

Transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) 凝集体の形成と分解からみた amyotrophic lateral sclerosis (ALS) 分子機構

笠原 壮¹⁾ 石原 智彦¹⁾ 小池 佑佳¹⁾ 須貝 章弘¹⁾ 小野寺 理^{1)*}

要旨： 孤発性筋萎縮性側索硬化症 (sporadic amyotrophic lateral sclerosis; SALS), および多くの家族性 ALS (familial ALS; FALS) において, 神経細胞質内 transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) 陽性の封入体を認める. この事実から TDP-43 は本症の根幹に関わる分子である. ALS 病因遺伝子の機能解析から, TDP-43 の病的凝集体形成 / 分解に関わる発症メカニズムの解明が進められている. 凝集体形成の場として, 非膜性構造であるストレス顆粒が注目されており, FUS や C9orf72 の関与が示されている. 一方, 凝集体分解機構であるユビキチン-プロテアソーム系, オートファジー系に関わる ALS 病因遺伝子も報告されている. SALS および FALS に共通する分子病態に対する治療研究が進められている.

(臨床神経 2020;60:109-116)

Key words： 筋萎縮性側索硬化症, 分子病態, TDP-43, 封入体形成, 凝集体分解機構

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は, 脳・脊髄の上位下位運動ニューロンの変性により, 進行性の筋力低下を来す神経変性疾患である. 本邦では, 年間 2.2 人/10 万人の発症率, 9.9 人/10 万人の有病率と推計されている¹⁾. 全体の 5~10% ほどは家族歴を有する (familial ALS; FALS) が, 大半は孤発性 ALS (sporadic ALS; SALS) である. SALS, FALS ともに正確な発症機序は不明であるが, 近年, 多くの ALS 病因遺伝子 / 蛋白質が同定され, その生理機能を通じた ALS 疾患病態メカニズムの解析が進んでいる. さらに FALS の病因遺伝子 / 蛋白質の一部は SALS の病態機序においても重要な役割を有することが明らかとなってきている. これらを踏まえ, 分子病態機序に即した, 治療介入研究も進められている. 本稿では ALS 関連遺伝子からの病態解明, 治療への展望について最近の知見を交えて記載する.

主要な ALS 病因遺伝子

1993 年に FALS の原因遺伝子として, *Cu/Zn superoxide dismutase* (*SOD1*) 遺伝子が初めて同定された²⁾. *SOD1* 遺伝子変異に伴う ALS (ALS1) は FALS の約 20% を占め, 病理学的には *SOD1* 陽性の封入体を認める. また変異 *SOD1* 発現マウスは ALS 類似の症候を呈し³⁾. ALS 病態生理研究, 治療薬開発研究において, 現在に至るまで広く使用されている. このよう

に *SOD1* 遺伝子の発見は, ALS 研究において画期的なものであった. しかし, ALS1 では脊髄後索の変性が生じ, 病理学的には Bunina 小体を認めないなど, 大多数の ALS と異なる特徴を有しており, *SOD1* 遺伝子変異を一般的な ALS モデルとするには問題もあった.

2006 年に SALS およびユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTL) におけるユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白質が transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) であることが報告された⁴⁾⁵⁾. TDP-43 は RNA 結合蛋白質 (RNA binding protein; RBP) の一種であり, 通常は核に局在するが, 封入体陽性細胞では核から消失している点の特徴である. さらに 2008 年以降には TDP-43 をコードする *TARDBP* 遺伝子変異に伴う FALS (ALS10), および SALS 例が複数報告された⁶⁾⁷⁾. *TARDBP* 遺伝子変異により ALS が引き起こされ, かつ TDP-43 陽性封入体が SALS 病理所見として認められることから, 同蛋白質は ALS 病態に根本的に関わっているといえる.

その後, エクソーム解析などの技術発展に伴い, ALS の新規病因遺伝子は相次いで報告されている. その数は広くコンセンサスが得られたものでも 20 以上となっている⁸⁾⁹⁾. 全遺伝子解析を実施すると, FALS の 60%, SALS でも 10% でこれらの遺伝子変異が同定される¹⁰⁾¹¹⁾. その中で FALS, SALS を通じて *TARDBP* 遺伝子変異例の占める割合は 1~2% に過ぎない¹²⁾. しかしながら, TDP-43 の核からの消失と TDP-43 陽性細胞質内封入体陽性という病理学的な特徴は, *TARDBP*

*Corresponding author: 新潟大学脳研究所神経内科 [〒 951-8585 新潟県新潟市中央区旭町通 1-757]

¹⁾ 新潟大学脳研究所神経内科

(Received August 28, 2019; Accepted October 8, 2019; Published online in J-STAGE on January 19, 2020)

doi: 10.5692/clinicalneuroi.cn-001362

Table 1 Major familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS) genes and their pathological findings.

