

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	小山 哲秀
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第1784号
学位授与の日付	平成29年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Increased cytoplasmic <i>TARDBP</i> mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. (ALSではTDP-43量調節機構の破綻により、運動神経細胞の <i>TARDBP</i> mRNAが細胞質で増加する)
論文審査委員	主査 教授 池内 健 副査 准教授 武井 延之 副査 教授 小野寺 理

博士論文の要旨

筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は、有効な治療法が存在しない重篤な神経変性疾患である。本疾患は、運動神経細胞が選択的に侵される疾患であり、末期には呼吸不全によって死に至る。ALSの病理学的所見として、下位運動神経におけるBunina小体と、ユビキチン陽性タウ陰性封入体が挙げられる。2006年にこの封入体の構成成分として、TDP-43 (Transactivation responsive region DNA-binding protein of 43KDa) が同定された。ALSの重要な所見として、核タンパク質であるTDP-43が核から消失し、細胞質に凝集して封入体を形成するが、その原因とメカニズムは不明である。

TDP-43は、RNA結合タンパク質であり、スプライシング関連因子の1つであると推定されている。TDP-43タンパク質は、増加すると凝集して、細胞に障害を与えるため、TDP-43タンパク質の量は、厳密に管理されていることが知られている。タンパク質の制御機構は、タンパク質レベルでの調節と、RNAレベルで行われる、NMD (Nonsense-mediated mRNA decay)を介した調節があることが知られている。しかし、どのようにして、TDP-43タンパク質の量を制御しているか、詳細は不明である。また、ALS患者の運動神経細胞で、TDP-43タンパク質の量制御がどのようになっているのか全く分かっていない。

申請者らは、まずTDP-43タンパク質の量制御機構の解明を行った。TDP-43は、最終エクソン6内に、3箇所の選択的イントロン領域(intron6, intron7, intron8)と、3つの選択ポリA付加部位(pA1, pA2, pA4)が存在している。TDP-43安定発現細胞を用いた解析の結果、TDP-43タンパク質は、核内で、*TARDBP* mRNAに直接作用し、エクソン6内の選択的イントロン領域に対するスプライシングを制御することで、*TARDBP* mRNAの量と、細胞内局在を調節して、タンパク質の量を厳密に調整していることを明らかにした。具体的には、TDP-43タンパク質が不足している時には、選択的イントロン領域に対するスプライシングを行わず、近位pA1を持ったmRNAを細胞質に移動させることで、タンパク質を産生していた。一方、TDP-43が過剰な時には、遠位pA4を持ったmRNAを核内に留めるか、もしくは、intron7にTDP-43タンパク質が結合することにより、pA1の使用を抑制し、これに引き続いて、主に選択的イントロン領域の2カ所(intron6とintron7)

のスプライシングを引き起こし、これが細胞質に運ばれて、NMDによる mRNA の分解を受けることで、TDP-43 タンパク質の量を減らしていた。

次に、ALS 患者の運動神経細胞内における mRNA の局在の検討を行った。その結果、コントロール群と ALS 群で、TARDBP mRNA の発現が確認された。このことは、ALS 運動神経細胞であっても、TDP-43 の量調節機構が保持されていることを示唆する結果であった。また、その局在を詳細に検討すると、ALS 患者群では、コントロール群の運動神経細胞と比較して、TARDBP mRNA が増加しており、特にタンパク質を産生する場である、細胞質で増加していることを明らかにした。さらに、ALS 患者において、TDP-43 タンパク質が正常に核局在する細胞と、核内の局在が失われ、細胞質に凝集体を形成している細胞とを比較すると、核内 TDP-43 タンパク質が喪失した運動神経細胞では、TARDBP mRNA が細胞質で有意に増加していることを明らかにした。

以上の結果から、次の事が明らかになった。正常な場合には、TDP-43 の量調節機構が働くことで TDP-43 のタンパク質は適量に調節されている。しかし、ALS では、核内の TDP-43 タンパク質が無いことで、常に TDP-43 が足りない状態であると判断され、誤って TDP-43 タンパク質を作り続けてしまっていると推定される。その結果として、TDP-43 タンパク質が過剰となり、さらなる異常凝集へとつながる悪循環に陥り、最終的に細胞死を来すと想定される。これらの知見から、今後の展望として、TARDBP mRNA の量調節機構を制御することに着目した、新しい ALS 治療法開発のターゲットになることが期待される。

審査結果の要旨

申請者は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄運動神経に蓄積する TDP-43 に着目し、その量調節機構と ALS 発症にかかわる分子病態について検討を行った。

TDP-43 の増減に伴う TARDBP mRNA の解析を内在性およびミニ遺伝子を用いた解析を培養細胞系で行った。その結果、TDP-43 は核内で TARDBP mRNA に直接作用し、cryptic イントロンのスプライシングを調節すること、polyA サイトが異なる mRNA バリエーション産生を調整することを明らかにした。TDP-43 が増加すると、スプライスの亢進と遠位 polyA4 を持った mRNA を増加させ、TDP-43 産生が抑制された。一方、TDP-43 が不足した場合には、このスプライシングが起こらず、近位 polyA1 サイトを有する mRNA が細胞質に移行し TDP-43 タンパク質産生を亢進させた。

このような TDP-43 量調節機構が実際に生体内で作用しているか否かを検討するために、ALS 患者由来の剖検サンプルを用いた解析を行った。ALS 非罹患者と比較して、TDP-43 病理陽性の ALS 患者の運動細胞では、細胞質に分布する TARDBP mRNA が有意に増加していた。このことから、ALS 患者においては TDP-43 の量調節機構が破綻しており、それが ALS 病態に関与している可能性が示唆された。

本研究は、TDP-43 の量調節に係わる分子機構を明らかにし、その恒常性維持機構の破綻が孤発性 ALS の病態に関与することを明らかにした点に博士論文としての価値を認める。