

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790839

研究課題名（和文）TDP-43 を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエを用いた病態・治療研究

研究課題名（英文）Establishment of novel *Drosophila* models of ALS expressing TDP-43, and analyses of its pathomechanisms

研究代表者

藤掛 伸宏 (Fujikake Nobuhiro)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・疾病研究第四部・科研費研究員

研究者番号：60467595

研究成果の概要（和文）：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニューロンが変性・脱落して運動障害を来す難治性の神経変性疾患である。最近の研究から ALS の発症には核内 TDP-43 蛋白質の消失・細胞質 TDP-43 の凝集体形成が関わると考えられているが、そのメカニズムは全く未解明である。本研究では ALS 発症分子メカニズムを解明するため、ALS の新規 *in vivo* モデルとして TDP-43 を発現するショウジョウバエを樹立した。そして候補遺伝子スクリーニングから、TDP-43 が惹き起す神経変性に関わる遺伝子として Atg6, Atg12 などのオートファジー関連遺伝子を同定し、オートファジー蛋白質分解系が ALS 発症に関わる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease which is characterized by selective motor neuron degeneration in the brain and spinal cord. Recent studies demonstrate that abnormalities of TDP-43 are involved in the pathomechanism of neurodegeneration in ALS. To elucidate the pathomechanism of TDP-43-induced neurodegeneration *in vivo*, we employed *Drosophila melanogaster* to model ALS because of its advantage in suitability for genetic-screening. We identified autophagy-related genes such as Atg6 and Atg12 as modifiers of neurodegeneration in ALS model flies expressing TDP-43. Our results suggest that the autophagy-mediated protein degradation pathway is involved in TDP-43-induced neurodegeneration in ALS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：遺伝子、遺伝学、神経科学、筋萎縮性側索硬化症、ALS、TDP-43、神経変性疾患、ショウジョウバエ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ポリグルタミン病など多くの神経変性疾患において、それぞれ異なる蛋白質がいずれもミスフォールディングを起こして凝集体を形成し、封入体として神経細胞内外に蓄積することが明らかになった。このことから、これらの多彩な神経変性疾患において、蛋白質のミスフォールディング／凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが存在すると考えられるようになった。

ALS は運動ニューロンが変性・脱落して運動障害を来し、多くは発症から5年以内に死亡する悲惨な難治性の神経変性疾患で、本邦では7000人以上の患者がいると推定されている。このうち10%程度は遺伝性を示し、その約2割でSOD1遺伝子の変異が発見されているが、大部分の原因遺伝子異常は未解明である。患者の90%以上を占める孤発性ALSはSOD1変異を持つALSとは臨床像が異なり、またSOD1以外の未知の蛋白質が神経細胞内に凝集・蓄積しているため、変異SOD1モデルマウスで得られた治療薬候補の孤発性ALS患者に対する臨床治験ではこれまで期待される成果が得られていない。以上のことからALSの治療法開発へ向けては、孤発性ALSの発症原因蛋白質を解明することが切望されていた。

孤発性ALSの発症原因解明の手掛かりとして、2006年に孤発性ALS患者の神経細胞内封入体の構成成分解析からTDP-43蛋白質が同定された。そして昨年になって、これまで原因遺伝子異常が未知であった遺伝性ALS家系において、TDP-43遺伝子の変異が次々と発見され、孤発性ALSと同様に神経細胞内にTDP-43の凝集・蓄積を認めることが明らかになった。しかしながら、培養細胞におけるTDP-43の過剰発現では、凝集、細胞毒性などが認められず、ALSのモデルとして十分な特徴を備えているとは言い難い。最近、TDP-43 C末端断片の発現では、凝集・封入体形成が認められることが報告され、TDP-43のミスフォールディング／凝集が孤発性ALSに関わることが示唆された。しかし、TDP-43によるALSの発症分子メカニズムは未解明であり、*in vivo*における発症分子メカニズム解明／治療法開発に必須であるALSのモデル動物の樹立が切望されている。

近年、様々な神経変性疾患の*in vivo*モデルとして、ショウジョウバエが注目されている。ショウジョウバエは世代時間が短く(10~14日)、遺伝子組換え体の作成が簡便にでき、多数の遺伝子変異体株(ライブラリー)がストックセンターから容易に入手できるため、分子遺伝学的な解析の速さはマウスに

比べてはるかに優れている。

## 2. 研究の目的

ALSの全く新しい*in vivo*モデルとして、TDP-43を発現するショウジョウバエモデルを樹立し、遺伝学的手法を用いてALSの発症分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) TDP-43を発現する新規ALSモデルショウジョウバエの樹立

野生型(WT)および家族性変異型(A315T、Q343R)TDP-43を発現する遺伝子改変ショウジョウバエを作製し、行動解析・生化学的解析・病理学的な解析を行い、ALSのモデルとしての妥当性を検討する。

### (2) ALSモデルショウジョウバエを用いた候補遺伝子スクリーニング

上記(1)にて作製したALSモデルショウジョウバエを用いて候補遺伝子スクリーニングを行い、ALSの発症分子メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) TDP-43を発現する新規ALSモデルショウジョウバエの樹立

