

201027102A

---

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業

細胞内膜構造に注目した  
運動神経病の画期的な治療法の開発  
平成 22 年度 総括・分担研究報告書

---

Annual Report of the Research Committee for a New Therapeutic Strategy  
in Motor Neuron Diseases in terms of Cell Membrane Structures

Health and Labour Sciences Research Grants  
The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan

主任研究者 小野寺 理

平成23(2011)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 細胞内膜構造に注目した運動神経病の画期的な治療法の開発 主任研究者 小野寺 理  
..... 1

### II. 分担研究報告

1. TDP-43 に関連した筋萎縮性側索硬化症の病態解明に関する研究 ..... 7

分担研究者 小野寺 理(新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター)

横関明男(新潟大学脳研究所神経内科)

研究協力者 有泉優子、佐藤達哉、(新潟大学脳研究所神経内科)

石平 悠(新潟大学大学院医歯学総合研究科)

高橋俊昭(新潟大学医学部保健学科)

高橋 均(新潟大学脳研究所病理学教室)

牛木辰夫(新潟大学腎研究施設構造病理学分野)

2. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における嗜銀顆粒性認知症病変の共存に関する研究 ..... 12

分担研究者 高橋 均(新潟大学脳研究所病理学分野)

研究協力者 相馬健一、付 永娟(新潟大学脳研究所病理学分野)

柿田明美(新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター)

3. 線虫を用いた変異型 p97 が TDP-43 蓄積におよぼす影響に関する研究 ..... 15

分担研究者 山中邦俊(熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野)

4. TDP-43 遺伝子改変マウスの作成と疾患モデルへの応用 ..... 18

分担研究者 佐藤俊哉(新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野)

研究協力者 廣川祥子、横山峯介(新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野)

西澤正豊(新潟大学脳研究所神経内科)

崎村建司(新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野)

小野寺 理(新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター)

5. 細胞内膜構造の走査電顕による解析に関する研究 ..... 21

分担研究者 牛木辰男(新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野)

研究協力者 甲賀大輔(新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野)

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

# I 総括研究報告

## 総括研究報告書

### 細胞内膜構造に注目した運動神経病の画期的な治療法の開発

主任研究者 小野寺理 (新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター)

#### 1. 本研究班の目的

運動神経の変性を主体とする運動神経疾患は、その治療法の開発が最も望まれている。運動神経疾患には、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、痙性対麻痺、Charcot-Marie-Tooth病(CMT病)などの疾患が知られている。近年、それらの原因遺伝子の多くが単離され、各々の疾患毎に治療方法が検討されてきたが、いまだ成功していない。一方、近年、ポリグルタミン病など、多少臨床像が相違しても、分子病態が類似している疾患群が明らかとなり、従来の疾患概念を超えた、分子病態に基づく病態の理解と治療方法の開発が重要となっている。

ここ2年、運動神経疾患と細胞内膜構造(ゴルジ装置、小胞体)との関連が注目されている。遺伝性痙性対麻痺の原因蛋白であるatlastinは、その変異により細胞内の膜構造、特に、ゴルジ装置、小胞体の3次元構造の異常を引き起こす(Hu et al. Cell 2009:138: 549-61, Orso et al. Nature 2009:460: 978-83)。さらに運動神経優位の軸索型の末梢神経障害を示すCMT病IIA型では、原因遺伝子であるmitofusion2の異常により、小胞体-ミトコンドリア間の結合が損なわれ、神経変性に至る(Martins et al. Nature 2008:456: 605-10)。ALSでは、以前よりゴルジ装置の断片化が指摘され、これはTDP-43の封入体を伴う細胞に認められる(Fujita Y et al. J Neurol Sci. 269:30-4)。これらの事実は、運動神経細胞死に、細胞内小器官の異常が関わっていることを示唆している。しかし、その機序、病態については明らかではない。

我々は優性遺伝性のALS家系においてTDP-43遺伝子にミスセンス変異を見だし、その剖検組織で核のTDP-43が消失していることから、本症にTDP-43の機能喪失が関与していると考え解析を進めてきた。現在までにTDP-43のノックアウトマウスは胎生致死であり、コンディショナルノックアウトマウスは早期に死亡することを明らかにしている。さらに、驚くべき事にTDP-43の喪失により、ゴルジ装置、小胞体の膜構造が破壊されることを見いだした。本研究計画ではTDP-43機能とゴルジ装置-小胞体システムとの関連を検討し、さらに運動神経細胞死における細胞内小器官の寄与について検討を加え、その細胞死のメカニズムを明らかにし、共通する治療方法を探求する。

#### 2. 研究計画および方法

本研究計画では、TDP-43の機能喪失モデル、ALS関連ミスセンス変異型TDP-43導入モデル、痙性対麻痺、運動神経優位型末梢神経障害の原因遺伝子(atlastinやmitofusin2)の機能喪失モデルを用い、細胞内の小器官の膜構造について検討する。対象とする細胞は、培養神経および胚性幹細胞より作製したヒト運動神経細胞、モデルマウス、モデル線虫、剖検ヒト組織にて解析する。神経細胞には、他の細胞とは異なるゴルジ装置-小胞体システムがあることが知られているため、ヒトES細胞より運動神経細胞を分化させ、本実験に用いる(Nat. Biotechnol. 23: 215-21)。機序として、次の仮説を検証する。TDP-43のC末は変性構造をとる事が知られている。そのため安定のためには同部への他のタンパク質の結合を必要とする。このパートナー蛋白の候補としてP47がある(Stelzl U et al. Cell. 122:957-68)。P47は核内蛋白であるが、状態によりvalosin-containing protein(VCP)と結合し、ゴルジ装置の再構成や、小胞体の膜構造に関わっている。これよりTDP-43の機能喪失によりP47の不安定性が引き起こされ、膜構造の異常が引き起こされると考



える。興味深いことに、VCP 変異は前頭側頭変性症を引き起こすが、この場合 TDP-43 の凝集を引き起こす。このことから TDP-43, VCP, P47 には密接な相互作用があると推定される。

#### 【平成22年度】

##### ① TDP-43 の機能喪失による細胞内膜構造異常の検討(小野寺, 牛木, 高橋, 横関)

RNAi の手法を用い、TDP-43 を減少させ、その結果起こる細胞内膜構造異常を、共焦点レーザー顕微鏡および走査電顕にて検討する。さらに TDP-43 の機能喪失による膜構造異常の機序を解明するため、TDP-43 に結合する蛋白質群を、LC-MS/MS を用い網羅的に解析し、各蛋白質の安定性を検討する。

##### ②膜構造異常による機能解析(小野寺)

リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡を用い、細胞外刺激に対する小胞体からのカルシウム応答異常を検討する。

##### ② 線虫を用いたモデル生物系の作製(山中)。

上記の疾患関連遺伝子の機能喪失モデルを、線虫にて作製する。線虫は蛍光蛋白により細胞内膜構造をラベルし、体表よりその構造を確認できる。線虫の運動能を表現形とし膜構造の異常と症状との関連を検討する。

