

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24年5月15日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2010～2011

課題番号：22659169

研究課題名（和文） TDP43 の病態機序に基づいた ALS の血中バイオマーカーの単離

研究課題名（英文） Identification for serum biomarker for ALS associated with the function of TDP-43

研究代表者

小野寺 理 (ONODERA OSAMU)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20303167

研究成果の概要（和文）：

ALS の病態機序に TDP-43 が深く関与している。我々は TDP-43 の機能喪失が深く関わっていると考え研究を進めている。これを明かとし、この機能喪失時に起こる変化を本症のマーカーとして開発することを目的とした。まず、ヒトグリア由来細胞である U87 さらにヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 用い、TDP-43 をターゲットとした RNA 抑制法にて TDP-43 を効率よく減少させる系を確立した。本方法により、TDP-43 を極めて効率よく発現を抑制できることが確認できた。確立した方法を用い培養細胞を用い、エクソンアレイ(選択的スプライシングの検索)、及びジーンアレイ(発現量の検索)を用い、特定のエクソンの発現の変化、もしくは mRNA 量の減少が認められないか検討した。その結果、複数の培養細胞において特定の遺伝子のスプライシングの変化を同定した。このスプライシング変化が、ALS 患者組織にて変化していることを検討した。その結果、ALS 患者、脊髄、大脳にて、特定の遺伝子のスプライシング変化が起こっていることを確認した。さらに ALS 患者運動神経細胞をレーザーマイクロダイセクション法にて取り出し、運動神経細胞でも同様にスプライシング変化が起こっていることを見いだした。この成果は、ALS 患者罹患組織で TDP-43 機能が減少していることを示した物である。さらに、この遺伝子のスプライシング変化は正常ではほとんど認めないため、この遺伝子のスプライシング多様体が、本症の病態を反映するバイオマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease caused by selective loss of motor neurons. In the ALS motor neurons, TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) is dislocated from the nucleus to cytoplasm and forms inclusions, suggesting that loss of a nuclear function of TDP-43 may underlie the pathogenesis of ALS. TDP-43 functions in RNA metabolism include regulation of transcription, mRNA stability, and alternative splicing of pre-mRNA. However, a function of TDP-43 in tissue affected with ALS has not been elucidated. We sought to identify the molecular indicators reflecting on a TDP-43 function. Using exon array analysis, we observed a remarkable alteration of splicing in several genes as a result of the depletion of TDP-43 expression in two types of cultured cells. In the cells treated with TDP-43 siRNA, wild-type splicing variants decreased and transcripts lacking some exons increased. The RNA binding ability of TDP-43 was necessary for inclusion and exclusion of these exons. Moreover, we found an increment of splicing variants in motor cortex, spinal cord and spinal motor neurons collected by laser

microdissection with ALS. Our results suggest a loss of TDP-43 function in tissues affected with ALS, supporting the hypothesis that a loss of function of TDP-43 underlies the pathogenesis of ALS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

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：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態機序は不明であり、有効な治療方法も開発されていない。壮年期に好発する最も代表的な神経難病であり、治療方法の開発が望まれている疾患である。2006年秋、ALSに認められる封入体の構成蛋白が TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) であることが報告され、本症の病態機序解明のブレークスルーとなった (Neumann et al. *Science*. 2006 314:130-3). 申請者は早くから FALS にて、TDP-43 遺伝子変異を見だしこれを報告してきた (Tan et al. *Acta Neuropathol*. 2007 113:535-42. Yokoseki et al. *Ann Neurol*. 2008;63:538-542). 時期を同じくして複数のグループから TDP-43 変異を伴う ALS が報告され、TDP-43 の重要性は確立された。

これから、ALS の病態機序に関しては TDP-43 を中心に精力的に研究が進むと考えられる。しかし治療研究のためには、バイオマーカーの確立が必須であり、急務である。神経変性疾患は、他領域に比して、疾患の診断、進行に関与する定量的、客観的なマーカーに乏しく、治療研究推進の障害となっている。本研究計画では、この点を、解決することを目標とする。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症の治療法の開発は、多くの患者さん、神経内科医の願いである。しかし、その現状は、決して明るくはない。TDP-43 の発見により、病態機序研究の画期的な進展が期待されるが、他の神経変性疾患を顧みても、その成果を臨床の現場に反映するには、より長い時間を必要とする。

神経変性疾患の治療研究が困難なのは、その診断、または進行を反映する定量的なマーカーに乏しいことがある。そのために、バイオマーカーの検索は急務である。バイオマーカーの探索として患者サンプルを用いた網羅的な探索が行われているが、その成果は決して芳しくない。その理由として、蛋白質を用いた網羅的検索の complexity があげられる。本研究申請では、TDP-43 の病態機序を利用することにより、候補蛋白を絞り込み、そこからバイオマーカーを得る。

3. 研究の方法

ALS 病態モデルとして、ヒトアストロサイトを用い、機能喪失モデルと、機能獲得モデルを作製する。機能喪失モデルとしては、レンチウイルスベクターを用い TDP-43 をターゲットとした種々の shRNA を導入し、TDP-43 の減少を試みる。ヒトアストロサイトを用いるため、条件設定、さらにオフターゲットエフェクトの有無を確認するため、複数のプローブでの検討が必要である。TDP-43 のノックアウトによる変化を、細胞障害性、細胞周期、形態にて検討し、二次的な影響の有無を除外する。また機能獲得モデルとしては、TDP-43 は過剰発現により凝集体を形成し、細胞障害性を示すことが示唆されている。そのため、同様にレンチウイルスベクターを用い、野生型、変異型 TDP-43 を過剰発現する。

培養細胞から、mRNA を回収する。

TDP-43 の機能, つまりスプライシングに影響を与えるという観点から, 選択的スプライシングの比率が変わる可能性と, **frame** がずれることによりナンセンス依存性 mRNA 分解機構が働き mRNA 量が減少する可能性がある. 本計画では, この両者を **array** を用い検討する. 回収した mRNA を用い, **Exon array** (選択的スプライシングの検索), 及び **Gene array** (発現量の検索) を用い, 特定のエクソンの発現の変化, もしくは mRNA 量の減少が認められないか検討する.

