

## 神経難病 ALS で TDP-43 タンパク質が凝集する 2つのメカニズムを発見

名古屋大学環境医学研究所/医学系研究科の渡邊征爾助教、山中宏二教授らの研究グループは、同医学系研究科の勝野雅央教授らとの共同研究により、神経難病 ALS（筋萎縮性側索硬化症）の病巣に異常凝集する TDP-43<sup>(注1)</sup> タンパク質の凝集過程が独立した2つのメカニズムによって引き起こされていることを発見しました。

ALS は大脳や脊髄にある運動神経細胞に原因不明の細胞死が起こり、全身の筋肉の麻痺や萎縮を生じる神経難病です。ALS の運動神経細胞では、TDP-43 と呼ばれるタンパク質が、細胞の核から細胞質へと漏出して凝集体を形成します。TDP-43 の機能は神経細胞にとって非常に重要であり、異常な凝集体の形成が ALS の運動神経細胞死につながる重要な原因であると考えられています。しかし、その TDP-43 凝集体がどのような過程を経て形成されるかは未解明でした。

そこで、研究チームは TDP-43 に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合して発現する培養細胞と ALS の一部を占める遺伝性 ALS の原因遺伝子変異 20 種類を組み合わせ、どのような遺伝子の異常が TDP-43 の凝集体形成を引き起こすのか調べました。

その結果、ALS 原因遺伝子のなかで、(1) 微小管に結合するタンパク質をコードする遺伝子群（微小管関連タンパク質: MRP）、(2) RNA に結合するタンパク質をコードする遺伝子群（RNA 結合タンパク質: RBP）が TDP-43 の凝集体形成に深く関わっていることを見出しました。そして、MRP では微小管依存的なアグリソーム<sup>(注2)</sup> 形成依存的に、RBP では液-液相分離<sup>(注3)</sup> 依存的に TDP-43 が凝集し、これら2つの凝集体形成メカニズムは互いに独立していました。さらに、ALS の剖検脊髄でアグリソーム形成のマーカー分子である HDAC6<sup>(注4)</sup> が、繊維状に TDP-43 が凝集しているスケイン様封入体と呼ばれる凝集体に存在し、アグリソーム形成依存的に凝集することが考えられました。したがって、ALS における TDP-43 凝集体の形態が、その形成メカニズムを示唆するものと考えられます。

今後、本研究で用いたスクリーニング系を用いた TDP-43 の凝集体形成阻害剤の探索や MRP・RBP それぞれの凝集メカニズムに対応した治療法の開発が可能になると期待されます。本研究成果は、国際科学誌 *Cell Death & Disease* に掲載されました（2020年10月23日）。

## ポイント

- ALS の鍵となる分子 TDP-43 の凝集体形成をスクリーニングする実験系を開発
- TDP-43 が異なる 2 つのメカニズム（液-液相分離・アグリソーム形成）によって、独立して凝集することを解明
- 剖検検体の解析から、TDP-43 凝集体の形態がその形成メカニズムを示唆することを解明
- それぞれの凝集メカニズムに着目した新規の ALS 治療法の開発が期待される

## 1. 背景

ALS は大脳と脊髄の運動神経細胞が徐々に傷害されて死に至る、原因不明の神経難病であり、本邦では約 9,000 人が闘病しています。思考や認知に関わる能力は保たれたまま、全身の筋肉の麻痺や萎縮が進行し、多くの患者さんは数年以内には人工呼吸器なしには生存できなくなるため、発症原因の解明と治療法の開発が強く期待されている重篤な疾患です。ALS の病巣に特徴的な異常が TDP-43 と呼ばれるタンパク質の凝集です。TDP-43 は、RNA 結合タンパク質のひとつで通常は細胞の核に存在していますが、ALS では細胞質へ漏出して凝集体を形成します。TDP-43 の凝集は ALS で普遍的に観察されることから、病態解明の本丸と考えられ、そのメカニズムの解明が強く求められていました。一方、ALS の約 10% を占める遺伝性 ALS では、様々な遺伝子の異常によって ALS を発症します。そこで、研究チームは TDP-43 に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合して発現する培養細胞と ALS の中でも遺伝子の異常によって発生する遺伝性 ALS の原因遺伝子変異 20 種類を組み合わせ、どのような遺伝子の異常が TDP-43 の凝集体形成を引き起こすのか、網羅的に探索を行いました。

