

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860718

研究課題名(和文)小胞体ストレスは運動ニューロン変性において本質的であるか？

研究課題名(英文)Is endoplasmic reticulum stress essential for motor neuron degeneration?

研究代表者

森 麗 (Mori, Akira)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70608877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はTDP-43やFUS/TLSの異常凝集モデルを用いて、小胞体ストレスが運動ニューロン変性に本質的に関与するかを検討した。ALS患者由来iPS細胞から誘導された運動ニューロンにおいて、小胞体ストレス関連分子の一部は変異型FUS/TLS発現細胞で発現が亢進していたものの、すべての変異に共通して挙動した分子は一部であった。一方TDP-43凝集モデルでは、骨格筋内TDP-43凝集が小胞体ストレスを誘導し、組織障害をもたらす可能性が示された。FUSおよびTDP-43凝集モデルはいずれも小胞体ストレスを誘導する可能性があり、ALSの治療ターゲットとして小胞体ストレスの制御が重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether endoplasmic reticulum (ER) stress is essential for motor neuron degeneration in both TDP-43 and FUS/TLS-aggregation models. In motor neurons differentiated from iPS cells derived from ALS patients, some molecules on ER stress pathways were upregulated in mutant FUS/TLS expressing cells. However, only a few molecules were upregulated commonly in all different types of mutant FUS/TLS cells. In TDP-43-aggregation model, it was suggested that sarcoplasmic TDP-43 aggregation induced ER stress and then provided tissue toxicity. In our observations, both FUS/TLS and TDP-43 aggregation might induce ER stress. Therefore, regulation of ER stress pathways would be a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis.

研究分野：運動ニューロン疾患

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 小胞体ストレス 運動ニューロン TDP-43 FUS

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は大脳運動皮質および脳幹部、脊髄前角細胞の運動ニューロンの選択的変性をきたし、今日まで有効な治療法はなく、大部分の患者は呼吸筋麻痺のため3~5年で死に至る。ALSの発症は、多因子によって規定されていると考えられ、その病因として神経栄養因子の枯渇あるいはカルシウム代謝障害、神経炎症、細胞骨格の変化、酸化ストレスなどの関与が推測されている。近年の報告では、小胞体ストレスが家族性ALSの発症に関わっている可能性が示された。小胞体ストレスとは、種々の特異的なシグナル伝達を含む複合的な反応であるが、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる反応を介して、小胞体における蛋白の折りたたみ容量が破綻しないように機能している。しかし小胞体ストレスが遷延すると、ついにはミトコンドリア依存のもしくは非依存的に細胞死に至る。

ALSの大多数は孤発性であるが、残りの10%は家族性の発症であり、そのうちの15~20%はCu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子の点変異によって発症する。我々の検討では、野生型もしくは変異型SOD1を発現させた培養神経細胞では、変異SOD1において、より高頻度に凝集塊が検出された。しかし小胞体関連分解の中心的役割を担うDerlin-1を過剰発現させることにより、これらの凝集塊が有意に減少し、野生型および変異型SOD1とDerlin-1の相互作用が示唆された (Mori et al., Neurochem Int 2011)。

近年の分子遺伝学の進歩に伴って、新規のALSの原因遺伝子が多数同定されてきているが、これらの家族性ALSや大部分を占める孤発性ALSにおいても、病態に小胞体ストレスが関与しているかは未解明のままである。

2. 研究の目的

近年、ALSにおけるユビキチン化封入体の主要な構成成分がTDP-43であると報告され、またTDP-43の遺伝子変異は家族性ALSの原因となることが示された。また、TDP-43と類似の構造を有するFUS/TLSも家族性ALSの原因遺伝子であることが明らかとなった。本研究の目的は、これらのTDP-43やFUS/TLSの異常凝集に焦点を当てたモデルにおいて、小胞体ストレスが細胞変性に本質的に関与するかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) FUS/TLS凝集モデルの作成と小胞体ストレスの関与の解析

野生型FUS/TLSおよび変異型FUS/TLS (R521CおよびR514S、G492Efs)をマウス運動ニューロン様の培養細胞 (NSC-34細胞)

にLopofectamine 2000を用いて遺伝子導入し、48時間後にATF6やBiP、GRP94、Calnexin、Caspase-12、CHOPの蛋白発現についてウェスタンブロット法により解析を行った。またALS患者由来iPS細胞から誘導された運動ニューロンについても、同様の検討を行った。

2) TDP-43凝集生体モデルの作成と小胞体ストレスの関与の解析

骨格筋に特異的に発現する creatine kinase 8 プロモーターにより野生型TDP-43を過剰発現可能なトランスジェニックマウスを作成し、骨格筋線維内TDP-43凝集形成モデルを確立することによって、凝集化TDP-43が実際に生体内で小胞体ストレスを誘導するか、BiPやCalnexin、GRP94、Caspase-12、CHOPの発現を免疫染色により検討した。

4. 研究成果

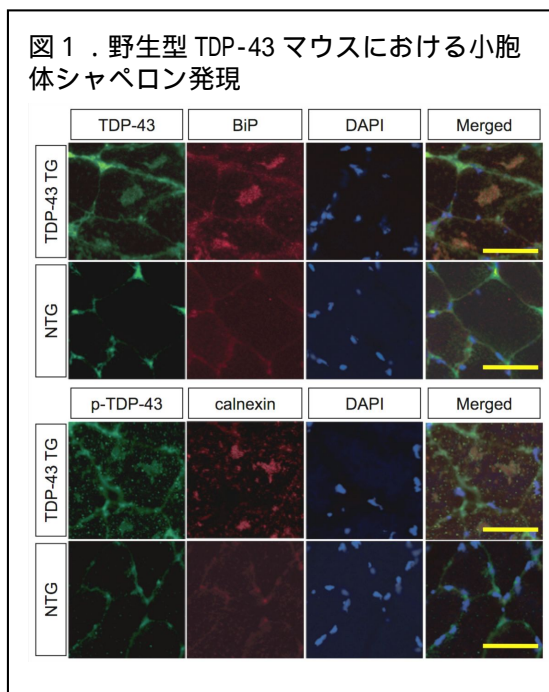
1) 変異FUS/TLSを発現するNSC-34細胞において、BiP、GRP94、Calnexinなどの小胞体シャペロンおよびCaspase-12やCHOPなどの小胞体関連アポトーシス促進分子の発現亢進が見られた。

これらの結果の再現性を確認するためALS患者由来iPS細胞から誘導された運動ニューロンにおいて、同様に各種小胞体ストレス関連パラメーターの蛋白発現を比較した。CalnexinおよびKDEL (小胞体シャペロンの構造) は、R521CおよびR514S、G492Efs変異いずれにおいても、コントロール患者より高い発現量を示した。しかしBiPの発現は、R514S変異を有する運動ニューロンでコントロール患者より高い傾向を示したが、R521CやG492Efs変異ではコントロール患者と同等あるいはそれ以下の発現量であった。またCHOPについても、R514SおよびG492Efs変異では発現亢進していたが、R521Cではその傾向は明らかではなかった。小胞体ストレス時の転写亢進に関わる活性型ATF6 p50についても、R514S変異では発現亢進が示唆される一方、R521CおよびG492Efs変異ではむしろ低下していた。

2) 野生型TDP-43マウスでは生後36週以降に経時的に体重が減少し、生化学的にCKやLD、ASTなどの筋逸脱酵素の上昇を認めた。また病理学的に筋線維内に空胞を形成し、TDP-43陽性の筋形質内凝集を認めた。これらの凝集をレーザーマイクロダイセクションにより摘出し、LC-MS/MSにより網羅的に凝集に含まれる蛋白解析を行ったところ、小胞体や細胞質に局在する分子シャペロンや蛋白品質管理に関与する蛋白発現の増加が見られた。免疫染色では、TDP-43陽性筋形質内凝集はBiP、Calnexinなどの小胞体シャペロンと共局在し (図1)、変性筋の筋核ではCHOPの発現がみられ、小胞体

関連アポトーシスが誘導されている可能性が考えられた。

図1. 野生型 TDP-43 マウスにおける小胞体シャペロン発現



< 考察 >

ALS 患者由来 iPS 細胞から誘導された運動ニューロンにおいて、小胞体シャペロン、小胞体ストレス関連転写因子、アポトーシス分子の一部は変異型 FUS/TLS 発現細胞で発現が亢進していたものの、すべての変異に共通して変化した分子は一部であり、十分な再現性が確認された結果は導き出せなかった。可能性として、非 SOD1 変異の家族性 ALS における小胞体ストレスの関与が乏しい可能性もあるが、疾患 iPS 細胞作成に当たったのクローンごとの特性、あるいは運動ニューロンへの分化条件など iPS 細胞を用いた実験の限界についても考慮する必要がある。

