

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300122

研究課題名(和文) TDP-43の発現量制御機構の解明とALSリスクの探索

研究課題名(英文) Analyses of regulatory mechanisms of TDP-43 level and risk factor of ALS

研究代表者

岡野 ジェイムス洋尚 (Okano, Hirotaka James)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90338020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は生化学的、細胞生物学的視点からTDP-43遺伝子の発現変化をはじめとするALS早期発見マーカーを考察し、ALSモデルマウスを用いて検証することを目的としている。変異型TDP-43遺伝子をノックインした2ラインの遺伝子改変マウスは、遅発性に上下肢運動能低下を呈し、下位運動ニューロンの脱落が顕著である。このマウスの末梢血において、神経症状発症前からTDP-43機能不全に伴うRNA代謝異常が起こっていることを明らかにした。また、同マウス脊髄由来神経-グリア共培養系を用いて、運動ニューロンに直接接するアストロサイトにおいて変異型TDP-43の発現量が高いことが示された。

研究成果の概要(英文)：TDP-43 gene has been identified as a causative gene of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Two types of mutant TDP-43 knock-in (mTDP-43 KI) mice with mutations in different sites of the gene were generated to investigate the biological effects of each mutation. Considerable phenotypes were observed in mTDP-43 KI mice: poor weight gain and loss of spinal motor neurons, which is related to ALS symptoms. By Exon Array and RT-PCR, defects of RNA metabolism following TDP-43 dysfunction were detected in the mononuclear cells from peripheral blood of KI mice. Furthermore, up-regulation of mutant TDP-43 was detected in astrocytes adjacent to motor neurons from KI mice. Our results, referencing TDP-43 mutations, will provide new insights into the pathophysiology of ALS.

研究分野：分子神経化学

キーワード：ALS TDP-43 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ALSは50代~60代を中心とした成人の呼吸機能を含む運動機能を全廃に至らしめる最も悲惨な神経疾患の一つである。患者数は2008年には8,285人(厚生労働省 特定疾患医療受給者証交付数より推定)に達しており、今なお年間300人のペースで増加の一途をたどっている。現在のところ有効な治療法は皆無であり、この悲惨な疾患に対する新規治療法の開発は急務である。ALS発症に至る分子メカニズムの全容は明らかでないが、ALS患者の運動ニューロンにみられる不溶性の構造物である封入体がこの疾患の病態生理と密接に関連すると考えられてきた。近年、封入体の構成要素としてRNA結合タンパク質TDP-43が同定された(Arai et al. 2006)。また、複数の優性遺伝性ALS家系と一部の孤発性ALSおよびFTLD症例においてTDP-43遺伝子の点突然変異が発見された(Kabashi et al. 2007)。さらに、我々が作成したヒト変異型TDP-43遺伝子ノックイン(KI)マウスが、加齢に伴ってALS様運動機能障害を発症することがわかり(慶應大岡野栄之教授との共同研究・未発表)、TDP-43がALSの発症に関わる責任因子の一つであることがほぼ明白となった。しかし、運動ニューロンの細胞死を引き起こす機序としてTDP-43の核内機能の低下が原因なのか、それとも細胞質における毒性の獲得が原因なのか未だに不明である。さらに大多数の孤発性ALS症例において遺伝子変異がないにもかかわらずTDP-43を含む封入体が発現し、運動ニューロンが死滅する病態メカニズムは全くわかっていない。最近、ヒト野生型TDP-43遺伝子を神経細胞特異的に過剰発現した遺伝子改変マウスの運動ニューロンにはTDP-43陽性封入体が発現し、マウス個体は生後1ヶ月以内に運動ニューロンの死滅によるALS様症状で死亡することが示された(Wils et al. 2010)。ALS患者の神経系に特異的にみられるN末端を欠いた断片化TDP-43が病状の進行と平行して増加しており、断片化TDP-43が細胞質に移行して封入体を形成することが細胞死の原因ではないかと疑われている。これらの知見は、細胞内のTDP-43タンパク質のレベルが過剰になると封入体形成および細胞死を引き起こすリスクとなる可能性を強く示唆している。つまり、もし何らかの原因でTDP-43タンパク質レベルを制御する生理機構が破綻することがあるなら、ALS発症の基点となりうると予測される。

