

< Symposium 33-2 > TDP-43 の新展開

TDP-43 病理形成メカニズムにおける TDP-43 の
カルパイン依存性断片化の意義山下 雄也¹⁾ 郭 伸²⁾

要旨：ALS の病理学的指標である TDP-43 病理の形成メカニズムは未解明であり、引き金になる TDP-43 の易凝集性断片形成に関するプロテアーゼやその活性化メカニズムに関する合理的な説明はなかった。われわれは、孤発性 ALS のもう一つの疾患特異的分子変化である、RNA 編集酵素 ADAR2 の発現低下を再現する ALS の分子病態モデルマウスの解析から、異常な Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体発現を介したカルパインの活性化が、凝集性の高い TDP-43 断片を形成することを明らかにした。この分子カスケードに通じるメカニズムは、孤発性 ALS のみならず他の神経疾患に観察される TDP-43 病理形成にも当て嵌まることが強く示唆されたので概説する。

(臨床神経 2014;54:1151-1154)

Key words：筋萎縮性側索硬化症, TDP-43 病理, カルパイン, AMPA 受容体, カルシウムシグナリング

TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) 病理は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病理学的指標であるが、その形成メカニズムの多くは未解明である。TDP-43 病理形成には、凝集能の高い断片への異常な断片化が TDP-43 病理形成の初期のイベントであることが示唆されている。TDP-43 の断片化に関するプロテアーゼに関しては、カスパーゼ 3 の関与が報告されているが、病的脳にはカスパーゼ部位以外で断片化された断片が存在することやカスパーゼ 3 ノックアウト細胞においても TDP-43 の断片化が確認されたことから他のプロテアーゼの関与が想定される。

一方、孤発性 ALS では GluA2 mRNA のグルタミン・アルギニン (Q/R) 部位における RNA 編集 (アデノシン・イノシン (A-I) 置換) 活性低下が疾患特異的な分子異常として発見されていた。GluA2 は AMPA 受容体のサブユニットの一つであり、この Q/R 部位の A-I 置換により AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性が制御されている。GluA2 Q/R 部位は adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) で特異的に編集され、孤発性 ALS 患者では ADAR2 の発現低下がおこっているため、RNA 編集低下の原因と考えられる¹⁾⁻³⁾。さらに ADAR2 の発現低下が直接細胞死に繋がることを、運動ニューロン特異的に ADAR2 をノックアウトするモデルマウス (ADAR2^{lox/lox}/VACht-Cre. Fast; AR2) を作成し、その解析から確認済である⁴⁾。

TDP-43 病理の形成と ADAR2 の発現低下の関連性を孤発性 ALS 患者の脊髄の免疫染色で検討すると、ADAR2 陽性運動ニューロンでは TDP-43 病理が無く、ADAR2 陰性細胞では TDP-43 病理が有るという関係が観察され、両者に分子連関が想定された⁵⁾。両者の分子連関の検討をおこない、TDP-43 が

ADAR2 活性の上流の可能性を支持する結果はえられなかったため、TDP-43 病理形成が ADAR2 活性低下の下流のイベントである可能性についてしらべた。

野生型マウスではすべての大径前角細胞の核が TDP-43 陽性であったのに対し、AR2 マウスの ADAR2 を欠損する運動ニューロンでは、核の TDP-43 免疫活性が陰性であった⁶⁾。さらに、ヘテロ接合体 AR2 (AR2H) マウスの核の ADAR2 の染色性が減少した運動ニューロンにおいて核の TDP-43 染色性の低下ないし消失と共に細胞質に抗 TDP-43 抗体陽性の凝集体が観察され、孤発性 ALS の運動ニューロンにみられる TDP-43 病理と酷似した免疫染色像を呈した。このことから、TDP-43 の切断にはカルシウム依存性プロテアーゼが関与していると考えられた。

In vitro の生化学的解析では、TDP-43 は十分量のカスパーゼ 3 存在下でも切断されなかったがカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインでは濃度・時間依存的に切断され、この切断はカルパイン特異的 inhibitor によって抑制された。次に *in vivo* での特異性を検証するために、ADAR2 を欠損しながら AMPA 受容体の Ca^{2+} の透過性を正常にした AR2res マウス (AR2/GluR-B^{R/R}) で同様の検討をおこなったところ、カルパインの活性化も TDP-43 の分解もおこらず、ADAR2 陰性の細胞でも TDP-43 が正常の核染色性を示した。内因性カルパイン阻害物質であるカルパスタチンのトランスジェニックマウスでは、TDP-43 切断が抑制され、ノックアウトマウスでは促進されたと共に脊髄運動ニューロンでは TDP-43 の細胞質局在が観察された。この結果は *in vitro* 同様に *in vivo* でも TDP-43 がカルパインにより切断を受けることを示している。

¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工学部門 [〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1]²⁾ 国際医療福祉大学臨床医学研究センター

(受付日：2014 年 5 月 24 日)

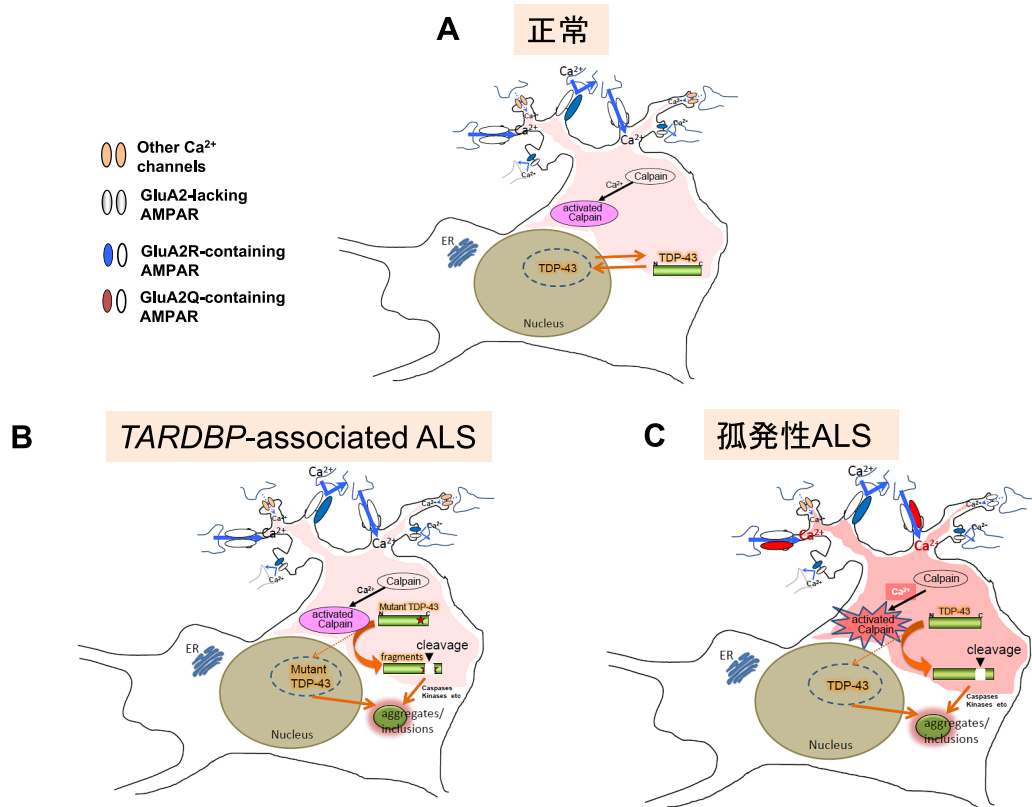


Fig. 1 孤発性 ALS と *TARDBP* 変異 ALS におけるカルパインの活性化と TDP-43.

(A) 正常の運動ニューロンでは、ある程度カルパインは活性化しているものの TDP-43 は正常に核に存在し機能する。(B) *TARDBP* 変異では、カルパインの活性は正常であるが変異 TDP-43 がカルパインに脆弱であるため、カルパインの生理活性の高い運動ニューロンで断片化し、凝集体を形成する。(C) 孤発性 ALS では、未編集型 GluA2 発現による AMPA 受容体からの Ca²⁺ 流入増加にともないカルパインが過剰に活性化し、TDP-43 が断片化し、凝集体を形成する。

さらに、カルパインは TDP-43 の C 端を切断し、その N 端断片は高い凝集性をもつことがわかった。この N 端断片はプリオンドメインをふくんでおり、TDP-43 の凝集性は C 端側のプリオンドメインが規定しているとする今までの知見とも合致した。患者の脳皮質・脊髄でもカルパインの活性化とカルパイン依存性 TDP-43 断片相同の C 端末を欠いた断片が検出されることから、AR2 マウスと同様のカスケードが孤発性 ALS 患者でもおこっていると考えられる。

