

令和 6 年 5 月 3 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06583

研究課題名（和文）TDP-43発現亢進を標的とした筋萎縮性側索硬化症の新たな治療戦略の構築

研究課題名（英文）Development of a new therapeutic strategy targeting increased expression of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

鈴木 宏昌（Suzuki, Hiroaki）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10424178

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症Amyotrophic lateral sclerosis(ALS)は、運動神経細胞のみが選択的に変性・脱落する神経変性疾患である。研究代表者は、これまでALS患者の運動神経細胞を含む脊髄などにおいて、Transactive response DNA-binding protein-43 kDa(TDP-43)の発現が上昇していることに着目し、TDP-43発現上昇が神経細胞に与える影響を検討してきた。本研究では、TDP-43により通常核内に局在するRNA結合タンパク質が細胞質に異所局在することを見出し、さらにそのメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSを含む運動神経変性疾患の発症機序は十分解明されておらず、また根本的治療法は未だ確立されていない。ALSの患者数は比較的少数ではあるが、病気をもたらす悲惨さやマイナス面が広く社会的に認知されており、ALSに対する有効な治療法発見をもたらす高齢化社会への影響は大きく、その意義は測りしれないものがある。本研究の成果を基に、将来より有効な薬物が臨床的に実用化され、神経科学領域での学問的な発展に寄与するのみならず、多くのALS患者を救うことで、高齢化社会を迎えた我が国の医療進歩に貢献することと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable motor neurodegenerative disease caused by the death of both upper and lower motor neurons. We have focused on findings that in ALS patients, the expression of Transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) is up-regulated in the spinal cord containing motor neurons. Previous study has investigated the impact of increased TDP-43 expression on neuronal cells. In this study, we found that TDP-43 causes RNA-binding proteins, which are normally localized in the nucleus, to be mislocalized to the cytoplasm. Furthermore, we elucidated the mechanism underlying mislocalization of RNA-binding proteins.

研究分野：神経科学

キーワード：神経変性疾患 筋萎縮性側索硬化症 TDP-43

## 1. 研究開始当初の背景

TAR DNA-binding protein-43 kDa (TDP-43)は、ほとんどの ALS に出現する細胞内ユビキチン陽性封入体の主要構成成分として同定された。さらに、孤発性・家族性の両 ALS 患者家系において、TDP-43 遺伝子 (*TARDBP*) に変異が認められていることから、TDP-43 が ALS の発症や進行に密接に関与していることが示唆されている。TDP-43 は主に核内に局在する DNA/RNA 結合タンパク質であり、RNA スプライシング・転写・RNA 輸送など様々な RNA 代謝に関与することが明らかになりつつあるが、具体的な生理機能や TDP-43 を主要構成成分とするユビキチン陽性封入体の病態的意義、さらに *TARDBP* 変異による神経変性メカニズムは十分に明らかになっていない。

一方、TDP-43 が ALS の原因因子の一つとして同定された後、注目すべき ALS 病態所見として、運動神経細胞を含む脊髄などで、*TARDBP* 変異の有無に関わらず、ALS 患者では TDP-43 の発現が亢進していることが複数報告された。我々もまた TDP-43 の発現上昇が運動神経細胞死を誘導することを細胞レベルで見出し、他のグループからも、TDP-43 transgenic 動物が ALS 様症状を示すことが報告されている。このため、TDP-43 の発現亢進が ALS 発症の引き金になる可能性が考えられるが、ALS における TDP-43 の発現亢進による神経毒性メカニズムの詳細は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

今回我々は、通常核内に局在する RNA 結合タンパク質が、TDP-43 の発現上昇により細胞質に異所局在することを見出し、TDP-43 による RNA 結合タンパク質の核内における機能喪失あるいは細胞質における毒性機能獲得が TDP-43 の発現上昇による神経細胞死誘導に寄与する可能性を見出した。本研究では、そのメカニズムの詳細を明らかにし、TDP-43 が関連する ALS 発症メカニズムの更なる理解と新規創薬標的の同定に基づく根本的治療薬を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