2. 研究の目的

本計画では生化学的、細胞生物学的視点からTDP-43遺伝子の発現量変化をはじめとするALS関連リスクを考察し、ALSモデルマウスを用いて検証することを目的としている。これまでに作成した変異型TDP-43遺伝子をノックインした2ラインの遺伝子改変マウス(G348C型変異、A382T型変異)を用

いてTDP-43の発現調節機構およびTDP-43機能不全に伴うRNA代謝異常を明らかにする。両ラインとも生後7ヶ月までは正常であるが、その後体重減少に引き続き11ヶ月になると上下肢運動能の低下が顕著になり、ヒトのALS症例と類似した経過をたどることから、リスクファクターの解析に適していると考えられる。RNA代謝異常の概念に着目し、本モデル動物を用いてALSの診断の遅れを改善するバイオマーカー候補因子の抽出を行うとともに、ノックインマウス由来培養細胞を用いて神経機能解析およびTDP-43の発現解析を行う。

3. 研究の方法

我々が作製した変異型TDP-43ノックインマウスは、ヒト変異型TDP-43(A382TまたはG348Cの2系統)にVenusを融合させた遺伝子をノックインしており、生後7ヶ月頃より遅発性の運動機能障害を呈し、下位運動ニューロンの脱落が顕著である。さらに病理学的にALSに特徴的なBunina小体が下位運動ニューロンの細胞質にて検出された。本研究では、ALS患者の遺伝子型と同様に、変異型TDP-43と正常型TDP-43の両方の対立遺伝子を有するマウスを用いて解析を行った。

(1) TDP-43は標的RNAのスプライシング調節などを行うRNA結合蛋白質であり、ALS患者の運動ニューロンにおいて異常局在を示すことが報告されている。変異型TDP-43ノックインマウスは遅発性の運動機能障害を示すことから、症状の進行時期を反映したバイオマーカー検索が可能である。そこで、変異型TDP-43に起因するRNA代謝異常を運動機能障害発症の前に末梢血中で捉えることによりALSの新規バイオマーカーの探索を行った。Exon Arrayおよび定量的RT-PCR法を用いた。

(2) ヒト野生型および変異型TDP-43・GFP融合遺伝子を培養細胞に過剰発現させてタイムラプスイメージングにより封入体の形成過程を解析した。また、ノックインマウスの胎児より脊髄を分散培養し、神経-グリアの共培養を行った。蛍光免疫染色を行い、運動ニューロンおよびグリア細胞マーカーの発現確認を行った。運動ニューロンを生きのまま可視化するため、運動ニューロン特異的に発現するHB9プロモーターの下流にmCherryを融合させたHB9::mCherryレポーター遺伝子を作製し、レンチウイルスを用いて導入した。HB9陽性運動ニューロンを用いてCaイメージングを行い、運動ニューロンのCa応答機能について検証した。さらに、この共培養系のSMI32陽性運動ニューロンに接するアストロサイト細胞に発現する変異型TDP-43::Venusの蛍光輝度値をイメージングソフトImage Jにより定量化した。

4. 研究成果

(1) totalTDP-43、ヒト変異型TDP-43、マ

ウス TDP-43 の mRNA 量について検討を行った。その結果、2 系統の変異型マウスの末梢白血球内では、内因性 TDP-43 が変異型 TDP-43 による機能低下を補完する機構が症状の発症前から過剰に働いていることが示唆された。また、野生型マウスと変異型マウス間だけでなく、2 系統の変異型マウス間を比較しても TDP-43 の RNA 代謝が若年期から異なっていることがわかった。次に、エクソアレイで抽出された候補因子のうち、Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) の RNA 代謝を解析した。NAIP は、ALS と同じ運動ニューロン疾患に属する脊髄性筋萎縮症 (SMA) の患者でスプライシング異常が報告されている。マウス Naip の mRNA 量解析を行ったところ、若年期から有意に 2 系統の変異型マウス間で異なる経過をたどることがわかった。NAIP は単独で ALS の診断バイオマーカーとするには難しいと予想されるが、エクソアレイで抽出された他の候補因子を含めた複数の項目を総合評価すれば RNA 代謝異常を定量的に示すことができると考えられる。この評価法は、患者個々の RNA 代謝解析にも有用であると考えられる。

(2) ヒト野生型および変異型 TDP-43・GFP 融合遺伝子を培養細胞に過剰発現させてタイムラプスイメージングを行ったところ、変異型導入細胞で TDP-43 が核から細胞質に移動して封入体を形成した後、細胞死が起こることが示された。一部の野生型 TDP-43 導入細胞でも発現量が多いと封入体ができ細胞死に至ることを発見した。

