

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390173

研究課題名（和文） 神経変性疾患における興奮性神経細胞死の病因的意義の検討

研究課題名（英文） Roles of excitotoxicity in pathogenesis of degenerative neurological diseases

研究代表者

郭 伸 (KWAK SHIN)

東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員

研究者番号：40160981

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患に特異的な病理変化としてみられる封入体の形成メカニズムは未解明であるが、封入体を構成する蛋白の異常な凝集がコアになると考えられており、その構成蛋白の一つに TDP-43 がある。今回、Ca²⁺依存性プロテアーゼであるカルパインの活性化が易凝集性 TDP-43 断片の形成に特異的に関わること、ただしその活性化が軽微かつ持続的であることが必要であることが明らかになった。Ca²⁺透過性 AMPA 受容体を発現するモデルマウスでは、タウ、APP、 α -シヌクレイン陽性の封入体の形成はみられなかったことから、Ca²⁺シグナリング異常が少なくとも一部の封入体形成に関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Presence of intracellular inclusion body is a pathological hallmark of degenerative neurological diseases but how these inclusions are formed is largely unknown. TDP-43 is a composite protein of inclusions seen in motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and cortical neurons of frontotemporal lobar degeneration (FTLD) patients. We found that calcium-dependent cysteine protease calpain specifically cleaved C-terminal regions of TDP-43, thereby generating aggregation-prone fragments. We did not find α -synuclein-, A β -, or tau-containing inclusions in the mutant mice with abnormal calcium signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症、封入体、TDP-43、AMPA 受容体、カルシウム、カルパイン

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の病因は未解明の部分が
多いが、Ca²⁺シグナルの異常を引き起こす分
子メカニズムが働いていることを示す知見
が蓄積しており、神経変性疾患の病理学的
指標の一つである細胞内封入体形成にも関
与していると考えられている (1)。神経細胞
内Ca²⁺シグナルの異常による神経細胞死は、
従来グルタミン酸受容体サブタイプである
NMDA受容体を介するものが研究の対象であ
り、脳虚血、NDMAアゴニストの投与など
による急性の興奮性神経細胞死のモデルが
用いられている。一方、神経変性疾患で生
じている緩徐な神経細胞死に関与するのは
むしろAMPA受容体であることが知られる
ようになってきている (2)が、適切なモデル
がないこともあり、分子メカニズムの検討
は充分に行われてきていない。

我々は、孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS)
脊髄運動ニューロンでAMPA受容体のCa²⁺透
過性を決定するサブユニットGluA2に、本
来行われるべきRNA編集効率が低下し (3)、
AMPA受容体のCa²⁺透過性を亢進させる分
子変化が生じていることを明らかにした。
GluA2 Q/R部位のRNA編集は、アデノシン
をイノシンに変換するRNA編集 (A-to-I RNA
editing) に関わる酵素 adenosine
deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) によ
り特異的に触媒され、ADAR2遺伝子をノ
ックアウトしたマウスはけいれん重積によ
り生後3週以内に死亡することが明らかに
されている (4)。我々は、ADAR2 遺伝子
のコンディショナルノックアウトマウス
(AR2) を作成し、ADAR2活性が低下・消
失することにより運動ニューロンにおけ
るGluA2のRNA編集が消失することを確
かめ、ADAR2を欠損した運動ニューロン
は、もっぱらAMPA受容体からのCa²⁺流
入を亢進させるメカニズムにより緩徐な
神経細胞死に陥ることを明らかにした (5)。
ADAR2により触媒されるGluA2 Q/R 部
位以外の編集部位は神経細胞死に関与し
ないので、このAR2マウスはAMPA受容
体を介する興奮性神経細胞死の *in vivo* モ