本手法により得られた候補遺伝子につき, データベースと照らし合わせ, ALS にて特異的な物を選別し, **ELISA** を用いた高感度アッセイ法を検討する

4. 研究成果

ALS 病態モデルとして, ヒトグリア由来細胞である U87 さらにヒト神経芽細胞腫由来の **SH-SY5Y** 用い, **TDP-43** をターゲットとした RNA 抑制法にて **TDP-43** を効率よく減少させる系を確立した. 本方法により, **TDP-43** は極めて効率よく発現を抑制できることが確認できた. 確立した方法を用い培養細胞から, mRNA を回収した. **TDP-43** の機能異常としては, つまりスプライシングに影響を与えるという観点から, 選択的スプライシングの比率が変わる可能性と, フレームがずれることによりナンセンス依存性 mRNA 分解機構が働き mRNA 量が減少する可能性がある. 本計画では, この両者をアレイを用い検討した. 回収した mRNA を用い, エクソンアレイ (選択的スプライシングの検索), 及びジーンアレイ (発現量の検索) を用い, 特定のエクソンの発現の変化, もしくは mRNA 量の減少が認められないか検討した. その結果, 複数の培養細胞において特定の遺伝子のスプライシングの変化を同定した. このスプライシング変化が, ALS 患者組織にて変化していることを検討した. その結果, ALS 患者, 脊髄, 大脳にて, このスプライシング変化が起こっていることを確認した. さらに ALS 患者運動神経細胞をレーザーマイクロダイセクション法にて取り出し, 運動神経細胞でも同様にスプライシング変化が起こっていることを見いだした. この成果は, ALS 患者罹患組織で **TDP-43** 機能が減少していることを示した物である. さらに, この遺伝子のスプライシング変化は正常ではほとんど認めないため, この遺伝子

のスプライシング多様体が, 本症の病態を反映するバイオマーカーとなる可能性が示された.

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 3 件)

- ① 今野卓哉, 石原智彦, 西澤正豊, 小野寺理 家族性ALS ALS10(遺伝性ALS-TDP)の臨床と病理 *Clinical Neuroscience* 29巻, 2011, 1019-1021
- ② Kosaka T, Fu YJ, Shiga A, Ishidaira H, Tan CF, Tani T, Koike R, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Primary lateral sclerosis: Upper-motor-predominant amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobar degeneration - immunohistochemical and biochemical analyses of TDP-43. *Neuropathology*. 2011 doi: 10.1111/j.1440-1789.2011.01271.x.
- ③ Soma K, Fu YJ, Wakabayashi K, Onodera O, Kakita A, Takahashi H Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*. 38, 2012, 54-60
- ④

[学会発表] (計 6 件)

- ① T. ISHIHARA, A. SHIGA, A. KAKITA, A. YOKOSEKI, M. NISHIZAWA, H. TAKAHASHI, *O. ONODERA; Alteration of snRNAs in amyotrophic lateral sclerosis 2011, 米国神経科学会
- ② A. SHIGA¹, T. ISHIHARA¹, A. MIYASHITA¹, T. KATO¹, M. KUWABARA¹, *A. YOKOSEKI², R. KUWANO¹, A. KAKITA¹, H. TAKAHASHI¹, M. NISHIZAWA¹, O. ONODERA¹; Aberrant splicing of POLDIP3 gene in motor neuron with ALS. 2011, 米国神経科学会
- ③ T. ISHIHARA, A. SHIGA, A. KAKITA, A. YOKOSEKI, M. NISHIZAWA, H. TAKAHASHI, *O. ONODERA; Alteration of snRNAs in amyotrophic lateral sclerosis 2011, 6th Brain Research Conference: RNA-Binding Proteins in Neurological Disease
- ④ A. SHIGA¹, T. ISHIHARA¹, A. MIYASHITA¹, T. KATO¹, M. KUWABARA¹, *A. YOKOSEKI², R. KUWANO¹, A. KAKITA¹, H. TAKAHASHI¹, M. NISHIZAWA¹, O. ONODERA¹;

Aberrant splicing of POLDIP3 gene in motor neuron with ALS. 2011, 6th Brain Research Conference: RNA-Binding Proteins in Neurological Disease

- ⑤ 廣川 祥子¹, 佐藤 俊哉¹, 石原 知彦², 藤野 尙至², 近藤 千草², 横山 峯介¹, 崎村 健司³, 西澤 正豊², 小野寺 理⁴ Tardbp 欠損マウスの mRNA 選択的スプライシングと組織特異的な多様性 2011, 分子生物学会
- ⑥ 桑原 美咲¹, 石原 智彦¹, 志賀 篤², 今野 卓哉¹, 小山 哲秀³, 西澤 正豊¹, 小野寺 理^{1,4} ALS 関連蛋白 TDP-43 の自己発現調節機能に關与するスプライシング因子の検討 分子生物学会

⑦

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 理 (ONODERA OSAMU)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号 : 20303167

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし