

201224102A

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24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

研究代表者 小野寺 理

平成25(2013)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(新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野) 横関明男(新潟大学医歯学総合研究科)
研究協力者	伊藤 岳(新潟大学脳研究所神経内科) 小山哲秀(新潟大学研究推進機構超域学術院)

2. 原発性側索硬化症:その神経病理と生化学的所見について	11
-------------------------------------	----

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	小阪崇幸、付 永娟、志賀 篤、柿田明美 (新潟大学脳研究所病理学分野) 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) 西澤正豊(新潟大学脳研究所神経内科)

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	14
---	----

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	17
---------------------------------------	----

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	20
---------------------------------	----

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

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）

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 （新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野）

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。

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。

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。

④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. 最終年の成果の概要

TDP-43 欠損による細胞内膜構造の変化を検討するため、3系統の cKO マウスを作成した。各系統の予備検討から、運動神経細胞の変化が最も明瞭な神経特異的 KO マウス (Tardbp^{flox/flox}, NSE-Cre+) を主たる解析対象として解析を進めた。神経特異的 KO マウスは、ほぼメンデル則に従って出生するが、徐々に体重差が現れ、P10 での体重は、野生型に比してホモ個体で明らかな低下を示し、生存期間の中央値は 20 日であった。大脳マクロ所見では、脳梁欠損を伴う広範な大脳萎縮を呈した。TDP-43 の免疫染色では、大脳皮質神経細胞で広範に TDP-43 が消失し、前角運動神経においても、半数以上が TDP-43 を消失していた。神経特異的 KO マウスの頸部前角運動神経細胞の数には変化がなかったが、運動神経は萎縮性 (野生型 462.0 μm^2 , 変異型 352.8 μm^2) であり、ニッスル染色にて 37.5% の細胞にクロマトリクスを認めた。ゴルジ体の崩壊を検討するため、運動神経のゴルジ体を立体的に再構築し、その容積を推定したところ、ゴルジ体容積の明らかな減少 (野生型 321.9 μm^3 , 変異型 160.8 μm^3) を認めた。さらにチトクローム C の免疫染色では、ミトコンドリア形態の異常も疑われた。

そこで、これらの超微構造を検討するために、走査型電子顕微鏡を用い、本マウスの脊髄前角の運動神経のミトコンドリアを観察した。その結果、ミトコンドリアの膨化、クリステの増加など、明らかな構造の異常を認めた。一方ゴルジ装置の網状構造に大きな変化をみとめることはなかった。脊髄での ATP 産生量は 76.7% に低下していたが、定量的 PCR によるミトコンドリア DNA 量には変化を認めなかった。このことからミトコンドリアの機能異常を推察した。

この現象が TDP-43 依存性であることを培養細胞系にて検討を加えた。Flp-in Hek293 細胞にて doxycycline にて誘導可能な TDP-43 の安定発現系を TDP-43 の翻訳領域の cDNA にて作成した。この細胞を用い TDP-43 の非翻訳領域をターゲットとした siRNA にて TDP-43 の発現を抑制した。その結果、これらの細胞では、ミトコンドリアは細切れかつ不整に染色され、ミトコンドリアの形態異常を認めた。この状態に doxycycline にて TDP-43 を発現誘導することによりミトコンドリアの形態異常を一部改善させることが出来た。本細胞系でミトコンドリアの形態維持に関連する蛋白質の挙動を検討した所、ミトコンドリア分裂に関わる DLP1 のリン酸化が TDP-43 の発現抑制により促進していることが確認された。

一方、膜構造異常の原因として、細胞内膜の機能維持に重要な役割を持つ VCP にも注目した。VCP は TDP-43 との結合が示唆されており、かつ VCP 変異はヒトで運動神経病を引き起こすことが示されていた。そこで、モデル動物として遺伝子改変が容易で生命周期の短い線虫を用い検討を加えた。ヒトの VCP R93C および R159H に相当する変異をもつ線虫 VCP を発現するトランスジェニック線虫を確立した。これらの線虫では、野生体と比して、発生や成長には差はなかった。免疫沈降実験において、TDP-43 は野生型及び変異型 VCP 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 VCP 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。一方、線虫 TDP-43 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。しかし、運動ニューロンの形成には変化を認めなかった。

最後に、TDP-43 の有無がポリグルタミンの凝集能に影響を及ぼすかどうかを調べた。ポリグルタミン(鎖長 40)凝集体形成線虫に TDP-43 欠損を導入すると、凝集体形成能が有意に低下し、長寿命化が観察された。但し、ポリグルタミンの発現自体には影響は観察されなかった。TDP-43 と同様な機能を持つ FUS についても、これらと同様な検討を行ったが、FUS 欠損変異体は TDP-43 欠損変異体とほぼ同様な表現型を示したが、ポリグルタミン凝集体形成能には変化を認めなかった。

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	新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
	横関 明男	新潟大学脳研究所神経内科
研究協力者	伊藤 岳	新潟大学脳研究所神経内科
	小山 哲秀	新潟大学研究推進機構超域学術院

