

201122050A

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 23 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24 (2012) 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、高橋俊昭(新潟大学脳研究所神経内科)	
2. ALS 類似の TDP-43 陽性封入体を広範に認めた SCA2 の 1 例	10
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 豊島靖子(新潟大学脳研究所病理学分野) 田中一(信楽園病院神経内科) 木村格平、森田 俊(信楽園病院病理科)	
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	13
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	16
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、小田佳奈子、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(新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野)	
5. 細胞内膜構造の走査電顕による解析に関する研究	19
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。

近年、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いだし、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)-floxed, 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。

① 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. 2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。本年は、この変化が細胞骨格蛋白の変化を伴わないで起こることを示し、一次的に重要なものである可能性を示した。

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

クアウトマウスを作成した。NSE39-Cre マウスを用いて、神経特異的ノックアウトマウス(Tardbp1flox/flox、NSE-Cre+)を作成し、個体を得ることに成功した。得られた個体においては脊髄前角細胞にて TDP-43 の消失を認め、同部位にてゴルジ装置の断片化を伴う変化を見いだした。これは TDP-43 の減少が、運動神経細胞でも細胞内膜器官の変化をもたらすことを示したことになる。今後、この変化がいつから見いだされる変化なのか、経時的な解析が必要であると考えた。

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。本年はヒト剖検組織の脊髄前角の運動神経細胞を用いて走査電子顕微鏡にて、細胞内の微細構造を明らかにすることに成功した。また免疫組織化学法と走査電顕法を比較解析することも可能とした。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、精製蛋白を用い TDP-43 凝集体が VCP により脱凝集されることを確認した。さらに、線虫 TDP-43 欠損変異体で、産卵数の減少、胚性致死率の上昇、運動能の低下を確認した。今後は、TDP-43 と VCP の関連についてさらに検索をすすめる。また線虫に関しては、TDP-43 欠損変異体の症状を緩和させる条件の検索をすすめる。

高橋らは、SCA type 2 (SCA2) で TDP-43 陽性の封入体が出現していることを見いだした。SCA2 の原因遺伝子の ataxin2 の CAG 繰り返し配列の正常範囲での増加は ALS の危険因子となることが報告されており、この結果は、ataxin2 と TDP-43 病理との関連を示す意味で大変重要と考える。

以上、本年、最も大きな伸展は、TDP-43 の欠損個体の脊髄前角細胞での膜構造異常を明確に見いだしたことである。今後、この膜構造異常による細胞機能障害について、最終年度に詳細に検討を加える。具体的にはミトコンドリア機能に注目しており、ミトコンドリア機能障害をターゲットとした運動神経病の治療方法の開発につなげていきたいと考える。

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
	高橋 俊昭	新潟大学脳研究所神経内科

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。我々は、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。本年は、この変化が、細胞骨格蛋白の異常によらないことを明らかとした。

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。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た。本年は微小管の形態を検討した。微小管を検索するために行った β -tubulin 染色時は、0.2%Triton-X100/PBS, 15 分にてパーマライズし、1%BSA/PBS にて 30 分ブロッキングを行い、1%BSA/0.1%Triton-X100/PBS で希釈した 1 次抗体 (rabbit anti- β -Tubulin antibody (1:50; Cell Signaling), monoclonal anti-TARDBP antibody (1:1000; Abnova) の 2 重染色) を 4°C で一晩静置、反応させた。反応後に 0.1%Triton-X100/PBS にて 5 分 3 回洗浄し、2 次抗体を 1 時間室温で反応させ、0.1%Triton-X100/PBS にて 5 分 3 回洗浄した。

(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%以下に抑制しても、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。このような細胞内膜器官の断片化は細胞骨格蛋白の異常により高頻度に誘発されるため、細胞骨格蛋白の代表的な物である微小管の構造を検討した。いずれの細胞においても、TDP-43 発現抑制細胞群で β チューブリンの構造に変化は認めなかった(右図)。

D. 研究発表

1. 論文発表

【ALS-臨床と分子病態研究の進歩】 家族性 ALS ALS10(遺伝性 ALS-TDP)の臨床と病理 (解説/特集)

今野卓哉, 石原智彦, 西澤正豊, 小野寺理
Clinical Neuroscience(0289-0585)29 巻 9 号

Page1019-1021(2011.09)

2. 学会発表

なし

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

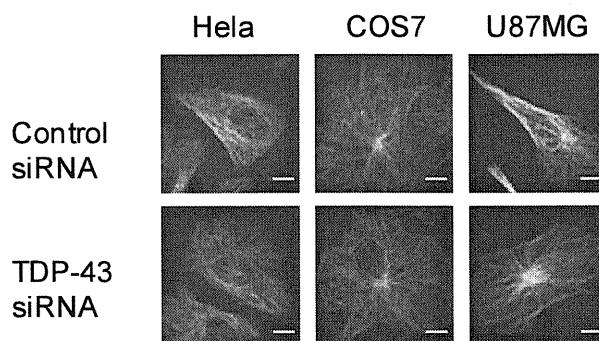
(特許取得・実用新案登録・その他)