デル動物といえ、Ca²⁺シグナルの異常に伴
う細胞死カスケードの解析に適している。

AR2 マウスは運動ニューロン選択的に
ADAR2 をノックアウトするためにアセチル
コリントランスポータープロモーター依
存性にCreを発現させたが、全身的にCre
を発現することによるコンディショナル
ノックアウトマウスを用いて、脳内各所
におけるAMPA受容体からCa²⁺流入を
増加させ、神経変性疾患で系統的に侵
されやすい脳脊髄部位における細胞死、
封入体形成を比較検討することにより、
Ca²⁺シグナルの異常が脳各所における
細胞死とどう関与しているかを検討す
ることが可能である。

2. 研究の目的

上記したように、ADAR2 遺伝子のコン
ディショナルノックアウトマウスは、AM
PA受容体のCa²⁺透過性を亢進させるメ
カニズムにより運動ニューロン死を引
き起こす。したがって、各種Ca²⁺依
存性酵素の活性化を引き起こすことが
予想される。なかでもCa²⁺依存性
Cysteine プロテアーゼであるCalpain
やCathepsin等は神経細胞死に主要な
役割を持つことが知られている。したが
って、AMPA受容体を介する緩徐な神
経細胞死にこれらのCa²⁺依存性酵素が
どう関与しているかを明らかにするこ
とは、Ca²⁺シグナルの異常が関わる神
経変性疾患全般の神経変性メカニズ
ムを解析していく上で、極めて重要
な情報を与える。

本研究では、AR2 マウスを用いて、
運動ニューロンにおけるCa²⁺透過性
AMPA受容体の発現増加がTDP-43
病理形成と関わるかを検討する。さ
らに、Tamoxifen誘導性に全身的に
ADAR2をノックアウトする変異マウス
を用い、Tamoxifen投与後の神経細胞
死を脳各部位で比較検討する。

3. 研究の方法

Cre-loxP系をもちいて運動ニューロン
選択的にADAR2をノックアウトし、AM
PA受容

体の Ca²⁺透過性亢進により緩徐進行性の神経細胞死を引き起こす AR2 マウスを用いて、TDP-43 の局在異常を免疫組織化学的に検討する。AR2 マウス脊髄前角では calpain 活性が上昇しているため、calpain による TDP-43 切断がどのようにおこるのかを、経時的 calpain による経時的 TDP-43 切断により解析する。また、Calpain による断片化が凝集体形成にどの様に関わるか人工的に合成した calpain 依存性各種 TDP-43 断片の凝集能を培養細胞で検討する。

さらに、運動ニューロン以外の脳部位で Ca²⁺透過性 AMPA 受容体発現がどの様に細胞死、封入体形成に関わるかを、Tamoxifen 依存性に Cre を発現する Cre-Esr1 マウスと ADAR2^{flox/flox} マウスを交配した ADAR2^{flox/flox}/Cre-Esr1 (ADEs) ないし ADAR2^{flox/+}/Cre-Esr1 (hetero ADEs) マウスに Tamoxifen を投与し、脳内各所に封入体が形成されるかどうかを免疫組織化学的に観察する

4. 研究成果

TDP-43 の免疫組織化学では、野生型マウスでは全ての大径前角細胞の核が TDP-43 陽性であったが、AR2, heterozygous AR2 マウスでは脊髄前角領域において、核の TDP-43 免疫活性が陰性及び低下している運動ニューロンが観察された。TDP-43 と ADAR2 との二重染色では、野生型、AR2 マウスを問わず、ADAR2 陽性細胞は全て核が TDP-43 陽性であったが、AR2 マウスの ADAR2 陰性細胞の核は TDP-43 にも陰性であった。

AR2 マウス脊髄を ADAR2 と TDP-43 の二重染色により経時的に観察すると、ADAR2 と TDP-43 免疫活性は共在するか、共に欠損しているかのいずれかであり、ADAR2 陽性/TDP-43 陰性、ADAR2 陰性/TDP-43 陽性細胞はみられなかった。

AR2H マウスを観察すると、核の ADAR2 の染色性が減少した運動ニューロンにおいて TDP-43 の局在異常が観察され、核・細胞質両者とも TDP-43 陰性の細胞や、細胞質に抗 TDP-43 抗体陽性の凝集体をもつ細胞が観察