	Gene name	Pathological protein inclusion
ALS1	<i>SOD1</i>	SOD1
ALS2	<i>ALS2</i>	TDP-43
ALS3	Unknown	TDP-43
ALS4	<i>SETX</i>	TDP-43
ALS5	<i>SPG11</i>	TDP-43
ALS6	<i>FUS</i>	FUS
ALS7	Unknown	TDP-43
ALS8	<i>VAPB</i>	TDP-43
ALS9	<i>ANG</i>	TDP-43
ALS10	<i>TARDBP</i>	TDP-43
ALS11	<i>FIG4</i>	TDP-43
ALS12	<i>OPTN</i>	TDP-43
ALS13	<i>ATXN2</i>	TDP-43
ALS14	<i>VCP</i>	TDP-43
ALS15	<i>UBQLN2</i>	TDP-43
ALS16	<i>SIGMAR1</i>	TDP-43
ALS17	<i>CHMP2B</i>	TDP-43
ALS18	<i>PFN1</i>	TDP-43
ALS19	<i>ERBB4</i>	TDP-43
ALS20	<i>HNRNPA1</i>	TDP-43
ALS21	<i>MATR3</i>	TDP-43
ALS22	<i>TUBA4A</i>	TDP-43
FTDALS1	<i>C9orf72</i>	TDP-43, p62, dipeptide repeats
FTDALS2	<i>CHCHD10</i>	TDP-43
FTDALS3	<i>SQSTM1</i>	TDP-43
FTDALS4	<i>TBK-1</i>	TDP-43

以外の遺伝子異常を伴う ALS の大部分においても認められ (Table 1), その割合は FALS と SALS を併せた全 ALS の 97% にのぼる¹³⁾. このことから, ALS 病態において TDP-43 は極めて重要な役割を果たしていると考えられる.

前述の *SOD1*, *TARDBP* 以外の主要な ALS 病因遺伝子として, *FUS* と *C9orf72* がある. *Fused in sarcoma/translocated in liposarcoma (FUS/TLS)* は 2009 年に ALS 病因遺伝子として報告された (ALS6)¹⁴⁾¹⁵⁾. ALS6 では病理学的に, *FUS* 陽性封入体を認めるが, TDP-43 陽性封入体を認めない. このことは, TDP-43 陽性封入体が運動神経細胞死による二次的な物でないことを明確に示す. *FUS* 蛋白質は RBP として TDP-43 と類似した構造, 性質をもつ. *C9orf72* 遺伝子変異は 2011 年に ALS および FTLD の原因遺伝子として報告された¹⁶⁾¹⁷⁾. 同遺伝子の非翻訳領域である第 1 イントロンには, 正常では 30 回程度の 6 塩基リピート配列 (GGGGCC) が存在するが, 変異例ではこの配列が数百から数千回に伸長している. 欧米, 特に北欧においては最も高頻度に認められ, 欧米の FALS の

39.3% に, さらに SALS においても 7.1% に認められる. 一方で本邦での頻度はごく稀である¹⁸⁾¹⁹⁾. *C9orf72* 遺伝子変異は FTLD においても高頻度で見られ, 欧米からの報告では, 家族性 FTLD の 24.9%, 孤発性 FTLD の 6.0% で *C9orf72* 遺伝子変異が認められる²⁰⁾. *C9orf72* 遺伝子変異による ALS/FTLD は病理学的には TDP-43 の蓄積を認める¹⁶⁾¹⁷⁾.

非 *C9orf72* 遺伝子変異例でも ALS と FTLD は臨床的にしばしば合併するが, 両疾患の病理学的, 遺伝学的な病態背景は異なる. 病理学的には ALS の大多数が TDP-43 病理を呈するのに対し, FTLD の 4~5 割は TDP-43 病理 (FTLD-TDP), 4~5 割は Tau 病理 (FTLD-Tau), 1 割程度が *FUS* (FTLD-FUS) 病理を呈する¹³⁾. FTLD の主要な病因遺伝子としては, *GRN* (FTLD-TDP), *MAPT* (FTLD-Tau) が知られているが, これらの変異では通常は運動神経の選択的変性は生じない. 一方, *TARDBP* および *FUS* 遺伝子変異は運動神経の選択的変性が主体であり, FTLD を来す頻度は高くない. ALS/FTLD の両者を来しうる遺伝子変異としては, *C9orf72* の他に *CHCHD10*, *SQSTM1*, *TBK1* 遺伝子などが知られている (Table 1)²¹⁾.

ALS 関連遺伝子からの病態解明

(1) RBP と凝集体形成

次に病因遺伝子の機能に注目した ALS 病態機序研究の現況について概説する. ALS 病因遺伝子には *TARDBP*, *FUS* 以外にも, *hnRNPA1*, *MARTR3* など RBP をコードするものが複数知られている²¹⁾. RBP の機能異常は ALS 以外にも様々な神経変性疾患の発症に関与する. その主要な機序は, 1) RBP の発現低下によるもの, 2) 凝集体形成にかかわるもの, 3) mRNA の繰り返し配列に RBP が結合することで, 結合した RBP の生理的な機能が低下するものなどに大別される²²⁾. 1) は脆弱 X 症候群 (fragile X syndrome; FXS) や脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy; SMA) における, FMRP 蛋白質, SMN1 蛋白質の発現低下が該当する. ALS では 2), 3) が病態機序として重要である. さらに RBP 以外の病因遺伝子には, 凝集体の分解に関わる因子が複数存在する (Table 2). これらの機能解析を通じた ALS 病態機序研究が進められている.

