

主論文の要約

TDP-43 regulates early-phase insulin secretion via CaV1.2-mediated exocytosis in islets

〔 TDP-43 は膵島において CaV1.2 を介して
早期相のインスリン分泌を制御する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 神経内科学分野

(指導：勝野 雅央 教授)

荒木 邦彦

【緒言】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの選択的変性を来し、急速進行性の筋萎縮により発症後 3~5 年で死に至る神経変性疾患である。2006 年に孤発性 ALS の病態分子として TAR DNA-binding protein of 43kDa（TDP-43）が同定された。TDP-43 は核内タンパク質であり、DNA および RNA に結合し、転写活性や RNA 代謝など多様に機能しているが、TDP-43 の機能と ALS の分子病態との関連については不明であった。ALS 患者の運動ニューロンでは核内の TDP-43 は消失し細胞質に封入体を形成することから、TDP-43 の機能異常（Loss of function）と TDP-43 凝集体の細胞毒性（Gain of toxic）の両者が病態に寄与すると考えられている。我々は TDP-43 の機能異常（Loss of function）が病態に寄与すると考え、これまで TDP-43 喪失により運動ニューロンが変性することを示してきた。また、我々は TDP-43 の機能異常の病態解明とともに運動ニューロン疾患のバイオマーカー開発を進めており、今回、ALS 患者でブドウ糖負荷時にインスリン分泌が低下すること、および ALS の剖検臓器組織において β 細胞核内の TDP-43 が消失することを見出した。そこで、TDP-43 の機能低下によりインスリン分泌が低下すると考え、TDP-43 の機能異常によるインスリン分泌能低下の分子機構の解明を行った。

【対象および方法】

49 名の対象者（臨床的に診断した 25 名の ALS 患者と 24 名の健常者、（表 1））に対して、75g 経口ブドウ糖負荷試験（OGTT = oral glucose tolerance test）を行い、血糖値とインスリン値（IRI = immunoreactive insulin）を経時的に比較した。また、インスリン分泌能と抵抗性の指標として、C-ペプチドインデックス（CPI）およびインスリンインデックス（IGI）と HOMA-IR を算出し比較した。算出方法は以下の通りである。CPI = [空腹時血清 C-peptide levels (ng/mL) \times 100 / 空腹時血糖値 (mg/dL)]、IGI = [(30 分 IRI 値 - 0 分 IRI 値) / (30 分血糖値 - 空腹時血糖値)]、HOMA-IR = [空腹時血糖値 \times 空腹時 IRI 値 / 405]。ALS 機能評価スケール（ALSFRS-R）とインスリンインデックス（IGI）の相関関係について調べた。ALS の剖検臓器サンプルにおいて TDP-43、Glucagon、Insulin、に対して免疫染色を行い、核内の TDP-43 の有無について ALS と疾病コントロールで定量的に比較した。

In vitro の実験系として、MIN6 細胞に対して electroporation 法で control-siRNA と *Tardbp*（TDP-43 タンパク質をコードする遺伝子）-siRNA を導入し、48 時間後に RNA およびタンパク質レベルで TDP-43 がノックダウンされていることを確認した上で、インスリン分泌能をインスリン ELISA kit で評価した。また、インスリン開口放出をリアルタイムで評価するため、全反射照明蛍光顕微鏡（TIRF）イメージングを行った。次にインスリン分泌能低下の原因遺伝子を解析するため、マイクロアレイによる網羅的トランスクリプトーム解析を行った。その結果 TDP-43 の標的として同定された *Cacnal1c*（CaV1.2 タンパク質をコードする遺伝子）について、補充によるインスリン分泌の改善の有無を *Tardbp*-siRNA を投与した MIN6 細胞で行い、マウスモデルによる

膵臓組織を用いた In situ hybridization 法を検証した。生理学的に細胞内 Ca イオン濃度を測定する Fura2 イメージング、および Ca イオンチャネルの細胞膜電流の測定を行うパッチクランプ法で Ca チャネルの機能を解析した。さらに TDP-43 タンパク質と *Cacnalc* mRNA の関連を明らかにするため、免疫沈降、mRNA 安定性試験、ルシフェラーゼアッセイなどを行った。

