

<教育講演 4>

TDP-43 蓄積症の概念と病態解明への展望

長谷川成人¹⁾ 野中 隆¹⁾ 山下万貴子¹⁾ 亀谷富由樹¹⁾ 新井 哲明²⁾
 吉田 眞理³⁾ 橋詰 良夫³⁾ 土谷 邦秋⁴⁾ 秋山 治彦²⁾

(臨床神経, 49 : 783—785, 2009)

Key words : FTLD, ALS, ユビキチン, リン酸化, 凝集

前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration : FTLD), および筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) の変性神経細胞やグリア細胞に出現するユビキチン陽性構造物の主要構成タンパク質として, 不均一核リボ核酸タンパク質の一種である TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定された¹⁾²⁾. この発見により神経変性疾患に TDP-43 proteinopathy の概念が加わると共に, 不明であった孤発性 ALS の分子病態が明らかになってきた. 生化学, 免疫組織学的解析から, FTLD, ALS 患者剖検脳, 脊髄に蓄積する TDP-43 は, C 末端の複数のセリン残基が異常にリン酸化され, 少なくとも一部は線維の形態をとって蓄積していることが判明した³⁾. また, 全長分子よりも, 18~26 kDa のバンド, およびスミア状に泳動される TDP-43 の C 末端断片が患者脳に多く蓄積すること, 加えて 18~26kDa のバンドパターンが FTLD, ALS, 家族性 FTLD でそれぞれことなることが明らかとなった³⁾. 2008 年に入り, 家族性, および孤発性 ALS の患者に TDP-43 の遺伝子変異が多数同定され, また今年になって認知症をともなう家族性 ALS の患者にも変異が見つかった. TDP-43 分子自体の異常が原因で ALS や認知症をともなう ALS が発症することが証明されると同時に, 病気の発症や進行が TDP-43 の蓄積を介して起こることを強く示唆するものである.

われわれは TDP-43 の蓄積機構を明らかにし, その蓄積をおさえるような薬剤や方法を探索する目的で, 患者脳や脊髄にみとめられる異常を培養細胞内で再現するモデルの作製をおこなった. TDP-43 は核に局在するタンパク質であるが, 封入体が形成されている細胞ではそれが核から消失している像が観察される. そこで, 核移行配列候補の PKDNKRK (78-84 残基) および PLRSRK (187-192 残基) を欠損させた変異体を発現するベクターを作製し, SH-SY5Y 細胞に一過性に発現させた. その結果, 78-84 残基を欠損させたばあい(Δ78-84)には, その発現は細胞質にみとめられ, この部分が核移行シグナルとして機能していることが確認された⁴⁾. 一方, 187-192 残基を欠損させたばあいには核の局在が観察されたものの, 野

生型 TDP-43 を発現したばあいは少しことなる顆粒状の局在を示した⁴⁾. これらの欠損変異体を細胞に発現させ, MG132 処理をおこなったところ, Δ78-84 発現細胞では細胞質に, Δ187-192 発現細胞に, 核内に凝集体がみとめられた⁴⁾. これらの凝集体は形や大きさだけでなく, 抗リン酸化 TDP-43 特異抗体 (pS409/410) および抗ユビキチン抗体に陽性を示し, 生化学的にも患者脳の封入体と同じ性質を有していることが示された. また両配列を欠損させた変異体 (Δ78-84 & 187-192) は, MG132 処理をしなくても, 変異体を発現させるだけでリン酸化 TDP-43 抗体およびユビキチン抗体に陽性の細胞質凝集体が出現した (Fig. 1 左)⁴⁾. 以上の結果から, TDP-43 の一部 (13 アミノ酸) を欠損した変異体を発現するだけで, 患者脳にみられる封入体とよく似た TDP-43 凝集体が培養細胞内で再現されることがわかった.

