

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300131

研究課題名(和文) ALS発症に関わるTDP43分子内標的の同定と抗体医療への応用研究

研究課題名(英文) Identification of pathogenic domain in TDP-43 for ALS toward the antibody medicine

研究代表者

漆谷 真 (Urushitani, Makoto)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60332326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態関連蛋白質であるTDP-43の機能ドメインであるRNA認識モチーフ(RRM)の微細局所構造解析を行い、RRM1内の異常会合部位を同定し同部以内の、システイン変異体が新たなTDP-43プロテオパチー細胞のモデルとなることを示した。子宮内エレクトロポレーション法を用いた新たなin vivoモデルを構築した。さらにRRM2ドメイン内のミスフォールドTDP-43露出配列に対するモノクローナル抗体の可変領域の遺伝子クローニングに成功し、細胞内低分子抗体(scFv)の作成を行い、その新たな評価モデルとして子宮内エレクトロポレーション法による胎児脳の発現モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：Using structural analyses of RNA-recognition motifs (RRM) of TDP-43, a ALS-linked protein, we identified a aberrant assembly interface in RRM1. The cysteine in the this region induced TDP-43 aggregates, cytosolic mislocalization, the incompetent RNA splicing, and cytotoxicity, which functionally and structurally mimicks TDP-43 proteinopathy. We also succeeded in cloning cDNA from murine hybridoma (3B12A), generating a monoclonal antibody recognizing the misfolded forms of TDP-43, and constructed mammalian expression plasmid for the single chain Fv (scFv). Since the commercially available transgenic mice expressing ALS-linked mutant TDP-43 (A315T) turned out to fail to replicate ALS phenotype, we newly establish the embryonic brain transfection system, using in-utero electroporation. The brain slice expressing aggregate prone mutant TDP-43 showed ALS-like TDP-43 aggregates, which could be tested to estimate the intra therapy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 TDP-43 高圧力NMR 抗体 凝集体 細胞モデル

1. 研究開始当初の背景

難治性致死性神経疾患である ALS の原因は長らく不明であったが、家族性 ALS の原因蛋白質として、superoxide dismutase 1 (SOD1)の突然変異が(Rosenら, 1993)、孤発性 ALS において TAR DNA binding protein 43 (TDP-43; Araiら 2006, Neumannら, 2006) が同定され、これらの構造変化の解明と、標的構造の解明が根本治療に直結する可能性が出てきた。とりわけ TDP-43 は孤発性 ALS に加え前頭側頭型認知症との関連性から注目され、その異所性局在や凝集体形成機構が内外で精力的に解析されている(野中ら 2009, Wintonら 2008, Kimら 2008, 漆谷ら 2009, 2010 他多数)。一方近年神経変性疾患の病巣拡大に原因タンパクの細胞外放出と伝播(プリオン仮説)が治療面からも注目されている(Aguzzi 2009) が、申請者はこれまでに変異 SOD1 蛋白質の細胞外放出機構を明らかにし(漆谷ら 2006, 2008)、細胞外 SOD1 に対するワクチン療法や抗体療法に成功した(漆谷ら 2007, 2010)。ミスフォールド蛋白質を標的とした治療をより有効なものとするためには、蛋白質構造変化を直接的に解析し、より病原性の高い局所ドメインを分子内標的として明らかにすることが必要である。しかしながら蛋白質構造に関するデータベース情報は静的な安定構造を基本としており、高エネルギー状態を有する病原構造の同定は困難である。高圧力 NMR 法はタンパク質水溶液に高圧力をかけることで、通常は分布率が低く観測困難なタンパク質の変性中間体を誘導する手法であり、分担研究者が世界で初めて変性中間体の立体構造解析に成功した(北原ら 2008)。我々は、本法を用いて、TDP-43 のコンフォメーション平衡の全容解明を行い、生理的平衡状態で存在する不安定な変性中間体と変性構造の中核となる責任ペプチド配列を同定することを試みた。次に変性中間体や責任配列ペプチドに対する抗体を作成し ALS 患者の組織化学的解析による評価を経て分子内標的を決定し、抗体改変技術を駆使して ALS モデル動物に対する治療研究に移行する事を目指した。尚、本研究の着想と技術開発について 2010-2011 年の挑戦萌芽研究に採択され研究を開始した。本申請は萌芽研究の進捗が順調であったことからその発展研究として申請採択されたものであり 2011 年の研究成果は萌芽研究の成果と一部重複する。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は原因不明の致死性神経変性疾患であるが、近年 ALS における凝集体の本体として TDP-43 が同定され、徐々に病的事象が明らかとなっている。しかし、ミスフォールド体として認識されている TDP-43 は構造変性過程の最終段階にあると考えられ、病態との本質的な関わりは未だ不明である。ALS 特異的病態の解明には