まず RBP と凝集体形成について記載する. TDP-43 (*TARDBP*) をはじめ, *FUS*, *hnRNPA1* などの RBP に共通する特徴として, 低複雑性プリオン様ドメイン (low complexity prion like domain; LCD) を有する点がある²³⁾²⁴⁾. LCD は数種類のアミノ酸のみにより構成される蛋白質のドメインであり, 従来, α ヘリックス構造や β シート構造といった一般的な蛋白質二次構造をとらないとされた. しかし近年の研究で, 特定の状況下では cross- β ポリマー (β シートが平行に並んだ重合体) を形成し, 凝集体形成に重要な役割を有することが明らかとなっている²⁵⁾²⁶⁾. ALS 関連の遺伝子変異の一部²⁷⁾や関連蛋白質の量的異常はこのプリオン様ドメインの結合傾向を高め, 病的蛋白質凝集体の形成を来すと考えられる.

Table 2 Classification of major amyotrophic lateral sclerosis (ALS) associated genes by their functions.

① Factors that form aggregates	<i>SOD1, SETX, SPG11, FUS*, ANG, TARDBP*, ATXN2, C9orf72, TIA1, HNRNPA1*, CHCHD10, MATR3*</i>
② Factors that degrade aggregates	<i>OPTN, VCP, CHMP2B, UBQLN2, SQSTM1, TBK1</i>

① Factors that form aggregates; genes that leads to cytoplasmic protein aggregation. ② Factors that degrade aggregates; genes that encode proteins involved in protein maintenance and degradation. *: RNA binding protein (RBP).

(2) 凝集体形成とストレス顆粒

その凝集体形成の主たる場として、罹患細胞の核・細胞質内の非膜性構造物 (membrane-less organelles) が注目されている²³⁾²⁸⁾²⁹⁾。非膜性構造物はその名前の通り、膜構造を有さない一過性の構造物で、蛋白質や RNA が高密度に集まり活発な生化学反応が行われている。代表的な細胞質内非膜性構造物にストレス顆粒がある。ストレス顆粒は、細胞が熱、ウイルス感染などのストレスを受けた際に、細胞の生存のために、ストレス状況下での蛋白質合成を一過性に抑制し、その構造は分単位で可逆的に形成、分解を繰り返す³⁰⁾。ストレス顆粒は、FUS など複数種類の RNA 結合蛋白質や多様な RNA を含有する。ストレス顆粒の恒常性が破綻し、その形成が過剰となることにより、その内部で LCD ドメインを持つ蛋白質の重合が生じ、凝集体形成のシードとなる可能性が指摘されている³¹⁾。

さらに、このストレス顆粒をはじめ、細胞内の非膜性構造物の主要な形成メカニズムとして液相分離現象 (liquid liquid phase separation; LLPS) がある。細胞内は様々な生体高分子が高密度で充満し、活発な生化学的反応が生じている空間である。そこで RNA 結合タンパクなどの凝集性の高い蛋白質が一定濃度以上集合すると、互いに凝集し周囲の液相からは分離された膜構造を有さない凝集相を形成する。この反応を LLPS と呼ぶ。LLPS を通じた凝集体形成過程は、FUS 蛋白質での報告を端緒として、ALS における凝集体形成機序として注目され、病態研究が進んでいる²⁶⁾³¹⁾³²⁾。

(3) ALS 関連分子と LLPS

FUS 蛋白質 LCD 内にはグリシンやセリンに隣接するチロシンが多く存在し、このアミノ酸配列が LLPS に重要とされる²⁶⁾。同部位は ALS6 の責任変異が多く同定され、凝集体形成との関連が指摘されている。特に同部位の G156E 変異では LLPS の異常に伴う、凝集性増強が実験的に示されている³¹⁾。また LCD 以外の部位、例えば C 末端側のアルギニン-グリシン-グリシン繰り返し配列も LLPS の効率に影響する³¹⁾。FUS 蛋白質については、翻訳後修飾の重要性も指摘されている。FUS に限らず蛋白質の一部は翻訳後にメチル化などの修飾を受けるが、FUS 蛋白質中のアルギニンのメチル化効率の低下は LLPS 凝集体形成を促進することが報告されている³²⁾。このように FUS 蛋白質については LLPS モデルによる病態機序研究が盛んである。

一方、TDP-43 も C 末側に LCD を有し、同部位には ALS10 の責任変異が集中することから、これらの変異と凝集体形成との関連が解析されている。しかし TDP-43 LCD には LLPS で重要とされるフェニルアラニンやチロシンの含有が少なく、TDP-43 における LLPS の制御は、他の RNA 結合タンパクとは異なる機序が想定されている³³⁾。In vitro の実験においてはアミノ酸残基の 321~340 番に相当する α ヘリックス構造³⁴⁾や、LCD 内に存在する三つのトリプトファン³³⁾のみの欠損による LLPS の効率低下が示されており、より限局したアミノ酸配列での LLPS の制御が示唆されている。さらに TDP-43 蛋白質は特定の RNA 配列 (GU 繰り返し配列) への結合性が高く、同 RNA の存在下では蛋白質同士の凝集性が低下するなど、周囲の環境によっても凝集性が変化する³⁵⁾。