変異型 TDP-43 ノックインマウスの運動ニューロン-グリア細胞共培養系の確立に成功した。なお、この培養系において SMI32 陽性運動ニューロン、GFAP 陽性アストロサイト、Iba1 陽性ミクログリアの存在を確認している。HB9 陽性運動ニューロンについて Ca イメージングを行い、イオノマイシンによる細胞内への強制的な Ca 流入への応答を確認した。このことから、我々が確立した変異型 TDP-43 ノックインマウス由来ニューロン-グリア共培養系では、シグナル伝達が可能な機能的な細胞を用いて評価を行うことができると考えられる。

この共培養系の SMI32 陽性運動ニューロンに接触しない (A)、細胞体に接触する (B)、軸索に接触する (C) アストロサイト細胞に発現する変異型 TDP-43 (A382T)::Venus の蛍光輝度値を定量化したところ、運動ニューロンに接するアストロサイトでは Venus の平均輝度値が高い傾向にあることがわかった (下図 矢印)。

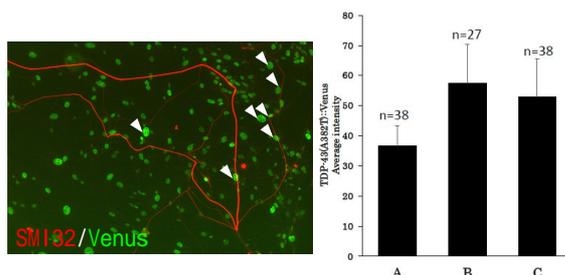


図 SMI32 陽性運動ニューロンの軸索に接するアストロサイト (左) と接触の有無による変異型 TDP-43 (A382T)::Venus の平均輝度値の比較

このことから、運動ニューロンが接するアストロサイトでは、変異型 TDP-43 の発現量が高いことが示唆された。本研究成果により変異型 TDP-43 ノックインマウスを用いた in vitro 解析ツールの確立に成功した。本研究で示した変異型 TDP-43 の発現変化は、神経変性疾患における運動ニューロンの脆弱性の機序に関与している可能性が考えられ、この培養系は今後 ALS のリスクファクター解析に有用となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件)(すべて査読有り)

- Hayashi S, Yano M, Igarashi M, Okano HJ, Okano H. (2015) Alternative role of HuD splicing variants in neuronal differentiation. *J Neurosci Res.* **93**: 399-409. doi: 10.1002/jnr.23496
- Izuhara L, Tatsumi N, Miyagawa S, Iwai S, Watanabe M, Yamanaka S, Katsuoka Y, Nagashima H, Okano HJ, Yokoo T. (2015) Generation of a felinized swine endothelial cell line by expression of feline decay-accelerating factor. *PLoS One.* **10**: e0117682. doi: 10.1371/journal.pone.0117682
- Hikishima K, Ando K, Yano R, Kawai K, Komaki Y, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, Okano H. (2015) Parkinson Disease: Diffusion MR Imaging to Detect Nigrostriatal Pathway Loss in a Marmoset Model Treated with 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Radiology.* **275**: 430-437. doi: 10.1148/radiol.14140601
- Hikishima K, Ando K, Komaki Y, Kawai K, Yano R, Inoue T, Itoh T, Yamada M, Momoshima S, Okano HJ, Okano H. Voxel-based morphometry of the marmoset brain: in vivo detection of volume loss in the substantia nigra of the MPTP-treated Parkinson's disease model. *Neuroscience.* in press. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.041.
- Sawada K, Hikishima K, Murayama AY, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. (2014) Fetal sulcation and gyrification in common marmosets (*Callithrix jacchus*) obtained by ex vivo magnetic resonance imaging. *Neuroscience.* **257**: 158-174. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013
- Fujioka M, Okamoto Y, Shinden S, Okano HJ, Okano H, Ogawa K, Matsunaga T. (2014)