TDP-43 により RNA 結合タンパク質の発現が核あるいは細胞質においてどのように変動するかを検討するため、HeLa 細胞に組換えアデノウイルスベクターを用いて TDP-43 を高発現させ、48 時間後細胞を回収し、核画分及び細胞質画分に分画後、ウェスタンブロッティングにより各 RNA 結合タンパク質を検出した。さらに、TDP-43 により発現が変動する分子をタンパク質レベルで網羅的に同定するため、TDP-43 を発現させた細胞を同様に分画後、全てのタンパク質を定量的に同定可能な定量的プロテオーム解析を行った。

## 4. 研究成果

以下のことが明らかになった。

### (1) TDP-43 は複数の RNA 結合タンパク質の細胞質における発現を上昇させる

HeLa 細胞に組換えアデノウイルスベクターを用いて TDP-43 を発現させ、48 時間後細胞を回収し、核画分と細胞質画分に分画した。その後、各画分における RNA 結合タンパク質をウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、TDP-43 はこれまで ALS の病態に関与が指摘されている複数の RNA 結合タンパク質の細胞質における発現を TDP-43 の発現量依存的に上昇させた。

### (2) TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇には、TDP-43 の核内局在及び RNA 結合能が必要である

TDP-43 による各 RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇に、TDP-43 のどの機能が関与するかを明らかにするため、TDP-43 の変異体を用いた検討を行った。TDP-43 は N 末端に核移行シグナルを有し、この核移行シグナルを介して主に核内に局在する。核移行シグナルを欠失し、主に細胞質に局在するようにした TDP-43 が RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇を引き起こすのか検討した。その結果、核移行シグナルを欠失した TDP-43 による RNA 結合タンパク質の発現上昇は認められなかった。このことから、TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇には、TDP-43 の核内局在が重要であることが明らかとなった。

また、TDP-43 は 2 箇所の RNA recognition motif (RRM) を有し、この領域を介して RNA に結合し、さまざまな RNA 代謝に関与する。TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇に TDP-43 の RNA 結合が重要であるのかを検討するため、1 つの RRM を欠失した TDP-43 を用いた検討を行った。その結果、RNA 結合能を欠損した TDP-43 は RNA 結合タンパク質の発現を上昇させなかった。この結果から、TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇には、TDP-43 の RNA 結合能が重要であることが明らかとなり、未同定の RNA を介して RNA 結合タンパク質の発現上昇が生じていることが示唆された。

さらに、核移行シグナルまたは RRM を欠失した TDP-43 は、TDP-43 による RNA 結合タンパク質の発現上昇作用を抑制したことから、これらの変異体は、機能喪失のみならず、優性抑制変異体として機能することが明らかになった。

(3) Exportin-1 阻害剤は TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇を抑制する

TDP-43 による細胞質での RNA 結合タンパク質の発現上昇が、核内 RNA 結合タンパク質の細胞質への輸送促進によるものなのかを鑑別するため、タンパク質核外輸送因子 Exportin-1 の阻害剤を用いた検討を行った。その結果、Exportin-1 阻害剤 Leptomycin B は、TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇を抑制した。このことから、TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇には、少なくとも一部は核内 RNA 結合タンパク質の細胞質への輸送促進が関与していることが明らかになった。

(4) TDP-43 による核外輸送促進には長鎖 RNA によりコードされたタンパク質をより標的とする

TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質における発現上昇において、TDP-43 の標的となるタンパク質を網羅的に探索するため、定量的プロテオーム解析を行った。HeLa 細胞に TDP-43 を組換えアデノウイルスベクターを用いて発現させ、48 時間後細胞を回収し、核画分および細胞質画分に分離し、それぞれの画分を定量的に全てのタンパク質を同定・定量するプロテオーム解析を行った。その結果、TDP-43 により細胞質において発現上昇するタンパク質には、長い RNA によってコードされるタンパク質が有意に検出され、特に 4,000 塩基以上の RNA によってコードされるタンパク質が TDP-43 の標的になりやすいことが明らかになった。