欧米において最も高頻度に遺伝子変異が認められる C9ORF72 もまた、凝集体形成の関与が報告されている。変異 C9ORF72 遺伝子の GGGGCC 6塩基リピート配列異常伸長は、イントロン内に存在するため本来は蛋白質に翻訳されない。しかし mRNA の開始コドン (AUG) を必要としない repeat associated non-ATG (RAN) translation という特殊翻訳機構により、センス・アンチセンスの両方向に蛋白質翻訳が行われる³⁶⁾³⁷⁾。その結果、グリシン-アラニン、グリシン-アルギニンといった2種類のアミノ酸の繰り返し、dipeptide repeat (DPR) が生じる。この DPR はそのものが封入体の構成因子である。さらにアルギニンに富む DPR は非膜性構造物内において TDP-43、FUS など ALS 関連蛋白質の LCD と結合し、架橋構造を形成する。その結果、非膜性構造物の分解が阻害され、凝集体形成が促進される³⁸⁾³⁹⁾。C9orf72 は RNA 結合部位や LCD を持たないが、LLPS による凝集体形成の促進という点で TDP-43 や FUS と病態機序を共有している可能性がある。

(4) ALS と非膜性構造物

核内非膜性構造物との関連では、我々をはじめとして複数のグループが、核内非膜性構造物の一種である GEM 小体と ALS との関連を報告している。GEM 小体は、survival motor neuron (SMN) 蛋白質をマーカーとする核内構造体で⁴⁰⁾、spliceosome の形成を通じて、mRNA のスプライシングに関与する⁴¹⁾⁴²⁾。Spliceosome はスプライシング反応を司る高分子複合体であり、機能性 RNA の一種である U small nuclear RNA (U snRNA) と複数の特異的蛋白質より構成される⁴³⁾⁴⁴⁾。GEM 小体の発現低下は、U snRNA の発現低下を来し、正常な mRNA のスプラ

イシングを阻害する³⁸⁾⁴⁵⁾。また TDP-43 は GEM 小体と核内で共局在しており⁴⁶⁾、TDP-43 の発現量は GEM 小体の数に影響する⁴⁷⁾⁴⁸⁾。

我々は実際の ALS 症例由来神経組織において一運動神経細胞あたりの GEM 小体数が有意に低下していることを見出した⁴⁵⁾。さらに TDP-43 病理を伴わない *SOD1* 遺伝子変異 (ALS1) 例では、GEM 小体数の低下は認めなかった。このことから ALS における GEM の発現低下は神経細胞変性による二次性的変化ではなく、TDP-43 の機能低下によることを示した⁴⁵⁾。また定量 PCR 法による解析で、TDP-43 封入体を認める脊髄、運動皮質、被殻では一部の U snRNA 発現量が低下したが、非罹患組織の小脳、筋、肝臓では変化を認めなかった。以上より、ALS の病態生理のひとつとして、TDP-43 機能低下を通じた核内構造体の形成、機能低下が想定される⁴⁵⁾⁴⁸⁾。

FUS と GEM 小体、spliceosome の関連も他施設より報告されている。FUS は細胞内で U snRNA、SMN 複合体と結合する。また、FUS のノックダウンにより GEM 小体が減少する⁴⁹⁾。FUS の NLS (nuclear localization signal : 核局在シグナル) 変異でも GEM 小体数の低下を認めており、FUS の核内局在の変化が GEM 小体形成に重要な可能性がある⁴⁹⁾。また GEM 小体が病態生理に関与する疾患として、ALS と同じ運動ニューロン疾患の SMA がある。SMA は *SMN1* 遺伝子の欠損により SMN 蛋白の発現量が著減し、同蛋白の機能喪失、GEM 小体数減少を呈している。さらに GEM 小体の減少を通じて、spliceosome 発現低下、次いでスプライシング異常を生じ、運動ニューロン疾患 SMA を来す⁵⁰⁾。このことから、GEM 小体の異常は運動ニューロン疾患に共通する病態機序である可能性がある。この U snRNA を含めた、機能性 RNA の発現量変動は、ALS のバイオマーカーとしても検討されている⁵¹⁾。