#### 【平成23年度】

##### ①モデルマウスにおける検討(佐藤, 牛木, 高橋)

コンディショナル ターゲティングが可能な TDP-43 floxed マウス TDP-43(ex3)-flox, および、疾患関連変異型TDP-43 ノックインマウス TDP43(Q343R) を用い、vivo での TDP-43 と VCP, P47 の蛋白複合体の形成について、免疫沈降法、免疫組織化学法にて検討する。さらに、そのゴルジ装置-小胞体構造について検討を加える。

##### ②ヒト における検討(牛木, 高橋, 小野寺)

患者剖検組織にて、小胞体-ゴルジ装置を免疫組織化学、および、電子顕微鏡にて解析する。神経細胞特異的なゴルジ装置の Golgi outposts にも注目して観察する(Ehlers. Neuron 55: 686-89)。TDP-43 の凝集体出現と、膜構造にどのような関連があるか 3次元構築を行い検討する。

##### ③ 線虫を用いたモデル生物系による薬剤の検討(山中)。

線虫にて確立したモデル系にて、想定される薬剤効果を確認する。また、線虫は容易に遺伝子のノックダウンを導入することができるため、これを用いて症状の重症度を規定する遺伝子ネットワークを明確にする。

#### 【平成24年度】

モデルマウスおよび線虫モデルを用い、膜構造を安定化させる薬剤の開発を試みる(山中, 佐藤, 横関, 小野寺)

### 3. 1年目の成果の概要

筋萎縮性側索硬化症 ALS では、上位および下位運動神経細胞の変性と脱落を認めるが、残存する運動神経細胞に認められる封入体の構成成分として TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定され、TDP-43 は ALS の病態に関与していると想定される。TDP-43 の機能として mRNA 前駆体のスプライシングを調節することが報告されているが、ALS の病態に直接関係するような遺伝子のスプライシング異常は知られていない。一方、ALS の運動神経細胞において、ゴルジ装置の断片化、さらに小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官の異常も指摘されている。TDP-43 が核から消失し、細胞質内封入体を形成した脊髄前角細胞において、ゴルジ装置の断片化、および TDP-43 の粗面小胞体への局在が報告されており、TDP-43 が細胞内小器官の構造維持に関わる可能性を考えた。

横関らは、本研究では、TDP-43 の発現を抑制することにより、培養細胞系において、ゴルジ装置の断片化のみならず、小胞体、ミトコンドリアの構造変化が引き起こされることを示した。この知見は、TDP-43 が細胞内小器官の形態維持に関与する可能性を示し、ALS の病態機序の背景として、細胞小器官の構造異常に伴う機能障害を示唆するものである。今後、動物モデルを用いて、運動神経において細胞小器官構造変化が認められるかを検討し、さらに TDP-43 が細胞小器官の形態維持に関与するメカニズムの解析が必要と考える。

佐藤らは筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスを確立するため、TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスを作成した。最初にヘテロ欠損個体(Tardbp+/-)を解析したところ、TDP-43 自身の厳密な発現制御機構により、多くの組織で mRNA 発現レベルが回復し、明確な表現型が現れないことが確認された。一方、初期胚では発現レベルの回復が不十分であり、発生遅延を生じるとともに、ホモ欠損個体(Tardbp-/-)が胎生致死であることが示された。そこで NSE39-Cre マウスを用いて、神経特異的ノックアウトマウス(Tardbp<sup>flox/flox</sup>/NSE-Cre+)を作成したところ、脊髄性筋萎縮症モデル(SMNF7/Δ7、NSE-Cre+)と同等以上の強い表現型が認められ、更なる解析が必要と考えられた。

牛木らは、細胞内膜系の微細構造を、とくに走査電子顕微鏡を用いて立体解析することを試みた。この手法では、光学顕微鏡よりはるかに高い分解能で、ゴルジ装置や小胞体の構造解析が可能で、しかも従来の透過型電子顕微鏡を用いた手法では得られない三次元情報の取得が可能である。そこで、本年は脊髄前角の運動神経細胞の基本構造の解析を行い、今後のモデルマウス解析の基盤をえた。また TDP-43 機能喪 in vivo 実験の細胞について走査電子顕微鏡で細胞内膜系を解析する手法を確立した。これらの研究は、次年度の研究の基盤として重要であり、今後はこの方法を用いた細胞内膜系の微細構造病態解析に利用できることが期待される。

山中らは酵母ツーハイブリッド法により、TDP-43 と野生型及び変異型 p97 との相互作用を検討した。その結果、相互作用は認めなかった。生体内での相互作用を知るために、IBMPFD や ALS の原因となる変異を導入した p97 を発現するトランスジェニック線虫を作製し、免疫沈降法によりそれらの相互作用を検討したが、認めなかった。このことは、野生型及び変異型 p97 は TDP-43 と安定な複合体を形成していないことを示唆している。ところが変異型 p97 に結合するコファクターの比率が野生体とは異なることを見いだした。今後は、TDP-43 蓄積の有無や膜融合・タンパク分解活性・細胞内小器官形成を検討し、寿命などにおよぼす影響を明らかにする。

高橋らは、剖検にて筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) と確定診断された 37 連続剖検例(男性 25 例、女性 12 例;死亡時 45-84 歳、平均 71.5 ± 9.0 歳;罹病期間 8-180 ヶ月、中央値 22 ヶ月)を対象に、嗜銀顆粒性認知症(argyrophilic grain disease: AGD)の共存の有無を検討した。その結果、37 例中 14 例 (38%) に大脳辺縁系を中心に AGD 病変が認められた。この出現頻度は、これまで検討されてきたタウオパチーであるアルツハイマー病や進行性核上性麻におけるそれに匹敵する値であり、「ALS では AGD を合併しやすい」ことを見出した。

## II 分担研究報告

## 厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業)

## 分担研究年度終了報告書

## 細胞内膜構造に注目した運動神経病の画期的な治療法の開発

## TDP-43 に関連した筋萎縮性側索硬化症の病態解明に関する研究

分担研究者	小野寺 理	新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
	横関 明男	新潟大学脳研究所神経内科
研究協力者	有泉 優子	新潟大学脳研究所神経内科
	石平 悠	新潟大学大学院医歯学総合研究科
	佐藤 達哉	新潟大学脳研究所神経内科
	高橋 俊昭	新潟大学医学部保健学科
	高橋 均	新潟大学脳研究所病理学教室
	牛木 辰夫	新潟大学腎研究施設構造病理学分野

## 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 ALS では、上位および下位運動神経細胞の変性と脱落を認めるが、残存する運動神経細胞に認められる封入体の構成成分として TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43)が同定され、TDP-43はALSの病態に関与していると想定される。TDP-43の機能としてmRNA前駆体のスプライシングを調節することが報告されているが、ALSの病態に直接関係するような遺伝子のスプライシング異常は知られていない。一方、ALSの運動神経細胞において、ゴルジ装置の断片化、さらに小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官の異常も指摘されている。TDP-43が核から消失し、細胞質内封入体を形成した脊髄前角細胞において、ゴルジ装置の断片化、およびTDP-43の粗面小胞体への局在が報告されており、TDP-43が細胞内小器官の構造維持に関わる可能性を考えた。本研究では、TDP-43の発現を抑制することにより、培養細胞系において、ゴルジ装置の断片化のみならず、小胞体、ミトコンドリアの構造変化が引き起こされることを示した。この知見は、TDP-43が細胞内小器官の形態維持に関与する可能性を示し、ALSの病態機序の背景として、細胞小器官の構造異常に伴う機能障害を示唆するものである。今後、動物モデルを用いて、運動神経において細胞小器官構造変化が認められるかを検討し、さらにTDP-43が細胞小器官の形態維持に関与するメカニズムの解析が必要と考える。