TDP-43 蛋白質の生理的構造からの逸脱機構を動的に解析することが必要かつ有効と考えられる。本研究では、高圧力 NMR 法を用いた TDP-43 の構造平衡の解析により、ALS 発症に関わる分子構造変化を捕らえ、ALS 病態の解明と逸脱構造を標的とした抗体医療への応用を目指した。

我々は期間内に、(1)高圧力 NMR 解析法を用いた TDP-43 主要ドメインの変性中間体構造とその責任配列の決定、(2)変性中間体モデルの構築と細胞発現系の解析、責任配列に対するモノクローナル抗体の作成、(3)ALS 患者組織化学により選抜された抗体を用いた変異 TDP43 トランスジェニックマウスの病態解析、(4)シグナル付加や一本鎖抗体等の改変抗体を用いた *in vitro*、*in vivo* での分子内標的治療法の開発を進めた

3. 研究の方法

1) 高圧力 NMR 解析

TDP-43 の RNA 認識モチーフである RRM1 と RRM2 の安定同位体を精製し安定同位体に対する高圧力負荷後の経時的の NMR 解析を行った。大腸菌で精製した組換えヒト TDP-43 の RRM1 ドメイン (AA103-183) を安定同位体標識させ PBS バッファーに溶解後耐圧セルに密閉し、2000bar の圧力を持続的に加えた。経時的に NMR 解析を行い、獲得した NMR 信号と既知の基軸配置と対比させ、化学シフトの有無と可逆性について検討した。

2) 質量解析によるプロテアーゼ抵抗性配列の同定

大腸菌組み換えタンパク質(非同位体)の精製とシステイン置換変異体の精製と種々の摂動刺激(高温、振盪刺激)後の分子量変化を非還元/還元 SDS-PAGE、ウェスタンブロットティング、ゲルろ過クロマトグラフィー(HPLC)によって解析した。組み換え野生型 RRM1 タンパク質を振盪刺激によって凝集させた後、非特異的プロテアーゼであるプロナーゼによって分解し、非分解産物を質量解析シアグリゲーションコアを同定した。

3) 家族性 ALS 関連変異 TDP-43 トランスジェニックマウスの繁殖表現型解析

ヒト TDP-43 変異遺伝子 (A315T) をプリオンプロモーター制御下に発現させたトランスジェニックマウスヘテロ個体(雄)2匹を Jackson 社より購入し、C57B16 と交配させた。体重変化、握力、四肢筋力低下を観察し、寿命を記録した。

5) 培養細胞への遺伝子導入による異常 TDP-43 の解析

ALS 関連 TDP-43 凝集体モデルを発現するプラスミドを作製し、不死化培養細胞 (HEK293A、SHSY-5Y、NSC34) などにリポフェクション法を用いて、一過性遺伝子導入を行い 24 ないしは 48 時間後にウェスタンブロット解析や

4%パラホルムアルデヒド (PFA) 固定後、共焦点レーザー顕微鏡による免疫蛍光観察を行った。

6) RRM1 の病態関連配列に対するマウスモノクローナル抗体作製

高圧力 NMR、質量解析によって同定された RRM1 ドメインにおける病態関連配列のペプチド性精製し、常法によりマウスに免疫、リンパ節より細胞を分散させ、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマは抗原ペプチドに対する ELISA で初回のスクリーニングを行い、陽性クローンを RRM1 組換えタンパクを光源として ELISA を行い、反応性の高いクローンを選択した。さらに培養細胞に遺伝子導入させた野生型、易凝集体形成型 TDP-43 に対して免疫蛍光染色によって検討した。