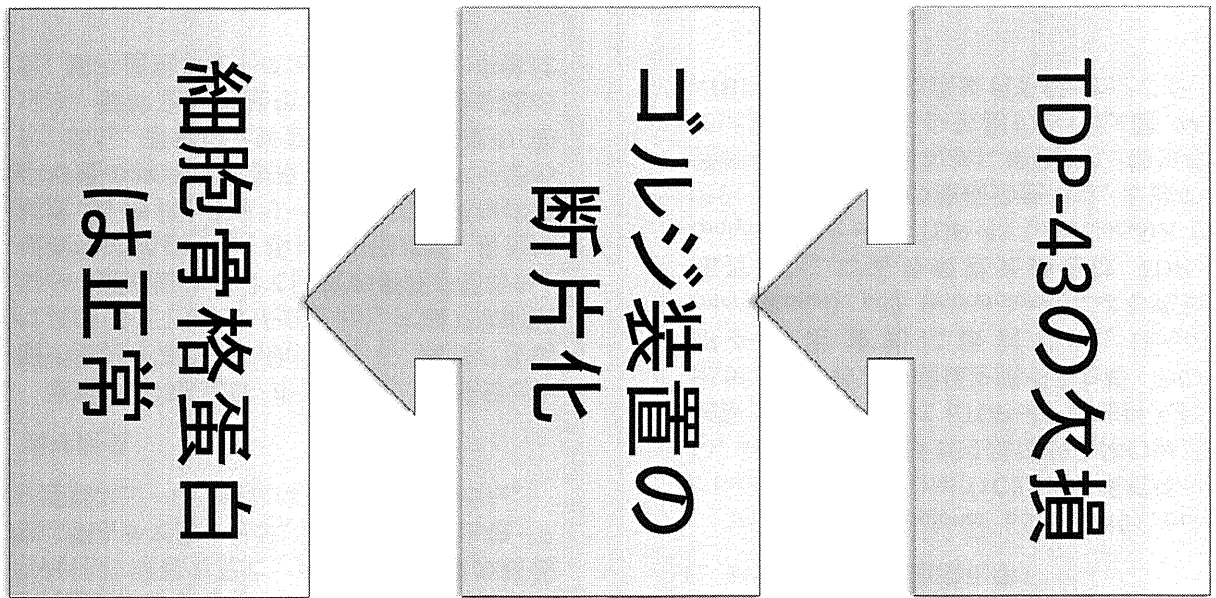
なし

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 コントロール細胞(上段)と TDP-43 発現抑制細胞(下段)の β -tubulin 染色像を示す。





細胞骨格蛋白

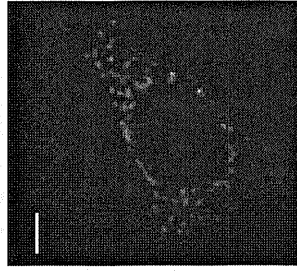
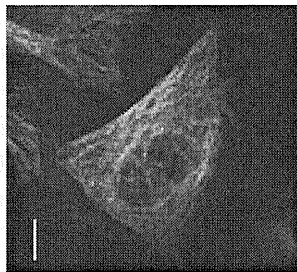
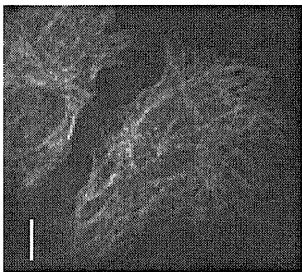
ゴルジ装置

TDP-43
siRNA

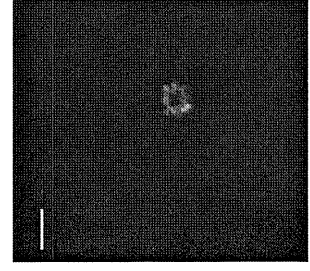
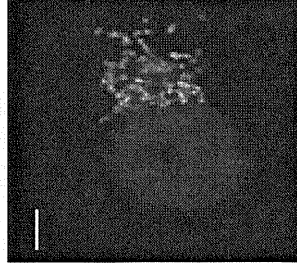
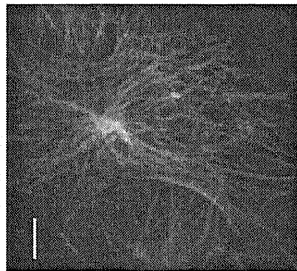
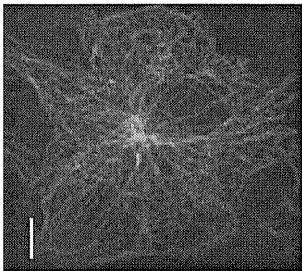
Control
siRNA