## A. 研究目的

ALSは、成人期に発症し、進行性の筋萎縮と筋力低下をきたし、呼吸不全により致死性の経過をたどる神経変性疾患である。病理学的には、上位および下位運動神経細胞の変性と脱落を認め、残存する運動神経細胞にBunina小体、ユビキチン陽性のskein様封入体を認めることが特徴であり、ユビキチン陽性のskein様封入体にはTDP-43が含まれる。また、家族性および孤発性のALSにて、TDP-43遺伝子変異が報告され、TDP-43はALSの病態に関与していると想定される。TDP-43はmRNA前駆体のスプライシングを調節する機能を有し、正常では核に存在する。しかし、ALSの運動神経細胞では、TDP-43は細胞質へ移動し封入

体を形成する。ALSにおけるTDP-43の病態機序として、封入体形成による細胞毒性獲得仮説と、核からの消失による機能喪失仮説が唱えられているが、病態に直接関連するメカニズムは明らかとなっていない。また、ALSの運動神経細胞では、ゴルジ装置の断片化、さらに小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官の異常も指摘されてきたが、TDP-43の機能とこれら細胞内小器官との関連は不明である。しかしながら、TDP-43が核から消失し、細胞質内封入体を形成した脊髄前角細胞において、ゴルジ装置の断片化が報告されており、我々は、TDP-43の新たな機能として、TDP-43が細胞内小器官の構造維持に関わる可能性を考えた。本研究は、TDP-43がゴルジ装置断片化に関与するメカニズムの解明と、他細胞内

小器官の形態への影響を検討し、運動神経細胞の変性に至る機序を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

TDP-43 の機能喪失モデルとして siRNA により TDP-43 の発現を抑制した HeLa 細胞、U87MG 細胞、SHSY-5Y 細胞、COS7 細胞を作成した。ゴルジ装置はアポトーシスによっても断片化するため、caspase 3/7 assay、CytoTox-Glo Assay にて細胞死を検討した。その結果より、TDP-43 発現を抑制しても、アポトーシスが引き起こされないことを確認した。次に、ゴルジ装置、小胞体、ミトコンドリアの形態、さらに小器官間の局在関連を蛍光免疫染色、もしくは蛍光標識蛋白を用いて、共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、傾向を確認した。また、TDP-43 と細胞小器官構造との関連が想定されることから、TDP-43 の核以外での分布を確認するため、マウス脳をシヨ糖密度勾配遠心法にて分画化し、TDP-43 の局在を検討した。さらに、TDP-43 が、ゴルジ装置や小胞体の構造に関与している蛋白質と結合すると想定し、ゴルジ装置、小胞体の維持に関与する VCP(valosin-containing protein)、p47 と TDP-43 との結合を、HeLa 細胞を用いた免疫沈降法にて検討した。

### (倫理面への配慮)

動物実験は、新潟大学当該委員会に研究計画を提出の上、実験の承認を得た上で、法令を遵守して実施した。

## C. 研究結果

TDP-43 siRNA により、TDP-43 の発現が 10%以下に抑制されることを確認した。また TDP-43 の発現細胞においても、アポトーシスは引き起こされず、後述する細胞内小器官の形態変化は、細胞死による 2 次的な変化ではないと判断した。TDP-43 発現抑制細胞では、ゴルジ装置は断片化し、細胞質に拡散していた(図 1)。また、断片化したゴルジ装置の多くは、シス嚢、トランス嚢が共局在していたが、両者が解離した断片も認めた。小胞体構造の検討では、HeLa、COS7 細胞では、コントロール群では網状構造細胞の割合が多く、TDP-43 発現抑制群ではその割合が減少した

(図 2)。ミトコンドリアは小胞体に添った細長くつながったネットワーク様に観察されるが、TDP-43 発現抑制群では、このミトコンドリアの分布密度が、細胞質の外側において減少していた。また、小胞体網状構造との局在を検討すると、両者が共局在している割合が、TDP-43 発現抑制群で低下していた(図 3)。マウス脳組織での TDP-43 局在の検討では、TDP-43 は小器官が存在する膜分画においても検出された。しかし、TDP-43 と VCP、p47 との蛋白-蛋白結合や相互作用の検討では、いずれの蛋白でも直接的な結合は認めず(図 4)、TDP-43 発現抑制においても VCP、p47 の発現に影響は認めなかった。現時点は TDP-43 がゴルジ装置、小胞体、ミトコンドリアの構造とどう関わる機構は不明である。小胞体とゴルジ装置間には膜輸送経路が存在し、ゴルジ装置の断片化と合わせて考えると、小胞体-ゴルジ装置間の膜輸送の障害により、これらの形態変化が引き起こされる可能性が推察される。さらに、小胞体とミトコンドリアが解離すると、小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオンの供給が障害され、細胞障害をきたすことが想定される。今後の研究において、TDP-43 が細胞内小器官の構造維持に寄与する分子機構に関して解析をすすめ、その作用機序を明らかにする。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

【ALS Update】ALS の病態 FUS の観点から  
志賀篤, 西澤正豊, 小野寺理

医学のあゆみ 235 巻 3 号 236-240 (2010.10)

2.【神経変性疾患における TDP-43】家族性筋萎縮性側索硬化症と TDP-43

石原智彦, 横関明男, 西澤正豊, 高橋均, 小野寺理

最新医学 65 巻 7 号 1648-1653(2010.07)

### 2. 学会発表

## E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

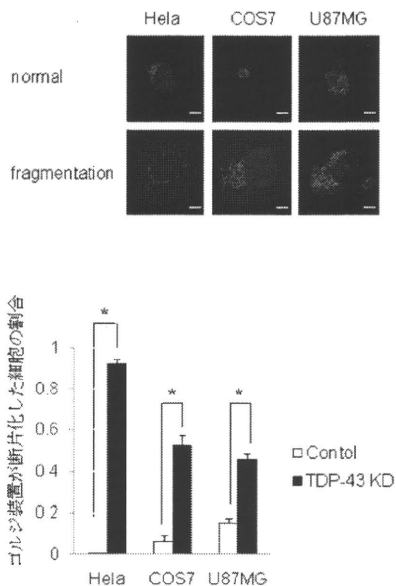
(特許取得・実用新案登録・その他)