7) ミスフォールド TDP-43 特異認識抗体に対するモノクローナル抗体 3B12A の可変領域遺伝子クローニングと小型抗体の作製

3B12A ハイブリドーマから常法により total RNA を精製したのに逆転写酵素によって cDNA とした。後さらに、市販の試薬により本抗体が IgG1 であることが判明したため、次に 5' RACE 法、さらにサブクラスごとのプライマーを用いて VH, VL の cDNA をクローニングした。DNA シーケンシングによってアミノ酸配列を同定した後、分泌シグナルを除いた配列を VH, VL の nanobody、さらに VH と VL 遺伝子を GGS の 3 リピートリンカーで連結した抗体を scFv として pcDNA3 に組み込んで乳細胞発現ベクターとした。

8) 子宮内エレクトロポレーション法を用いた胎児マウス脳へのミスフォールド TDP-43 遺伝子導入。

市販のエレクトロポレーター (NEPA21) 用いて、胎生 12 日齢のマウスのうに、ピペラで作製した先細りピペットに pcDNA3 プラミドに挿入したヒト野生型、変異型、易凝集体 TDP-43 を子宮ごと取り出した胎児脳の脳室内に注入後、エレクトロポレーターで通電し、子宮を母体に戻し、48 時間後に遺伝子の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) TDP-43 の RRM1 ドメインは圧力や振盪刺激で異常な高次構造を形成する。

我々は RRM1 蛋白質が 2000bar という通常の蛋白質では不可逆的変化を来さない圧力で凝集体形成をすることを見出した。この凝集体は SDS-PAGE によって二量体を主としてオリゴマー形成をしており、ジチオスレイトール (DTT) 投与によって単量体化することからジスルフィド結合と判明した。さらに NMR 解析によって、3 箇所不可逆的的化学シフトを示す配列群 (ドメイン) が同定された。この凝集体は RRM1 蛋白質でのみ認め、同様のドメイン構造を有する RRM2 蛋白質では認め

なかった。さらに RRM1 のジスルフィド結合を介した凝集体形成は短時間の熱処理や振盪刺激によっても再現され、刺激終了後も経時的に形成が増加することから、RRM1 蛋白質が物理刺激に対して脆弱であり、seeding 効果を有することが示された。

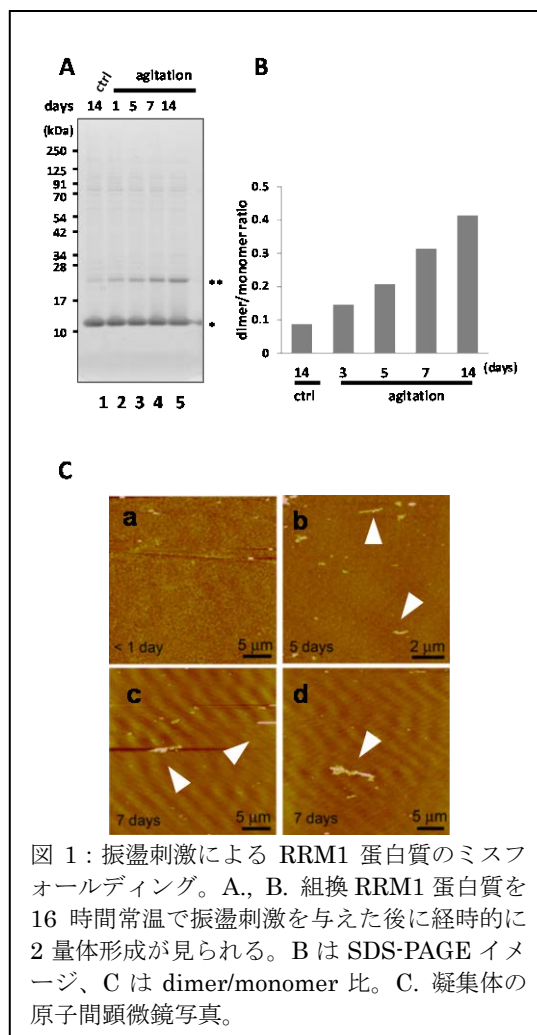
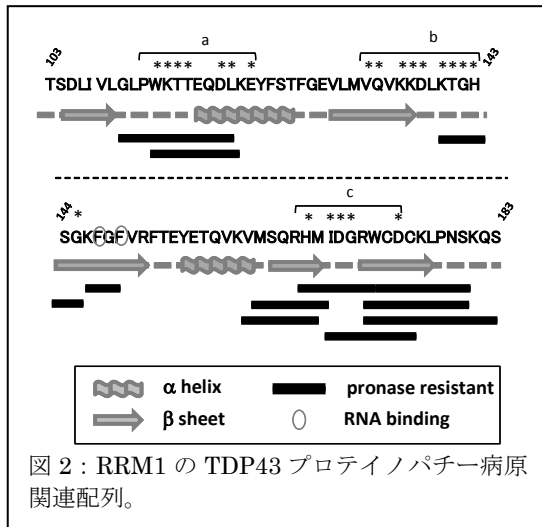