## 2. 研究成果

本研究では、TDP-43 の凝集体形成を検出しやすくするため、TDP-43 に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合して発現する培養細胞（TDP-43-EGFP 安定発現 Neuro2a 細胞）を作成しました。この培養細胞に赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合させた ALS 原因遺伝子産物 20 種類をそれぞれ発現させ、凝集体の形成を蛍光顕微鏡により観察しました(図 1A)。その結果、ALS 原因遺伝子産物は「1. 共凝集（自身と TDP-43 を巻き込んで凝集）するもの」「2. 自身は凝集するが TDP-43 を巻き込まないもの」「3. 自身も TDP-43 も凝集しないもの」に大別されることが判りました。さらに「1. 自身と TDP-43 が共凝集するもの」に分類された遺伝子は、(1) 微小管に結合するタンパク質（微小管関連タンパク質：MRP）をコードする遺伝子と（2）RNA に結合するタンパク質（RNA 結合タンパク質：RBP）をコードする遺伝子に分類されることも判りました(図 1B)。

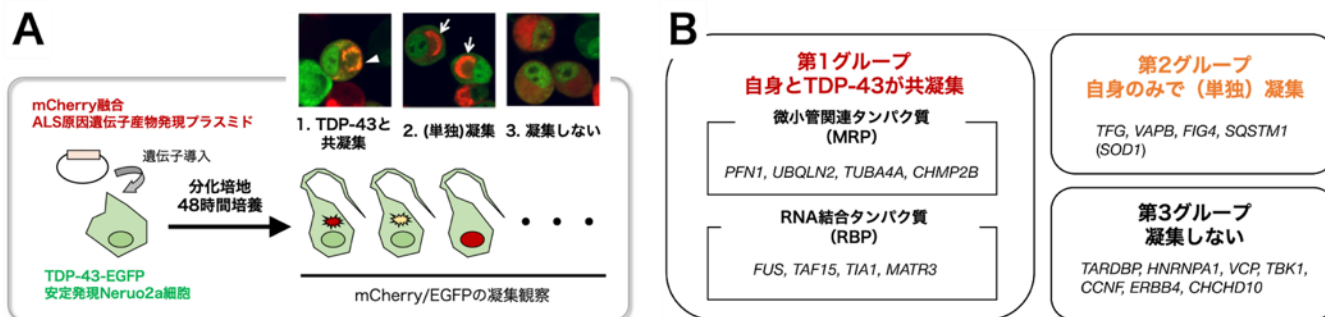
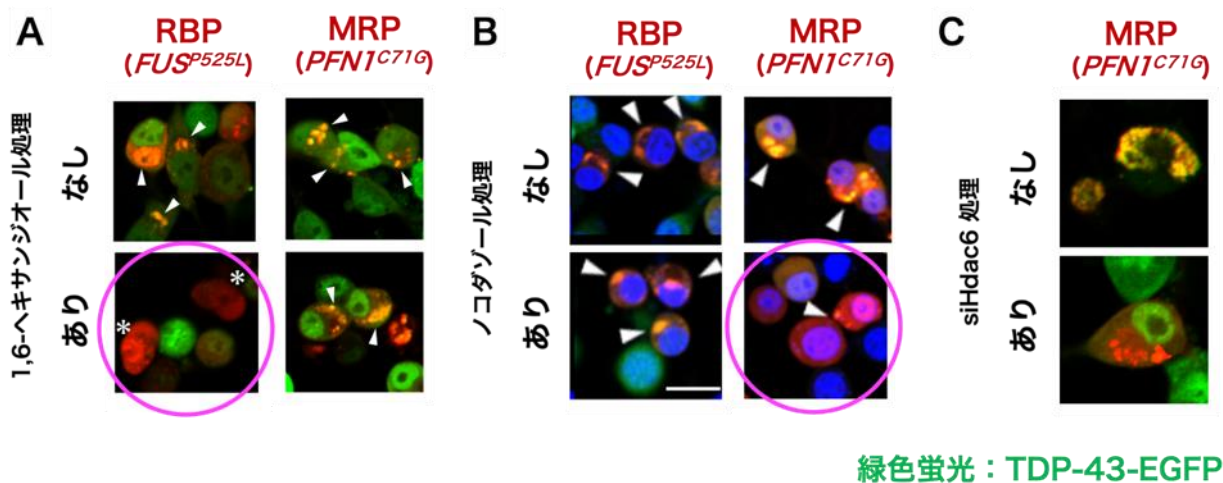