なし

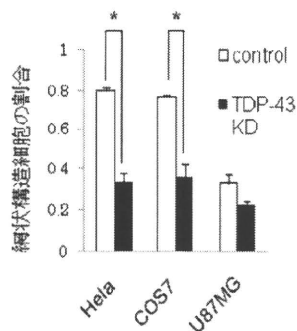
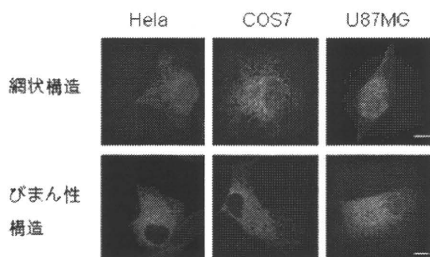
F. 健康危険情報

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)



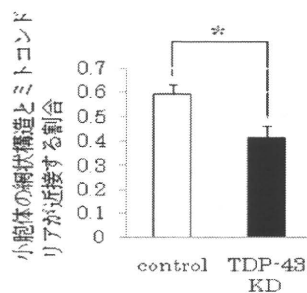
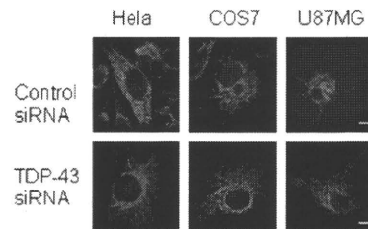
【図 1】 TDP-43 発現抑制による、ゴルジ装置形態の検討

蛍光免疫染色法による、ゴルジ装置の正常形態と、TDP-43 発現抑制による断片化形態画像(上段)。ゴルジ装置が断片化した細胞の頻度を示す(下段)。



【図 2】 TDP-43 発現抑制細胞での小胞体構造の検討

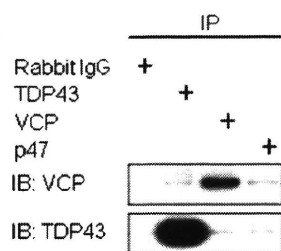
蛍光標識蛋白による、小胞体の正常構造(細胞質に網状構造が広がる)と、異常構造(網状構造が乱れ、びまん性の蛍光を示す)の代表的画像(上段)。各細胞における、網状構造細胞の頻度を示す(下段)。



【図 3】TDP-43 発現抑制でのミトコンドリアの構造と、小胞体との関係

蛍光免疫染色法による、ミトコンドリアネットワークの正常形態と、TDP-43 発現抑制により分布密度が低下した細胞(上段)。小胞体網状構造部において、ミトコンドリアが近接して存在する割合を示す(下段)。

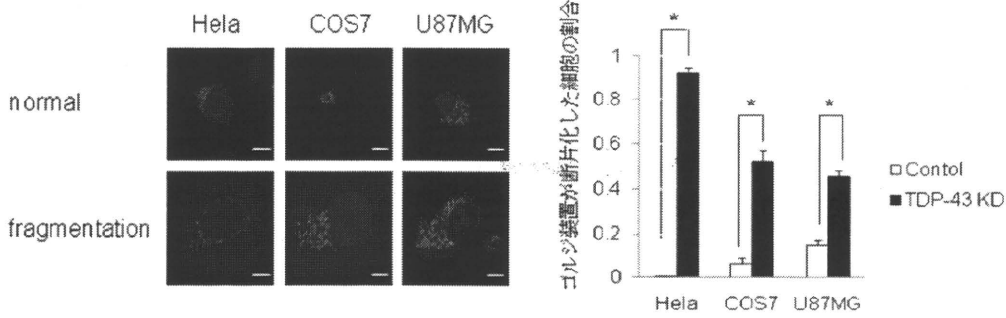
様式 I



【図 4】 TDP-43 と VCP, P47 との結合を検討

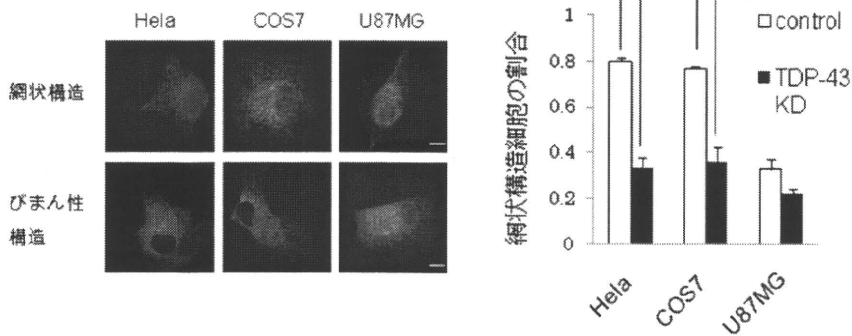
左上段で示した抗体を用いて、免疫沈降法により、TDP-43 との蛋白-蛋白結合を確認した。細胞は Hela 細胞。蛋白間で明らかな直接結合は認められない。

図1



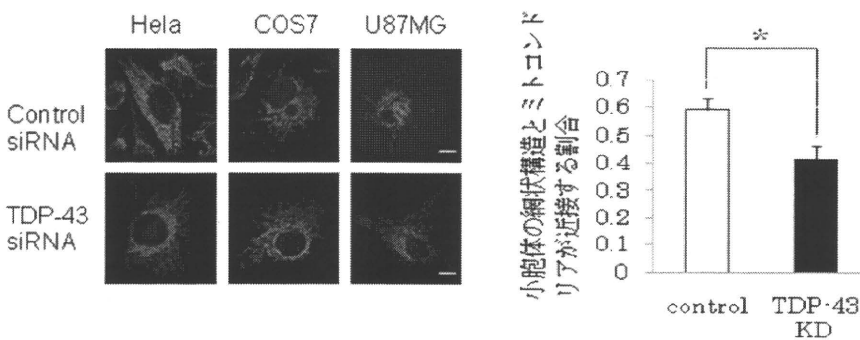
【図1】TDP-43発現抑制による、ゴルジ装置形態の検討  
 蛍光免疫染色法による、ゴルジ装置の正常形態と、TDP-43発現抑制による断片化形態画像(右). ゴルジ装置が断片化した細胞の頻度を示す(左, 平均±S.E., \* p<0.005).

図2



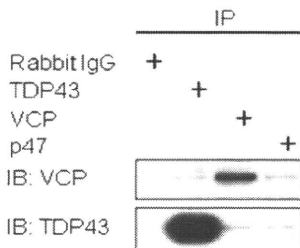
【図2】TDP-43発現抑制細胞での小胞体構造の検討  
 蛍光標識蛋白による、小胞体の正常構造(細胞質に網状構造が広がる)と、異常構造(網状構造が乱れ、びまん性の蛍光を示す)の代表的画像(右). 各細胞における、網状構造細胞の頻度を示す(左, 平均±S.E., \* p<0.005).

図3



【図3】TDP-43発現抑制でのミトコンドリアの構造と、小胞体との関係  
 蛍光免疫染色法による、ミトコンドリアネットワークの正常形態と、TDP-43発現抑制により分布密度が低下した細胞(右). 小胞体網状構造部において、ミトコンドリアが近接して存在する割合を示す(左, 平均±S.E., \* p<0.05).

図4



【図4】TDP-43とVCP, P47との結合を検討  
 左上段で示した抗体を用いて、免疫沈降法により、TDP-43との蛋白-蛋白結合を確認した. 細胞はHeLa細胞. 蛋白間で明らかな直接結合は認められない.

厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業)

分担研究年度終了報告書

細胞内膜構造に注目した運動神経病の画期的な治療法の開発

孤発性筋萎縮性側索硬化症における嗜銀顆粒性認知症病変の共存に関する研究

分担研究者	高橋 均	新潟大学脳研究所病理学分野
研究協力者	相馬健一	新潟大学脳研究所病理学分野
	付 永娟	新潟大学脳研究所病理学分野
	柿田明美	新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター

研究要旨

今回、我々は、剖検にて筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) と確定診断された 37 連続剖検例(男性 25 例、女性 12 例; 死亡時 45-84 歳、平均 71.5 ± 9.0 歳; 罹病期間 8-180 ヶ月、中央値 22 ヶ月)を対象に、嗜銀顆粒性認知症(argyrophilic grain disease: AGD)の共存の有無を検討した。その結果、37 例中 14 例 (38%) に大脳辺縁系を中心に AGD 病変が認められた。AGD の有無と死亡時年齢等の間に関連性はなかった。この出現頻度は、これまで検討されてきたタウオパチーであるアルツハイマー病や進行性核上性麻におけるそれに匹敵する値であり、多数の剖検例で AGD の有無を検討した既報のデータを対照として利用した統計解析では、今回の ALS 群との間に有意差 ( $p < 0.001$ ) が得られた。つまり、「ALS では AGD を合併し易い」との解釈が可能であった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は TDP-43 を病的タンパクとする神経変性疾患である。一方、嗜銀顆粒性認知症(argyrophilic grain disease: AGD)は、近年、認知症を引き起こす新たなタウオパチーとして確立されたもので、加齢とともに増加する疾患である。近年、孤発性 ALS に AGD の共存を認めたことを臨床病理学的に重要とする 1 例の症例報告と、AGD ではその病変部位に小麦粒様(顆粒状)構造物を含むリン酸化 TDP-43 陽性の異常構造物が認められたという研究報告がある。

本研究では、Gallyas-Braak (G-B)陰性、タウ陰性、TDP-43 陽性の異常構造物が神経細胞ならびにグリア細胞に出現する ALS について AGD の出現の有無を検討した。

B. 研究方法

病理組織学的ならびに TDP-43 免疫組織化学的検索等によって、ALS と確定診断された 37 剖検例(男性、25 例; 女性、12 例; 死亡時

45-84 歳、平均 71.5 ± 9.0 歳; 罹病期間 8-180 ヶ月、中央値 22 ヶ月)を対象とした。これら 37 例について、H-E および K-B 染色を用いた通常の観察に加え、個々の例において新たに作製した前頭側頭葉のフォルマリン固定パラフィン切片に G-B 染色、さらにリン酸化タウ(AT8)および 4 リピートタウ(RD4)に対する抗体を用いた免疫染色を行った。AGD 病変を有する例については、そのステージを検討するため、その他の必要検索部位を追加した。併せて、リン酸化 TDP-43 (pS409/410) に対する抗体を用いた免疫組織化学を追加した。

(倫理面への配慮)

全ての対象病患者剖検脳は、書面によるご遺族の同意を得た上で、検索がなされた。

C. 研究結果

ALS の 37 例中 14 例 (38%; 男性 10 例、女性 4 例)に AGD の出現を認めた。その AGD の病変の程度と広がりについては、Saito ら (2004)、および Ferrer ら(2008)のステージ分類があるが、今回は Saito らのそれを用いて評

価した。その結果、stage I、5例；stage II、4例；stage III、5例であった。

AGD 陽性 14 例と AGD 陰性 23 例の間で、死亡時年齢、性別および罹病期間に有意差は認められなかった。また、AGD の有無と人工呼吸器装着、認知症や側頭葉病変の有無との間にも有意差は認められなかった。興味あることに、AGD の有無と Braak らの NFT ステージとの間では有意差 (Mann-Whitney  $U$ -test,  $p = 0.01$ ) が認められた。

AGD 共存の 14 例中 11 例(79%)にいわゆる ALS における側頭葉病変が認められている。AGD 共存の 14 例の側頭葉を TDP-43 免疫組織化学にて検索すると、その多くに TDP-43 陽性の胞体内封入体を有する神経およびグリア細胞の出現(それぞれ 93%と 64%)が認められた。陽性グリア細胞は全て coiled body (oligodendrocytes) であり、bush-like astrocytes の形状を示すものは認められなかった。一方、AGD の診断に不可欠の嗜銀顆粒の形状を示す TDP-43 陽性構造物の出現は 1 例でのみ確認できた。

今回、既報の Braak & Braak (1998)のデータ、つまり本研究の対象例と同じ年齢層である 51-85 歳では、4.6% (99/2154 例)に AGD 陽性というデータを利用して、カイ 2 乗検定を行うと、ALS における AGD の共存 38% (14/37 例)との間には有意差( $p=0.001$ )が認められた。加えて、Togo ら(2002)が行ったと同様に 3 つの既報のデータを利用して、カイ 2 乗検定を行ってみた。その結果、ALS においては、全ての対照群 (9.3% (Tolnay ら、1997)、5.7% (Martinez-Lage & Munoz、1997) および 4.7% (Braak & Braak、1998)) との間にも有意差 (全てにおいて  $p < 0.001$ ) が得られた。従って、このような既報のデータの利用が統計学的に正しいと判断されれば、ALS は AGD を共存し易い病態にある、と結論することが可能である。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Shibata N, Kakita A, Takahashi H, Ihara Y, Nobukuni K, Fujinami H, Sakoda S, Kobayashi M. Increased expression and activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in the spinal cord of patients with sporadic

amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 119: 345-354, 2010

- (2) Mori F, Tanji K, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Relationship between Bunina bodies and TDP-43 inclusions in spinal anterior horn in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36: 345-352, 2010
- (3) Fu Y-J, Nishihira Y, Kuroda S, Toyoshima Y, Ishihara T, Shinozaki M, Miyashita A, Piao Y-S, Tan C-F, Tani T, Koike R, Iwanaga K, Tsujihata M, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M, Kakita A, Ikeuchi T, Takahashi H. Sporadic four-repeat tauopathy with frontotemporal lobar degeneration, Parkinsonism, and motor neuron disease: a distinct clinicopathological and biochemical disease entity. *Acta Neuropathol* 120: 21-32, 2010
- (4) Shimazawa M, Tanaka H, Ito Y, Morimoto N, Tsurumi K, Kadokura M, Tamura S, Inoue T, Yamada M, Takahashi H, Warita H, Aoki M, Hara H. An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. *PLoS One* 5: e15307, 2010

##### 2. 学会発表

- (1) 付 永娟, 西平 靖, 黒田重利, ほか. 前頭側頭葉変性症(FTLD)に属する新規 4 リピートタウオパチー:3 剖検例におけるその臨床病理と生化学的所見. 第 51 回日本神経病理学会, 東京, 2010, 4, 24
- (2) Fu Y-J, Tan C-F, Nishihira Y, et al. Pathological TDP-43 in a case of primary lateral sclerosis. VIIth International Conference on Frontotemporal Dementias, 6-8 October, Indianapolis, Ind., USA

