

TDP-43ノックアウトマウスの解析

コンベンショナルタイプ
全身性にノックアウト

↑

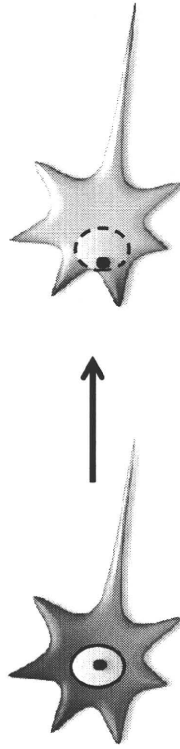
コンディショナルタイプ
神経特異的ノックアウト

胎生致死 (E4.5~5.5)



発生遅延過程の解明

出生後早期死亡(P0~31)



神経変性過程の解明



膜構造変化を中心にTDP-43の生理的機能を解明する

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

細胞内膜構造の走査電顕による解析に関する研究

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

研究要旨

運動神経病の病因解析に、神経細胞の細胞内膜構造の形態変化が注目されている。そこで、本研究では、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 機能喪失 *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。

A. 研究目的

近年、遺伝性痙性対麻筋萎縮性側索硬化症(ALS)、痙性対麻痺、Charcot-Marie-Tooth 病などの運動神経疾患における神経細胞の細胞内膜構造(ゴルジ装置、小胞体)の変化が注目されている。たとえば、ALS では、以前から指摘されてきたゴルジ装置の断片化が、TDP-43 の封入体を伴う細胞に認められることが明らかになり、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が示されてきている。

そこで本研究では、TDP-43 の機能喪失による細胞内膜構造異常の検討を念頭に、正常運動神経細胞と、TDP-43 の機能喪失 *in vitro* 実験群の細胞の細胞内膜系の微細構造を、主に走査電子顕微鏡を用いて解析した。

B. 研究方法

正常運動神経細胞の解析には、正常ラットの脊髄前角を用いた。また TDP-43 の機能喪失 *in vitro* 実験群については、RNAi の手法を用いて TDP-43 を減少させた HeLa 細胞を用いた。いずれの試料も、0.5%グルタルアルデヒドと 0.5%パラホルムアルデヒドの混合液で前固定した後、1%四酸化オスミウムで後固

定したものをを用いた。その後、脊髄前角標本については、50%DMSO に浸漬した状態で凍結切断し、0.1%四酸化オスミウムで 48 時間オスミウム浸軟処理を行った。一方、培養細胞は、そのままでは同様の処理ができないので、寒天包埋法を開発し、その後、凍結切断をして、同様のオスミウム浸軟処理を行った。いずれの標本も、その後、導電染色を施し、脱水、臨界点乾燥、金属コーティング後、日立 S-5000 電界放出型走査電顕により細胞内膜系の観察を行った。

(倫理面への配慮)

今回の研究で用いた実験動物のラットの前角運動神経の観察については、新潟大学の動物実験倫理指針もとづいている。また、TDP-43 の機能喪失 *in vitro* 実験群は培養細胞を用いるもので、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

走査型電子顕微鏡(走査電顕)は、細胞や組織の立体微細構造の観察に適しているが、一般に用いられている試料作製法では、細胞内の可溶性タンパク質に内部構造が隠されて、細胞内膜系の観察ができない。そこで、本研究では、オスミウム浸軟法(Tanaka and Naguro

1981, Koga and Ushiki 2006)を用いて、可溶性タンパク質を溶かし去り、走査電顕で細胞内膜系を立体的に観察することができるようにした。とくに、培養細胞については、これまでの方法では、走査電顕で細胞内膜系の観察をコンスタントに行うことが難しかった。そこで、この研究で新たに、培養ディッシュを低温融解寒天を用いて包埋する手法を考案することにより、細胞の断面を目的に合わせて自由に作るようにするとともに、その後のオスミウム浸軟処理を確実に行うことができるようにした。その結果、組織片のみならず、ディッシュに培養した細胞においても細胞内の微細構造、とくに細胞内膜系の構造を走査電顕で観察できるようになった。

