

は、重要な識別点となる。

髄液などのバイオマーカーに関しては、経時的縦断的な検討が必要で、最終的な病理診断が得られて初めて意味付けが可能となる。

PETやSPECTなどの機能画像によるタウの沈着を感度と特異性高く視覚化できれば、タウオパチーとしての鑑別には有用になると考えられる。

### E. 結論

- 1) PSP と CBD は、臨床病理学的に原著の報告をこえて広いスペクトラムがある。従来非典型的とされた例もスペクトラムとして包含することが望ましい。
- 2) PSP と CBD は病変分布に重複が多いため、PSP を疑えば CBD を、CBD を疑えば PSP を両面的に鑑別疾患として考慮してみる必要がある。
- 3) タウの細胞病理は明確に 2 疾患を区別可能であり、類似した病変分布を識別する方法や生体マーカーを探索することが重要である。

### F. 文献

1. Steele J, et al.: Arch Neurol 10:333-59, 1964
2. Rebeitz JJ, et al.: Arch Neurol 18:20-33, 1968
3. Hauw JJ et al.: Neurology 44:2015-9, 1994
4. Dickson et al.: J Neuropathol Exp Neurol 61:935-46, 2002
5. Williams DR et al.: Brain 128:1247-58, 2005
6. Williams DR et al.: Mov Disord 22:2235-41, 2007
7. Kanazawa M et al: Mov Disord 24:1312-8, 2009
8. Armstrong MJ et al.: Neurology 80:492-503, 2013
9. Yoshida M: Neuropathology 26 : 457-470, 2006

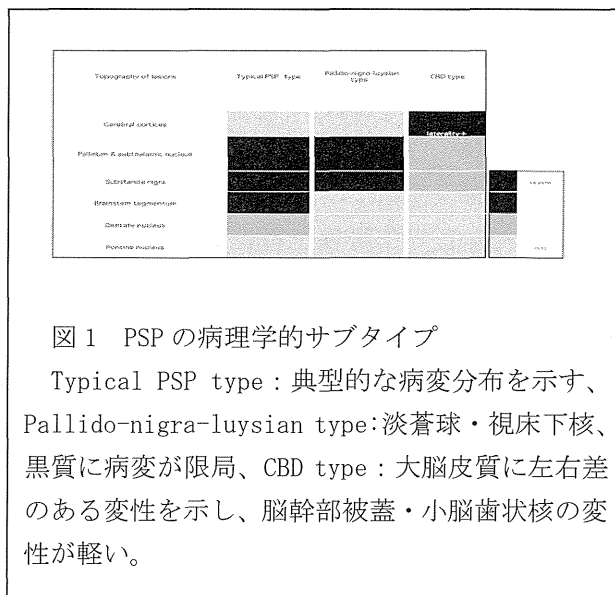


図1 PSPの病理学的サブタイプ

Typical PSP type : 典型的な病変分布を示す、Pallido-nigro-luysian type: 淡蒼球・視床下核、黒質に病変が限局、CBD type : 大脳皮質に左右差のある変性を示し、脳幹部被蓋・小脳歯状核の変性が軽い。

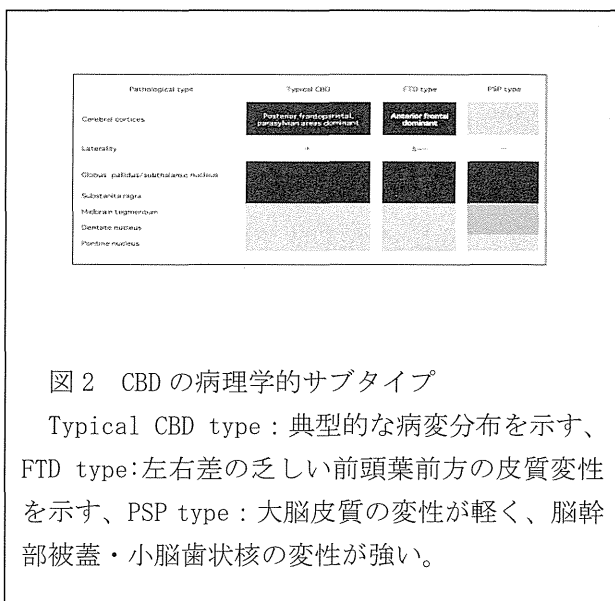


図2 CBDの病理学的サブタイプ

Typical CBD type : 典型的な病変分布を示す、FTD type: 左右差の乏しい前頭葉前方の皮質変性を示す、PSP type : 大脳皮質の変性が軽く、脳幹部被蓋・小脳歯状核の変性が強い。

## 新規 PET トレーサー $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$ による in vivo tau imaging

平野成樹<sup>1,2)</sup> 島田 斉<sup>1)</sup>

1) 独立行政法人放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター

2) 千葉大学大学院医学研究院 神経内科学

### 研究要旨

タウ蛋白病変は Alzheimer 病(AD)及び多くの非 AD 型認知症における神経障害に密接に関与している。我々はタウ蛋白病変を生体内で可視化するための新規 PET リガンドである  $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$  を開発し、様々なタウオパチー患者において PET 撮像を行った。その結果  $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$  は、①AD における特徴的なタウ蛋白病変を可視化でき、②AD における  $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$  の集積は認知機能障害の程度と相関しさらに③非 AD 性認知症のタウ蛋白病変も可視化できた。

### A. 研究目的

#### 背景

#### a. Alzheimer 病と軽度認知機能障害における

#### in vivo 脳内タウイメージング (AD/MCI study)

Alzheimer 病(AD)の神経病態カスケードは、アミロイド  $\beta$  蛋白( $\text{A}\beta$ )の蓄積とそれに続く異常にリン酸化したタウ蛋白の凝集が引き金となり、神経炎症や神経伝達異常を引き起こし、神経細胞死と最終的な症状発現に至る一連の病的プロセスを引き起こすと考えられている。近年生体内の  $\text{A}\beta$  を可視化するアミロイドイメージング技術が登場したことで、AD の病態研究は急速な進歩を遂げたが、軽度認知機能障害(MCI)の時期には既に AD とほぼ同程度の  $\text{A}\beta$  蓄積が認められ、重症度の指標とはならないこと、AD 発症後に  $\text{A}\beta$  ワクチンによる治療を行っても、進行を抑制し得ないことも明らかになった。一方タウは  $\text{A}\beta$  よりも遅れて出現し、AD 発症以後も増加するため、タウの蓄積の程度は病期を反映する可能性があること、神経障害には  $\text{A}\beta$  よりもタウの方が密接に関与していることを示唆する知見が蓄積されてきたことなどから、タウを可視化するイメージング技術の開発が望まれていた。

我々は独自に新規のタウイメージング用 PET リガンドである  $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$  を開発し、前臨床試験及び予備的な臨床研究において、タウ蛋白病変へ

の高い親和性と選択性が認められることがわかってきている。

#### b. 大脳皮質基底核変性症と進行性核上性麻痺

#### における in vivo 脳内タウイメージング (CBS preliminary study)

大脳皮質基底核変性症(CBD)および進行性核上性麻痺(PSP)は、異常リン酸化タウ蛋白が神経細胞内およびグリア細胞内に蓄積するタウオパチーで、臨床診断が CBD であっても病理学的には PSP や AD などであることが多いことから近年臨床診断としては corticobasal syndrome(CBS)として包括されている。

AD のタウが 3 リポート(R)と 4R が混在しているのと異なり、CBS のタウは 4R が蓄積する。タウイメージング PET リガンドの開発においては、疾患により蓄積するタウのアイソフォームが異なることから、AD のタウに結合するリガンドが、非 AD 性タウオパチーのタウ蛋白病変にも結合するとは限らないという問題点がある。 $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$  は、前臨床試験において、AD だけでなく CBS のタウ蛋白病変にも結合をすることが明らかになっている。

### 目的

本研究では  $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$  PET によるタウイメージ

ングの特徴を検討するために、 $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$  PET を用いて各種認知機能障害患者及び健常高齢者の脳内タウ蛋白病変の評価を行った。

## B.研究方法

本研究の実施に当たっては、放射線医学総合研究所の研究倫理審査委員会より承認を得た。また全被験者に口頭と書面による説明を行い、本人ないしは家族から研究に参加する旨の同意書を書面で頂いた。

### 対象

#### a.AD/MCI study

対象は臨床診断基準に則り診断された AD13 例、MCI5 例、健常高齢者 10 例。

※但し本研究においては、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  PET の小脳を参照とした standard uptake value 比(SUVR)画像を用いた視覚判定により、AD 及び MCI 患者は全例 PIB 集積陽性(PIB(+))、健常高齢者は全例 PIB 集積陰性(PIB(-))と判断した症例のみを対象として組み入れた。