図1 本研究で実施した TDP-43 凝集体形成スクリーニング

A. スクリーニングの概略図. TDP-43 が緑色、ALS 原因遺伝子産物が赤色の蛍光をそれぞれ発するので、共局在は黄色 (1)、ALS 原因遺伝子産物の単独凝集は赤色 (2) の凝集体として観察される. 今回の検討では、TDP-43 単独での凝集は観察されなかった. B. スクリーニング結果に基づく、ALS 原因遺伝子産物の分類結果. TDP-43 と共凝集した第 1 グループの遺伝子は、微小管関連タンパク質 (MRP) と RNA 結合タンパク質 (RBP) をコードする遺伝子群にそれぞれ細分化することができた.

次に MRP と RBP による TDP-43 凝集体形成のメカニズムを明らかにするため、阻害剤による検討を行いました. 研究チームは、最近、液-液相分離 (LLPS) が神経変性疾患の凝集体形成に重要であるという報告があることに着目し、LLPS を阻害する 1,6-ヘキサンジオールで細胞を処理したところ、RBP による TDP-43 凝集体が著しく減少しました (図 2A). しかし、興味深いことに MRP による TDP-43 凝集体には全く影響がありませんでした. そこで、微小管の伸長を阻害するノコダゾールで細胞を処理すると、今度は逆に MRP による TDP-43 凝集体のみが減少し、RBP による凝集体には全く影響しませんでした (図 2B). さらに、微小管を介して異常タンパク質を細胞内の 1 箇所に集積する仕組みであるアグリソーム形成に重要な HDAC6 を減少させたところ、こちらも微小管に関連する MRP による TDP-43 凝集体のみが減少することが判明しました (図 2C). これらの結果は、MRP と RBP による TDP-43 凝集体の形成メカニズムが、それぞれアグリソーム形成と LLPS という異なる独立した 2 つの経路によることを示唆しています.



緑色蛍光 : TDP-43-EGFP

図2 RBP は LLPS 依存的に、MRP はアグリソーム形成依存的に、それぞれ TDP-43 と共凝集する  
A. LLPS を阻害する 1,6-ヘキサンジオールで処理すると、RBP と TDP-43 の凝集は大きく減少した (赤

丸) ことから LLPS 依存的に凝集していることが考えられた. 一方、MBP と TDP-43 の共凝集には全く影響を受けなかった. **B.** 微小管の伸長を阻害するノコダゾールで処理すると、MBP と TDP-43 の共凝集が大きく減少した (赤丸). 一方、RBP と TDP-43 の共凝集は全く影響を受けなかった. **C.** アグリソーム形成に重要な HDAC6 を siRNA によって抑制すると (siHdac6)、MBP と TDP-43 の共凝集が大きく減少した. 従って、MBP と TDP-43 の凝集はアグリソーム形成依存的であることが考えられた.

最後に、今回見出したメカニズムが実際に ALS の運動神経細胞でも生じているのかを確かめるため、ALS の剖検脊髄組織を HDAC6 と TDP-43 に対する抗体で染色しました (図 3)。その結果、HDAC6 は TDP-43 凝集体のなかでも繊維状を示すスケイン様封入体の一部と共局在することが明らかになりました。一方で球状や顆粒状の TDP-43 凝集体では、HDAC6 との共局在は全く観察されませんでした。この結果は、ALS における TDP-43 凝集体の形態が、その形成メカニズムを示唆していると考えられます。また、同一患者さんの脊髄で HDAC6 陽性と陰性、両方の凝集体が観察されたことから、アグリソームと LLPS のどちらのメカニズムによって TDP-43 が凝集するのかは運動神経細胞ごとに異なっていることが考えられました。

