

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791006

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症におけるTDP-43陽性封入体の部位別神経変性機序の検討

研究課題名(英文) Study of regionally different pathomechanism in TDP-43-positive inclusions of amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

中村 正孝 (NAKAMURA, Masataka)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：80575142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の下位運動神経細胞のTDP-43陽性封入体には、pSmad2/3とSmurf2の免疫反応を認めたが、Betz細胞や海馬顆粒細胞などの脳内におけるTDP-43陽性封入体には、これらの免疫反応は認められなかった。この結果から、部位により封入体形成過程や神経変性が異なることが推測された。次に細胞モデルを用いてTGF-β/SmadシグナルとTDP-43凝集体形成との関連について検討したところ、シグナルの賦活によりTDP-43凝集体形成が抑制された。ALSにおける治療法の開発においてTGF-β/Smadシグナルが重要なターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：TDP-43-positive inclusions in lower motor neurones of sporadic Amyotrophic lateral sclerosis (SALS) patients were immunopositive for Smurf2 and pSmad2/3. In contrast, TDP-43-positive inclusions in the extramotor neurones in the brain of SALS patients were noticeably negative for Smurf2 and pSmad2/3. These results demonstrated that the composition of the TDP-43 inclusions is regionally distinct, suggesting different underlying pathogenic processes. We replicated cytoplasmic aggregates of TDP-43 in HEK293T cells by transfecting the cells with a nuclear localization signal deletion mutant of TDP-43 and inhibiting proteasome activity. Overexpression of Smad2 reduced the amount of cytoplasmic aggregates in HEK293T cells, and TGF beta stimulation augmented this reduction effect in a dose-dependent manner. Our results suggest that activation of TGF beta/Smad signaling system may be a potential therapeutic approach to delay the progression of ALS.

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：ALS TDP-43 pSmad2/3 Smurf2 TGF-beta

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動神経細胞が選択的にかつ進行性に変性・消失していく原因不明の疾患である。また、前頭側頭葉変性症(FTLD)は、前頭葉と側頭葉に進行性の変性を呈する認知症性神経変性疾患である。これらの疾患にはユビキチン陽性の細胞質内封入体の特異的に出現することが知られていたが、その主要構成成分である蛋白質は長い間不明であった。2006年にこれらの主要構成成分として、DNA/RNA binding proteinである TAR DNA binding protein-43(TDP-43)が同定された(Neumann, et al. Science 314; 130-133, 2006. Arai, et al. Biochem Biophys Res Commun 351; 602-611, 2006)。しかし脳内に認められる封入体には TDP-43 の C 末断片が豊富に存在しているが、N 末断片は少ない。一方脊髄に認められる封入体では、C 末断片も N 末断片も認められることから、同じ TDP-43 陽性封入体でも変性部位により、異なる変性機序が存在することが推測される

2. 研究の目的

(1) TDP-43 陽性封入体の部位別の変性機序の解明

孤発性 ALS の脊髄前角細胞のユビキチン陽性 TDP-43 陽性細胞質内封入体に TGF-beta の主要なシグナル因子であるリン酸化 Smad2/3(pSmad2/3)が存在することを報告した(Nakamura M et al. Acta Neuropathologica, 2008)。このことから ALS では TGF-beta-Smad シグナル伝達障害が起こっている可能性を見いだした。アルツハイマー病のリン酸化タウ陽性細胞質内封入体である神経原線維変化にも pSmad2/3 が蓄積することが報告されている。いままでの報告から、AD と ALS には核細胞質間輸送障害と pSmad2/3 の観点から同様の変性機序が生じている可能性が推測される。しかし、認知症を伴う ALS(ALS-D)や FTLD-U に認められる前頭葉や側頭葉の TDP-43 陽性封入体の見られる細胞ではこれらの検討はまだ行っていない。

同一症例においても、脊髄と大脳皮質の神経細胞に存在する TDP-43 陽性封入体の TDP-43 断片化の構成成分は異なることから、pSmad2/3 の染色性が脊髄と大脳皮質では異なる可能性があるかと仮定した。本研究ではまず Smad2/3 とその E3 リガーゼである Smurf2 に関して、ALS の様々な部位における TDP-43 陽性封入体での免疫反応を検討するために免疫組織化学的検討を行った。