された。

培養細胞を用いて、プロテアーゼによる TDP-43 の切断を検討したところ calpain 処理でのみ TDP-43 の切断が認められた。この切断は複数の箇所でも起こり、calpain 特異的であった。

MALDI-TOF Mass 解析のフラグメント断片から同定した Calpain による TDP-43 断片の凝集能を検討したところ、Calpain 依存性の 3 種の N 端フラグメントの内、長い断片の 2 種は、全長 TDP-43 より有意に高い凝集能を有したが、最も短い N 端フラグメント、C 端フラグメントは凝集能の変化を認めなかった。これらの N 端断片を Calpain 処理すると、より短い断片に切断されることが明らかになった。

ADEs, hetero ADEs マウスでは海馬に著明な細胞死がみられた。大脳皮質、線条体、海馬、黒質を免疫組織化学的に観察したが、タウ、APP、 α -シヌクレインに陽性の封入体は形成されなかった。

以上の結果より ALS の TDP-43 病理形成にはカルシウム依存性プロテアーゼ calpain による TDP-43 の切断が易凝集性断片を形成することで関与していることが明らかになった。さらに、その活性化レベルが高すぎても低すぎても易凝集性断片は形成されないことも明らかになった。TDP-43 の局在異常を来す条件では、これ以外の蛋白による神経封入体は形成されないことが示された。

引用文献

- 1.) Bezprozvanny I: *Trends Mol Med* **15**, 89-100, 2009.
- 2.) Kwak S, *et al*: *Curr Opin Neurobiol* **16**, 281-287, 2006.
- 3.) Kawahara Y, *et al*: *Nature* **427**, 801, 2004.
- 4.) Higuchi M, *et al*: *Nature* **406**, 78-81, 2000.
- 5.) Hideyama T, *et al*: *J Neurosci* **30**, 11917-11925, 2010.

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 13 件)

- ① Hideyama T, Yamashita Y, H Aizawa, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, Kwak S: Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS motor neurons. *Neurobiol Dis.* 45, 2012. 1121-1128. doi:10.1016/j.nbd. 2011. 12. 033. 査読有
- ② Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Hideyama T, Kimura D, Suzuki T, Kwak S: RNA editing of the Q/R site of GluA2 in cultured cell lines expressing different levels of the RNA editing enzyme ADAR2. *Neurosci Res.* 73, 2012. 42-48. doi:10.1016/j.neures.2012.02.002. 査読有
- ③ Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S, Kwak S: Abnormal processing of TDP-43 does not regulate ADAR2 activity in cultured cell lines. *Neurosci Res.* 73, 2012. 153-160. doi:10.1016/j.neures.2012.02.015. 査読有
- ④ Hideyama T, Teramoto S, Hachiga K, Yamashita T, Kwak S: Co-occurrence of TDP-43 mislocalization with reduced RNA editing enzyme, ADAR2, in aged mouse motor neurons: implications for age-related acceleration of ALS. *PLoS One.* 7, (8) 2012. e43469. doi: 10.1371/journal.pone.0043469. 査読有
- ⑤ Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saido TC, and Kwak S: A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat Commun.* 3, 2012. 1307. doi:10.1038/ncomms2303. 査読有
- ⑥ 郭 伸: RNA editing 活性低下と TDP-43 病理: 孤発性 ALS 運動ニューロンにおける疾患特異的両分子異常の分子連関. *Brain Nerve.* 64, (5) 2012. 549-556. 査読無
- ⑦ 日出山拓人、郭 伸: ADAR2 発現低下と孤発性 ALS. *脳* 21, 15, 2012. 34-40. 査読無
- ⑧ Hideyama T, Kwak S: When does ALS start? ADAR2-GluA2 hypothesis for the etiology of sporadic ALS. *Front Mol Neurosci.* 4, 2011. 33. 査読有
- ⑨ 日出山拓人、郭 伸: 興奮毒性と AMPA 受容体編集異常. *Clinical Neuroscience.* 28, 2011. 1011-1014. 査読無
- ⑩ Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S: Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci.* 30, 2010. 11917-11925. 査読有
- ⑪ Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O, Kwak S: TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol.* 120, 2010. 75-84. doi:10.1007/s 00401 -010-0678-x. 査読有
- ⑫ 日出山拓人、山下雄也、郭 伸: グルタミン酸受容体と孤発性筋萎縮性側索硬化症. *実験医学.* 28, 2010. 109-117. 査読無
- ⑬ 日出山拓人、郭 伸: ALS における RNA editing 異常. *Clinical Neuroscience.* 28, 2010. 246-247. 査読無