一方、骨格筋における TDP-43 凝集は小胞体ストレスを誘導することによって、組織障害をもたらす可能性が示された。本研究では解析の容易さから骨格筋における TDP-43 凝集モデルを作成したが、同様に運動ニューロンにおいても TDP-43 凝集が小胞体ストレスを誘導するか検討を加える必要がある。本研究の成果として、FUS/TLS および TDP-43 凝集モデルはいずれも小胞体ストレスを誘導する可能性があり、ALS の治療ターゲットとして小胞体ストレスの制御が重要と考えられた。

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. Uchino M., Yamashita S., Uchino K., Mori A., Hara A., Suga T., Hirahara T., Koide T., Kimura E., Yamashita T., Ueda A., Kurisaki R., Suzuki J., Honda S., Maeda Y., and Hirano T. Muscle biopsy findings predictive of malignancy in rare infiltrative dermatomyositis. **Clin. Neurol. Neurosurg.** 115, 603-606 (2013). 査読有 DOI: 10.1016/j.clineuro.2012.07.019.
2. Yamashita S., Fujimoto A., Mori A., Hirahara T., Mori A., Hirano T., Maeda Y., Uchino M., & Ando Y. Coexistence of amyotrophic lateral sclerosis and myasthenia gravis. **J. Neuromusc. Dis.**, 1, 111-115 (2014). 査読有 DOI: 10.3233/JND-140007
3. Nakahara K., Ueda M., Yamada K., Koide T., Yoshimochi G., Funayama M., Kim JH., Yamakawa S., Mori A., Misumi Y., Uyama E., Hattori N., Ando Y. Juvenile-onset parkinsonism with digenic parkin and PINK1 mutations treated with subthalamic nucleus stimulation at 45 years after disease onset. **J. Neurol. Sci.**, 345, 276-277 (2014). 査読有 DOI: 10.1016/j.jns.2014.07.053.
4. Yamashita S., Mori A., Nishida Y., Kurisaki R., Tawara N., Nishikami T., Misumi Y., Ueyama H., Imamura S., Higuchi Y., Hashiguchi A., Higuchi I., Morishita S., Yoshimura J., Uchino M., Takashima H., Tsuji S., Ando Y. Clinicopathological features of the first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a *MATR3* mutation. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, 41, 391-398 (2015). 査読有 DOI: 10.1111/nan.12179.
5. Mori A., Yamashita S., Nakajima M., Hori H., Tawara A., Matsuo Y., Misumi Y., Ando Y. CMAP decrement as a potential diagnostic marker for ALS. **Acta Neurol. Scand.**, in press, (2016). 査読有 DOI: 10.1111/ane.12510.

[学会発表] (計 3 件)

1. 西上朋、山下賢、俵望、森麗、西田泰斗、内野克尚、永利聡仁、栗崎玲一、中西俊人、堀寛子、平原智雄、渡邊聖樹、上山秀嗣、山下太郎、前田寧、安東由喜雄。アジア初の声帯および咽頭麻痺を伴う遠位型ミオパチー (MPD2/VCPDM) の 1 家系 2 症例に関する多角的

- 検討. 第 55 回日本神経学会総会, May 24, 2014, 福岡 (ポスター)
2. 森麗、山下賢、堀寛子、俵明恵、中原圭一、高松孝太郎、三隅洋平、安東由喜雄. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 診断における反復刺激試験の有用性の検討. 第 55 回日本神経学会総会, May 21, 2014, 福岡 (ポスター)
 3. Tomo Nishikami, Satoshi Yamashita, Nozomu Tawara, Akira Mori, Hiroko Hori, Tomoo Hirahara, Yasushi Maeda, Yukio Ando. The first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a MATR3 mutation. 19th International Congress of the World Muscle Society, Oct 8, 2014, Tharersaal, Berlin, Germany

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 麗 (MORI Akira)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療
医師

研究者番号 : 70608877

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

江良択実 (ERA Takumi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号 : 00273706