Hashiguchi, Atsuko Katsumoto, Misako Kunii, Keita Takahashi, Koyano Shigeru, Hideyuki Takeuchi, Fumiaki Tanaka
2. 発表標題 DDX5 accumulates in neuronal cytoplasmic inclusions with TDP-43 in SALS.
3. 学会等名 61st Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Okayama, 2020,5.
4. 発表年 2020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	土井 宏  (Doi Hiroshi)  (10326035)	横浜市立大学・医学部・准教授   (22701)	
研究分担者	竹内 英之  (Takeuchi Hideyuki)  (30362213)	横浜市立大学・医学部・准教授   (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	田中 章景  (Tanaka Fumiaki)  (30378012)	横浜市立大学・医学研究科・教授     (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関