(5) 凝集体分解と ALS 関連遺伝子

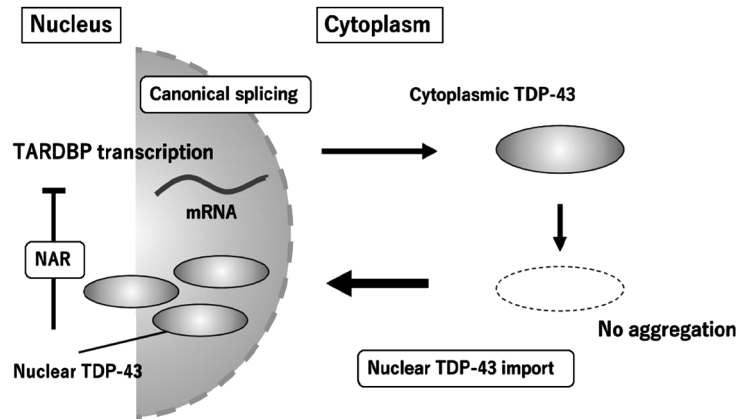
次に、異常蛋白の凝集体分解因子について述べる。神経細胞内での老廃物、異常蛋白質や傷害オルガネラの主要な除去機構は、ユビキチン-プロテアソーム系、およびオートファジー-リソソーム系である。前者は、ユビキチン化された蛋白質が、蛋白質分解酵素複合体プロテアソームにより分解される機構であり、比較的選択的な分解作用を持つ。後者は、大きな蛋白質や傷害されたオルガネラなどの分解を担い、脂質二重膜が細胞質成分を取り囲むオートファゴソームの形成と、オートファゴソームにリソソームが融合して内容物を消化する 2 段階の過程からなる。*SQSTM1/p62* や *NBR1* などのレセプター蛋白質を介して、ユビキチン化された蛋白質がオートファゴソームに輸送されることにより、両者は相補的に作用していることが示されている⁵²⁾。細胞質内の TDP-43 クリアランスにおいてもユビキチン-プロテアソーム系、およびオートファジー-リソソーム系の両者が作用する⁵³⁾。ALS のみならず、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病といったなど神経変性疾患全般において、これら異常蛋白質の除去機構の異常が、主要な病態機序のひとつと考えられている⁵²⁾。

ALS 病因遺伝子には、これら蛋白質除去機構に関連する蛋白質をコードするものが含まれる。ユビキチン-プロテアソーム系機能の調節に関与するものとして、*valosin-containing protein (VCP)* がある。VCP 変異蛋白質は、ユビキチンをはじめ凝集体分解に作用する蛋白質の結合を阻害する⁵⁴⁾。ユビキリンファミリーをコードする *ubiquilin-2 (UBQLN2)*⁵⁵⁾ の変異もまた FALS の原因となりうる。一方、オートファジーにかかわる遺伝子としては *optineurin (OPTN)* がある。OPTN 蛋白質は分解対象をオートファゴソームに運び込む際のアダプターとしての作用を有する。加えて、OPTN は NFκB の制御にも関わり、神経炎症の側面でも ALS 病態に関与する可能性がある⁵⁶⁾。NFκB は、炎症性サイトカインの TNF-α を介し、神経障害性ミクログリアを誘導する。この NFκB の阻害は、変異 *SOD1* マウスの生存期間を延長し、治療ターゲットのひとつと考えられている⁵⁷⁾。さらに *sequestosome 1 (SQSTM1/p62)*⁵⁸⁾ は、ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジーをつなぐレセプター蛋白質である。OPTN、*SQSTM1/p62* の上流に位置する *TANK binding kinase 1 (TBK-1)* も ALS の病因遺伝子として報告がなされている¹²⁾⁵⁹⁾⁶⁰⁾。*TBK-1* 変異は本邦の SALS の 1~2% で認められ、比較的頻度の高い原因遺伝子である⁶¹⁾。*TBK-1*-OPTN 系のさらに上流には、傷害ミトコンドリアの品質管理を行う、家族性パーキンソン病の病因遺伝子 *PINK1* が存在している⁶²⁾。この異なる遺伝性神経疾患の原因遺伝子の機能的な類似からは、神経変性疾患に共通する病態メカニズムの可能性が示唆されるが、その機序の解明はなお今後の課題である。

(6) SALS への展開

最後に、TDP-43 の自己調節機能について述べる。大多数の SALS では明らかな原因遺伝子変異は見出されず、これらの症例での発症機序は不明である。我々は、TDP-43 の自己調節モデルをもとに、より一般化された ALS 病態生理の解明を目指している。TDP-43 蛋白質は核内で自身の mRNA に結合し、選択的スプライシングとポリ A 部位を自己調節することにより、その発現量を厳密に制御している (negative autoregulation; NAR)⁶³⁾。当教室では自己調節機構の破綻により、細胞質での TDP-43 の相対的過剰を報告している⁶³⁾⁶⁴⁾。SALS の病理像では細胞質で断片化・リン酸化された TDP-43 が封入体を形成する一方で、核内の TDP-43 は減少する⁴⁾⁵⁾。このため核内における TDP-43 の NAR 機能は低下し、細胞質では TDP-43 が蓄積しているにもかかわらず、自己 mRNA および蛋白発現量を増加させ、さらに凝集体形成を加速させる⁶³⁾。すなわち、TDP-43 は ALS 病態において、その自己調節のために病態を促進させる悪循環を生じさせている (Fig. 1)。*In silico* モデルの検討では、この悪循環の要因には、TDP-43 の凝集性の亢進、TDP-43 の核細胞質間の移行不良、異常 TDP-43 分解効率の低下、そして自己調節能の効率の低下があり、FALS に関わる代表的な遺伝子の機能と良く対応させることができる⁶⁴⁾。この TDP-43 の NAR 破綻の原因と FALS の病因遺伝子群の機能の一致はまた、治療ターゲット

<TDP-43 metabolisms in healthy state>



<TDP-43 metabolisms in disease state>

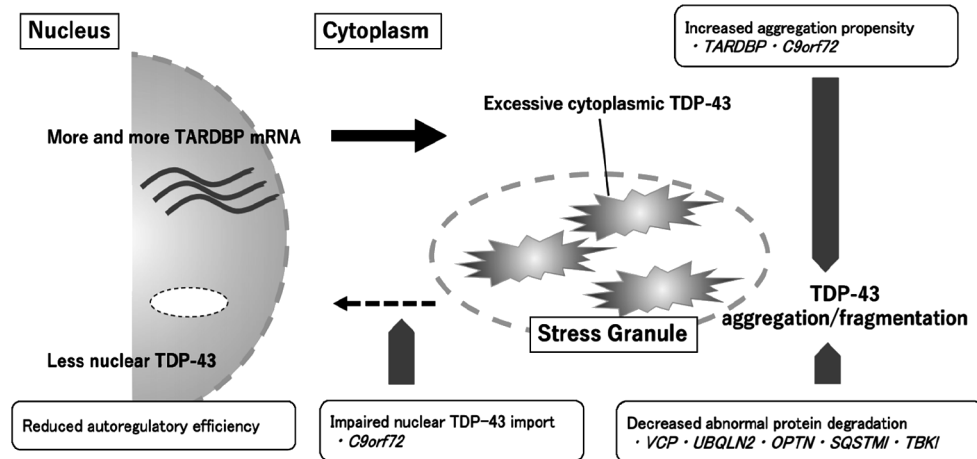


Fig. 1 A hypothesis for the mechanism of transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) pathology in amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Impaired nuclear-cytoplasmic TDP-43 transport, decreased efficiency of abnormal protein degradation, increased aggregation propensity and reduced autoregulatory efficiency shift the TDP-43 autoregulation system enters a disease state. In the disease state, the level of nuclear TDP-43 decreases, TDP-43 aggregation/fragmentation increases, and the level of canonical *TARDBP* mRNA increases. Concepts was obtained from Reference 64. NAR: Negative autoregulation.

となる共通項としてとらえられる。さらに、TDP-43 自己調節に重要な選択的イントロン 6 のスプライシングを、アンチセンス核酸 (antisense-oligonucleotide; ASO) を用いて阻害すると、*TARDBP* mRNA 発現の増加、不溶性の断片化 TDP-43 の増加など ALS 病態に類似の変化が認められた⁶⁵⁾。この結果からも TDP-43 自己調節機構の破綻が ALS の病因に関連している可能性が示される。

治療への展望

ALS の治療薬として、本邦では ALS の治療として、リルゾール (riluzole) およびエダラボン (edaravone) が認可されており、疾患進行抑制効果が期待されている。リルゾールは過度の運動ニューロン興奮を抑制し、エダラボンは酸化スト

レスを抑制することによる治療効果をコンセプトとしている。そのほかに現在本邦では、メチルコバラミン、ペランパネル、ヒト型リコンビナント肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) などの治験が進行中である。さらに患者由来の iPS 細胞を用いたスクリーニングから、ボスチニブ (bosutinib)、ロピニロール (ropinirole) の効果が報告され、これについても治験が開始されている⁶⁶⁾⁶⁷⁾。

また、新しいアプローチの治療開発も進められている。その方法のひとつには、ASO による治療がある。ASO による治療は、神経難病においても既に実用化がされており、2017 年より SMA に対して使用可能となっている。これは対象遺伝子 *SMN2* の splicing を調節し、運動機能獲得、生存期間延長に画期的な効果を呈している⁶⁸⁾⁶⁹⁾。ALS においては、*SOD1* 変異⁷⁰⁾ や *C9orf72* 変異⁷¹⁾ を対象とした、ASO による変異蛋白

の除去や、RNA 毒性の低減が、治療候補として有力視されている。そのほか、RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) を、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて運動ニューロンに発現させる方法⁷²⁾ や、さらには CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子治療の報告もなされている⁷³⁾。これら遺伝子治療は、ヒトの実臨床応用には未だ障壁は多いものの、本稿で述べたような ALS 病態そのものに介入できる可能性をもつものである。

遺伝子治療の他に、最近報告された新しい治療ターゲットとして、*Stathmin2* (*STMN2*) があげられる⁷⁴⁾⁷⁵⁾。*STMN2* は TDP-43 の核内での減少により、特異的な splicing 異常を来し、正常型蛋白質の発現低下を来す。*STMN2* 蛋白質は生理的には運動ニューロンの修復や伸長に関与していると考えられ、正常型 *STMN2* の発現量の減少を介した運動ニューロン死も想定される。*STMN2* の濃度を回復・維持することができれば、運動ニューロンをレスキューする治療候補となる可能性がある。また、ALS に限らず、神経変性疾患の治療においては、今後有用な治療候補が見出されれば、ますます早期かつ特異的な診断が重要となってくるのが想定される。この *STMN2* splicing 変化と TDP-43 機能との関連につき、十分な追試が行われれば、ALS 診断の有用な分子マーカーとなりうる。

以上のように、原因遺伝子の機能解析を通じ、近年明らかとなった ALS 病態から、新しいコンセプトの治療候補が報告され、治療介入が現実のものとなりつつある。しかし、原因遺伝子の多様さ、臨床経過の多彩さから想定されるように、ALS の病態は単一の開始機序ではなく、症例毎に異なる複数の経路が関わる可能性がある。有効な疾患治療のためには、複数の生理的経路あるいは ALS に共通する機序に対する治療が必要となる。さらにひとたび運動神経細胞が変性、消失した場合、その再生は困難であり、疾患早期での診断と治療介入が必要となる。分子病態の解明とともに、ALS 病態をより早期にとらえ得るバイオマーカーについても、今後の研究の発展が期待される。

※著者全員に本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- Doi Y, Atsuta N, Sobue G, et al. Prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *J Epidemiol* 2014;24:494-499.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264:1772-1775.
- 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. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;351:602-611.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-133.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008;40:572-574.
- Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, et al. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008;63:538-542.
- Chia R, Chio A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neuro*. 2018;17:94-102.
- Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2017;377:162-172.
- Muller K, Brenner D, Weydt P, et al. Comprehensive analysis of the mutation spectrum in 301 German ALS families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89:817-827.
- Naruse H, Ishiura H, Mitsui J, et al. Burden of rare variants in causative genes for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) accelerates age at onset of ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019;90:537-542.
- Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 2015;347:1436-1441.
- Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 2013;79:416-438.
- Kwiatkowski TJ, Bosco D, Leclerc A, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009;323:1205-1208.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009;323:1208-1211.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011;72:245-256.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011;72:257-268.
- Konno T, Shiga A, Tsujino A, et al. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:398-401.
- Ogaki K, Li Y, Atsuta N, et al. Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2012;33:2527. e2511-2527. e2516.
- Majounie E, Renton AE, Mok K, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012;11:323-330.
- Alsultan AA, Waller R, Heath PR, et al. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 2016;6:49.
- Nussbacher JK, Tabet R, Yeo GW, et al. Disruption of RNA metabolism in neurological diseases and emerging therapeutic interventions. *Neuron* 2019;102:294-320.

- 23) Li YR, King OD, Shorter J, et al. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J Cell Biol* 2013;201:361-372.
- 24) Cushman M, Johnson BS, King OD, et al. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J Cell Sci* 2010;123:1191-1201.
- 25) Guenther EL, Cao Q, Trinh H, et al. Atomic structures of TDP-43 LCD segments and insights into reversible or pathogenic aggregation. *Nat Struct Mol Biol* 2018;25:463-471.
- 26) Kato M, Han TW, Xie S, et al. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* 2012;149:753-767.
- 27) Kim HJ, Kim NC, Wang YD, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 2013;495:467-473.
- 28) Hyman AA, Weber CA, Jülicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:39-58.
- 29) Bosco DA, Lemay N, Ko HK, et al. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* 2010;19:4160-4175.
- 30) Mahboubi H, Stochaj U. Cytoplasmic stress granules: dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863:884-895.
- 31) Patel A, Lee HO, Jawerth L, et al. A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell* 2015;162:1066-1077.
- 32) Qamar S, Wang G, Randle SJ, et al. FUS phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation- π interactions. *Cell* 2018;173:720-734. e715.
- 33) Li H-R, Chiang W-C, Chou P-C, et al. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) liquid-liquid phase separation is mediated by just a few aromatic residues. *J Biol Chem* 2018; jbc. AC117. 001037.
- 34) Conicella AE, Zerze GH, Mittal J, et al. ALS mutations disrupt phase separation mediated by alpha-helical structure in the TDP-43 low-complexity c-terminal domain. *Structure* 2016;24:1537-1549.
- 35) French RL, Grese ZR, Aligireddy H, et al. Detection of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) oligomers as initial intermediate species during aggregate formation. *J Biol Chem* 2019;294:6696-6709.
- 36) Gendron TF, Bieniek KF, Zhang YJ, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol* 2013;126:829-844.
- 37) Mori K, Weng S-M, Arzberger T, et al. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science* 2013;339:1335-1338.
- 38) Wang Q, Sawyer IA, Sung M-H, et al. Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nature communications* 2016;7:10966.
- 39) Lee KH, Zhang P, Kim HJ, et al. C9orf72 dipeptide repeats impair the assembly, dynamics, and function of membrane-less organelles. *Cell* 2016;167:774-788. e717.
- 40) Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 1996;15:3555-3565.
- 41) Staněk D, Neugebauer KM. The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* 2006; 115:343-354.
- 42) Neugebauer KM. Special focus on the Cajal Body. *RNA Biol* 2017;14:669-670.
- 43) Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;3:a003707.
- 44) Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* 2007;8:340-345.
- 45) Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, et al. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2013;22:4136-4147.
- 46) Wang IF, Reddy NM, Shen CK. Higher order arrangement of the eukaryotic nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:13583-13588.
- 47) Shan X, Chiang PM, Price DL, et al. Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107: 16325-16330.
- 48) Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, et al. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med* 2013;5:221-234.
- 49) Yamazaki T, Chen S, Yu Y, et al. FUS-SMN protein interactions link the motor neuron diseases ALS and SMA. *Cell Rep* 2012; 2:799-806.
- 50) Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155-165.
- 51) Watson CN, Belli A, Di Pietro V. Small non-coding RNAs: New class of biomarkers and potential therapeutic targets in neurodegenerative disease. *Front Genet* 2019;10:364.
- 52) Son JH, Shim JH, Kim K-H, et al. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med* 2012;44:89.
- 53) Urushitani M, Sato T, Bamba H, et al. Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of polyubiquitinated TDP-43. *J Neurosci Res* 2010;88:784-797.
- 54) Watts GD, Thomasova D, Ramdeen SK, et al. Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Clin Genet* 2007;72:420-426.
- 55) Deng HX, Chen W, Hong ST, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 2011;477:211-215.
- 56) Maruyama H, Morino H, Ito H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010;465:223-226.
- 57) Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, et al. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 2014;81:1009-1023.
- 58) Fecto F, Yan J, Vemula SP, et al. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2011; 68:1440-1446.
- 59) Pottier C, Bieniek KF, Finch N, et al. Whole-genome sequencing reveals important role for TBK1 and OPTN mutations in frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease. *Acta Neuropathol* 2015;130:77-92.
- 60) Freischmidt A, Wieland T, Richter B, et al. Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci* 2015;18:631-636.
- 61) Tohrai G, Nakamura R, Sone J, et al. Frequency and

- characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2018;64:158. e115-158 e119.
- 62) Matsuda N, Sato S, Shiba K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 2010;189:211-221.
- 63) Koyama A, Sugai A, Kato T, et al. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res* 2016;44:5820-5836.
- 64) Sugai A, Kato T, Koyama A, et al. Robustness and vulnerability of the autoregulatory system that maintains nuclear TDP-43 levels: a trade-off hypothesis for ALS pathology based on in silico data. *Front Neurosci* 2018;12:28.
- 65) Sugai A, Kato T, Koyama A, et al. Non-genetically modified models exhibit TARDBP mRNA increase due to perturbed TDP-43 autoregulation. *Neurobiol Dis* 2019;130:104534.
- 66) Imamura K, Izumi Y, Watanabe A, et al. The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med* 2017;9:eaaf3962.
- 67) Fujimori K, Ishikawa M, Otomo A, et al. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat Med* 2018;24:1579.
- 68) Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, et al. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med* 2017;377:1723-1732.
- 69) Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, et al. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2018;378:625-635.
- 70) Miller TM, Pestronk A, David W, et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol* 2013;12:435-442.
- 71) Donnelly CJ, Zhang P-W, Pham JT, et al. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron* 2013;80:415-428.
- 72) Yamashita T, Kwak S. Cell death cascade and molecular therapy in ADAR2-deficient motor neurons of ALS. *Neurosci Res* 2019;144:4-13.
- 73) Gaj T, Ojala DS, Ekman FK, et al. In vivo genome editing improves motor function and extends survival in a mouse model of ALS. *Sci Adv* 2017;3:eaar3952.
- 74) Melamed Ze, Lopez-Erauskin J, Baughn MW, et al. Premature polyadenylation-mediated loss of stathmin-2 is a hallmark of TDP-43-dependent neurodegeneration. *Nature neuroscience* 2019;22:180.
- 75) Klim JR, Williams LA, Limone F, et al. ALS-implicated protein TDP-43 sustains levels of STMN2, a mediator of motor neuron growth and repair. *Nat Neurosci* 2019;22:167.

Abstract

Molecular mechanism of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from the viewpoint of the formation and degeneration of transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) inclusions

Sou Kasahara, M.D.¹⁾, Tomohiko Ishihara, M.D., Ph.D.¹⁾, Yuka Koike, M.D., Ph.D.¹⁾,
Akihiro Sugai, M.D., Ph.D.¹⁾ and Osamu Onodera, M.D., Ph.D.¹⁾

¹⁾Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

Sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) and many cases of familial ALS (FALS) demonstrate cytoplasmic transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43)-positive inclusion bodies. Thus, TDP-43 plays a vital role in ALS pathogenesis. Functional analysis of the ALS causative genes advanced the elucidation of the mechanism associated with the formation and degradation of TDP-43 aggregates. Stress granules, which are non-membranous organelles, are attracting attention as sites of aggregate formation, with involvement of FUS and C9orf72. Concurrently, ALS causative genes related to the ubiquitin-proteasome and autophagy systems, which are aggregate degradation mechanisms, have also been reported. Therefore, therapeutic research based on the molecular pathology common to SALS and FALS has been advanced.

(*Rinsho Shinkeigaku (Clin Neurol)* 2020;60:109-116)

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, molecular pathogenesis, TDP-43, inclusion body formation, aggregate degradation