TDP-43
siRNA

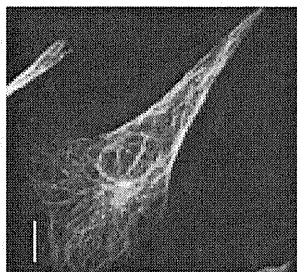
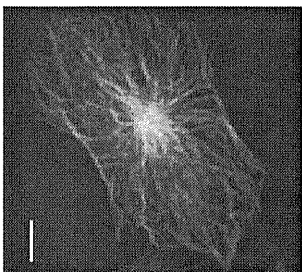
Control
siRNA



HeLa



COS7



U87MG

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

ALS 類似の TDP-43 陽性封入体を広範に認めた SCA2 の 1 例

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	豊島靖子	新潟大学脳研究所病理学分野
	田中 一	信楽園病院神経内科
	木村格平	信楽園病院病理科
	森田 俊	信楽園病院病理科

研究要旨

近年、spinocerebellar atrophy type2 (SCA2)の原因蛋白である ataxin 2 (ATX2)のポリグルタミン鎖 (polyQ)軽度伸長が、Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)の危険因子になりうるということが相次いで報告された。我々は SCA2 患者の中樞神経系に pTDP-43 陽性の、ALS 類似構造物が広く出現し、SCA2 と ALS の病理組織学的な類似性を見いだした。その分布は、ALS での type1 (Nishihira ら)によく似ていたが、2次運動ニューロンに封入体は認められなかった。SCA2 症例における TDP-43 の蓄積メカニズムは不明であるが、pTDP-43 陽性封入体が polyQ 抗体で認識されないことから、protein-protein interaction により polyQ や ATX2 と直接に関連している可能性は低いと考えられた。ATX2 の polyQ 異常伸長が TDP-43 の細胞障害性を何らかの機序で強調する可能性が示唆された。

A. 症例

死亡時 52 歳男性、母、兄が同病。30 歳、構音障害で発症。46 歳時、遺伝子診断で SCA 2 確定 (CAG repeats 22/42)。50 歳で高度の小脳症状と眼振を呈し入院。このころから糖尿病を発症、全身状態が徐々に悪化した。52 歳、薬剤性肝障害で死亡。剖検時上下肢の筋萎縮は明らかであったが、経過を通して上位・下位運動ニューロン症状は認められなかった。

B. 剖検所見

脳重 1,005g(脳幹・小脳 100g)。橋底部と小脳の萎縮が著明であり(図 1a, b)、黒質の色調は高度に低下していた(図 1b)。大脳では前頭葉から運動野にかけて軽度の萎縮を認めた。組織学的検索では、橋核、小脳皮質、黒質に高度の、赤核と下オリーブ核、脳幹網様体に中等度の神経細胞脱落とグリオーシスを認めた。また、運動野と脊髄前角に中等度の(図 1c,d)、脳幹運動神経核に軽度の変性を認めた。残存運動ニューロンには Bunina 小体は

認められなかった。

(倫理面への配慮)

なお、剖検組織標本の研究への使用については、個々の症例において、書面によるご遺族の同意が得られている。

C. 研究結果(免疫組織化学)

pTDP-43 (monoclonal, pS409/410)、polyQ stretches (monoclonal (1C2))の各種抗体を用い、pTDP-43 および 1C2 陽性封入体の形態を観察し、ALS の際に pTDP-43 陽性封入体が出現する部位との関係を調べるため、その分布を半定量的に検討した。Ubiquitin (monoclonal)、p62 (monoclonal)による免疫染色も施行した。二重免疫蛍光染色は TDP-43 (polyclonal)と p62、TDP-43 (polyclonal)と 1C2 で行った。1C2 での免疫染色では、多数の神経細胞の胞体が顆粒状に染色され、橋核などでは核内封入体も少数認められた(図 2A)。pTDP-43 抗体で免疫染色を行ったところ、少

数ながら広い範囲に異常構造物を認めた。形態は様々であったが、赤核では skein-like inclusion が比較的多く認められた(図 2B)。この部位では ubiquitin 陽性の封入体、p62 陽性封入体も認められたが、p62 では神経突起内封入体と思われる構造物が認められた(図 2E 矢印)。核内封入体も存在し、被殻では Cat's eye-shaped intranuclear inclusion が認められた(図 2D)。運動野の神経細胞内、内包オリゴデンドロサイト内にも封入体が見られた(図 2C)、下位運動ニューロンの神経細胞内には pTDP-43 陽性封入体は認められなかった。赤核内の封入体の二重免疫染色では、1C2 と pTDP-43 は共局在せず、p62 と pTDP-43 は少数共局在するものがみられた(図 2F 矢印)。

p-TDP 陽性封入体は比較的広範に認められ、1C2 陽性封入体が多い部位に多い傾向があり、小脳や脊髄には認められなかった(Table 1)。その分布を図示すると Fig.3 のようになり、Nishihira らが ALS で報告した Type 1 によく似た分布になることがわかった。