In vivo の実験系として、膵臓 β 細胞特異的に発現する RIP (rat insulin promoter) プロモーター下に発現する Cre 用いて、Cre-loxP システムにより膵臓特異的な *Tardbp* ノックアウトマウスを樹立した。作成にあたっては RIP-Cre を搭載したアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの腹腔内投与、および、RIP-Cre トランスジェニックマウスと *Tardbp*-flox/flox マウスの交配を用いた。作成した膵臓特異的 *Tardbp* ノックアウトマウス (AAV は 8-10 週齢、交配は 6 週齢) において、腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT)、膵島単離、膵還流実験などを行い、インスリン分泌能を解析した。

【結果】

75gOGTT において、ALS 患者群で早期インスリン分泌能の低下を認めた (図 1A)。また、ALS 患者における剖検膵臓の免疫染色によって TDP-43 の核内喪失を認めた (図 1B)。

インスリン分泌機構は、主に基礎分泌とグルコース負荷による 2 相性 (早期相と後期相) 分泌に分かれる。 β 細胞株である MIN6 細胞においてインスリン分泌能を評価したところ、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞でグルコース負荷による早期相のインスリン分泌低下を認めた (図 2A-C)。また、siRNA 抵抗性の TDP-43 の補充によりインスリン分泌は回復した (図 2D-E)。全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF) イメージングにより直接単一インスリン顆粒を評価することで、TDP-43 ノックダウンによる早期相のインスリン分泌低下を確認した (図 2F-H)。

マイクロアレイの結果、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞で電位依存性 Ca チャネル (*Cacnalc*) の mRNA レベルの低下を認め、CaV1.2 を補充すると、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞のインスリン分泌が回復した。また、TDP-43 をノックダウンした MIN6 細胞において、Fura2 イメージングで Ca の細胞内流入は低下し (図 2I-J)、パッチクランプで Ca チャネル電流の電流密度は有意に減少していた (図 2K)。

TDP-43 をノックダウンすると *Cacnalc* の発現が低下する理由を探るため、RNA-IP、mRNA 安定性試験、ルシフェラーゼアッセイを行った。RNA-IP では TDP-43 が *Cacnalc* の mRNA に結合することが示され (図 3A-B)、TDP-43 ノックダウンにより成熟 mRNA (mRNA) の発現量が低下したが (図 3C-D)、mRNA 安定試験では差が見られなかった (図 3E)。さらに、未成熟 mRNA (Pre-mRNA) も成熟 mRNA 同様に低下することから (図 3F)、転写活性について検討した。*Cacnalc* および *CACNA1C* のルシフェラーゼアッセイによって、TDP-43 ノックダウンがプロモーター活性を低下させることを見出した (図 3G-H)。

次に膵臓特異的 TDP-43 ノックアウトマウスを作成し、コントロールである *Tardbp*

flox/flox マウスと比較したところ、糖負荷試験およびインスリン試験で、早期相のインスリン分泌低下を認めた（図 4A-C）。また TDP-43 をノックアウトした膵島、および膵灌流実験においてもインスリン分泌低下を認めた（図 4D-E）。RIP-Cre トランスジェニックマウスを用いた交配実験でも同様の結果が得られた。

【考察】

我々は ALS の神経系以外の全身症状に着目し、患者に対する糖負荷試験でインスリン分泌の低下を、剖検膵臓組織で β 細胞核内の TDP-43 喪失を見出した。TDP-43 は核内に存在するタンパク質であり、RNA 代謝（転写、スプライシング、輸送）、シナプス（シナプス小胞輸送、神経伝達物質の分泌、シナプス伝達）、発達や細胞形態に関連した多様な作用を有することが知られている。本研究では、MIN6 細胞を用いた *in vitro* の実験系および膵臓特異的 *Tardbp* ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験系で、TDP-43 が CaV1.2 の遺伝子プロモーター領域に結合し転写活性を上昇させ、インスリン分泌を制御していることを示した。また、これまで ALS による糖代謝異常の原因として、筋肉の萎縮によるインスリン抵抗性が注目されてきたが、本研究では ALS 病初期において、TDP-43 の β 細胞核内喪失によるインスリン分泌低下が糖代謝異常に寄与していることを明らかにした。

【結語】

本研究では、核内の TDP-43 喪失が CaV1.2 チャネルの低下を介し、インスリン顆粒のエキソサイトーシス（インスリン分泌）を阻害することを示した。運動ニューロンにのみ変性が起きると思われていた ALS において、糖代謝異常が生じ膵臓にまで病態が広がっていることが明らかになった。膵臓におけるインスリン分泌能は ALS 患者に新たな TDP-43 関連病態マーカーと考えられる。また、TDP-43 は ALS の病態分子であるのみならず、糖尿病の発症に関わる分子であることも示唆された。