#### b. CBS preliminary study

対象は臨床診断基準に則り診断された大脳皮質基底核変性症(CBD)1 例、進行性核上性麻痺(PSP)1 例。

### 神経心理

mini-mental state examination (MMSE), frontal assessment battery (FAB), Wechler Memory Scale-Revised (WMS-R)の logical memory I & II, neuropsychiatry inventory (NPI), clinical dementia rating scale (CDR)による評価を行った。

### PET 撮像と解析

70 分間の $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$  PET ならびに $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  PET を施行し、小脳皮質の集積で標準化した SUVr 画像の作成を行い、PBB3 集積の特徴と PIB 集積との異同、臨床症状との関連について検討した。

### MRI 撮像

PET と同日に 3.0T MRI(GE 3.0T Excite system)を用いて、3D-T1 強調画像水平断の撮像を行った。

## C.研究結果

### a.AD/MCI study

対象被験者間で年齢、性別に有意な差は認めなかった(表 1)。

表 1 対象被験者

|                             | 健常対照                    | MCI due to AD          | AD                    |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| n                           | 10                      | 5                      | 13                    |
| Male:Female                 | 7:3                     | 3:2                    | 5:8                   |
| 年齢                          | 68.2 (7.5)              | 68.9 (8.2)             | 74.2 (7.5)            |
| MMSE                        | 28.7 (1.4)              | 25.8 (1.9)             | 19.0 (2.9)            |
| FAB                         | 17.2 (0.8)              | 14.4 (1.5)             | 12.5 (2.7)            |
| WMS-R [logical memory I/II] | 20.7 (5.3) / 15.7 (6.6) | 12.8 (8.5) / 7.8 (6.1) | 3.2 (3.4) / 2.9 (3.3) |
| NPI                         | 0.1 (0.3)               | 2.4 (2.8)              | 5.6 (8.2)             |
| CDR                         | 0.5                     | 5 (100%)               | 6 (46%)               |
| 1                           | -                       | 0 (0%)                 | 6 (46%)               |
| 2                           | -                       | 0 (0%)                 | 1 (8%)                |
| 3                           | -                       | 0 (0%)                 | 0 (0%)                |

mean (SD).

MMSE: mini-mental state examination, FAB: frontal assessment battery

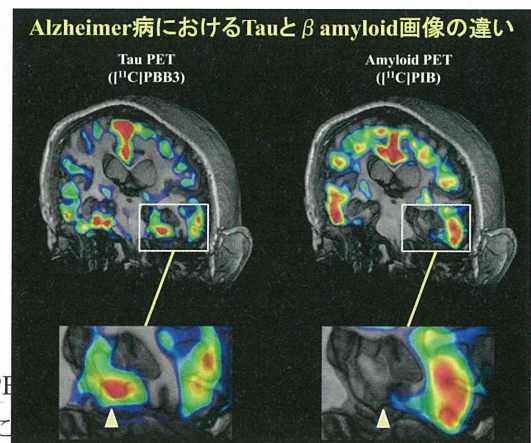
WMS-R: Wechler Memory Scale-Revised, NPI: neuropsychiatry inventory

CDR: clinical dementia rating

健常者は全てPIB陰性、MCIとAD患者は全てPIB陽性

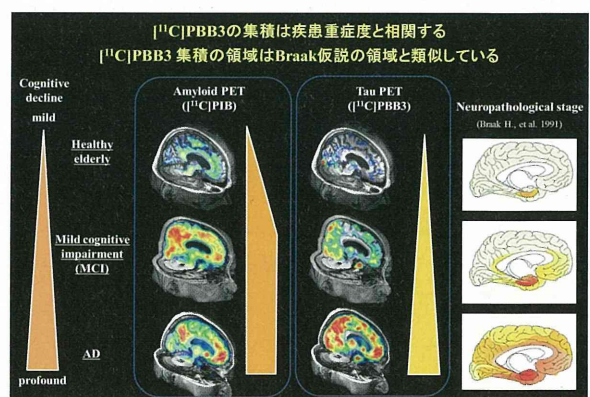
側頭葉内側面に PBB3 の強い集積を認めた(図 1)。

図 1 AD 患者のタウ PET 画像と  $\text{A}\beta$  PET 画像



健常高齢者でも側頭葉内側面に PBB3 集積を認める症例では、傍海馬領域に軽度の萎縮を認めた。

図 2 AD の重症度と PET 画像



認知機能の指標である MMSE スコアと PET で

測定した A $\beta$ 、タウの蓄積量の間を見ると、大脳皮質の PBB3 集積が高い(タウの量が多い)ほど MMSE のスコアは低く、有意な負の相関を示した ( $p = 0.040, r = -0.502$ )。一方、大脳皮質の PIB 集積 (A $\beta$  蓄積量)と MMSE スコアとの間には有意な相関を認めなかった ( $p = 0.494, r = -0.178$ )。

### b. CBS preliminary study

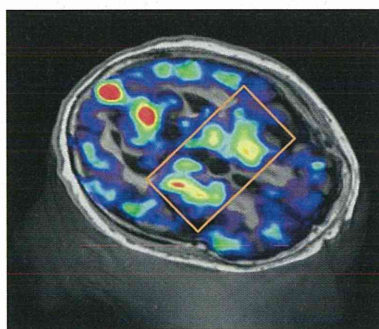
CBD 患者ならびに PSP 患者は、いずれも A $\beta$  蓄積を示唆する明らかな PIB 集積を認めなかった。

[Case1: CBD(経過約 6 年), PET 検査時 66 歳女性]

左上肢の動かしにくさで発症し、その後 1 年以内に易転倒性なども出現した。PET 検査時の診察では、垂直性眼球運動障害、左側優位の寡動と姿勢反射障害が前景に立つ Parkinson 症状(UPDRS motor = 58)とジストニア、右上肢の他人の手徴候、左半身の皮質性感覚障害などを認めた。また、紹介医における事前の検査では、L-dopa チャレンジテストでは明らかな効果を認めず、頭部 MRI では左右差に乏しい両側前頭葉の萎縮を、[<sup>123</sup>I]IMP SPECT では右側優位に両側前頭葉の血流低下を認め、[<sup>123</sup>I]MIBG 心筋シンチグラフィでは明らかな異常を認めなかった。

[<sup>11</sup>C]PBB3 PET 検査では、大脳基底核などに左右差を伴う PBB3 集積を認めた(図 3)。相対的に PBB3 の強い集積を認める右側では、VSRAD advance の解析にて、対側よりも強い白質の萎縮(大脳基底核周囲)を、紹介元臨床機関にて撮像されていた脳血流 SPECT で対側より強い血流低下(前頭葉)を認め、臨床的には運動症状(Parkinson 症状ならびにジストニア)優位側(左側)の対側であった。

図 3 CBD のタウ PET 画像

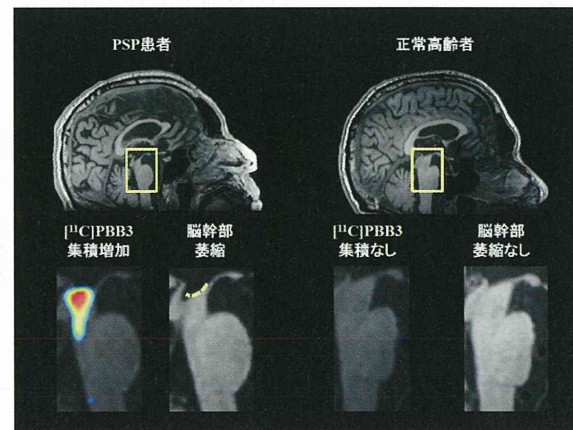


[Case2: PSP(経過約 1.5 年), PET 検査時 57 歳男性]

左下肢の動かしにくさで発症し徐々に進行。発症半年後には易転倒性が出現し、動作緩慢、物忘れ、注意力低下なども認めるようになった。PET 検査時の診察では、frontal release sign、垂直性眼球運動障害、四肢稼動と姿勢反射障害が前景に立つ Parkinson 症状(UPDRS motor = 25)などを認めた。紹介医における事前の検査では、L-dopa チャレンジテストでは明らかな効果を認めず、頭部 MRI では中脳被蓋の萎縮の他、軽度の前頭葉萎縮と第三脳室拡大を、[<sup>123</sup>I]IMP SPECT では右側優位の両側前頭葉および側頭葉内側、右側大脳基底核領域の血流低下を認めた。