(2) TGF-beta/Smad シグナルと TDP-43 凝集体形成との関連についての解析

TDP-43 の核移行シグナル(NLS)を変異あるいは欠損させた発現プラスミドを培養細胞に導入し、72 時間後に観察すると、細胞質に TDP-43 の凝集体が観察され、その凝集体はリン酸化を受けていることが報告されていたことから(Winton MJ, et al. J Biol Chem 2008, Nonaka, et al. FEBS Lett, 2009) この細胞モデルを用いて TGF-beta/Smad シグナルの賦活に応じて TDP-43 凝集体形成が影響を受けるか否か検討をおこなった。

3. 研究の方法

(1) TDP-43 陽性封入体の部位別の変性機序の解明

対象

孤発性 ALS 患者 13 例
正常対象者 9 例

ホルマリン固定、パラフィン包埋された腰髄、運動野、基底核、海馬切片を用いて、以下の一次抗体を用いて免疫染色を行った。

一次抗体:

Smurf2 (sc-25511; Santa Cruz)
pSmad2/3 (sc-11769R; Santa Cruz)
pTDP-43 (pS409/410; Cosmo Bio CO)
TDP-43 (10782-2-AP; ProteinTec Group.)
N-terminal (3-12) TDP-43
(TIP-TD-P07; Cosmo Bio CO.)
C-terminal (405-414) TDP-43
(TIP-TD-P09; Cosmo Bio CO.)
Ubiquitin (u-5379; SIGMA)

(2) TGF-beta/Smad シグナルと TDP-43 凝集体形成との関連についての解析

発現 プラスミド

pcDNA3-TDP-43 (WT)
pcDNA3-HA-TDP-43 (WT)
pcDNA3- NLS-TDP-43 (82-84 KRK AAA)
pcDNA3-HA- NLS-TDP-43 (82-84 KRK AAA)
pcDNA3-Flag-Smad2
pRK-TGF-beta type1 receptor constitutive active (TGFGA)
pRK-TGF-beta type1 receptor dominant negative (TGFDN)
pcDNA3.1-Flag-Ub

発現プラスミドを HEK293T 細胞に発現させ、プロテアソーム阻害剤である MG132 (10 μM, last 16 hours) の非存在下あるいは存在下で 72 時間培養後に、以下の抗体を用いて免疫染色あるいはウエスタンブロッティング

を行った。

抗体

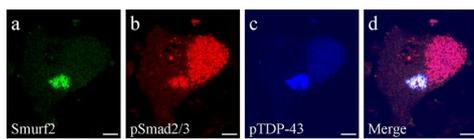
- TDP-43 (10782-1-AP, Protein Tech Group)
- pTDP-43(pS409/410, Cosmo Bio)
- pSmad2 (#3101, Cell Signaling)
- Ubiquitin (Ub) (#8017, Santa Cruz)
- Flag antibody (F3135, SIGMA)
- p62 antibody (61082, BD transduction)
- LC3 antibody (PM036, MBL)
- 試薬
- Recombinant human TGF-beta1 (TGF-beta1) (R&D systems)
- TGF-beta receptor1 kinase inhibitor (TGF-beta R1 KI) (Calbiochem)

4. 研究成果

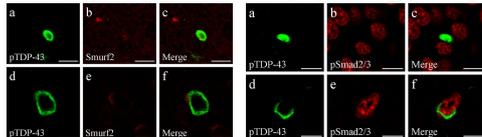
(1) TDP-43 陽性封入体の部位別の変性機序の解明

ALS の脊髄前角細胞と延髄舌下神経細胞の TDP-43 陽性封入体には、pSmad2/3 と Smurf2 の免疫反応を認めたが、Betz 細胞や海馬顆粒細胞などの脳内における TDP-43 陽性封入体には、これらの免疫反応は認められなかった。このことから、ALS では部位により、封入体形成過程や神経変性が異なることが推測された。