次に, 患者脳に蓄積する TDP-43 が, 全長 TDP-43 よりも, 分子中央部で切断を受けた C 末端断片が多いことに注目し, 切断分子が全長分子よりも凝集しやすいかどうかについて検討した. TDP-43 の様々な C 末端断片 (アミノ酸残基 162-414, 218-414, 274-414, 315-414) を Green fluorescent protein (GFP) との融合タンパク質として, SH-SY5Y 細胞に発現させ, 凝集体形成について検討した. その結果, 全長分子を発現したばあいには凝集体が形成されないのに対し, 162-414 および 218-414 の C 末端断片を発現した細胞では, リン酸化 TDP-43 抗体およびユビキチン抗体に陽性の凝集体が数多く観察された (Fig. 1 右)⁵⁾. さらに全長 TDP-43 と C 末端断片を共発現させたばあいには, 全長 TDP 分子が凝集した C 末断片と共に凝集する像も観察された⁵⁾. 以上の結果から, 全長 TDP-43 よりも断片化 TDP の方が細胞内で凝集しやすいこと, C 末断片の凝集体をシードとして全長 TDP が共凝集することが細胞系で確認された. さらに FTLD-U 患者脳の不溶性画分でもっとも強く検出される 23kDa バンドを切り出し, トリプシンでゲル内消化後, 質量分析により, 実際の患者脳に蓄積する C 末断片がどの部位で切断を受けて生じたのか同定することを試みた. その結果, 218Met-219Asp の間および 246Glu-247

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所分子神経生物 [〒156-8585 東京都世田谷区上北沢 2-1-8]

²⁾ 同 老年期精神疾患

³⁾ 愛知医大加齢研

⁴⁾ 都立松沢病院検査科

(受付日 : 2009 年 5 月 22 日)

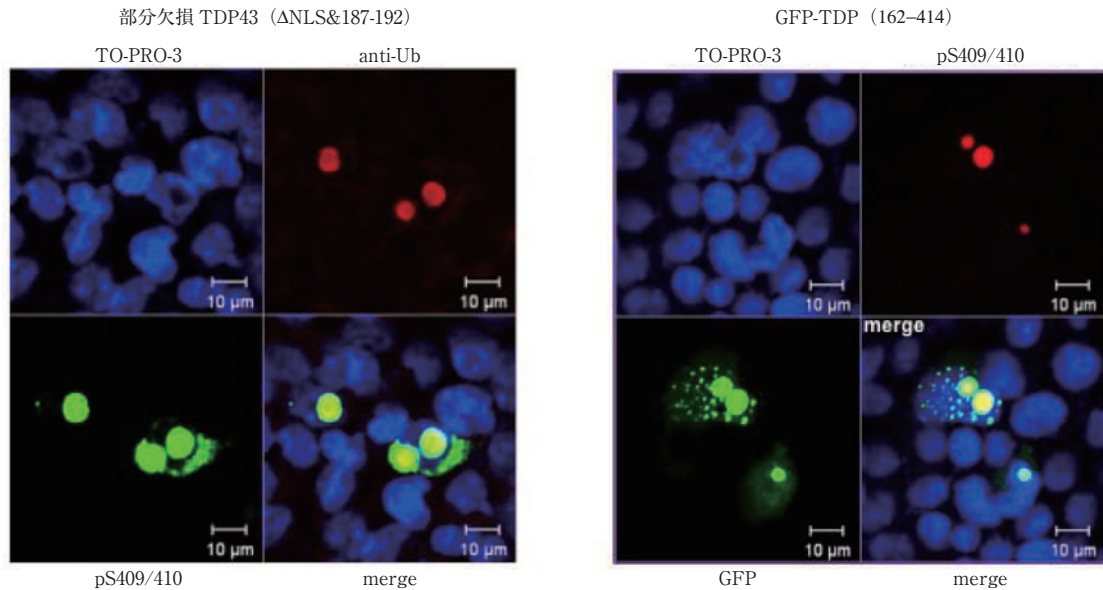


Fig. 1 TDP-43 proteinopathy 細胞モデル

FTLD, ALS 患者組織にみられる TDP-43 の凝集を再現した TDP-43 proteinopathy の細胞モデル。核移行配列 (78-84) およびその類似配列 (187-192) を部分欠損した TDP-43 を SH-SY5Y 細胞に発現すると、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410) および抗ユビキチン抗体 (anti-Ub) に陽性の封入体が形成される (左)。TDP-43 の C 末端断片 (162-414) を GFP 融合タンパク質として発現しても同様に、pS409/410 および anti-Ub 陽性凝集体が形成され、それは GFP の蛍光でも検出することができる (右)。