図 1: 振盪刺激による RRM1 蛋白質のミスフォールディング。A., B. 組換え RRM1 蛋白質を 16 時間常温で振盪刺激を与えた後に経時的に 2 量体形成が見られる。B は SDS-PAGE イメージ、C は dimer/monomer 比。C. 凝集体の原子間顕微鏡写真。

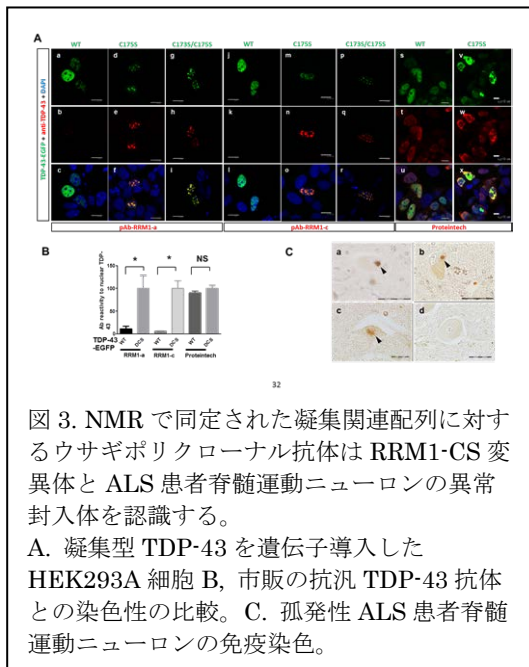
(2) RRM1 ドメインは異常会合に関与する病原配列が存在する。

高圧力 NMR 解析によって判明した 3 箇所不可逆的的化学シフト配列の凝集体形成における意義を調べるために、振盪刺激によって生じた凝集体を非特異的プロテアーゼであるプロナーゼによって消化し、残存ペプチドを質量解析 (LC-MS/MS) によって解析した所、システインを 2 つ有する RRM1 ドメインの最もカルボキシル側がプロテアーゼ抵抗性領域であることが判明した。さらに RRM1 に存在する 2 つのシステイン残基 (C173, C175) をセリン単置換させた変異体解析によって、凝集体は分子間ジスルフィド結合を伴うことから異常会合の会合であると考えられた (図 2)。このチミン/グアニンリピート (TG12) の投与の有無で凝集体系性能に変化はなく、DNA/RNA 結合は無関係と考えられた。さらに興味深いことに、C173/C175 の両者をセリンに置換させた変異体ではさらに凝集

体形成が促進されることから、2つのシステイン残基は RRM1 の構造維持にフリーであることが必要であることが判明した。



(3) RRM1 の病原配列に対するウサギポリクローナル抗体は CS 変異体や ALS における TDP-43 封入体を認識するが (図 3)、マウスモノクローナル抗体は抗原特異性が得られなかった (図 3)。