#### E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

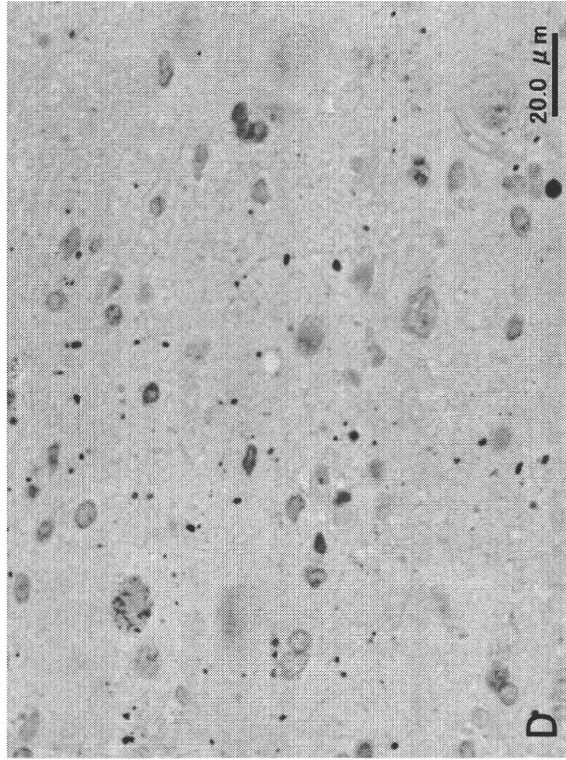
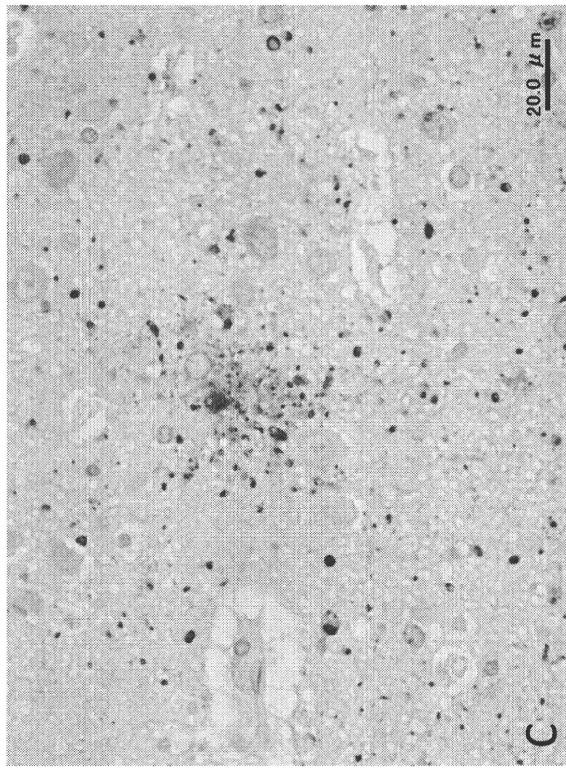
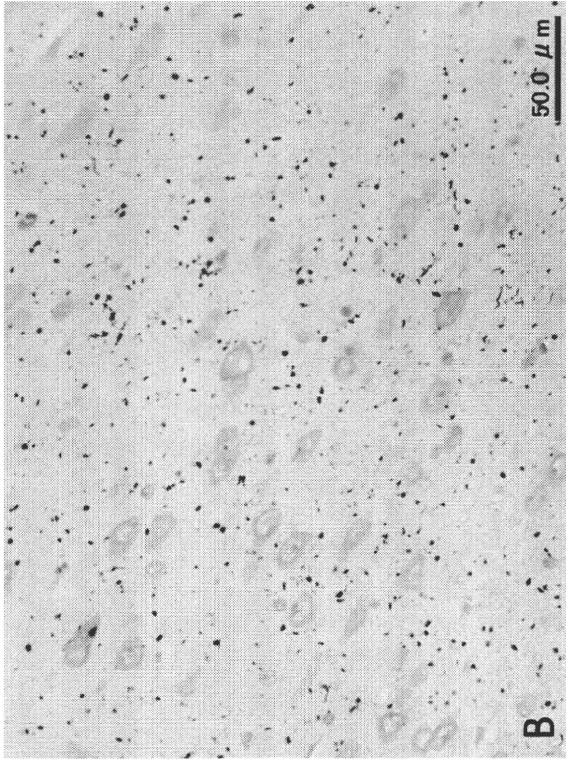
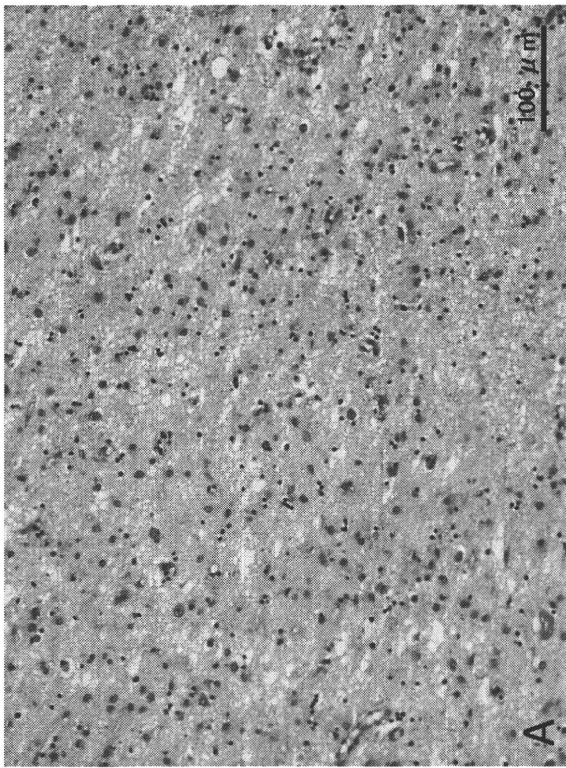
(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

#### F. 健康危険情報

なし





### 孤発性筋萎縮性側索硬化症における嗜銀顆粒性認知症病変の共存

A: 扁桃体における高度の神経細胞脱落 (H-E 染色)    B: 海馬 CA1 における嗜銀顆粒の出現 (Gallyas-Braak 染色)  
 C: 海馬 CA1 におけるタウ陽性アストロサイト (AT8 免疫)    D: 扁桃体における TDP-43 陽性顆粒の出現 (pS409/410 免疫)

厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業)

分担研究年度終了報告書

細胞内膜構造に注目した運動神経病の画期的な治療法の開発

線虫を用いた変異型 p97 が TDP-43 蓄積におよぼす影響に関する研究

分担研究者 山中 邦俊 熊本大学発生医学研究所 分子細胞制御分野

研究要旨

酵母ツーハイブリッド法により、TDP-43 と野生型及び変異型 p97 との相互作用を検討したところ、相互作用は認められなかった。生体内での相互作用を知るために、IBMPFD や ALS の原因となる変異を導入した p97 を発現するトランスジェニック線虫を作製し、免疫沈降法によりそれらの相互作用を検討したが、認められなかった。このことは、野生型及び変異型 p97 は TDP-43 と安定な複合体を形成していないことを示唆している。ところが変異型 p97 に結合するコファクターの比率が野生体とは異なることを見いだした。今後は、TDP-43 蓄積の有無や膜融合・タンパク分解活性・細胞内小器官形成を検討し、寿命などにおよぼす影響を明らかにすることが必要である。