オスミウム浸軟法で見た細胞においては、可溶性タンパク質が溶かされて、細胞内の細胞内膜系の諸構造、すなわち、ゴルジ装置、粗面小胞体、滑面小胞体、ミトコンドリアなどが、走査電顕で立体的に明瞭に観察することができるようになった。したがって、これらの諸構造の三次元構造を、それぞれの細胞で詳しく観察することが可能になった。

ラットの脊髄前角運動神経細胞においては、神経細胞の核を取り巻くようにゴルジ装置が発達しており、その間には、粗面小胞体と小管構造の網目が発達し、さらに管状のミトコンドリアが多様な走行を示して存在していた。このうち、前角の運動神経細胞のゴルジ装置は、細胞体以外に樹状突起にまで侵入し、全体が連続した三次元的な網状構造をしていることが、レーザー共焦点の顕微鏡の解析と組み合わせることで、明瞭に示すことができた。以上のことは、正常な運動神経細胞においては、ゴルジ装置が樹状突起と細胞体の中で、きわめてよく発達していることを示している。また、走査電顕により、ゴルジ装置の cis 側と trans 側の配置を明瞭に観察可能することができることから、次年度のモデルマウスの解析において、この方法が、きわめて有用であることが示された。

一方、TDP-43 の機能喪失 *in vitro* 実験群については、低温融解寒天を用いた寒天包埋法を利用することで、培養ディッシュの細胞の細胞内の構造を、詳しく解析することを可能にした。これにより、HeLa 細胞の細胞内膜系を立体的に詳しく解析することができた。この細胞では、比較的小さなゴルジ装置は核の近傍

に集合していた。一方、TDP-43 機能喪失細胞群においては、ゴルジ装置が散在する傾向にあったが、ゴルジ層板の構造については、正常群と大きな違いは認められなかった。

以上の点について、今後、より詳細な検討を行う予定でいる。

D. 研究発表

1. 論文発表

走査型電子顕微鏡と細胞・組織の3Dイメージング技術の進展。新潟市医師会報、475、1-8、2010.

2. 学会発表

T Ushiki and D Koga: Considering the cellular function from the three - dimensional morphology of cell organelles. BRI International Symposium 2010 "Current Understandings and Future Directions for ALS" Niigata, November 22-23, 2010.

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

特になし

F. 健康危険情報

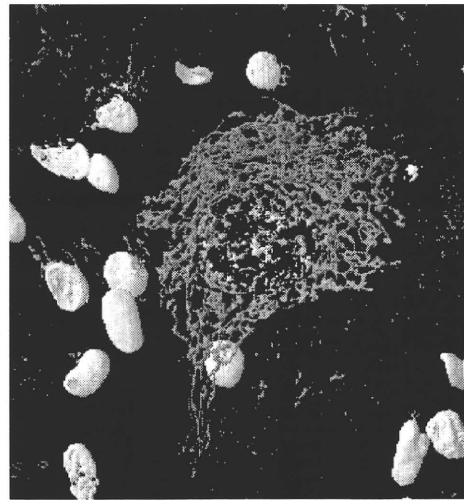
特になし。

細胞内膜構造の走査電顕による解析に関する研究

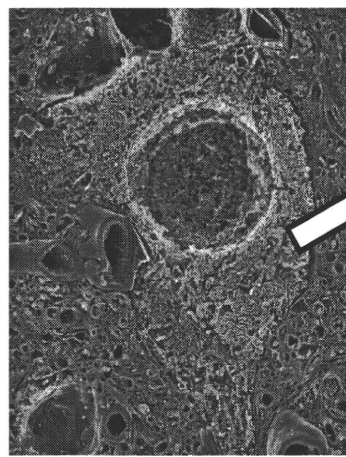
(新潟大学 牛木辰男)

細胞内膜系の三次構造変化から病態を採る

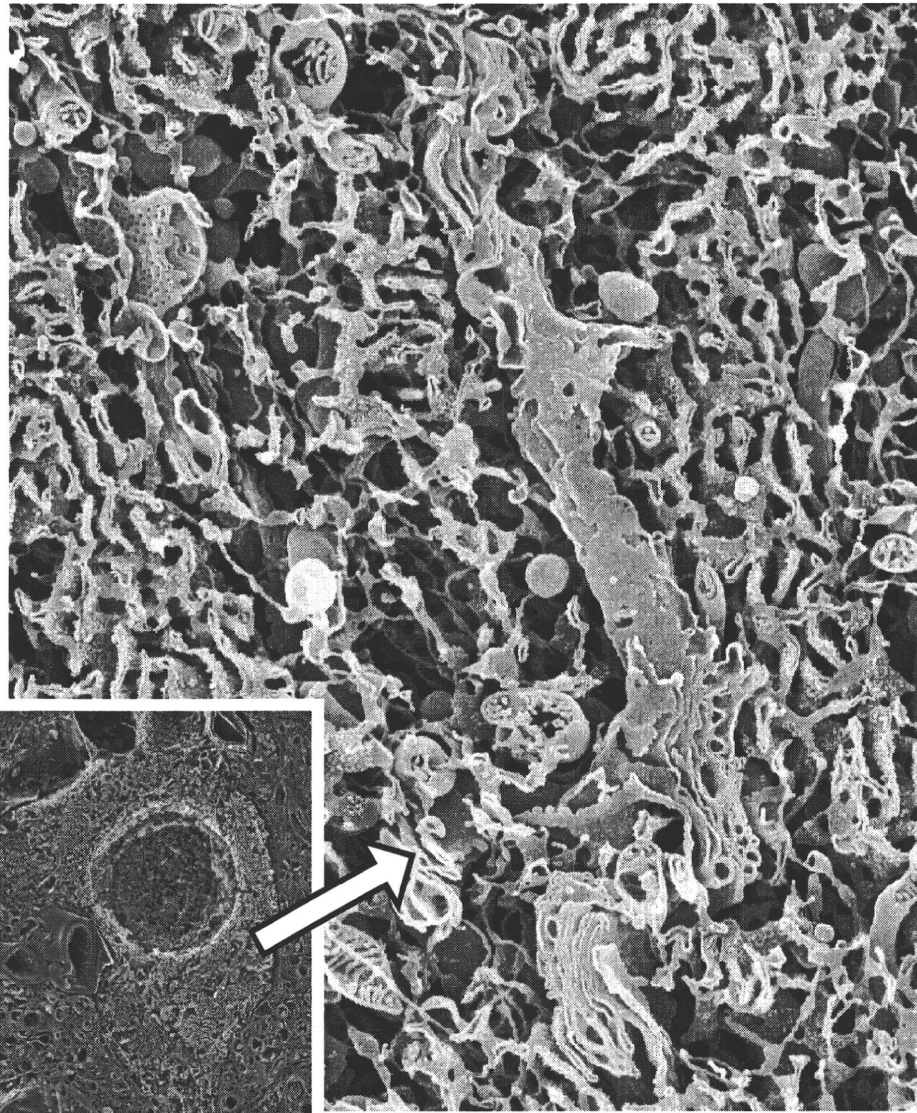
光顕レベルでの細胞内膜系の観察



共焦点レーザー顕微鏡の三次元再構築法で見たゴルジ装置 (ラット脊髄前角運動神経細胞)



高倍率による細胞内膜系の立体観察



走査電子顕微鏡で見た細胞内膜系の立体微細構造 (ラット脊髄前角運動神経細胞)

Ⅲ 研究成果の刊行に 関する一覧表

小野寺 理

雑誌（発表論文）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
志賀篤 西澤正豊 小野寺理	【ALS Update】 ALSの病態 FUSの観点 から	医学のあゆみ	235巻3号	236-240	2010
石原智彦 横関明男 西澤正豊 高橋 均 小野寺理	【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	最新医学	65巻7号	1648-1653	2010

高橋 均

雑誌

1. Shibata N, Kakita A, Takahashi H, Ihara Y, Nobukuni K, Fujinami H, Sakoda S, Kobayashi M. Increased expression and activation of cytosolic phospholipase A₂ 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

山中 邦俊

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)