[<sup>11</sup>C]PBB3 PET 検査では、中脳被蓋を中心とする脳幹部等に高い PBB3 集積を認めた(図 4)。脳幹部における PBB3 集積の周囲には強い脳萎縮を認め、VSRAD advance の解析では強い白質の萎縮も認められた。

図 4 PSP のタウ PET 画像



### D. 考察

本研究の結果から、AD および MCI 患者における [<sup>11</sup>C]PBB3 PET は [<sup>11</sup>C]PIB PET とは全く異なる集積パターンを呈し、タウ蛋白病変の分布を反映していると考えられた。

Braak らは連続病理解剖の詳細な検討を行い、AD におけるタウ蛋白病変(神経原線維変化)の進展パターンを提唱し、進展ステージと認知障害が非常によく相関することを報告している。本研究の結果からは、[<sup>11</sup>C]PBB3 の集積パターンは Braak ステージの進展と類似し、病期を反映していると考えられた。

さらに $^{11}\text{C}$ PBB3はCBSにおけるタウ蛋白病変も可視化出来ると考えられた。CBSにおける $^{11}\text{C}$ PBB3の集積は、CBSにおける特徴的な臨床症状に関連した部位で強く、脳萎縮や脳血流低下などとも相関する可能性が示唆された。

今後は更に多数例での検討を行うことで、タウオパチーの鑑別診断法と病期の客観的評価法が確立することが期待される。さらに、 $^{11}\text{C}$ PBB3はモデル動物(タウトランスジェニックマウス)とヒトのタウ蛋白病変をいずれも可視化出来ることから、基礎研究の成果を臨床研究につなげるトランスレーショナルリサーチの実現にも寄与し、タウを標的とした新規治療薬開発のような創薬分野においても重要なイメージングバイオマーカーとなることが期待される。

#### E. 結論

$^{11}\text{C}$ PBB3は、ADにおける特徴的なタウ蛋白病変を可視化できた。ADにおける $^{11}\text{C}$ PBB3の集積は、Braakのタウステージの進展と類似し、病期を反映していると考えられた。さらに非AD性認知症のタウ蛋白病変も可視化することが出来た。

#### F. 文献

Braak H, et al. *Acta Neuropathol.* 82(4):239-59, 1991.  
Maruyama M†, Shimada H†, et al. *Neuron.* 2013. (in press) (†: cofirst author)

## 長鎖非コード RNA の機能を規定するタンパク質因子

廣瀬哲郎

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門

### 研究要旨

ポストゲノム時代に入り、ヒトゲノム遺伝子間領域から機能不明な多数の ncRNA が産生されていることが発見され注目が集まっている。我々は、NEAT1 と呼ばれる長鎖 ncRNA (lncRNA) が、核内構造体パラスペックルの構築を司ることを見いだした。これによって、ncRNA が、細胞内構造構築という新しい機能を司ることが明らかになった。パラスペックルは、NEAT1 lncRNA をコアに多数の RNA 結合タンパク質が集約して構成される。我々は、蛍光タンパク質融合ヒト完全長 cDNA ライブラリーを用いて、40 種類ものパラスペックルタンパク質を同定したところ、FUS, TARDBP などの複数の筋萎縮性側索硬化症(ALS)関連タンパク質が含まれることを見出した。また共同研究によって ALS 患者脊髄で異常なパラスペックル形成が観察された。上記 40 種類のパラスペックルタンパク質の RNAi 実験によって、パラスペックル構造構築に必要な複数のステップが同定され、これによってパラスペックル構造体は、NEAT1 という特異的な lncRNA の生合成と共役して形成されることが明らかになった。パラスペックルの生理機能は、未だ明らかにはなっていないが、我々は複数のアプローチ法によって、その機能解明を目指しており、いくつかの機能と作用機序が明らかになってきた。

### A. 研究目的

LncRNA の新しい機能である NEAT1 lncRNA による核内構造体形成機構と生理機能の解明によって、lncRNA の動作原理とその重要性を明らかにする。またパラスペックルに含まれる神経変性疾患関連タンパク質の機能解析を通して、疾患細胞におけるパラスペックルを介した制御機構の重要性を明らかにする。

### B. 研究方法

1. 密度勾配遠心法によって分画した HeLa 細胞分画中の高密度核質画分に濃縮される転写物を RT-qPCR によってスクリーニングした。その後、詳細な RNA の細胞内局在を RNA-FISH 解析によって確認した。

(倫理面への配慮)

### C. 研究結果

NEAT1 lncRNA の機能解析は、化学修飾を施

- したアンチセンスオリゴヌクレオチドを核内にヌクレオフェクションによって導入することによってノックダウンした。
- パラスペックル局在性タンパク質のスクリーニングには、産総研が保有する Venus 融合型 FLJ cDNA リソースを用いた。約 11000 種類の cDNA クローンを細胞にトランスフェクションして得られた発現タンパク質の細胞内局在情報の中から、核内構造体様部位に局在している約 550 クローンを集め、それらの構造体が、パラスペックルマーカータンパク質 (SFPQ) の抗体染色シグナルとオーバーラップするかどうかを共局在スクリーニングした。こうして得られたパラスペックルタンパク質は、個々のタンパク質に対する抗体で内在性タンパク質の面積染色を実施し、確かにパラスペックル局在であることを確認した。
- パラスペックルタンパク質の機能解析は、RNAi による個々のパラスペックルタンパク

質の欠損によって、パラスペックル構造と NEAT1 の蓄積量がどのように変化するかを調べた。

5. Neat1 のノックアウトマウスは、理化学研究所の中川真一博士との共同で作成し、それ由来の MEF 細胞を機能解析に用いた。
6. ALS 患者由来の脊髄運動ニューロンにおけるパラスペックル形成状況の観察は、慶應義塾大学医学部の岡野栄之教授、西本祥仁博士との共同研究によって実施された。

### C. 研究結果と考察

#### 1. 核内アーキテクチャル RNA の発見

ヒト HeLa 細胞を核と細胞質に分離し、さらにショ糖密度勾配遠心によって核質低密度画分、核質高密度画分、核小体に分離した。当時ヒト完全長 cDNA データベース (H-Inv DB) に登録されていた lncRNA 様転写物由来の cDNA クローンを 150 種類選別し、それらの上記画分の細胞内局在を RT-qPCR にて調べた。その結果、機能不明 lncRNA の NEAT1 (MENε/β) が、例外的に核質高密度画分に高度に濃縮されることが明らかになった。NEAT1 の RNA-FISH によって、この lncRNA が核内パラスペックルに局在していることが明らかになった。さらに ASO によるノックダウン実験を実施したところ、NEAT1 のノックダウンによって、パラスペックル構造自体が消失することが明らかになった。これによって、NEAT1 lncRNA がアーキテクチャル RNA としてパラスペックル構造構築を司ることを提唱した (詳細は文献 1 を参照)。

#### 2. パラスペックルタンパク質の同定

産総研が保有するヒト完全長 cDNA リソース (FLJ リソース) を用いて、共局在スクリーニングによってパラスペックルに局在する 35 種類のタンパク質を同定した。それまでに明らかになっている 5 種類のパラスペックルタンパク質と併せて、40 種類のパラスペックルタンパク質が同定された。タンパク質のドメイン構造から、パラスペックルタンパク質の大部分は、RNA 結合性タンパク質であることが示された。さらに筋萎縮性側索硬化症の原因タンパク質として知られている 5 種類の RNA 結合タンパク質が含まれている

ことが明らかになった。これによって、パラスペックルとは、NEAT1 lncRNA によって多数の RNA 結合性タンパク質が集約されて構成されるユニークな核内構造体であることが明らかになった。(詳細は文献 3 を参照)

#### 3. パラスペックル構造構築機序の解析

上記 40 種類のパラスペックルタンパク質のそれぞれを RNA 干渉によって機能阻害し、その結果引き起こされるパラスペックル構造の表現型変化を観察した。その結果、カテゴリー 1 として分類されている 7 種類の RNA 結合タンパク質が、パラスペックル形成に必須であることが明らかになった。カテゴリー 1 タンパク質の一つである HNRNPK の作用機構を詳細に検討したところ、HNRNPK は NEAT1 の 2 つのアイソフォームの中で、パラスペックル構造形成に必須な NEAT1\_2 アイソフォームの合成に必須であることが明らかになった。HNRNPK は、NEAT1\_2 アイソフォームを合成するために、もう一つのアイソフォームである NEAT1\_1 の 3'末端 RNA プロセッシングを抑制する働きがあることが示された。この他にカテゴリー 1 タンパク質には、合成された NEAT1\_2 を安定に保つ因子、さらには蓄積している NEAT1 lncRNA 同士を集約して、巨大なパラスペックル構造構築に関わる因子が存在することが明らかになった。以上のことからパラスペックル構造構築は、NEAT1 lncRNA の生合成経路に沿って進行する事が示された。(詳細は文献 3、文献 4 を参照)