A. 研究目的

AAA タンパク質の 1 つである p97 (VCP もしくは CDC-48 とよばれる) の変異は、骨パジェット病及び前頭側頭葉型認知症を伴う家族性封入体筋炎 (IBMPFD) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こすことがわかってきた。これらの疾患の特徴の 1 つは、TDP-43 の蓄積が認められることである。

本研究では、IBMPFD や ALS の原因となる変異を導入した p97 を発現するトランスジェニック線虫を作製し、変異 p97 と TDP-43 蓄積との関連及び変異 p97 が発生・分化・老化・寿命などにおよぼす影響を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

IBMPFD や ALS 患者において同定された変異を持つように改変した線虫 p97 遺伝子をボンバードメント法により線虫に導入する。目的の発現クローンであるかは、p97 に付加した FLAG タグを利用したウエスタンブロット法で確認する。線虫抽出液を FLAG 抗体で免疫沈降し、その後 TDP-43 抗体や種々の p97 コファクターの抗体でウエスタンブロットし相互作用を検討する。

酵母ツーハイブリッド法により、TDP-43 と p97 や種々のコファクターとの相互作用を検討する。

C. 研究結果

これまでにヒトの R93C および R159H に相当する変異をもつ p97 を発現するトランスジェニック線虫を確立した。野生体と比較して、発生や成長には有意な差は観察されなかった。FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験において、TDP-43 は野生型及び変異型 p97 と共沈しなかった。酵母ツーハイブリッド法によっても、TDP-43 と p97 やそのコファクター群との相互作用は認められなかった。このことは、野生型及び変異型 p97 は生体内で TDP-43 と安定な複合体を形成していないことを示唆している。

しかし変異型 p97 を発現していると、共沈してくるコファクターの比率が変化することを見いだした。このことは、p97 の機能分化に異常をきたしている可能性を示唆している。

D. 研究発表

1. 論文発表

Y. Sasagawa, K. Yamanaka, Y. Saito-Sasagawa, and T. Ogura. *C. elegans* UBX cofactors for CDC-48/p97 control spermatogenesis. *Genes Cells* 15: 1202-1215 (2010)

2. 学会発表

山中邦俊：線虫を用いた p97/VCP/CDC48 の機能解析、新潟脳神経研究会第 290 回例会、平成 22 年 6 月 4 日、新潟

Yamanaka, K., Sasagawa, Y., Murayama, Y., and Ogura, T. Involvement of *C. elegans* p97-cofactor complexes in sex determination. The 3rd International Symposium on Protein Community, 13-16 September, 2010, Nara

**E. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）**

（特許取得・実用新案登録・その他）

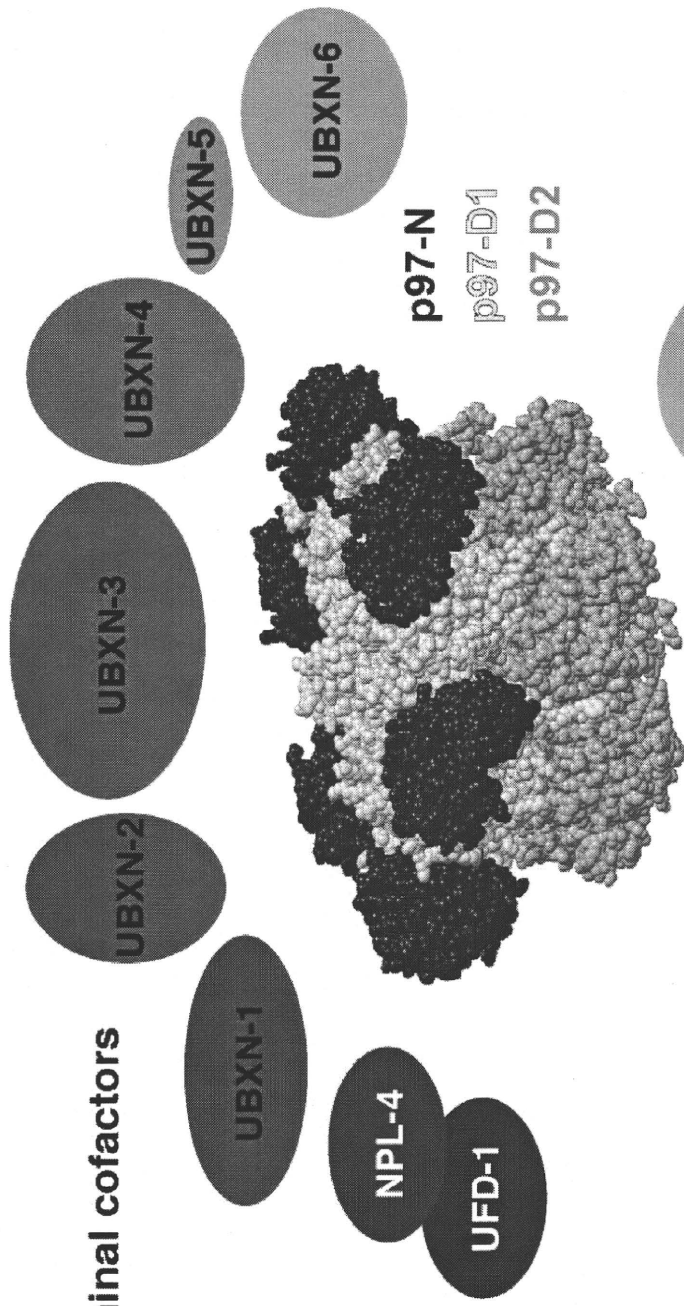
なし

**F. 健康危険情報**

（国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。）

なし

**N-terminal cofactors**



**C-terminal cofactors**

コファクターの使い分けによる機能変換  
膜融合、凝集体形成抑制、タンパク質分解、小胞体関連分解など



p97 変異 (IBMPFD, ALS) による機能変換異常  
膜融合異常、TDP-43 蓄積など

## 厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業)

## 分担研究年度終了報告書

## 細胞内膜構造に注目した運動神経病の画期的な治療法の開発

## TDP-43 遺伝子改変マウスの作成と疾患モデルへの応用

分担研究者 研究協力者	佐藤 俊哉	新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野
	廣川 祥子	新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野
	横山 峯介	新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野
	西澤 正豊	新潟大学脳研究所神経内科
	崎村 建司	新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野
	小野寺 理	新潟大学脳研究所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)のモデルマウスを確立するため、TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスを作成した。最初にヘテロ欠損個体(Tardbp<sup>+/-</sup>)を解析したところ、TDP-43 自身の厳密な発現制御機構により、多くの組織で mRNA 発現レベルが回復し、明確な表現型が現れないことが確認された。一方、初期胚では発現レベルの回復が不十分であり、発生遅延を生じるとともに、ホモ欠損個体(Tardbp<sup>-/-</sup>)が胎生致死であることが示された。そこで NSE39-Cre マウスを用いて、神経特異的ノックアウトマウス(Tardbp<sup>flx/flx</sup>、NSE-Cre<sup>+</sup>)を作成したところ、脊髄性筋萎縮症モデル(SMN<sup>F7/Δ7</sup>、NSE-Cre<sup>+</sup>)と同等以上の強い表現型が認められ、更なる解析が必要と考えられた。