野生型(WT)TDP-43および家族性変異型(A315T、Q343R)TDP-43を発現するショウジョウバエを樹立し、その表現型を解析した。その結果、神経系におけるTDP-43の遺伝子発現がショウジョウバエの生存率の低下・寿命短縮・進行性運動障害を惹き起こすことを見出した。また複眼におけるTDP-43の遺伝子発現では複眼変性が生じた。さらにこれらの神経変性・神経症状は家族性ALS変異A315TあるいはQ343Rにより増悪された。次にTDP-43蛋白質の生化学的な変化をウェスタンブロット法にて解析したところ、ALS患者と同様にTDP-43の異常な断片化・リン酸化・不溶化が生じていることが明らかとなった。病理学的な解析では、ALS患者と同様に病変部位においてTDP-43の凝集体が認められ、さらにこれらの凝集体は家族性変異により増加されることを明らかにした。以上のことから、TDP-43を発現するショウジョウバエは、ALSの病理学的特徴・生化学的特徴を反映する良いモデルとなることが明らかとなった。

### (2) ALSモデルショウジョウバエを用いた候補遺伝子スクリーニング

上記(1)で樹立したALSモデルショウジョウバエと様々な遺伝子変異体／遺伝子組換え体ショウジョウバエを交配し、次世代ショウジョウバエの複眼変性を評価することにより候補遺伝子スクリーニングを行った。その結果、蛋白質のフォールディングを補正する分子シャペロン(Hsp40、Hsp70)の遺伝子発

現では ALS モデルショウジョウバエが呈する複眼変性の著明な改善は認めなかった。また細胞内における主要な蛋白質分解系であるプロテアソームの活性をドミナントネガティブ変異体の過剰発現により減弱させたが、明らかな複眼変性の増悪は認めなかった。一方でオートファジー・リソソーム蛋白質分解系関連遺伝子である Atg6 あるいは Atg12 遺伝子を RNAi 法によりロックダウンさせたところ、ALS モデルショウジョウバエが呈する複眼変性が増悪した。さらにユビキチン化蛋白質選択的オートファジー分解に関与する p62 のロックダウンにおいても ALS モデルショウジョウバエが呈する複眼変性が増悪した。これらの結果から、選択的オートファジー・リソソーム分解系は TDP-43 が惹き起す神経変性に関与していると考えられた。今後、選択的オートファジー活性の低下により TDP-43 蛋白質が特異的に蓄積し、その結果複眼変性が増悪したのか、あるいはユビキチン化蛋白質全般的に蓄積し、その結果二次的に複眼変性が増悪したのか検討する必要がある。本研究から TDP-43 の *in vivo* での毒性獲得にオートファジーが関与している可能性が示され、オートファジーの賦活化による ALS 治療が期待された。

#### 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 5 件)

- ① 藤掛伸宏、長野清一、永井義隆、ショウジョウバエなど小動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル、神経内科、査読無、vol. 76、2012、266-274  
<http://www.kahyo.com/item/S201203-763>
- ② 永井義隆、藤掛伸宏、ショウジョウバエモデルから解明された TDP-43 プロテノパチーの分子病態、Dementia Japan、査読無、vol. 25、2011、129-136  
<http://www.sasappa.co.jp/online/abstract/jsdr/1/25/html/101250206.html>
- ③ Rahman MS, Nagai Y, Popiel HA, Fujikake N, et al, Genetic Testing for Huntington's Disease in Parkinsonism, Mymensingh Medical Journal、査読有、vol. 19、2010、510-514  
<http://www.banglajol.info/index.php/MMJ/article/view/6708>
- ④ Mizuno H, Fujikake N, Wada K, Nagai Y,  $\alpha$ -Synuclein Transgenic *Drosophila* As a Model of Parkinson's Disease and

Related Synucleinopathies、Parkinson's Disease、査読有、vol. 2011、2010、212706  
doi:10.4061/2011/212706

- ⑤ 永井義隆、藤掛伸宏、TDP-43 プロテノパチーの動物モデル、最新医学、査読無、vol. 65、2011、1603-1613  
<http://www.saishin-igaku.co.jp/backnum/2010/y6507.html>

[学会発表] (計 6 件)

- ① 鈴木マリ、藤掛伸宏、和田圭司、永井義隆、高栄養負荷は神経変性疾患モデルショウジョウバエにおける神経変性を増悪する、第 34 回日本神経科学大会、2011 年、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、永井義隆、TDP-43 を発現する ALS モデルショウジョウバエにおけるオートファジー系蛋白質分解の関与、第 52 回日本神経学会学術大会、2011 年、名古屋国際会議場 (愛知県)
- ③ Fujikake N, Saitoh Y, Yokoseki A, Onodera O, Wada K, Nagai Y, Expression of TDP-43 causes neurological phenotypes with an enhancement by FALS mutations in novel *Drosophila* models of ALS、10th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases、2011、CCIB Convention Center (Barcelona, Spain)
- ④ Fujikake N, Saitoh Y, Yokoseki A, Onodera O, Wada K, Nagai Y, Abnormal accumulation of TDP-43 proteins causes neurodegeneration in novel *Drosophila* models of ALS、3rd International Symposium on Protein Community、2010、Hotel Nikko (Nara, Japan)
- ⑤ 永井義隆、藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、TDP-43 を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエの樹立とその病態解析、第 33 回日本神経科学会・第 53 回日本神経化学会合同大会、2010 年、神戸コンベンションセンター (兵庫県)
- ⑥ 永井義隆、藤掛伸宏、斉藤勇二、横関明男、小野寺理、和田圭司、TDP-43 を発現する新規 ALS モデルショウジョウバエを用いた病態解析、第 51 回日本神経学会総会、2010 年、東京国際フォーラム (東京都)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r4/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤掛伸宏 (Fujikake Nobuhiro)

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・疾病研究第四部・科研費研究員

研究者番号：60467595