Asp の間で切断されたことを強く示唆するペプチド断片が検出された⁵⁾。われわれが凝集を確認した C 末端断片 (218-414) と近い位置であることが判明した。最近、Zhang らは、カスパーゼ 3 による切断で産生される C 末端断片 (220-414) を GFP 融合タンパク質として発現させると pS409/410 抗体およびユビキチン抗体陽性の凝集体が形成することを報告し、カスパーゼによる切断が凝集の引き金になる可能性を示唆した⁶⁾。しかしながら前述のように、筆者らの解析では 219Asp-220Val の間の切断は検出されず、検出されたのは 218Met-219Asp の間の切断であった⁵⁾ことから、実際の患者脳、脊髄で切断にかかわる酵素はカスパーゼではなさそうである。抗体による解析からもわかるように切断部位は複数あり、特定の酵素による特定部位の切断が重要かどうかは不明である。また C 末端断片が全長分子よりも凝集傾向が強いことは確かであるが、最初に C 末端断片が凝集するのか、全長分子が凝集した後に切断を受けるのかについても明らかではない。切断に関しては今後のさらなる解析が必要であるが、患者脳で起こっている現象を培養細胞内で再現するモデルが樹立されたことは FTLD や ALS の治療薬候補を探索する上で重要である。われわれはこの細胞モデルをもちいて、いくつかの低分子化合物について評価をおこなった。その結果、最近アルツハイマー病の第 II 相臨床試験において顕著な効果が報告された二つの薬剤に TDP-43 の凝集をおさえる効果をみいだした⁷⁾。今後、動物モデルなどで効果を確認していく必要はあるが、有効な治療法のない ALS や FTLD などの TDP-43 proteinopathy の治療薬候補として期待される。

文 献

- 1) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130
- 2) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, et al: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 602
- 3) Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, et al: Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and ALS. *Ann Neurol* 2008; 63: 535—538
- 4) Nonaka T, Arai T, Buratti E, et al: Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 2009; 583: 394—400
- 5) Nonaka T, Kametani F, Arai T, et al: Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* In press.
- 6) Zhang YJ, Xu YF, Cook C, et al: Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 7607—7612
- 7) Yamashita M, Nonaka T, Arai T, et al: Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Lett* in press

Abstract**The TDP-43 proteinopathies, toward understanding of the molecular pathogenesis**

Masato Hasegawa, M.D.¹⁾, Takashi Nonaka, M.D.¹⁾, Makiko Yamashita, M.D.¹⁾,
Fuyuki Kametani, M.D.¹⁾, Tetsuaki Arai, M.D.²⁾, Mari Yoshida, M.D.³⁾,
Yoshio Hashizume, M.D.³⁾, Kuniaki Tsuchiya, M.D.⁴⁾ and Haruhiko Akiyama, M.D.²⁾

¹⁾Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry

²⁾Department of Psychogeriatrics, Tokyo Institute of Psychiatry

³⁾Department of Neuropathology, Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University

⁴⁾Department of Laboratory Medicine and Pathology, Tokyo Metropolitan Matsuzawa Hospital

The TDP-43 proteinopathies: Toward understanding of the molecular pathogenesis. TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein was identified as a major component of ubiquitin-positive inclusions in FTLD and ALS, and the concept of TDP-43 proteinopathies was proposed. Immunoblot and immunohistochemical analyses using multiple anti-phosphorylated TDP-43 antibodies revealed that hyperphosphorylated 18-26 kDa C-terminal fragments in addition to the full-length TDP-43 are major constituents of inclusions in FTLD-U and ALS. Recent discovery of mutations in the TDP-43 gene in familial and sporadic ALS, indicating that abnormality of TDP-43 protein cause neurodegeneration. It also strongly suggests that aggregation of TDP-43 or the process is responsible for neurodegeneration in FTLD-U and ALS. To investigate the molecular mechanisms of aggregation of TDP-43, we have established two cellular models for intracellular aggregates of TDP-43 similar to those in brains of TDP-43 proteinopathies patients. The first consists of SH-SY5Y cells expressing mutant TDP-43 that lacks both the nuclear localization signal (NLS) and residues 187-192 (Δ NLS & 187-192). The second model consists of SH-SY5Y cells expressing an aggregation-prone TDP-43 C-terminal fragment as a green fluorescent protein (GFP)-fusion. In these cells, round structures positive for both anti-pS409/410 and anti-Ub are observed. These results suggest that intracellular localization of TDP-43, truncation of TDP-43 and proteasomal dysfunction of cells may be involved in the pathological process of TDP-43 proteinopathies. We also found that two small compounds that have been reported to be beneficial in phase II clinical trials of Alzheimer's disease, inhibited the formation of TDP-43 aggregates in these two cellular models, suggesting that these compounds may be effective for the treatment of ALS and FTLD-U.

(Clin Neurol, 49: 783—785, 2009)

Key words: FTLD, ALS, ubiquitin, phosphorylation, aggregation