## A. 研究目的

運動神経疾患の代表である筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスを確立し、運動神経細胞内の膜構造変化を捉えるとともに、運動神経疾患に共通する病態機序の解明に寄与することを目的とする。

我々は、ALS の原因遺伝子の一つとして TAR DNA-binding protein 43 kDa(TDP-43)を発見し、ALS の発症機序において TDP-43 が一次的な役割を担うことを明らかにした(Yokoseki et al. Ann Neurol 2008 63: 538-542)。さらに TDP-43 の変異を有する家族性 ALS (FALS)患者の病理像は、孤発性 ALS と極めて類似しており、TDP-43 が孤発性の発症においても深く関与していることを示した。(Tan et al. Acta Neuropathol. 2007 113: 535-542)。TDP-43 は核蛋白であるが、ALS 患者の運動神経細胞では、TDP-43 が細胞質内凝集体として存在し、核から TDP-43 が消失する。この現象は、TDP-43 の局在異常すなわち機能喪失が病態の本質である可能性を示唆している。このような背景から、機能喪失モデルとして TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスを

作成し、TDP-43 の生理的機能と ALS 病態の関係を解明することを計画した。

## B. 研究方法

TDP-43 は、二つの RNA 認識モチーフ(RPM1、RPM2)を有する不均一核内リボ核酸蛋白(hnRNP)であり、転写制御、選択的スプライシング、mRNA の安定化、mRNA の輸送などに関与するタンパク質である。この遺伝子は 6 つのエクソンから構成され、機能上重要な RPM1 と核移行シグナルをコードするエクソン 3 を置換の標的とした。C57BL/6N 系統の ES 細胞 RENKA を用いて、エクソン 3 の両端に部位特異的組換えを生じさせる loxP 配列を挿入することにより、TDP-43 コンディショナルノックアウトマウス(Tardbp<sup>+flx</sup>)を確立した。

次に生殖細胞系列で Cre 酵素を発現する TLCN-Cre マウスと交配させ、TDP-43 ヘテロ欠損マウス(Tardbp<sup>+/-</sup>)を作成した。さらに TDP-43 の神経細胞における役割を解析するため、NSE39-Cre マウス(JAX 006663)と交配させ、神経特異的ノックアウトマウスの作成も行った。この NSE39-Cre マウスは、脊髄性筋



萎縮症の原因遺伝子 SMN の解析でも使用されたマウスであり (Frugier et al. HMG 2000 9: 849-845)、神経特異的 SMN ノックアウトマウスと対比させながら、ALS モデルとしての資質を検討する。

(倫理面への配慮)

動物の愛護及び管理に関する法律に基づいて行うとともに、新潟大学の動物実験規則および組換え DNA 実験安全管理規則に従い、学長許可を受けて実施した。

C. 研究結果

確立した TDP-43 コンディショナルノックアウトマウス (Tardbp<sup>+/flox</sup>) を TLCN-Cre マウスと交配させ、TDP-43 ヘテロ欠損個体 (Tardbp<sup>+/-</sup>) を作成した。ヘテロ個体には明らかな異常は認められなかったが、ヘテロ個体同士の自然交配を行い、その分離比を検討したところ、野生型個体 49 匹 (65%)、ヘテロ個体 26 匹 (35%)、ホモ個体 0 匹であり、TDP-43 ノックアウトマウス (Tardbp<sup>-/-</sup>) が胎生致死であることが示された。そこで体外受精法と初期胚培養を組み合わせ、死亡時期の決定を行った。胚発生が停止するのは、着床直後 (E4.5~5.5) と考えられたが、体外培養の結果からは、初期卵割時から発生遅延が生じることが示された。

次に TDP-43 ヘテロ欠損個体 (Tardbp<sup>+/-</sup>) の各組織における TDP-43 mRNA の発現量を調べたところ、未受精卵では発現レベルが半減していたが、大脳 (102%)、小脳 (84%)、脊髄 (99%)、筋肉 (75%) など、多くの組織では正常近くまで mRNA が回復していた。最近になり、TDP-43 蛋白が自身の mRNA の 3' UTR に結合し、mRNA の不安定性を制御することにより、負のフィードバックループを形成していることが報告された (Ayala et al. EMBO J 2011 30: 277-288)。我々の結果は、この報告を支持するものであり、TDP-43 の厳密な発現制御機構が、細胞の増殖や生存に必須であると推察される。特に初期胚での TDP-43 減少と発生遅延の関係は、TDP-43 の生理的機能を端的に表現していると思われ、より詳細に解析すべき点と考えている。またヘテロ欠損個体で表現型が明確でなかった理由として、TDP-43 の発現制御機構により、mRNA が回復していることが一因と考えられるが、逆に TDP-43 の発現を制御することができれば、ALS モデル

への突破口が開ける可能性もあり、更なる検討が必要と考えている。

TDP-43 ノックアウトマウスが胎生致死となるため、NSE39-Cre マウスを用いて神経特異的ノックアウトマウス (Tardbp<sup>flox/flox</sup>, NSE-Cre<sup>+</sup>) を作成した。神経特異的ノックアウトマウスは、ほぼメンデル則に従って生まれてくることから、胎生期には大きな異常を示さないと考えられた。しかし出生時点で既に体重差が認められ、生後 2 週齢頃より体重減少が明らかとなり、メディアン生存期間は 8 (0-31) 日であった。NSE39-Cre の応用例として知られる脊髄性筋萎縮症モデル (SMN<sup>F7/Δ7</sup>, NSE-Cre<sup>+</sup>) では、運動神経の軸索変性を主体とする病理変化を示し、平均 25 (17-36) 日齢で死亡することが報告されている。よって我々のモデルは、脊髄性筋萎縮症モデルと同等以上の強い表現型を示すものと考えられた。NSE39-Cre は、神経細胞以外にも、心筋、肝臓での組換え率が高いことも知られているため、その評価には注意を要するが、脊髄性筋萎縮症モデルである神経特異的 SMN ノックアウトマウスとの違いを注意深く評価し、ALS モデルとしての資質を検討する。特に大型細胞の代表である運動神経と他の神経細胞において、TDP-43 の要求性に相違がないか等、動物モデルの利点を生かして解析を進める予定である。さらに ALS の病理学的変化である膜構造変化に着目し、ALS の病態機序解明による治療法開発への足掛かりにしたいと考えている。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 40 回新潟神経学夏期セミナー (2010 年 8 月 6 日、ポスター発表)

第 1 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム (2010 年 11 月 22 日、ポスター発表)

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

なし

F. 健康危険情報

なし