TARDBP (TDP-43 遺伝子) は ALS の原因遺伝子の一つであり、*TARDBP*-ALS 患者の運動ニューロンにも、野生型 TDP-43 を発現する孤発性 ALS 同様 TDP-43 病理が観察される。そのメカニズムを探るため、ALS 関連変異 TDP-43 のカルパインによる切断を検討した。その結果、ALS 関連変異 TDP-43 (A315T, M337V) は、野生型 TDP-43 よりカルパインにより有意に切断されやすいことがわかった。変異 TDP-43 がカルパインに脆弱であることが、ALS を発症するメカニズムを考察すると、カルパインの活性化に部位差が (脊髄前角 > 後角 > 前頭葉皮質) ある事がわかり、Ca²⁺ の流入量の部位差によると予想される。AMPA 受容体の一部は Ca²⁺ 透過性であり、運動ニューロンではその発現比率が高い。AMPA 受容体は 4

種のサブユニットからなる四量体で、GluA2 サブユニットの有無が Ca²⁺ 流入を規定している。すなわち GluA2 の発現比率が低いと GluA2 をふくまない Ca²⁺ 透過性 AMPA 受容体の発現が多いので、皮質運動ニューロンや小脳プルキンエ細胞などのニューロンにくらべて GluA2 の発現割合が低い運動ニューロンでは Ca²⁺ の流入量が多く⁷⁾、カルパインの活性化をひきおこすと考えられる。このため運動ニューロンでは変異 TDP-43 が易凝集性断片に切断されやすく *TARDBP*-ALS を発症するメカニズムになっていると考えられる。遺伝子異常が或る疾患をひきおこすメカニズムに、遺伝子産物自体の機能異常の他、遺伝子産物と相互に作用する分子の機能変化やその生理的分布の相違の要因があることを示唆する結果である (Fig. 1)。

最後に、カルパインの活性化の程度が TDP-43 の断片化・凝集体形成におよぼす影響を考察する。*In vitro* ではカルパインは直ちに TDP-43 を 3 つの主要な断片に切断しそれ以上の切断はおこらないが、カルパインを追加することにより小さな可溶性断片につぎつぎに切断される。このことは活性化カルパインが直ちにカルパスタチンにより非活性化される事を示唆する。未編集型 GluA2 をふくむ AMPA 受容体は持続的に

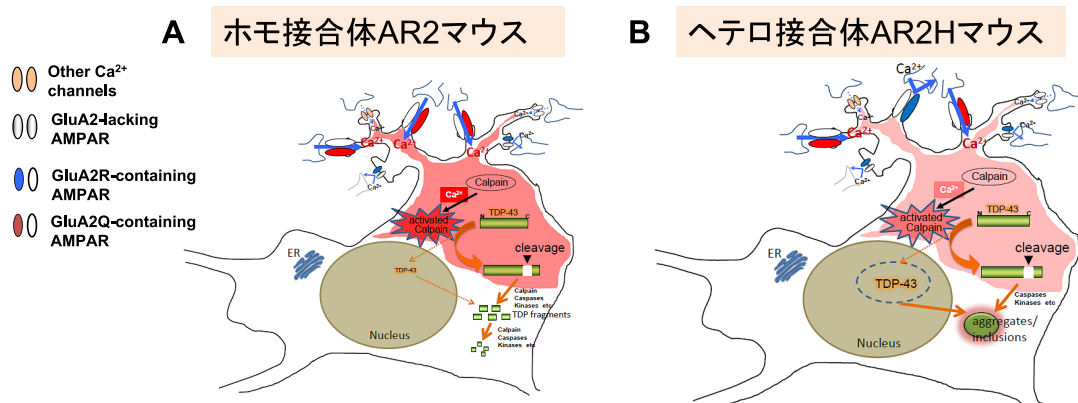


Fig. 2 TDP-43 病理形成とカルパインの活性.