脊髄前角細胞の TDP-43 陽性封入体



海馬顆粒細胞の TDP-43 陽性封入体

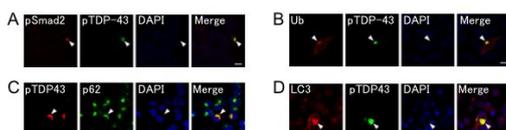


(2) TGF-beta/Smad シグナルと TDP-43

凝集体形成との関連についての解析

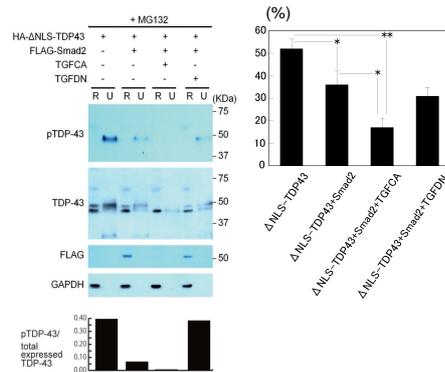
WT-TDP-43 の発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションすると、その発現は核に認められたがプロテアソームを阻害しても凝集体は認めなかった。

NLS-TDP-43 の発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションすると、細胞質に TDP-43 の発現を認め、プロテアソーム阻害下では細胞質内に凝集体が形成され、これらの凝集体は pTDP-43, pSmad2, Ub, p62, LC3 抗体に陽性であった。



NLS-TDP-43 と Smad2 の発現プラスミドを共発現させると、不溶性画分の pTDP-43 と、可溶性画分の TDP-43 の発現量は減少した。その減少効果は、Smad2 に加えて TGFCa も共発現させると増大した。TGFCa の代わりに、TGFDN を共発現させるとその減少効果は消失した。

細胞質に凝集体を持つ細胞の割合も、NLS-TDP-43 と Smad2 を共発現させると約 35% 減少し、その上 TGFCa を加えると約 70% 減少した。



培養細胞内に形成された凝集体は、pTDP-43, Ub, pSmad2 抗体に陽性を示した。このことから ALS にみられる封入体と非常によく似た TDP-43 凝集体が培養細胞内で再現された。凝集体は p62 や LC3 抗体にも陽性反応を示したことから、プロテアソーム阻害下で凝集体の分解にオートファジーが関わっていたと考えられた。TGF-beta/Smad シグナルはオートファジーを活性化することが報告されている。TGF-beta/Smad シグナルの賦活は、細胞内で障害された TGF-beta/Smad シグナルを増大させ、オートファジーを活性化したのかもしれない。TGF-beta/Smad シグナルの賦活は、TDP-43 凝集体形成を抑制したことから、ALS における治療法の開発において TGF-beta/Smad シグナルが重要なターゲットとなる可能性が示唆された。

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 2 件)

Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Jiang S, Fujita K, Wate R, Nakano S, Fujisawa J-I, Kusaka H. Activation of Transforming Growth Factor-β/Smad Signaling Reduces Aggregate Formation of Mislocalized TAR DNA-Binding Protein-43. Neuro-degenerative Diseases 11(4):182-193 doi: 10.1159/000338151. 2013/07

Nakamura M, Kaneko S, Wate R, Asayama S, Nakamura Y, Fujita K, Ito H, Kusaka H. Regionally different immunoreactivity for Smurf2 and pSmad2/3 in TDP-43-positive inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology* 39(2):144-156 DOI: 10.1111/j.1365-2990.2012.01270.x. 2013/02

〔学会発表〕(計 4 件)

Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Fujisawa J-I, Kusaka H. Activation of Transforming Growth Factor- beta/Smad Signaling Reduces Aggregate Formation Of Mislocalized TAR DNA binding protein-43. 24th international symposium on ALS/MND (Milan, Italy) 2013.12.5-7

中村正孝, 金子鋭, 藤田賢吾, 和手麗香, 中野智, 藤澤順一, 伊東秀文, 日下博文 TGF- /Smad シグナルによる TDP-43 凝集抑制効果の検討 第 54 回に本神経学会総会(東京) 2013.5.30

Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Fujisawa J-I, Kusaka H. Activation of Transforming Growth Factor- beta/Smad Signaling Reduces Aggregate Formation Of Mislocalized TAR DNA binding protein-43. 64th Annual meeting of the American Academy of Neurology (New Orleans, USA) 2012.4.21-28

Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Asayama S, Nishii M, Fujita K, Wate R, Kusaka H. Smurf2 accumulates in TDP-43 positive cytoplasmic inclusions in spinal cord but not in hippocampus of sporadic ALS. 87th Annual Meeting of the American Association of Neuropathologists. (Seattle, USA) 2011.6.23-26

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 正孝 (NAKAMURA Masataka)

関西医科大学 医学部 助教

研究者番号 : 80575142