(5) 考察

ALS において、運動神経細胞を含む脊髄等において、TDP-43 の発現が亢進しており、さらに *in vitro*・*in vivo* 両者の TDP-43 高発現実験モデルにおいて、TDP-43 の発現上昇が神経毒性を示すことが明らかになっている。このため、TDP-43 の発現亢進が ALS 発症の引き金になる可能性が考えられるが、TDP-43 の発現亢進による神経毒性メカニズムの詳細は未だ不明である。

今回我々は、通常核内に局在する RNA 結合タンパク質が、TDP-43 の発現上昇により細胞質に異所局在することを見出し、TDP-43 による RNA 結合タンパク質の核内における機能喪失あるいは細胞質における毒性機能獲得が TDP-43 の発現上昇による神経細胞死誘導に寄与する可能性を見出した。

TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質での発現上昇には、TDP-43 の核内局在が必要であること、さらに TDP-43 の RNA 結合能が重要であることが明らかになった。さらに、RNA やタンパク質を核から細胞質に移行させる機能を有する Exportin-1 の阻害剤により、TDP-43 による RNA 結合タンパク質の細胞質での発現上昇が抑制された。以上の結果をまとめると、TDP-43 は核内において RNA に結合し、Exportin-1 による核外輸送を促進することによって特定のタンパク質の発現を細胞質で上昇させることがメカニズムの一つとして考えられた。

定量的プロテオーム解析を用いて、TDP-43 によって細胞質でその発現が上昇するタンパク質を網羅的に同定した結果、TDP-43 は 4,000 塩基以上の RNA がコードするタンパク質をより標的とすることが明らかとなった。

以上の結果より、TDP-43 による細胞質での発現上昇には、TDP-43 に結合した長鎖 RNA が核から細胞質に Exportin-1 依存性に移行することで、細胞質での発現が上昇するメカニズムが考えられた。そして TDP-43 による神経毒性のメカニズムの一つとして、RNA 結合タンパク質の核内における機能喪失あるいは細胞質における毒性機能獲得が寄与する可能性を見出した。今後は、今回見出した TDP-43 による RNA 結合タンパク質の異所局在に関して、その作用発揮に TDP-43 の RNA 結合が重要であることから、TDP-43 に結合する短鎖 RNA を同定し、短鎖 RNA の導入により TDP-43 による神経毒性が緩和されるのか検討を進め、最終的に新たな ALS 治療薬となりうる核酸医薬の開発を目指したい。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hiroaki Suzuki, Masaaki Matsuoka	4. 巻 158
2. 論文標題 Proline-arginine poly-dipeptide encoded by the C9orf72 repeat expansion inhibits adenosine deaminase acting on RNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 753-765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.15445.	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Suzuki, Masaaki Matsuoka
2. 発表標題 The proline-arginine repeat protein linked to C9-ALS/FTD inhibits adenosine deaminase acting on RNA
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / 第1回 CJK 国際会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木宏昌、松岡正明
2. 発表標題 Poly-dipeptide linked to C9-ALS/FTD causes neuronal cell death by inhibiting ADARs
3. 学会等名 第144回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 草薙 伸也、小林 悠理、鈴木 宏昌、松岡 正明
2. 発表標題 ALS/FTD原因遺伝子CHCHD10による細胞死メカニズムの解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長谷川成人、岩崎憲治、樽谷愛理、Cesar Aguirre、富田泰輔、鈴木宏昌、佐原成彦、Ruben Fernandez-Busnadiego、服部憲幸、坂口一樹、高澤知規、章 白浩、瀬口典子、清川慎介、大川純代、横山優二、他	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 70
3. 書名 医学のあゆみ	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------