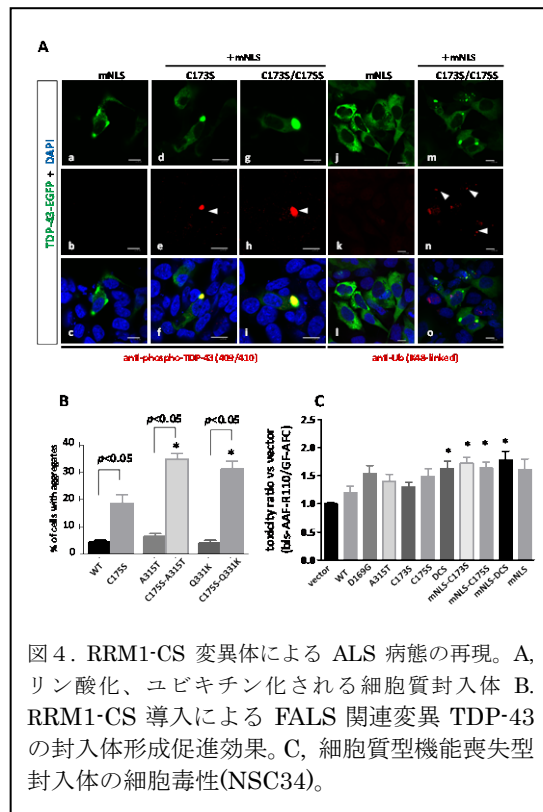


(4) RRM1 のシステイン変異体は TDP-43 プロテオパチーの細胞病理学的な多くの特徴を再現する。

次に RRM1 ドメインのシステイン残基が、全長 TDP-43 のコンフォメーション維持にいかなる役割を果たすかについて検討した。カルボキシル末端に EGFP タグを付加させた TDP-43 (TDP43-EGFP) を共焦点レーザー顕微鏡にて解析した所、C173S, C175S の単変異体、C173S/C175S の二重変異体とも著明な核内と細胞質に封入体を形成した。さらに核移行シ

グナルをアミノ酸置換させた NLS 変異体 (mNLS) は細胞質内に 1 ~ 2 個の round inclusion を形成し、これらはユビキチン (K28) 陽性、リン酸化 TDP-43 (409/410) 抗体陽性で ALS における Lewy 小体様封入体 (LBHI) に類似するものであった。さらにこれら変異体 (CS 変異体) は以下のような病的現象を示した (図 4a)。

- a) 野生型に比し、オリゴマー形成能が高かった。
- b) CFTR mRNA のスプライシング能が低下していた。
- c) 細胞質封入体は核内の野生型 TDP-43 の細胞質への異所性局在を促進し、封入体へ共存させた。
- d) TDP-43 がスプライシングを行う CFTR RNA の効率低下していた。
- e) 家族性 ALS で同定された TDP-43 突然変異体 (A315T, Q331K) は細胞への遺伝子導入させても変異のみでは野生型の過剰発現と比べ形態上明らかな変化は認めない。ところがこれら FALS 変異に C173C, C175S などの RRM1 変異体を導入すると両者の凝集体形成能に著明な差が生じた (図 4b)。
- f) 細胞質型の CS 変異体は細胞死アッセイによって、運動ニューロン細胞株 NSC34 に対して毒性を示した (図 4c)。



(5) A315T TDP-43 トランスジェニックマウスは ALS の表現型を示さず、致死性消化器系障害を呈する。

2009 年 PNAS 誌で報告された A315T 変異 TDP-43 をプリオンプロモーター下に発現させたマウスを購入、繁殖した。Tg ヘテロ雄と

nonTg C57Bl/6 雌を 2 対購入した。後輩は極めて困難で、出生しても雄は 4 週間で死亡雌は 90 日で死亡した。生存期間中四肢麻痺は明らかでなく、脊髄の病理解析でも運動ニューロン死や細胞内封入体は認めなかった。大腸の拡大が著明でイレウスによる死亡が疑われた。