[学会発表] (計 11 件)

- ① Hideyama T, Teramoto S, Yamashita T, Kwak S: Age-related association of TDP-43 mislocalisation with reduced

- activity of ADAR2, an RNA editing enzyme, in normal mouse motor neurons suggests a molecular basis for age-related acceleration of ALS. The 22nd Meeting of the European Neurological Society. Prague, Czech, 2012. 6. 9-12 (口演)
- ② Kwak S, Hideyama T, Teramoto S, Yamashita T: Molecular link between TDP-43 and reduced ADAR2 in ALS motor neurons. GRC Neurobiology of Brain Disorders. Easton, MA, U.S.A. 2012. 8. 5-10 (ポスター)
- ③ Hideyama T, Teramoto S, Yamashita T, Kwak S: Aging and ADAR2 activity in motor neurons. The 23rd International Symposium on MND/ALS. Chicago, U.S.A. 2012. 12. 5-7 (ポスター)
- ④ Sasaki S, Yamashita T, Hideyama T, Kwak S: Autophagy in the spinal motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. The 23rd International Symposium on MND/ALS. Chicago, U.S.A. 2012. 12. 5-7 (ポスター)
- ⑤ Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Kwak S: Inefficient RNA editing of GluA2 with ADAR2 downregulation and sporadic ALS. 8th IBRO World Congress of Neuroscience. Firenze, Italy, 2011. 7. 14-19 (ポスター)
- ⑥ Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Kwak S: Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. 6th Brain Research conference "RNA binding proteins in neurological disease. Washington DC, U.S.A, 2011. 11. 10-11 (ポスター)
- ⑦ Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Kwak S: Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons. 41st Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington DC, U.S.A, 2011. 11. 12-16 (ポスター)
- ⑧ Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Kwak S: Downregulation of RNA editing enzyme ADAR2 and sporadic ALS. The 22nd International Symposium on MND/ALS. Sydney, Australia, 2011. 11. 30-12. 2 (口演)
- ⑨ Sasaki S, Hideyama T, Kwak S: Ultrastructural study of spinal cord motor neurons in ADAR2-deficient mice. The 22nd International Symposium on MND/ALS. Sydney, Australia, 2011. 11. 30-12. 2 (ポスター)
- ⑩ Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S: Absence of GluR2 RNA editing induces slow death of motor neurons in conditional ADAR2 knockout mice. 40th Annual Meeting Society for Neuroscience. San Diego, U.S.A, 2010. 11. 13-17 (ポスター)
- ⑪ Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Kwak S: Close association of TDP-43 pathology with loss of RNA editing enzyme ADAR2 in motor neurons in sporadic ALS. The 21st International Symposium on MND/ALS. Orland, U.S.A 2010. 12. 11-13 (ポスター)
- [図書] (計1件)
- ① 日出山拓人、郭伸: 筋萎縮側索硬化症 (ALS). 運動ニューロン疾患. 神経疾患最新の治療(2012-2014) (小林祥泰, 水澤英洋監修) 南江堂, 東京, 2012. 243-246.
- [その他]
ホームページ等
<http://square.umin.ac.jp/teamkwak>
6. 研究組織
(1) 研究代表者

郭 伸 (KWAK SHIN)

東京大学・大学院医学系研究科・客員研
究員

研究者番号：40160981