(A) ホモ接合体 AR2 マウスは、連続的な Ca²⁺ 流入が多いため、カルパインが過剰に活性化し、TDP-43 が断片化後、更に分解し、可溶性断片まで分解が進むため、凝集体が形成できない。(B) ヘテロ接合体 AR2H マウスは、連続的な Ca²⁺ 流入にともない、適度にカルパインが活性化し、TDP-43 が断片化し、凝集体を形成する。

Ca²⁺ を透過するので、すべての GluA2 が未編集型である AR2 マウスでは Ca²⁺ 流入は野生型の約 30 倍であり、凝集体を形成する前に可溶性断片につきつぎと切断されるため凝集体が形成されないと考えられる (Fig. 2A)。これに対し、AR2H マウスでは Ca²⁺ 流入が 4~5 倍で、凝集性の高い断片が一定期間存在可能で凝集体が形成されると考えられる (Fig. 2B)⁸⁾。TDP-43 病理形成には Ca²⁺ の持続的なほどよい上昇という細胞内環境が必要であることを示唆する結果である。

これらの結果より、孤発性 ALS における TDP-43 病理形成は ADAR2 発現低下に始まるカルパインの活性化により引き起こされることが明らかとなった。カルパインの活性化をきたす機序には AMPA 受容体以外にも様々な細胞内 Ca²⁺ 調節機構の破綻が考えられる。脳外傷 (TBI, traumatic brain injury) においても、カルパインによる TDP-43 の切断が証明されており⁹⁾、ALS 以外の TDP-43 病理の形成にもカルパインの活性化が果たす役割を検討する必要がある。一方カスパーゼ 3 はカルパインの活性化に引き続いて起こること¹⁰⁾ や TDP-43 切断活性が低い事から考えると、TDP-43 病理形成における役割はそれ程大きくはない可能性がある。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

- 1) Kawahara Y, Ito K, Sun H, et al. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 2004;427:801.
- 2) Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, et al. Profound

downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis* 2012;45:1121-1128.

- 3) Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, et al. Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 46:806-815.
- 4) Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, et al. Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* 2010;30:11917-11925.
- 5) Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, et al. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol* 2010;120:75-84.
- 6) Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, et al. A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat Commun* 2012;3:1307.
- 7) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, et al. Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: an implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem* 2003;85:680-689.
- 8) Feldmeyer D, Kask K, Brusa R, et al. Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat Neurosci* 1999;2:57-64.
- 9) Yang Z, Lin F, Robertson CS, et al. Dual vulnerability of TDP-43 to calpain and caspase-3 proteolysis after neurotoxic conditions and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34:1444-1452.
- 10) Tomioka M, Shirota K, Iwata N, et al. In vivo role of caspases in excitotoxic neuronal death: generation and analysis of transgenic mice expressing baculoviral caspase inhibitor, p35, in postnatal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;108:18-32.

Abstract**Calpain plays a crucial role in TDP-43 pathology**Takenari Yamashita, Ph.D.¹⁾ and Shin Kwak, M.D. Ph.D.²⁾¹⁾Division of Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine,
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo²⁾International University of Health and Welfare

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disease affecting healthy middle-aged individuals. Mislocalization of TAR DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43) or TDP-43 pathology observed in the spinal motor neurons is the pathological hallmark of ALS. The mechanism generating TDP-43 pathology remained uncertain. Several reports suggested that cleavage of TDP-43 into aggregation-prone fragments might be the earliest event. Therefore, elucidation of the protease(s) that is responsible for TDP-43 cleavage in the motor neurons is awaited. ALS-specific molecular abnormalities other than TDP-43 pathology in the motor neurons of sporadic ALS patients include inefficient RNA editing at the GluA2 glutamine/arginine (Q/R) site, which is specifically catalyzed by adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2). We have developed the conditional ADAR2 knockout (AR2) mice, in which the ADAR2 gene is targeted in motor neurons. We found that Ca²⁺-dependent cysteine protease calpain cleaved TDP-43 into aggregation-prone fragments, which initiated TDP-43 mislocalization in the motor neurons expressing abnormally abundant Ca²⁺-permeable AMPA receptors. Here we summarized the molecular cascade leading to TDP-43 pathology observed in the motor neurons of AR2 mice and discussed possible roles of dysregulation of calpain-dependent cleavage of TDP-43 in TDP-43 pathology observed in neurological diseases in general.

(Clin Neurol 2014;54:1151-1154)

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, TDP-43 pathology, Calpain, AMPA Receptor, Calcium signaling