(6) ミスフォールド型 TDP-43 における認識配列の同定と同部位に対するマウスモノクローナル抗体の作製、並びに scFv の作製。RRM2 に存在する D246 が細胞質型、凝集型の TDP-43、ALS 患者切片で認分子外露出していることを、同部位に対するモノクローナル抗体によって示した。さらにハイブリドーマから導光体の VH, VL の配列をクローニングし細胞内抗体のコンストラクションを行った。

(7) 子宮内エレクトロポレーション法によって胎児脳に発現させた RRM1 GS 変異体は ALS 組織で認める TDP-43 の凝集体を形成し、ALS の病態モデルとなりうる。

TDP-43 トランスジェニックマウスが ALS モデルとなりえないことが判明したため、我々はあらたな in vivo モデルの構築を子宮内エレクトロポレーション法にて試みた。妊娠 12 日目マウスの子宮内胎児側脳室に TDP43-EGFP 発現プラスミドを先細りピペットを用いて注入したのち子宮壁を電極で挟んで通電し、母体に戻して妊娠を継続させた(図 6)。

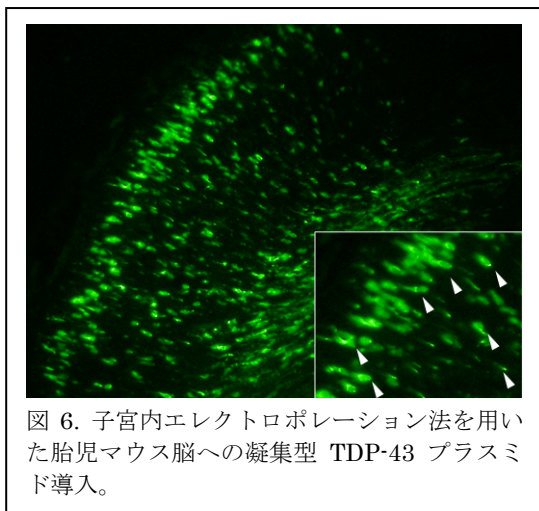


図 6. 子宮内エレクトロポレーション法を用いた胎児マウス脳への凝集型 TDP-43 プラスミド導入。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1) Morimura T, Numata Y, Nakamura S, Hirano E, Gotoh L, Goto YI, Urushitani M, Inoue K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. *Exp Biol Med* 2014, in press

2) Oono M, Okado-Matsumoto A, Shodai A, Ido A, Ohta Y, Abe K, Ayaki T, Ito H, Takahashi

R, Taniguchi N, Urushitani M. Transglutaminase 2 accelerates neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis through interaction with misfolded superoxide dismutase 1. *J Neurochem* 2014, 128 403-418

3) Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S, Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, Takahashi R, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M. Aberrant assembly of RNA-recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43). *J Biol Chem* 2013, 288, 21, 14886-14905.

4) Shodai A, Ido A, Fujiwara N, Ayaki T, Morimura T, Oono M, Uchida T, Takahashi R, Ito H, Urushitani M. Conserved Acidic Amino Acid Residues in a Second RNA Recognition Motif Regulate Assembly and Function of TDP-43. *PLoS ONE* 2012, 7, e52776

5) Tashiro Y, Urushitani M, Inoue H, Koike M, Uchiyama Y, Komatsu M, Tanaka K, Yamazaki M, Abe M, Misawa H, Sakimura K, Ito H, Takahashi R. Motor Neuron-specific Disruption of Proteasomes, but not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem*, 2012, 287, 42984-4299

6) Ido A, Fukuyama H, Urushitani M. Protein misdirection inside and outside motor neurons in ALS: a possible clue for therapeutic strategies. *Int J Mol Sci* 2011, 12, 6980-7003

7) Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto A, Takahashi R, Ito H. An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology*, 2011, 77, 1995-1997

8) Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, Urushitani M, Oono M, Kawamoto Y, Yamashita H, Shimohama S, Kato S, Hirano A, Tomimoto H, Ito H, Takahashi R. Colocalization of 14-3-3 Proteins with SOD1 in Lewy Body-Like Hyaline Inclusions in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Cases and the Animal Model. *PLoS ONE* 2011, 6, e20427

9) Yanagisawa D, Amatsubo T, Morikawa S, Taguchi H, Urushitani M, Shirai N, Hirao

K, Shiino A, Inubushi T, Tooyama I. In vivo detection of amyloid β deposition using (19)F magnetic resonance imaging with a (19)F-containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2011, 16, 184:120-127

10) 守村敏史, 高橋良輔, 漆谷 真. ミスfolded蛋白質による神経細胞死と治療戦略. 遺伝子医学 MOOK 別冊「細胞死研究の今-疾患との関わり、創薬に向けてのアプローチ」. 2013, 44-51

11) 漆谷 真. 変異 SOD1 タンパク質によるALSの病態機序. 脳 21「筋萎縮性側索硬化症(ALS)の基礎研究」. 2012, 15; 9-15

12) 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症の免疫療法. 炎症と免疫「神経免疫の新展開」. 11月号, 2011, 19; 557-563

13) 大野美樹, 漆谷 真. 神経変性疾患に対する免疫療法の現状. 細胞工学「脳内免疫システム」. 10月号, 2011, 30; 1054-1059

[学会発表] (計 9件)

1) 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症の病態に即した抗体医療戦略. 第 22 回日本 Cell death 学会 学術集会シンポジウム. 2013 年 7 月. 京都

2) 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症に対する抗体医療研究の現状. 第 18 回 日本神経感染症学会総会学術集会シンポジウム. 2013 年 10 月. 宮崎

3) 漆谷 真. 「筋萎縮性側索硬化症の抗体療法」第 52 回 日本神経学会学術集会 シンポジウム; 神経変性疾患における抗体療法 2011 年 5 月 名古屋

4) Urushitani M. 7th ALS Research Forum, ALS Society of Canada, "Molecular targeting strategies against misfolded proteins in ALS". 2011 年 5 月 Toronto, Canada

5) 漆谷 真, 小代 明美, 綾木 孝, 藤原 範子, 伊東 秀文. TDP-43 の核外脱出シグナル内に存在する酸性アミノ酸がその構造と機能維持に及ぼす役割について. 第 36 回日本神経科学大会. 2013 年 6 月 21 日. 京都

6) 内田司, 井戸明美, 高橋良輔, 漆谷 真. テトラサイクリン誘導性に TDP-43 を発現するヒト神経由来細胞の樹立とその応用. 第 53 回日本神経学会 学術集会. 2012 年 5 月, 東京

7) 大野 美樹, 井戸 明美, 松本 紋子, 谷口

直之, 高橋 良輔, 漆谷 真. ALS モデルマウスにおけるトランスグルタミナーゼ 2 の誘導. 第 34 回日本神経科学大会. 2011 年 9 月 横浜

[図書] (計 2件)

1) 漆谷 真. 「ALS におけるワクチン・抗体療法の開発」アクチュアル脳・神経疾患の臨床『すべてがわかる筋萎縮性側索硬化症・運動ニューロン疾患』辻 省次, 祖父江 元編. 中山書店, 東京, 2013, 275-281.

2) Urushitani M and Morimura T. Molecular Targeted Therapy against Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Symptoms, Treatment and Prognosis*. Ed: Segawa K and Ijichi R, Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, 2012 85-108.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: TDP-43 の凝集体が蓄積する疾患を治療及び/又は予防するための化合物のスクリーニング方法

発明者: 漆谷真、藤原範子、北原 亮、伊東秀文

権利者: 滋賀医科大学、兵庫医科大学、立命館大学

種類:

番号: 特願 2013-046451

出願年月日: 平成 25 年 3 月 8 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表

漆谷 真 (URUSHITANI MAKOTO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 60332326

(2) 研究分担者

北原 亮 (KITAHARA RYO)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号: 70512284

(3) 連携研究者

伊東秀文 (ITO HIDEFUMI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 20250061