Ataxin 2 (ATX2) polyQ 鎖の intermediate expansions が孤発性 ALS の危険因子になりうるという欧米でのデータが相次いで報告されたが、これら2疾患の病態生理がどう関わっているのかは不明である。また、これまで SCA2 症例の中樞神経系に pTDP-43 陽性封入体が出現するかを詳細に検討した報告はない。今回我々が検索した症例では、比較的広範に pTDP-43 陽性の構造物が観察された。その分布が Nishihira らが報告した ALS での Type 1 の封入体分布に似ていることは SCA2 での封入体出現が 2 次的なものではなく、ALS 類似の病態機序が関わっていると考えられ興味深い。さらに興味深いことに、運動野、内包には封入体が比較的多いにもかかわらず、2 次運動ニューロンには認められなかった。このことは、以前 SCA3 で我々が報告 (Tan ら)した、2 運動ニューロンのみに TDP-43 陽性封入体が認められたという結果と明らかに異なっており、同じように運動神経系が冒されるポリグルタミン病でも、2 次運動ニューロン変性に関わる TDP-43 病理が違っていることを示すものと考えられる。

今回の二重免疫蛍光染色の結果、pTDP-43 陽性封入体は 1C2 で認識されておら

ず、protein-protein interaction により polyQ や ATX2 と直接に関連している可能性は低いと思われた。ATX2 long expansions 症例 (SCA2 症例)で TDP-43 の細胞病理が明らかになったことは、ATX2 の polyQ 異常伸長が TDP-43 の細胞障害性を強調する可能性を示唆していると考えられる。このことから、孤発性 ALS において、TDP-43 の断片化やリン酸化、異常凝集など、何らかの過程において、ATX2 の polyQ intermediate expansions がわずかながらその細胞障害性を増強し、結果として ALS の発症に関与する可能性が考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyoshima Y, Tanaka H, Shimohata M, Kimura K, Morita T, Kakita A, Takahashi H (2011) Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is associated with TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* 122: 375-378

2. Soma K, Fu Y-J, Wakabayashi K, Onodera O, Kakita A, Takahashi H (2012) Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 54-60

2. 学会発表

1. 相馬健一, 付 永娟, 若林孝一, ほか. 筋萎縮性側索硬化症における嗜銀顆粒性認知症の共存について. 第52回日本神経病理学会京都, 2011, 6, 4

2. Fu Y, Aida I, Takahashi H. Spinocerebellar ataxia with brown pigments and cerebellar cortical degeneration. IInd Congress of Asian Society of Neuropathology, Beijing, China, 4-6 November 2011

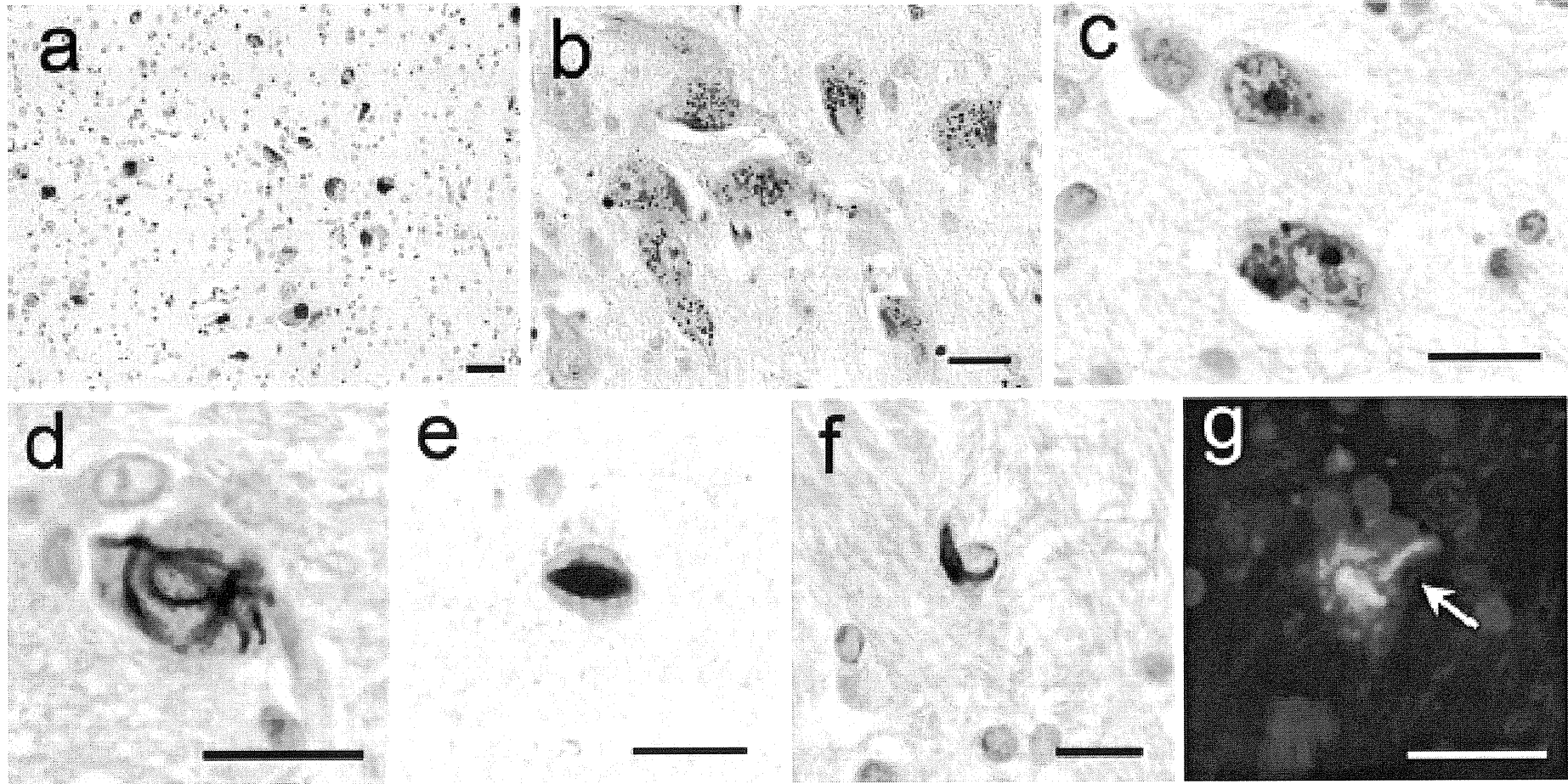
E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

F. 健康危険情報

なし



Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) における TDP-43 陽性神経細胞内封入体の出現

○ ポリグルタミン免疫染色

橋被蓋神経細胞の胞体内陽性構造物 (a) および橋核神経細胞の胞体内 (b) と核内 (c) の陽性構造物

○ TDP-43 免疫染色

中脳赤核神経細胞の胞体内陽性構造物 (d), 被殻神経細胞の核内陽性構造物 (e) および内包乏突起細胞の胞体内の陽性構造物 (coiled body) (f)

○ ポリグルタミンと TDP-43 の二重免疫染色

同一神経細胞の胞体内にポリグルタミン(赤)と TDP-43(緑: 矢印)の共存はあるが、共局在は認められない (g)

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

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

ALS や IBMPFD では、共通して TDP-43 が蓄積することが特徴の1つである。今年度は、TDP-43 機能喪失とこれらの疾患との関連を求めて、線虫 TDP-1 (TDP-43 ホモログ) 欠損変異体を用いて、TDP-1 消失が線虫の発生・分化・運動・老化・寿命などにおよぼす影響を観察した。いくつかの表現型が観察されたが、なかでも運動能の低下が観察されたことは、ALS が運動神経病であることを考えると興味深い結果である。今後 TDP-1 欠損により、運動神経の形成や機能にどのような影響がおよぶのかを明らかにする必要がある。また生化学的解析から、p97 が TDP-43 C 末断片凝集体に対して脱凝集活性を持つことを示唆する結果を得た。

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。

ひとつの可能性として、TDP-43 が蓄積することにより機能的な TDP-43 が減少もしくは消失することにより、すなわち TDP-43 の loss-of-function により上記疾患が引き起こされることが考えられる。そこで本年度は、線虫 TDP-1 (TDP-43 ホモログ) 欠損変異体を用いて、TDP-1 消失が線虫の発生・分化・運動・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した。

また、TDP-43 凝集体に対して p97 は AAA シャペロンとして脱凝集活性を示すのかを明らかにすることも目的とした。

B. 研究方法

線虫 TDP-1 欠損変異体を常法に従い 20°C および 25°C で培養し、成長速度、産卵数、胚性致死率、雄出現率、寿命を測定した。ストレス感受性は、35°C における生存率、ツニカマイシンに対する感受性を測定することにより求めた。運動能は、緩衝液中での 1 分間の

thrashing 数を測定することにより求めた。

TDP-43 C 末断片を大腸菌を用いて発現・精製した。試験管内で凝集体を形成させ、その後 p97 を添加し凝集体の挙動を SDS-PAGE および分光学的に解析した。

C. 研究結果

線虫 TDP-1 欠損変異体は野生体と比べて、成長遅延、産卵数の減少、胚性致死率・雄出現率の上昇、ストレス(高温ストレス、小胞体ストレス)感受性、運動能の低下、長寿命化などが観察された。ストレス感受性および長寿命化が、熱ショックタンパク依存性であるのかインスリン様シグナル経路依存性であるのかを現在解析している。また運動能の低下が観察されたことから、TDP-1 欠損が運動ニューロンにおよぼす影響を解析中である。

TDP-43 C 末断片凝集体に p97 を添加すると、ATP 依存的に一部の TDP-43 C 末断片が可溶性画分に検出されることがわかった。この結果は、p97 が TDP-43 C 末断片凝集体に対して脱凝集活性を持つことを示唆している。

D. 研究発表

1. 論文発表

K. Yamanaka, Y. Sasagawa, and T. Ogura. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochem. Biophys. Acta* 1823:

130-137 (2012)

たその情報源の詳細。)

2. 学会発表

なし

村山 佑樹, 山中 邦俊, 笹川 洋平, 江崎 雅俊, 小椋 光 : 線虫 CDC-48 の C 末端アダプター-UFD-2, UFD-3 の細胞機能解析. 第 34 回日本分子生物学会年会、12 月 12 日-16 日 2011、横浜.

Ogura, T., Noi, K., Arita-Morioka, K., Esaki, M., Murayama, Y., and Yamanaka, K. Multiple aspects of multifunctional p97. 9th International Conference on AAA Protein, 6-11 November, 2011, Kumamoto Japan.

Sasagawa, Y., Ogura, T., and Yamanaka, K. Analysis of CDC-48/p97 on the meiotic chromosome segregation in *C. elegans*. 9th International Conference on AAA Protein, 6-11 November, 2011, Kumamoto Japan.

Murayama, Y., Yamanaka, K., Sasagawa, Y., Esaki, M., and Ogura, T. Antagonistic control of CDC-48 by C-terminal adaptors UFD-2 and UFD-3 in *C. elegans*. 9th International Conference on AAA Protein, 6-11 November, 2011, Kumamoto Japan.

Murayama, Y., Sasagawa, Y., Ogura, T., and Yamanaka, K. Characterization of cellular functions of UFD-2 and UFD-3, C-terminal adaptors for CDC-48, in *C. elegans*. 18th International *C. elegans* Meeting, 22-26 June, 2011, UCLA, USA.

Sasagawa, Y., Ogura, T., and Yamanaka, K. CDC-48/p97 is required for meiotic chromosome segregation in *C. elegans*. 18th International *C. elegans* Meeting, 22-26 June, 2011, UCLA, USA.

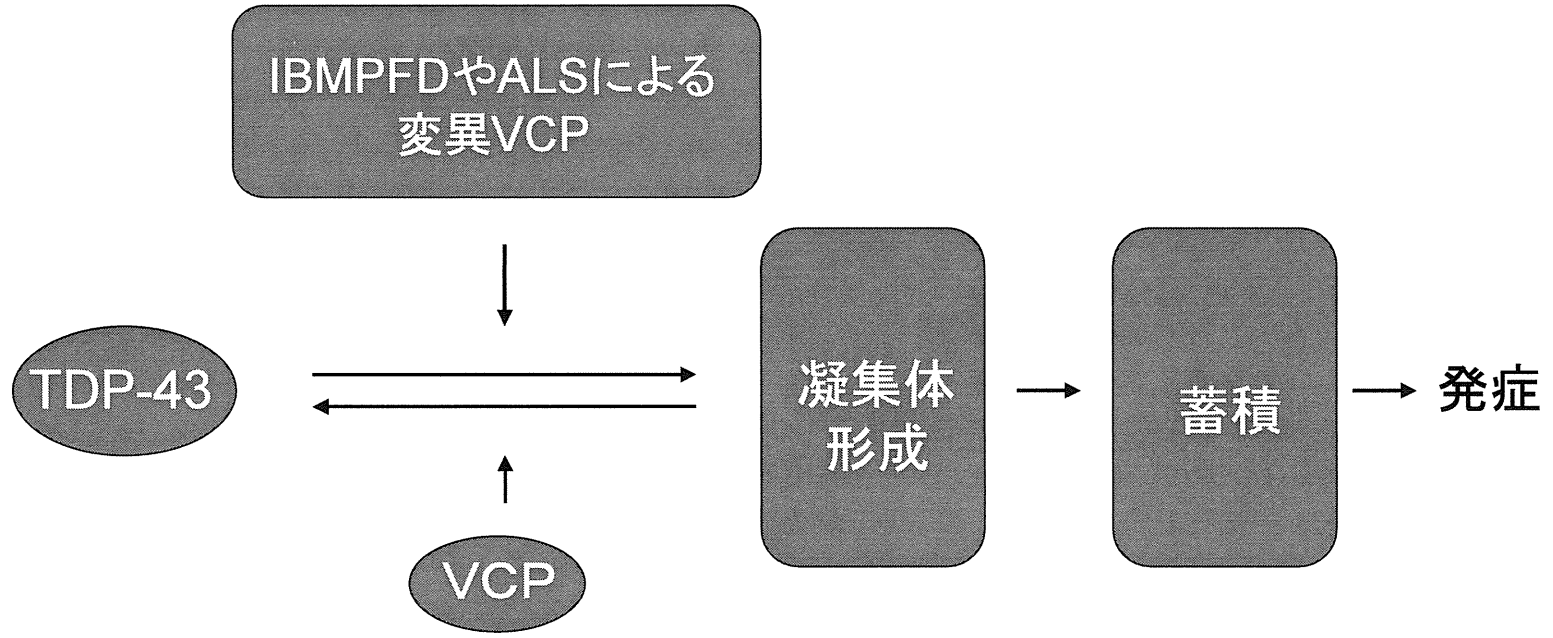
E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

F. 健康危険情報

(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



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	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	新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野
	小田佳奈子	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、3系統の TDP-43 コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作成した。TDP-43 のホモ欠損個体(Tardbp^{-/-})が胎生致死であることから、神経特異的 KO マウス(Tardbp^{flox/flox}、NSE39-Cre⁺)を中心に解析を行ったところ、下位運動神経においてゴルジ体の崩壊が認められ、ALS の初期変化であるクロマトリーシスとの相関が示唆された。しかし 3 系統の cKO マウスの結果から、運動神経のみならず多くの神経細胞においても TDP-43 が必須であることが確認され、ALS モデルとして TDP-43 の機能を部分的に喪失させた新しいマウスの必要性が生じた。そこで Zinc Finger Nuclease(ZFN)を用い、TDP-43 の Glycine-rich region(GRR)の長さのみを変化させたマウスの作成を開始した。現在までに 2 系統のマウスを確立し、更に系統数の増加を計画している。

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(cKO)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(RRM1、RRM2)を有する不均一核内リボ核酸蛋白(hnRNP)であり、機能上重要な RRM1 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、エクソン 3 の両端に loxP 配列を挿入した遺伝子改変マウス(Tardbp^{flox/flox})を確立した。このマウスから作成したホモ欠損個体(Tardbp^{-/-})が胎生致死を示すことから、3 系統の cKO マウス、すなわち神経特異的 KO (NSE39-Cre)、前脳特異的 KO (Emx1-Cre)、運動神経特異的 KO (VACHT-Cre.Fast)を作

成して解析を進めた。

TDP-43 が多くの細胞において必須であることが示唆されたため、TDP-43 のタンパク質ドメインを改変し、部分的な機能喪失あるいは機能獲得を介した ALS モデルが必要であると考へた。そこで Zinc Finger Nuclease(ZFN)を用い、新しい遺伝子改変マウスの作成に着手した。具体的には、ZFNをコードする mRNA を受精卵へマイクロインジェクションし、配列特異的な切断により、複数のマウス系統を一気に作成する試みである。

(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

3 系統の cKO マウスのうち最も解析が進んでいる神経特異的 KO マウス(Tardbp^{flax/flax}、NSE-Cre⁺)の表現型に関しては、遺伝的背景により死亡時期が異なり、C57BL/6 背景のホモ個体では、周産期致死を示すことが明らかとなった。このため SJL 系統への戻し交配群(N2 世代)を用いたところ、生後(P)10~13 日齢に死亡する系統が樹立でき、以後はこの系統を解析に用いた。出生時のホモ個体は、僅かな体格差が疑われる程度であるが、徐々に体重差が明瞭となり、P10 での体重は、野生型が 6.1~7.0g、ホモ個体が 3.6~4.8g と明らかな低下を認めた。大脳の形態観察では、脳梁欠損を伴う広範な大脳萎縮を呈していた。TDP-43 の免疫染色では、核の染色性を失った神経細胞が多数認められ、大脳皮質では半数以上の神経細胞に TDP-43 の喪失が及ぶものと推定された。

次に下位運動神経におけるゴルジ体の崩壊を検討するため、マウスの脊髄を用いて運動神経のゴルジ体を立体的に再構築し、その容積を推定するとともに、TDP-43 の核内染色性との相関も検討した。神経特異的 KO マウスの TDP-43 陰性運動神経では、ゴルジ体容積が $160.8 \pm 25.2 \mu\text{m}^3$ 、陽性運動神経では $157.7 \pm 27.7 \mu\text{m}^3$ 。一方、野生型マウスでは $321.9 \pm 26.1 \mu\text{m}^3$ であり、神経特異的 KO マウスでは、核の染色性に関わらず、ゴルジ体容積の減少

が認められた。またゴルジ体の崩壊はニッスル染色でも確認できたことから、TDP-43 が減少する早い段階から、ゴルジ体崩壊が生じる可能性があり、経時的な解析を進めている。

さらに神経特異的 KO マウスを用いて、TDP-43 の機能喪失と運動神経の脆弱性の相関について解析する予定であったが、定性的な観察からは判断が難しく、他の 2 系統の cKO マウスの観察においても、TDP-43 を喪失した神経細胞が、ほとんど例外なく萎縮性的変化を示すことから、運動神経特異的な変化を示す新たなモデルが必要と考えられた。新たなモデルの候補として、TDP-43 の C 末領域に存在する Glycine-rich region(GRR)に着目した。この GRR は、他の hnRNP との結合領域であり、ナンセンス変異(Y374X)を含む ALS の変異が集中する領域でもある。また比較ゲノム学的に見ても、GRR は高等生物でのみ保存されている領域であり(Wang et al. PNAS 2002 99: 13583-313588)、GRR 領域の欠損によりタンパク質が凝集し、その凝集程度が GRR の長さに依存することも報告されている(Ayala et al. J Cell Sci 2008 121: 3778-3785)。このような背景から、GRR 領域長を変化させた複数のマウスを作成し、GRR の機能解析を進める必要があると考え、最近開発された ZFN を用い、GRR 部分欠損マウスの作成を開始した。現在までに 2 系統のマウスを樹立しているが、更に受精卵へのマイクロインジェクションを行い、系統数の増加を進めている。

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(2011 年 7 月 30 日、ポスター発表)

第 34 回日本分子生物学会年会(2011 年 12 月 14 日、ポスター発表)

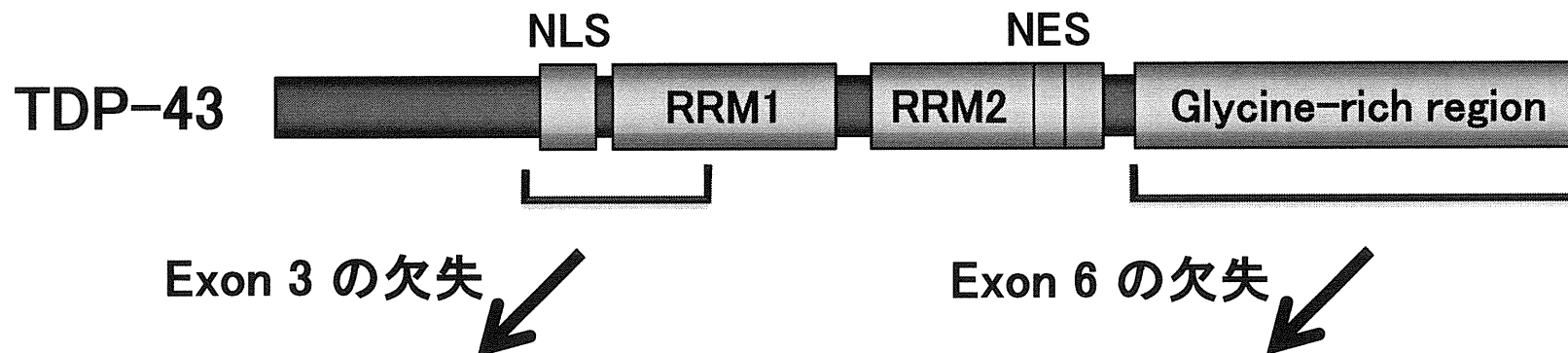
E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

なし

F. 健康危険情報

なし

ALSモデル樹立のための異なる戦略



TDP-43の機能喪失モデル
【コンディショナルKOマウス】

ゴルジ体が崩壊する機構を突破口に、
TDP-43の生理的機能の解明を目指す

TDP-43の機能改変モデル
【ZFNによる新しいマウス】

Glycine-rich regionの機能解明を介し、
ALSモデルの作成を目指す

膜構造変化を中心にALSの病態解明とTDP-43の関連を究明

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について、走査電子顕微鏡(走査電顕)を用いて立体解析することを目的としている。この手法では、光学顕微鏡(光顕)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、①細胞培養系の走査電顕観察法の開発、②同一標本の光顕・走査電顕相補解析法の開発、③ヒトの病理標本の走査電顕観察手法の開発を行った。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する予定である。

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解析するための手法として、①細胞培養系の走査電子顕微鏡(走査電顕)観察法の確立、②同一標本の光学顕微鏡(光顕)・走査電顕相補解析法の開発、③ヒトの病理標本の走査電顕観察手法の開発を行った。

B. 研究方法

①細胞培養系の走査電顕観察法

昨年開発した手法をベースに、培養細胞を寒天等の包埋剤でブロック状にし、オスミウム

浸軟処理を行うことにより、培養細胞の細胞内膜系を走査電顕観察する方法を検討した。

②同一標本の光顕・走査電顕相補解析法

固定したマウス・ラット組織片について、凍結技法を用いて光顕切片を作製し、隣接ブロックを走査電顕標本にすることで、細胞内膜系を詳しく解析できる手法を検討した。

③ヒトの病理標本の走査電顕観察手法

ヒトの通常の病理標本を切り出して、走査電顕で細胞内膜系を観察する方法を検討した。

(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

①細胞培養系の走査電顕観察法の開発

培養細胞を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後、