#### 4. パラスペックル機能の解析

培養癌細胞をある種の抗癌剤で処理すると、パラスペックルが肥大化することが明らかになった。この肥大化は、コアとなる NEAT1 lncRNA の発現が、転写レベルで著しく誘導されたことによることが示された。この抗癌剤は、細胞死を引き起こすことが知られているため、パラスペックル肥大化は、細胞死制御に関わる可能性が浮上した。そこで理化学研究所の中川真一博士と共同で作成した Neat1 KO マウス (文献 2 を参照) 由来の MEF 細胞を用いて、抗癌剤による細胞死誘導パターンをコントロール MEF 細胞と比較した。その結果、抗癌剤を処理した際の細胞死誘導が起こる時間が、Neat1 KO MEF で著しく早まるこ

とが明らかになった。これによってパラスペックル肥大化には、抗細胞死機能があることが示唆された。一方、パラスペックルによって制御されている遺伝子を同定するために、HeLa 細胞において NEAT1 をノックダウンした細胞を用いてマイクロアレイを行った。その結果、NEAT1 のノックダウンによって発現上昇する遺伝子が複数同定できた。これらのパラスペックル標的遺伝子の発現は、パラスペックルタンパク質によって活性化されていることが明らかになり、これによってパラスペックルタンパク質は、NEAT1 lncRNA との結合によって発現活性化能を失い、NEAT1 から解離すると発現活性化能を獲得することが示唆された。実際上記抗癌剤処理によって、パラスペックルが肥大化すると、より多くのパラスペックルタンパク質が NEAT1 によってパラスペックル内に係留されるため、標的遺伝子の発現は抑制されることも明らかになった。以上のことから、パラスペックルは、NEAT1 によって一群の発現制御因子を係留する「分子スポンジ」として機能していることが強く示唆された。NEAT1 の発現が、様々な生理条件化で変化することによって、係留されるタンパク質の核質中の存在量変動し、それが標的遺伝子の発現レベルを決定しているものと考えられる。パラスペックルタンパク質の中には、ALS 関連因子が複数含まれていることから、慶応大学医学部の岡野英之教授、西本祥仁博士によって、ALS 患者脊髄の運動ニューロンにおいてパラスペックルの消長が観察されたところ、ALS 初期の運動ニューロンにおいて、通常の運動ニューロンではほとんど確認できないパラスペックルが異常形成され、そこに ALS 関連タンパク質が係留されていることが観察された。この現象は、ALS 患者特異的な運動ニューロン内環境変化を感知した NEAT1 lncRNA の発現上昇に起因することも明らかになった。以上のことから、疾患状態を含む細胞内環境変化に応答した NEAT1 lncRNA の発現変動が、パラスペックルという分子スポンジの大きさを決定し、それによって核内制御因子の係留を介して遺伝子発現の制御に関わるという図式が成り立つことが明らかになってきた（文献 5 を参照）。

#### D.結論

1. NEAT1 lncRNA は、核内構造体パラスペックルの構造構築を司るアーキテクチャル RNA である。
2. NEAT1 lncRNA の生合成と共役して、ALS 関連因子を含む 40 種類以上の RNA 結合タンパク質群が NEAT1 上に会合し、巨大なパラスペックル構造が構築される。
3. NEAT1 lncRNA の発現は、様々な生理条件で変動し、パラスペックルの大きさが決定される。
4. パラスペックルは、NEAT1 lncRNA との相互作用を介して、一群の核内制御タンパク質を係留する「分子スポンジ」として働くと考えられる。
5. パラスペックルは、細胞死の負のレギュレーターとして機能する。
6. 初期 ALS 患者脊髄の運動ニューロンでは、異常なパラスペックル形成が起こり、ALS 関連タンパク質がそこに係留されている。

#### E.文献

1. Sasaki et al., PNAS 106: 2525-2530 (2009)
2. Nakagawa et al., J Cell Biol 193: 31-39 (2011)
3. Naganuma et al., EMBO J 31: 4020-4034 (2012)
4. Naganuma and Hirose, RNA Biology (2013)
5. Nishimoto et al., Mol Brain 6:31 (2013)



## 運動ニューロン疾患と核ワールド ALS の核と核小体：蛋白合成との関連から

小柳清光<sup>1)</sup>，橋本智代<sup>1,2)</sup>，山崎峰雄<sup>3)</sup>，長竿 淳<sup>4)</sup>，朴 英善<sup>5)</sup>，渡部和彦<sup>6)</sup>，  
青木正志<sup>7)</sup>，森田 俊<sup>8)</sup>，柿田明美<sup>9)</sup>，小森隆司<sup>10)</sup>，高橋 均<sup>11)</sup>

- 1) 信州大学医学部神経難病学， 2) 産業医科大学神経内科， 3) 日本医科大学神経内科，  
4) 本間獣医科， 5) 首都医科大学天壇病院神経内科，  
6) 東京都医学総合研究所神経変性病理解剖プロジェクト， 7) 東北大学医学部神経内科，  
8) 信楽園病院病理科， 9) 新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析分野， 10) 東京都立神経病院検査科，  
11) 新潟大学脳研究所病理学分野

### 研究要旨

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の下位運動ニューロンの脱落機序を蛋白合成系から探ることを目的とし，ALS，顔面神経引き抜きラット，および *SOD1*（superoxide dismutase 1）遺伝子組換えラットの脊髄前角細胞または顔面神経核神経細胞で，リボゾーム（r）RNA 遺伝子転写活性と RNA、細胞脱落を計測し，これらと TDP-43 との関連に付いて，著者らの既報と新規研究内容を紹介した。顔面神経引き抜きラットの顔面神経核神経細胞の脱落は rRNA 遺伝子転写活性の減少に引き続いて生じた。ALS 前角細胞では rRNA 遺伝子転写活性が減少しており，それは TDP-43 の核外への移動と関連していた。*SOD1* 遺伝子 H46R 変異ラットの前角細胞脱落機序は孤発性古典型 ALS とは異なっていた。

### A. 研究目的

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の下位運動ニューロンの脱落機序を蛋白合成系から探ることを目的とし，ALS，顔面神経引き抜きラット，および *SOD1*（superoxide dismutase 1）遺伝子組換えラット<sup>1)</sup>の脊髄前角細胞または顔面神経核神経細胞で，リボゾーム（r）RNA 遺伝子転写活性と RNA、細胞脱落を計測し，これらと TDP-43 との関連に付いて，著者らの既報と新規研究内容を紹介する。

### B. 研究方法

症例：新規研究で用いた症例は，臨床病理学的

に孤発性古典型 ALS と診断された日本人剖検例 9 例（50 歳-84 歳，男 4 例，女 5 例），及び年齢相応の日本人対照 10 例（50 歳-87 歳，男 5 例，女 5 例）の剖検例を用いた。いずれも肝疾患と悪性腫瘍が無く，ALS 以外の神経変性疾患を合併していない、人工呼吸器不使用症例である。

また *SOD1*（superoxide dismutase 1）遺伝子 H46R 組換えラット 4 匹，litter mate 2 匹を東北大学神経内科青木正志教授より分与を受け、実験に使用した。

方法：rRNA 遺伝子転写活性を計測する目的で，ホルマリン固定パラフィン包埋された腰髄で，厚

さ 6 $\mu\text{m}$  の切片に AgNOR 染色し、核内陽性所見の断面積を MetaMorph<sup>2)</sup>によって計測した (図 1)。



図1 ALS前角細胞 (矢印がリボソーム RNA遺伝子転写活性陽性領域)

rRNA 遺伝子転写活性と TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43kDa) の変化と相関を見る目的で、腰髄同一切片に AgNOR 染色とリン酸化非依存性 TDP-43 免疫染色を行った。

RNA ポリメラーゼ I が関与する転写因子群の一つであるヌクレオリンに対する抗体を用いて免疫組織化学を行い、陽性所見を MetaMorph で蛍光測光した。

倫理面への配慮：研究は第一著者が現在および過去に所属した信州大学および東京都神経科学総合研究所の倫理委員会の承諾を得て推進した。本研究では個人が特定できないよう暗号化を行った。