- Pharmacological inhibition of cochlear mitochondrial respiratory chain induces secondary inflammation in the lateral wall: a potential therapeutic target for sensorineural hearing loss. *PLoS One*. **9**: e90089. doi: 10.1371/journal.pone.0090089
7. Yamada A, Yokoo T, Yokote S, Yamanaka S, Izuhara L, Katsuoka Y, Shimada Y, Shukuya A, Okano HJ, Ohashi T, Ida H. (2014) Comparison of multipotency and molecular profile of MSCs between CKD and healthy rats. *Hum Cell*. **27**: 59-67 doi: 10.1007/s13577-013-0082-7
8. Nakamura S, Igarashi M, Kinoshita M, Okano HJ, Okano H. (2014) Proposing a new RNA quadruplex structure: j-motif, with possible links to neural development. *J Biochem*. **155**: 385-392. doi: 10.1093/jb/mvu013.
9. Zhou Z, Kohda K, Ibata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. (2014) Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. *Mol Brain*. **7**: 24. doi: 10.1186/1756-6606-7-24.
10. Yamanaka S, Yokote S, Yamada A, Katsuoka Y, Izuhara L, Shimada Y, Omura N, Okano HJ, Ohki T, Yokoo T. (2014) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term dialysis patients display downregulation of PCAF expression and poor angiogenesis activation. *PLoS One*. **9**: e102311. doi: 10.1371/journal.pone.0102311
11. Kuwako K, Nishimoto Y, Kawase S, Okano HJ, Okano H. (2014) Cadherin-7 regulates the circuit connectivity of the cerebellar mossy fiber. *Cell Rep*. **9**: 311-323. doi: 10.1016/j.celrep.2014
12. Takemi, M Kondo T, Yoshino-Saito K, Sekiguchi T, Kosugi A, Kasuga S, Okano HJ, Okano H, Ushiba J. (2014) Three-dimensional motion analysis of arm-reaching movements in healthy and hemispinalized common marmosets. *Behav Brain Res*. **275**: 259-268. doi: 10.1016/j.bbr.2014.09.020
13. Hikishima K, Sawada K, Murayama AY, Komaki Y, Kawai K, Sato N, Inoue T, Itoh T, Momoshima S, Iriki A, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. (2013) Atlas of the developing brain of the marmoset monkey constructed using magnetic resonance histology. *Neuroscience*. **230**: 102-113. doi: 10.1016/j.neuroscience
14. Mizutari K, Fujioka M, Hosoya M, Bramhall N, Okano HJ, Okano H, Edge ASB. (2013) Notch Inhibition Induces Cochlear Hair Cell Regeneration and Recovery of Hearing after Acoustic Trauma. *Neuron*. **77**: 1-12. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.032
15. Imai S, Ikegami D, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T, Narita M. (2013) Epigenetic transcriptional activation of MCP-3 is responsible for long-lasting neuropathic pain. *Brain*. **136**: 828-843. doi: 10.1093/brain/aws330.
16. Nishimoto Y, Okano HJ, Imai T, Poole AJ, Suzuki N, Keirstead HS, Okano H. (2013) Cellular toxicity by 26k-Da fragment and Amyotrophic Lateral Sclerosis-associated mutant forms of TDP-43 in the human embryonic stem cell-derived motor neuron. *Neurol Clin Neurosci*. **1**: 24-31. doi: 10.1002/ncn3.2
17. Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, Suyama S, Kuwako K, Imai T, Murayama S, Suzuki N, Okano H. (2013) The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Brain*. **6**: 31. doi: 10.1186/1756-6606-6-31
18. Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, Eto Y. (2013) Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). *Mol Genet Metab*. **109**: 386-389. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.06.003
19. Seki F, Hikishima K, Nambu S, Okanoya K, Okano HJ, Sasaki E, Miura K, Okano H. (2013) Multidimensional MRI-CT atlas of the naked mole-rat brain. *Front. Neuroanat*. **7**: 1-12. doi: 10.3389/fnana.2013.00045
20. Matsumoto K, Yokoo T, Matsunari H, Iwai S, Yokote S, Teratani T, Gheisari Y, Tsuji O, Okano H, Utsunomiya Y, Hosoya T, Okano HJ, Nagashima H, Kobayashi E. (2012) Xenotransplanted Embryonic Kidney Provides A Niche for Endogenous Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Erythropoietin-Producing Tissue. *Stem Cells*. **30**: 1228-1235. doi: 10.1002/stem.1101.
21. Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, Okano H, Okada Y. (2012) ADAM28 Promotes Carcinoma Cell Metastasis by Digestion of von Willebrand Factor. *J Natl Cancer Inst*. **104**: 906-922. doi: 10.1093/jnci/djs232
22. Imamura M, Okuno H, Tomioka I, Kawamura Y, Lin ZY, Nakajima R, Akamatsu W, Okano HJ, Matsuzaki Y, Sasaki E, Okano H. (2012) Derivation of induced pluripotent stem cells by retroviral gene transduction in Mammalian species. *Methods Mol Biol*. **925**: 21-48. doi:

- 10.1007/978-1-62703-011-3_2.
23. Ince-Dunn G, Okano HJ, Jensen KB, Park WY, Zhong R, Ule J, Mele A, Fak, JJ, Yang C, Zhang C, Yoo J, Okano H, Noebels JL, Darnell RB. (2012) HITS-CLIP reveals nElav (Hu) proteins regulate RNA splicing and abundance to control brain glutamate levels and neuronal excitability. *Neuron*. **75**: 1067-1080. doi: 10.1016/j.neuron
24. Matsuda S, Kuwako K, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, Matsuzaki Y, Akaike A, Sugimoto H, Okano H. (2012) Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis via the transcriptional repression of the Hes5 gene. *J. Neurosci*. **32**: 12543-12557. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956844>
25. Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Yamamizu K, Morita M, Suzuki T, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Narita M. (2012) Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. **7**: e44368. doi: 10.1371/journal.pone.0048480. doi: 10.1371/journal.pone.0044368
26. Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. (2012) Conditions for quantitative evaluation of injured spinal cord by in vivo diffusion tensor imaging and tractography: preclinical longitudinal study in common marmosets. *Neuroimage*. **63**: 1841-1853. doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.08.040
27. Kanzaki S, Fujioka M, Yasuda A, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Ogawa K, Okano H. (2012) Novel *in vivo* imaging analysis of an inner ear drug delivery system in mice: Comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections. *PLoS One*. **7**: e48480. doi: 10.1371/journal.pone.0048480

〔学会発表〕(計5件)

1. Hiroataka James Okano. Impaired axonal transport in Purkinje cells of HuC knockout mice. 2014 11/16. Neuroscience 2014. Washington DC. (USA)
2. 岡野ジェームス洋尚、角元恭子、吉田哲、長谷川実奈美、ロバート・ダーネル、岡野栄之。小脳プルキンエ細胞におけるRNA結合タンパク質HuCの機能。Neuro 2013. 2013年6月21日 国立京都国際会館(京都)
3. 岡野ジェームス洋尚。最新MRI画像技術を用いたマーモセット神経疾患モデルの病態解析。第87回日本薬理学会年会。2014年3月19日 仙台国際センター(仙台)

4. 岡野ジェームス洋尚。小型サル(マーモセット)を使った再生医療研究と疾患モデル作出について。日本化学会第94回春季年会。2014年3月29日 名古屋大学東山キャンパス(名古屋)
5. Hiroataka James Okano. Function of Neuronal Elav-like (Hu) Proteins in Embryonic and Adult Brain. BRI International Symposium 2013: RNA World in Brain. July 28 2013. Niigata University. (Niigata)

〔図書〕(計2件)

1. 岡野ジェームス洋尚。株式会社メディカルドゥ。遺伝子医学 MOOK 26号「脳内環境—維持機構と破綻がもたらす疾患研究」。2014年、総頁228頁(p48-53)
2. 岡野ジェームス洋尚。医歯薬出版株式会社。神経科学の最前線とリハビリテーション 脳の可塑性と運動、2015年、総頁272頁(p40-44)

〔産業財産権〕

取得状況(計2件)

名称: 筋萎縮性側索硬化症および/または前頭側頭葉変性症モデルマウス
発明者: 岡野栄之 岡野ジェームス洋尚 宮内央子
権利者: 学校法人慶應義塾
種類: 特許
番号: WO2013180214 A1
出願年月日: 2013.5.30
取得年月日: 2013.12.5
国内外の別: 国内

名称: Amyotrophic Lateral Sclerosis and /or Frontotemporal Labar Degeneration Model Mouse
発明者: Hideyuki Okano Hiroataka James Okano Chikako Miyauchi
権利者: Keio University
種類: 特許
番号: PCT/JP2013065029
出願年月日: 2013.5.30
取得年月日: 2015.1.15
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1)研究代表者
岡野ジェームス洋尚 (Hiroataka James Okano)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90338020

(2)研究協力者

原 央子 (Chikako Hara)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40528452