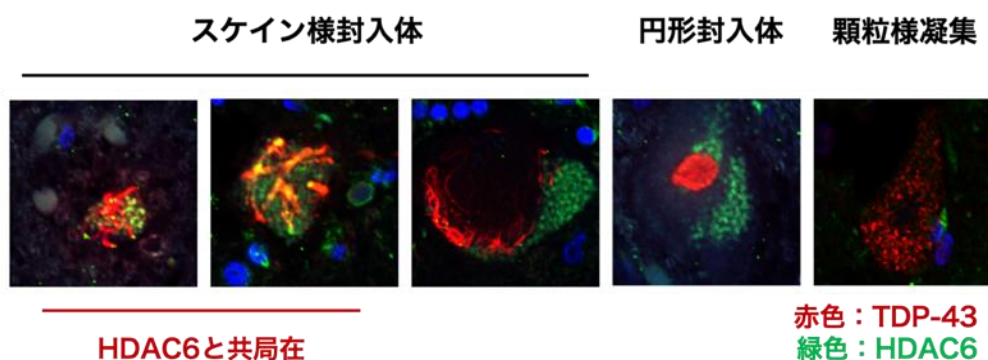


図 3 ALS の運動神経細胞における HDAC6 と TDP-43 の共局在

HDAC6 は TDP-43 のスケイン様封入体の一部と特異的に共局在し、円形封入体や顆粒様凝集とは共局在しなかった。

### 3. 今後の展開

本研究で使用した TDP-43 の凝集体形成をスクリーニングする実験系は簡便で、TDP-43 の凝集体形成を阻害する阻害剤を今後、探索するうえで有用であると考えられます。また、MRP と RBP の凝集体形成メカニズムが異なることが明らかになったことで、それぞれの凝集メカニズムに対応した治療法の開発が可能になると期待されます。

本研究は、科学研究費補助金 (18H02740, 18H04860, 19KK0214 (山中宏二)、17H04986 (渡邊征爾))、AMED 難治性疾患実用化研究事業 (20ek0109426h0001)、上原記念生命科学財団 (山中宏二・渡邊征爾)、中部科学技術センター学術・みらい助成 (渡邊征爾) の支援を受けて実施されました。

## 4. 用語説明

### 注 1. TDP-43

正確には TAR-DNA binding protein 43 と呼び、細胞内で RNA の制御を行う RNA 結合タンパク質の一種です。正常な TDP-43 タンパク質は細胞の核に選択的に局在していますが、ALS では TDP-43 が細胞質へ漏れ出して凝集します。TDP-43 タンパク質の異常（TDP-43 病理）は ALS で普遍的に見られることから、TDP-43 病理の形成メカニズムの解明は ALS における治療法を開発する上で非常に重要と考えられています。

### 注 2. アグリソーム

細胞内で異常タンパク質が生じた際に作られる構造で、細胞核周辺の異常タンパク質が集積された領域です。細胞内のゴミ捨て場とも呼ばれ、微小管に沿って異常タンパク質を集めることで効率的な分解の促進や毒性の緩和に役立っていると考えられています。

### 注 3. 液-液相分離

自己会合するタンパク質などにより、溶液が自然に密度や濃度の違う相に分離する現象で Liquid-Liquid Phase Separation、略して LLPS とも呼ばれます。身近な例では水と油の分離などがあります。細胞内の LLPS は、細胞にとって必要な化学反応を効率的に起こすために必須と考えられています。最近の研究で、ALS やアルツハイマー病などの神経難病に関わる複数のタンパク質で LLPS の異常が報告され、LLPS の異常化と神経難病との関連が注目されています。

### 注 4. HDAC6

HDAC6 はヒストン脱アセチル化酵素の一種で、細胞質に分布して主に微小管や熱ショックタンパク質 90 (HSP90) などを脱アセチル化することが知られています。特にアグリソーム形成においては、微小管を介して異常化タンパク質をアグリソームまで輸送するのを助ける重要な分子です。

## 5. 発表雑誌

雑誌名：Cell Death & Disease（10月23日）

論文タイトル：Aggresome Formation and Liquid-liquid Phase Separation Independently Induce Cytoplasmic Aggregation of TAR DNA-binding protein 43

著者：Seiji Watanabe<sup>1,2</sup>, Hidekazu Inami<sup>1</sup>, Kotaro Oiwa<sup>1,3</sup>, Yuri Murata<sup>1</sup>, Shohei Sakai<sup>1,2</sup>, Okiru Komine<sup>1,2</sup>, Akira Sobue<sup>1,2</sup>, Yohei Iguchi<sup>3</sup>, Masahisa Katsuno<sup>3</sup>, and Koji Yamanaka<sup>1,2</sup>

所属：

1. Department of Neuroscience and Pathobiology, Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, Nagoya, Aichi, 464-8601, Japan

2. Department of Neuroscience and Pathobiology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Aichi, 466-8550, Japan

3. Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Aichi, 466-8550, Japan

DOI : [10.1038/s41419-020-03116-2](https://doi.org/10.1038/s41419-020-03116-2)

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Ce\\_De\\_201023en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Ce_De_201023en.pdf)