### C. 研究結果

(1) 顔面神経引き抜きラットの顔面神経核神経細胞では、引き抜き後わずか 30 分で rRNA 遺伝子転写活性が有意に減少し、1 日後には細胞内 RNA が減少、1 週間から有意な神経細胞脱落が起こった (図 2)<sup>3)</sup>。

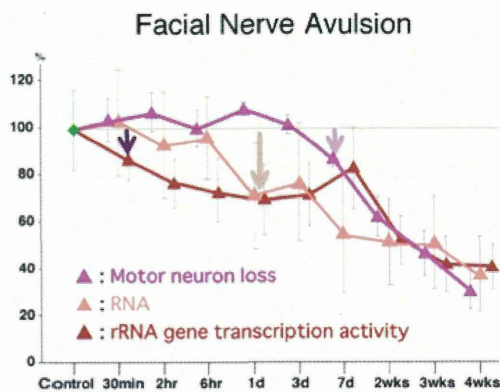


図2 顔面神経引き抜きラットの顔面神経核神経細胞 (Nagasao J, et al. J Neurosci Res 2008 から引用)

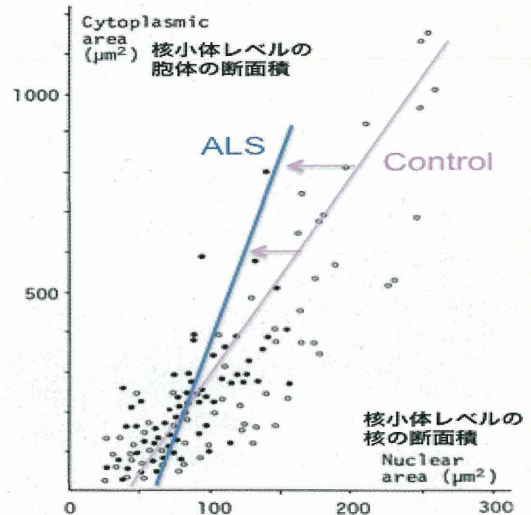


図3 ヒト前角細胞の核と胞体の大きさ (Oyanagi K, et al. In: Neuropathology in Brain Research, 1991 より引用改変)

(2) ALS の前角細胞では、胞体より先に核が萎縮する (図 3)<sup>4)</sup>。

(3) 対照および ALS 前角細胞では、AgNOR 染色でみる rRNA 遺伝子転写活性領域は、核小体と核内の顆粒状構造で陽性であった (図 1)。

(4) ALS 前角細胞では、核の断面積当たりの rRNA 遺伝子転写活性が減少しており、それに引き続いて核が萎縮する (図 4)。

古典型ALS脊髄運動ニューロン：  
核断面積あたりのrRNA遺伝子転写活性 (早期症例)

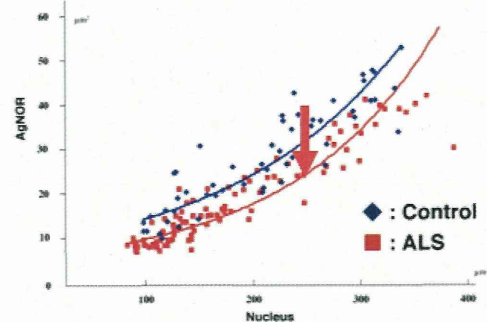


図4 ALSでは、まずリボソームRNA遺伝子の転写活性が減少し、次に核が萎縮する。

(5) ALS 前角細胞の AgNOR 陽性領域はヌクレオリン免疫染色陽性領域と一致した (図 5)。

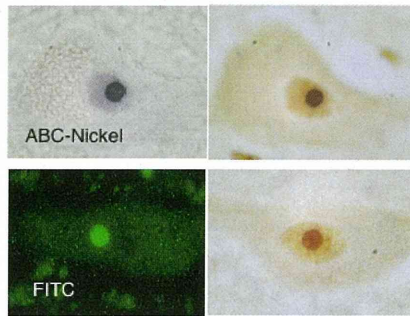


図5 前角細胞におけるnucleolin免疫染色と AgNOR染色と的一致

(6) ALS 前角細胞では、ヌクレオリン量が減少していた (図 6)。

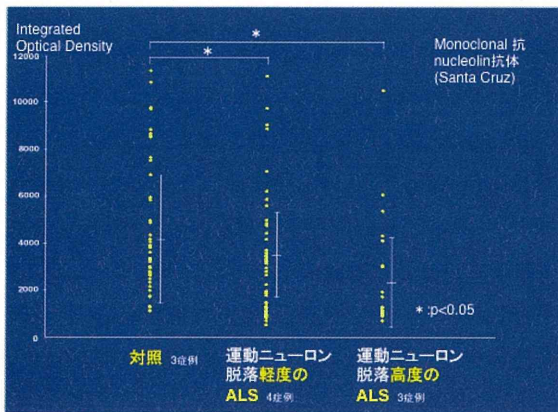


図6 ALSでは大きさが保たれた前角細胞でもnucleolinが減少していた

(7) ALS 前角細胞で、TDP-43 が核内に認められる細胞では rRNA 遺伝子転写活性は保たれて居り、TDP-43 が核から消失し胞体で認められる細胞では rRNA 遺伝子転写活性は減少していた (図 7)。

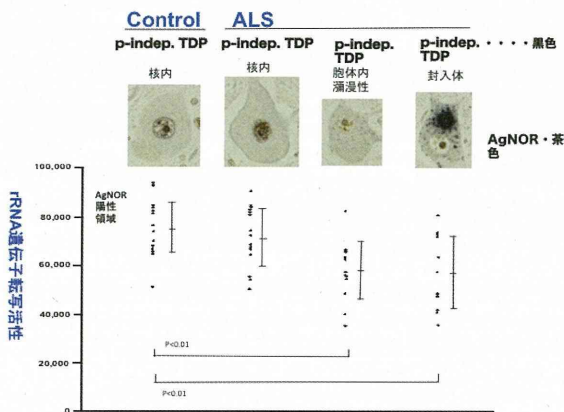


図7 TDP-43の様態とrRNA遺伝子転写活性

(8) SOD1 遺伝子 H46R 組み替えラットの脊髄前

角細胞では、rRNA 遺伝子転写活性は、発症直後には増加する傾向を示し、発症末期には核の大きさと相関しつつ減少していた (図 8)。

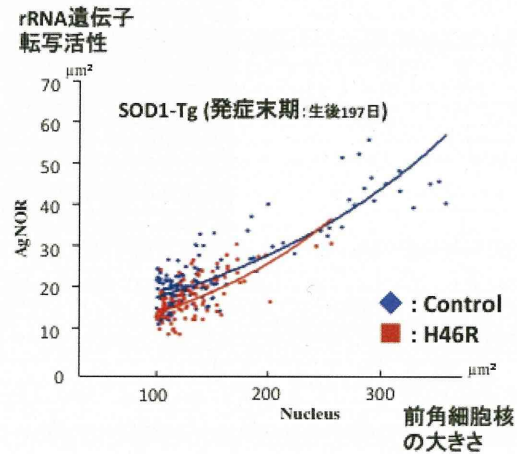


図8 SOD1遺伝子H46R組換えラット前角細胞の核の大きさと rRNA遺伝子転写活性

#### D. 考察

(1) 顔面神経引き抜きラットの顔面神経核神経細胞では、rRNA 遺伝子転写活性の減少は、病変の極めて早期に起こり、それ以後の細胞変性と脱落のきっかけであるように思われる。

(2) ALS 脊髄前角細胞で、まず核が萎縮することは、病変の極めて早期に核内で何らかの変化が生じている事を示している。すでに Mann, Yates ら<sup>5)</sup>は ALS 前角細胞では核がまず萎縮し、引き続いて細胞質 RNA が減少することを報告している。

(3) しかし ALS 前角細胞では、核の萎縮よりさらに早く rRNA 遺伝子転写活性が減少することが分かった。

(4) ヒト前角細胞における rRNA 遺伝子の転写は主として核小体で行われ、核内の顆粒状物質でも行われていると思われた。

(5) ヒト前角細胞でもヌクレオリンが rRNA 遺伝子転写のアクチベータ蛋白である可能性を見出した。

(6) ALS 前角細胞ではヌクレオリンが減少しており、それが rRNA 遺伝子転写活性減少と関連していることが示唆された。

(7) TDP-43 は DNA の転写に密接に関与する分子であると言われている。ALS 前角細胞で、TDP-43 の核から細胞質への移動と、rRNA 遺伝子転写活性減少とは相関していた。

(8) SOD1 遺伝子 H46R 組み替えラットの脊髄前角細胞の脱落と、rRNA 遺伝子転写活性とは、相関が無さそうであり、同ラット前角細胞脱落機序は、孤発性古典型 ALS とは異なると考えられた。

#### E. 結論

ラット下位運動ニューロンの脱落は rRNA 遺伝子転写活性の減少に引き続いて生じる。ALS 前角細胞では rRNA 遺伝子の転写活性が減少しており、それは TDP-43 の核外への移動と関連している。SOD1 遺伝子 H46R 変異ラットの前角細胞脱落の機序は孤発性古典型 ALS とは異なっている。

#### F. 文献

1. Nagai M, et al. J Neurosci, 21:9246-9254, 2001
2. Piao Y, et al. Brain Res, 1372:152-159, 2011
3. Nagasao J, et al. J Neurosci Res, 86:435-442, 2008
4. Oyanagi K, et al. In: Ikuta F (ed) Neuropathology in Brain Research, pp115-126, 1991
5. Mann DMA, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatr, 37:1036-1046, 1974

本研究に開示すべき COI はありません。

## ALS と major spliceosome

山中 宏二<sup>1,2)</sup>

1) 名古屋大学環境医学研究所・病態神経科学分野,

2) 理化学研究所脳科学総合研究センター・運動ニューロン変性研究チーム

### 研究要旨

TDP-43 は、RNA 代謝に広範に関与する RNA 結合タンパク質である。TDP-43 のどのような機能変調が ALS の病態に関与しているかを検討した。培養細胞や、マウス初代培養細胞の検討から TDP-43、FUS は脊髄性筋萎縮症の病因タンパク質 SMN と相互作用し、スプライソソーム構成成分の成熟に重要な役割をはたす核内小体である Gem の維持に寄与していることが判明した。TDP-43 ノックダウン細胞および孤発性 ALS 運動ニューロンでは、主に major spliceosome 構成因子の異常蓄積がみられ、TDP-43 の変調を介したスプライソソーム破綻が ALS 病態に寄与していることが示唆された。

### A.研究目的

TDP-43 は ALS の変性ニューロンにおいて、タンパク質の細胞内局在が核から細胞質へ移動し、凝集体を形成、リン酸化、ユビキチン化、断片化していることから、本タンパク質の機能異常が ALS の運動神経変性に深く関与していることが考えられる。そこで、本研究では RNA 代謝に関する広範な機能を有する RNA 結合タンパク質である TDP-43 のどのような機能変調が孤発性 ALS の病態に関与しているのかを明らかにすることを目的とし、特に、TDP-43 の核内局在から推定されるスプライソソームに関して詳細な検討を行った。

### B.研究方法

培養細胞を用いて TDP-43 の詳細な核内分布を検討し、また TDP-43 や遺伝性 ALS の原因遺伝子産物 FUS の発現を抑制した際に、核内小体の変化を検討した。さらに、脊髄性筋萎縮症の病因タンパク質であり、Gem と呼ばれる核内小体に集積することが知られる SMN について、TDP-43 や FUS タンパク質との関連を検討した。TDP-43 の異常が認められる孤発性 ALS の脊髄運動ニューロン、FTLD-TDP の側頭葉ニューロンにおけ

るスプライソソーム構成成分について、定量的 PCR、免疫組織学的手法を用いてその発現量を検討した。

（倫理面への配慮）患者由来試料を用いた研究に関して、理化学研究所、名古屋大学、東京都健康長寿医療センター、福祉村病院における倫理委員会の承認を得て、各施設の倫理指針を遵守して研究を行った。

### C.研究結果

TDP-43 は核質での分布に加え、スプライソソーム構成因子 snRNP (small nuclear ribonucleoprotein)の構成に重要な SMN 蛋白質が集積する Gem を含む核内小体に集積することが判明した。また、TDP-43 は Gem において、ALS 病因タンパク質の FUS、小児運動神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症(SMA)の原因タンパク質 SMN と複合体を形成していることが判明した (図 1)。TDP-43 や FUS を欠失した細胞では Gem が消失し、TDP-43 の異常がみられる孤発性 ALS 運動神経においても Gem の減少が認められた。そこで、TDP-43 を発現抑制した培養細胞や

ALS, FTLD-TDP の病巣において、スプライソソームの RNA 成分である snRNA (small nuclear RNA) の発現量を検討した。

スプライソソームは、major spliceosome と minor spliceosome からなり、mRNA 前駆体から、イントロンを切り出す反応を行うタンパク質・RNA 複合体である。含まれる低分子 RNA (U small nuclear RNA: U snRNA) の種類により、U1, U2, U4, U5, U6 (major spliceosome), U11, U12, U4atac, U5, U6atac (minor spliceosome) と呼ばれ、これらの連鎖的反應によってイントロンが切り出される。Major spliceosome はスプライシングイベントの 90% 以上を担当するため、その異常は広範なスプライシング異常を来すと推測される (文献 2)。

TDP-43 の発現をノックダウンした培養細胞において U snRNA の発現異常を認め、孤発性 ALS 凍結脊髄においても広範な snRNA (U1, U2, U4, U5, U11, U12) の発現上昇が認められ、免疫組織学的検討では、ALS の運動神経核に著明な U snRNA, snRNP の異常蓄積を認めた (図 2)。ところが、これらの変化は FTLD-TDP の側頭葉では検出できなかった (文献 1)。

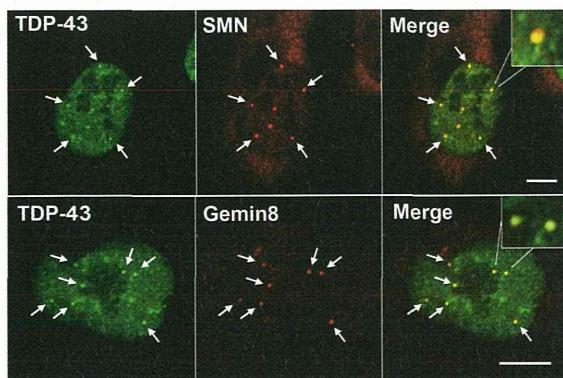


図 1. TDP-43 は核内小体 Gem において SMN, Gemin8 タンパク質と共局在する。Hela 細胞における内在性 TDP-43, SMN, Gemin8 タンパク質をそれぞれ抗体を用いた蛍光染色で可視化した。(左) TDP-43 (緑), (中央) SMN, Gemin8 (赤), (右) Merged image

Bar: 10 $\mu$ m

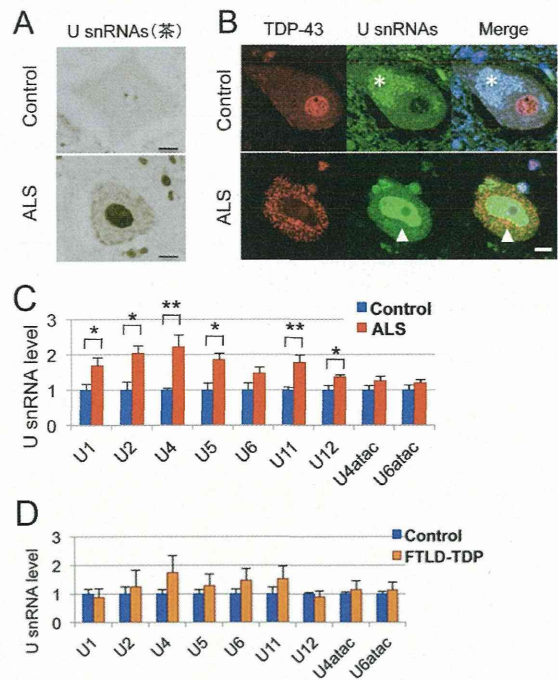


図 2. ALS 患者の脊髄運動ニューロンにおける U snRNA の異常蓄積. A, B) U snRNA を認識する抗体による免疫染色. 運動神経核内において U snRNA の著明な蓄積を認める. C, D) 各スプライソソームの RNA 成分の定量的 PCR による発現量解析. C) 孤発性 ALS 患者頸髄試料 (ALS: n=4, control: n=5)

D) 病理学的に FTLD-TDP と診断された患者側頭葉試料 (FTLD-TDP: n=3, control: n=4)

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01. (Student's t-test)

#### D. 考察

スプライソソームの機能破綻は、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の主要な病態仮説である。本研究により ALS 病態においてもスプライソソーム破綻を見いだしたことから、運動神経細胞はスプライソソーム異常に脆弱であり、2 つの運動神経変性疾患に一部共通したメカニズムが存在することが考えられる (文献 1、図 3)。

Summary: Spliceosomal dysregulation  
in ALS and SMA

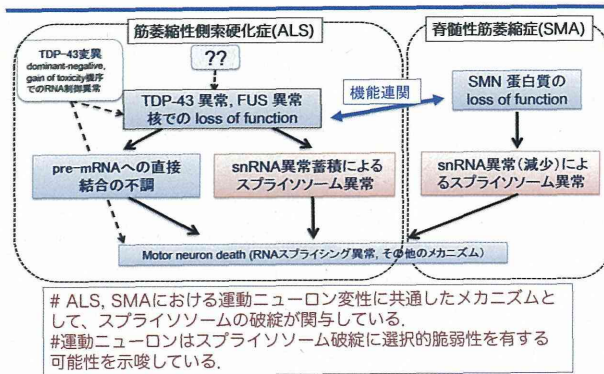


図 3. 本研究のまとめ

E. 結論

本研究から、TDP-43 は、FUS、SMN と相互作用をすることで、核内構造体 Gem に局在して、その機能維持に寄与している。TDP-43 の機能変調によりスプライソソームの破綻を来し、運動神経変性を惹起しうるということが考えられる。

同じく運動ニューロン変性を来す脊髄性筋萎縮症は SMN の機能喪失を主因とし、SMN の機能喪失によるスプライソソームの破綻を呈する。ALS と SMN に共通したスプライソソーム異常は、運動神経の選択的脆弱性を解く鍵になるかもしれない。

本研究の共同研究者に深謝いたします。

共同研究者：築地仁美、古屋亜佐子（理化学研究所脳科学総合研究センター）、井口洋平、熱田直樹、祖父江元（名古屋大学神経内科）、田中章景（横浜市立大学神経内科）、初田裕幸、村山繁雄（東京都健康長寿医療研究センター研究所）、赤津博康、橋詰良夫（福祉村病院）

F. 文献

1. Tsuji H, et al. **EMBO Molecular Medicine** 5: 221-234, 2013.
2. Will CL, et al. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology** 3: a003707, 2013.

## ALS と minor spliceosome

石原智彦<sup>1)</sup> 有泉優子<sup>1)</sup>, 志賀篤<sup>2)</sup>, 加藤泰介<sup>1)</sup>, 佐藤達哉<sup>1)</sup>, 横関明男<sup>1)</sup>,  
柿田明美<sup>3)</sup>, 西澤正豊<sup>1)</sup>, 高橋均<sup>2)</sup>, 小野寺 理<sup>4)</sup>

1) 新潟大学脳研究所神経内科学部門, 2) 同病理学部門,  
3) 同脳疾患標本資源解析学分野 4) 分子神経疾患資源解析学分野

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 神経組織における TDP-43 蛋白の機能異常がスプライシング調節因子 minor spliceosome の発現低下を来たすという仮説を提唱し, これを検討した. ALS 罹患神経組織において, spliceosome の主要構成因子 U snRNA の成熟に重要な GEM 小体が低下すること, U snRNAs のうち minor spliceosome に属する U12 snRNA が低下することを見出した. また ALS 非罹患組織ではこの変化は認めなかった. これらは ALS における TDP-43 の機能低下の具体的な影響を明らかにしたものとして重要である.

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は上位および下位運動神経細胞が選択的に障害される代表的な運動ニューロン病である. 核蛋白の一種である TAR DNA binding protein of 43kDa (TDP-43) 蛋白陽性封入体形成は ALS の病理学的マーカーであり, 家族性・孤発性 ALS 症例にて 40 種類を超える *TARDBP* (TDP-43) 遺伝子変異が同定されている. これらの事実からは同蛋白が ALS の発症に関与することが強く示唆される. その機序として TDP-43 の機能低下 (loss of function) による RNA 代謝異常を介した神経変性が提唱されている. われわれは代表的な運動ニューロン疾患である脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) において, スプライシング調節因子である spliceosome が低下する事実注目した. SMA では遺伝的に SMN 蛋白質が低下している. SMN 蛋白質は核内小体のひとつ GEM 小体の主要構成蛋白である. SMA では, SMN 蛋白, GEM 小体の発現低下を背景として, spliceosome の主要構成因子である U snRNA の低下を来す. Spliceosome は対応する pre-mRNA の配列から,

major/minor spliceosome に分類される. SMA では特に minor spliceosome の低下が生じる. 我々は ALS においても TDP-43 の機能低下から minor spliceosome の発現低下が生じるという仮説を提唱し, これを検討した.

### B. 研究方法

- 1) 脊髄運動神経細胞における GEM 小体の観察  
Control/ALS 患者由来脊髄標本を用いて, TDP-43/SMN の二重染色を行った. さらに共焦点レーザー顕微鏡と 3D 画像解析ソフト Imaris を用いて運動神経細胞内の GEM 小体数を定量した. Control 5 例, ALS 5 例において, それぞれ 16-42 個の運動神経細胞を解析した.
- 2) 培養細胞での U snRNA の定量  
SMN, TDP-43 発現を抑制した複数種類の培養細胞において, 逆転写定量 PCR 法にて 9 種類の UnRNA (U1, U2, U4, U5, U6, U11, U12, U4atac および U6atac) を定量した. 各細胞で安定して発現する 2 種類の遺伝子を専用ソフト Genorm を用いて選定し, 内在性コントロールとして使用した.
- 3) ALS 患者組織での U snRNA の定量  
当研究所の



有する凍結病理検体を対象に検討を行った。TDP-43 病理変化を有する組織として脊髄、大脳皮質運動野および視床を、非罹患組織として小脳、骨格筋、腎臓を選定した。各組織より RNA を抽出し、培養細胞と同様の方法で U snRNA の定量を行った。

4) ALS 脊髄での minor spliceosome の定量  
Control/ALS 患者由来脊髄標本を用いて、脊髄運動ニューロンにおける、minor spliceosome 関連蛋白 snRNP 59KDa/TDP-43 の二重免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト病理検体を対象に検討を行った。対象とするヒト由来試料については、試料の保存管理、その後の解析について患者および患者の親族に説明し、研究目的に使用することへの同意を得ている。また個人のプライバシーに関しても十分に保護している。

### C. 研究結果

#### 1) ALS 脊髄における GEM 小体の減少

正常の脊髄前角運動神経細胞における GEM 小体の個数は 0 個から 30 個まで様々であり、その分布も正規分布を示さなかった。一方で ALS 群では同様に細胞ごとの差が大きく、GEM 小体の個数は 0 個から 30 個まで様々であったが、全体として、5 個以下の細胞が多数であった (図 1)。症例別に GEM 小体数の平均を求め比較すると、ALS 群では、control 群と比して有意に GEM 小体の低下を認めた。さらに *TARDBP* 変異を伴う ALS10 症例でも孤発性 ALS と同様の GEM の低下を認めたが、*SOD-1* 変異の ALS-1 症例では低下を認めなかった。

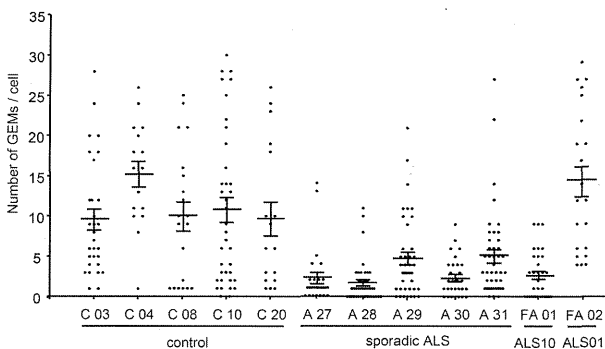


図 1 ALS 脊髄運動神経細胞における GEM の低下

2) TDP-43 発現抑制培養細胞における U snRNA の減少 グリア系の細胞である U87MG 細胞にて、SMN の発現低下により広範な U snRNA の低下、特に minor spliceosomal U snRNA の低下を認めた。TDP-43 の発現低下では、神経系の細胞である SH-SY5Y や U87-MG では minor spliceosomal U snRNA の有意な低下を認めた。しかし、非神経細胞の HeLa 細胞では有意な変化を認めなかった。

3) ALS 組織における U12 snRNA の減少 ALS にて TDP-43 陽性封入体を認める脊髄、大脳皮質運動野および視床で minor spliceosomal U snRNA を中心とする低下を認めた (図 2)。また共通の変化として minor spliceosome に属する U12 snRNA の低下を認めた。一方で TDP-43 陽性封入体を認めない小脳および非神経組織の筋肉、腎臓では U snRNA の有意な変化を認めなかった。

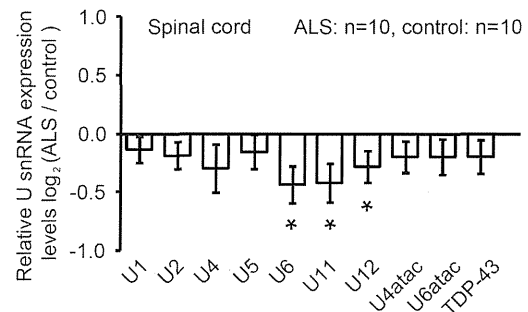


図 2 ALS 脊髄における snRNA の低下

#### 4) ALS 脊髄での minor spliceosome の減少

minor spliceosome 関連蛋白 snRNP 59KDa は通常では核内に存在する。免疫染色を行い、その intensity を比較したところ、Control (n=14) と比較して ALS (n=13) 由来の脊髄運動神経細胞では、snRNP 59KDa の有意な染色性の低下を認めた。

### D. 考察

TDP-43 機能異常は、GEM 小体の低下、U snRNA の低下、snRNP の低下を起こす。これは SMA モデル動物で認められる現象 (cell. 2008) とよく一致しており、運動神経変性の原因を考察するうえで重要と考える。

GEM 小体の減少が、major でなく、minor spliceosome 由来の U snRNA により影響する理由としては、遺伝子数の違いがあげられる。Major, Minor spliceosome を構成する、それぞれの U

snRNA の遺伝子数は、Major spliceosomal snRNAs は U1 で 16 個、U6 で 44 個と複数個存在するが、minor ではほぼ単一コピーである。GEM 小体数の低下は、よりコピー数の少ない遺伝子、すなわち、U12 を含む Minor spliceosome の量に影響すると考える。

Minor spliceosome により制御される U12 type イントロンは全イントロンの 1%以下とまれだが、これを有する mRNA は、'information function' すなわち、DNA 複製、修復、転写、RNA 翻訳に関わるものなど、重要な機能を持つ遺伝子に多く見られる。また、その splicing 速度は、U2type の 2-5 倍程度遅いとされ、pre mRNA スプライシングの律速段階となるなど、生化学的な重要な特徴が知られている。

ALS の重要な特徴は運動神経の選択的変性である。われわれの仮説では、その選択性を説明する 2 つの可能性がある。一つは TDP-43 の機能喪失が運動神経およびグリア細胞に選択的に起きる点である。

これは *TARDBP* 遺伝子変異を有する ALS10 症例でも同様である。もう一つの可能性は運動神経細胞が minor spliceosome の低下に対し、他の細胞、組織と比較して脆弱である可能性である。

実際に Minor spliceosome と運動神経細胞の関連に注目した研究が報告されている (Cell, 2012) 。同報告では SMA モデル生物種における、Stasimon という蛋白の pre mRNA の U12 intron splicing 異常が、脊髄運動神経の介在ニューロンで生じ、運動神経細胞死を引き起こすこととしている。ALS 病態生理に直接的に影響する U12 type intron を有する mRNA は未同定であるが、その検索、病態生理の検討についても更なる研究が必要と考えられる。

## E. 結論

TDP-43 は SMN と同様に、GEM 小体の形成、U snRNA、特に U12 snRNA の生合成に重要と考えられる。我々の実験および既報からは、minor spliceosome 依存性の RNA 代謝異常に対する、運動ニューロンの脆弱性が示唆される。これは ALS における TDP-43 の機能低下の具体的な影響を明らかにしたものとして重要である。

## F. 文献

- Ishihara, T. et.al. Hum Mol Genet. (Epub ahead of print) 2013
- Zhang, Z. et.al. Cell. 585-600, 2008
- Lotti, F. et.al. Cell, 440-54, 2012

## ALS と splicing

石垣 診祐<sup>1)</sup>、祖父江 元<sup>1)</sup>

1) 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

### 研究要旨

FUS は神経細胞の核で splicing factor である PSF/SFPQ と複合体を形成する。この複合体は ALS 関連 FUS 変異体では形成が阻害された。このことは splicing など transcriptome の機能喪失の可能性を強く示唆するものであり FUS 抑制モデルを用いて解析を行ったところ FUS が制御する transcriptome は ALS/FTLD における細胞選択性と関連した。また FUS と PSF/SFPQ はタウ遺伝子 (Mapt) の選択的スプライシングを制御し、4 リpeatタウ/3 リpeatタウ比率を増加させることで神経変性に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

FUS の質的機能喪失による神経細胞の変化についての詳細を検討し、ALS/FTLD における病態への関与を明らかにする

### B. 研究方法

分化運動ニューロン (NSC34 細胞) より核単離後に密度勾配と超遠心による分画を行い、内在性の FUS の複合体サイズの検討を行った。同様に野生型および ALS 関連変異 FUS の複合体サイズの検討を行った。複合体の構成成分を同定するために抗 FUS 抗体での IP 後に LC/MS 解析を行った。FUS 発現抑制モデルを用いた splicing profile 解析より同定した FUS 標的 RNA について、複合体との結合を調べた。また、マウス初代運動ニューロン、大脳皮質ニューロン、グリア細胞、小脳ニューロン、ヒト iPS 由来ニューロンなどに FUS に対する shRNA をレンチウイルスにより導入し FUS の発現抑制モデル細胞を作成し、これらにおける遺伝子発現および選択的スプライシングのプロファイルと比較した。また Mapt 遺伝子の exon10 の splicing について相違を検討した。

### C. 研究結果

異なる FUS の発現抑制モデル細胞のプロファイル解析の結果、ALS/FTLD で細胞死を起こす運動ニューロン、大脳皮質ニューロンでは FUS が制御する RNA のプロファイルが非常に近似しているのに対し、障害を受けない小脳ニューロンでは FUS の knock-down による影響が非常に小さく、プロファイルも異なっていた。グリア細胞は選択的スプライシングのプロファイルは運動ニューロン、大脳皮質ニューロンと異なっていたものの、遺伝子発現に関しては近似していた。このことより、FUS が制御する transcriptome は ALS/FTLD における細胞選択性と関連するということがわかった。

一方、初代培養神経における FUS 発現抑制モデルと TDP-43 発現抑制モデルのプロファイルを比較解析すると、遺伝子発現が 1/4、選択的スプライシングが 1/10 ほどは共通することがわかった。特に遺伝子発現については共通の pathway が存在し、それが神経変性に関わっている可能性が示唆された。

野生型の FUS が核内で形成する高分子複合体は変異 FUS で形成が障害されていた。複合体の構成

成分の一つは PSF/SFPQ であり、FUS とともに alternative splicing を担っているものと推測された。

また、FUS 発現抑制モデルを用いた splicing profile 解析から同定された FUS の標的 RNA である Mapt 遺伝子は FUS-PSF/SFPQ 複合体に結合した。FUS 発現を抑制したマウス初代運動ニューロン、大脳皮質ニューロンでは Mapt Ex10 の inclusion が増加していた。グリア細胞、小脳ニューロンでは変化を認めなかった。ヒト iPS 細胞由来ニューロンでも同様に Mapt 遺伝子 Ex10 の増加を確認した。ヒト FUS を過剰発現させる実験を行うと、Mapt Ex10 の inclusion の比率は回復した。しかしながら ALS 関連 FUS 変異体の過剰発現ではこの回復は認められなかった。ヒト剖検脊髄・脳における検討から FUS と PSF/SFPQ は塩基性封入体陽性の ALS/FTLD 症例において脊髄運動ニューロン、海馬ニューロンの細胞質の封入体に異常局在していることがわかった。また剖検脳から抽出したタンパク質を用いた解析では ALS, FTL, PSP 症例で FUS-PSF の結合の程度は低く、Mapt Ex10 の inclusion が増加していた。

#### D. 考察

FUS が制御する transcriptome は ALS/FTLD における細胞選択性に関連する。また FUS が核内で形成する複合体の splicing ターゲットのひとつがタウをコードする Mapt の exon10 であり、FUS により 3-repeat および 4-repeat タウの異なるアイソフォームの生成が制御されていることがわかった。これは運動ニューロン、大脳皮質ニューロンに特異的であり ALS/FTLD における病変特異性に合致する。4-repeat タウは微小管を安定化させることでニューロンのダイナミクスに対して抑制的に機能することから、今回の知見は ALS/FTLD において FUS がタウのアイソフォーム変化を通じて病態に関与している可能性を示唆する。

#### E. 結論

FUS は質的機能喪失により遺伝子発現、選択的スプライシングの変化を引き起こすことによって神経変性に関与する可能性がある。FUS により 3-repeat および 4-repeat タウの異なるアイソフォームの生成が制御されており、この比率の変化が ALS/FTLD における大脳病変と関わっている可能性を示唆した。