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。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。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いる。このことから、我々は、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。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、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。本年は、この変化が TDP-43 の発現により回復しうることを示した。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。

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

細胞系は Flip-in Hek293 システムを用い野生型 TDP-43 を doxycycline で発現誘導可

能な安定発現細胞を用いた。実験の方法は、次の通りである。1) 内在性 TDP-43 を非翻訳領域をターゲットとした siRNA を用いてノックダウンを行う。2) 次に 48 時間後に doxycycline を加え、外来性の TDP-43 を発現させる（外来性 TDP-43 は翻訳領域のみを発現し、siRNA の影響を受けない）3) doxycycline 添加後 72 時間後に mitotracker によりミトコンドリアを染色し、その形態を評価した。評価は、得られた画像について、処理の有無が解らないように番号をふり、2 名の評価者が、各々独立してミトコンドリアの形態を定性的に評価し、その平均値とした。

C. 研究結果

HEK293 の TDP-43 安定発現系細胞にて、非翻訳領域を対象とした TDP-43 のノックダウンにおけるミトコンドリアの形態を観察した。正常なミトコンドリアが細長い形態を示すのに対し、TDP-43 をノックダウンした細胞では細切れかつ不整に染色され、ミトコンドリアの形態異常を認めることが確認された。

次に、doxycycline 投与の有無により、外来性 TDP-43 の誘導の有無によりミトコンドリアの形態を比較した。その結果、doxycycline 投与群では正常な形態を持つミトコンドリアは 52% 存在するのに対して、非投与群では 41% しか存在せず、doxycycline 投与により形態の優位な改善を認めた。

この機序を検討するために、ミトコンドリアの形態のダイナミクスに関連する種々の抗体にて、Western Blot 法による検討を加えた。その結果、ミトコンドリア分裂に関わる蛋白質 pDLP1(616) が doxycycline 投与群において増加していた。その他のミトコンドリア・ダイナミクスに関わる蛋白質 (OPA1, mfn2) の発現量に TDP-43 に関連した変化は認めなかった。

D. 考察

今回の検討によって、TDP-43 がミトコンドリアの形態維持に直接関与していることが示された。また、ミトコンドリアダイナミクスに関連する蛋白質の内、pDLP1(616) の変化を認めた。

今まで TDP-43 の局在の面からミトコンドリアとの関連について検討してきたが、種々の解析を用いてもミトコンドリアへの TDP-43 の局在を示すことはできなかった。今回の、この結果は、初めて生化学的に、この形態異常の背景を示唆する結果として興味深い。今後、更に実験を追加して、この現象について確認していく必要がある。

ALS におけるミトコンドリア機能異常は、古くから唱えられている魅力的な説である。しかし、その真偽は明らかではなかった。その形態維持に TDP-43 の機能が関与しているとすれば、ミトコンドリア機能から、本症を新たに捕らえ直すことも可能であると考えた。

E. 結論

Flip in Hek293 細胞において、TDP-43 knock down によるミトコンドリアの形態異常は、外来性 TDP-43 を発現させる事により、回復する事を示した。

TDP-43 の発現量に相関して pDLP1 の発現量に差を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kato T, Watanabe N, Yamahira A, Kondo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. PLoS One. 2012;7(8):e43120.

Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012 Sep 25.

2. 学会発表

第 53 回 日本神経学会総会 (2012 年 5 月 23 日)

石原智彦, 志賀篤, 横尾麻衣子, 有泉優子, 横

様式 I

関明男, 譚春鳳, 柿田明美, 西澤正豊, 高橋均,
小野寺理. 「ALS 患者神経組織ではスプライシ
ング関連機能性 RNA が低下する」

Society For Neuroscience 2012, (New Orleans,
Oct,17,2012) Tomohiko Ishihara, Atsushi Shiga,
Akio Yokoseki, Akiyoshi Kakita, Masatoyo
Nishizawa, Hitoshi Takahashi, Osamu Onodera

‘Reduction of U12 snRNAs in nervous tissues
with TDP-43 pathology in amyotrophic lateral
sclerosis’

G. 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

H. 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。)

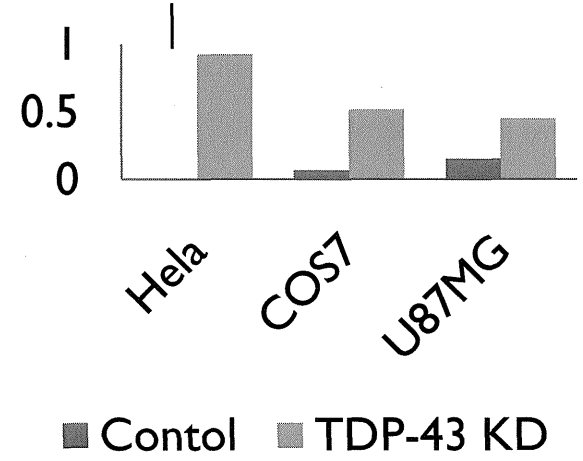
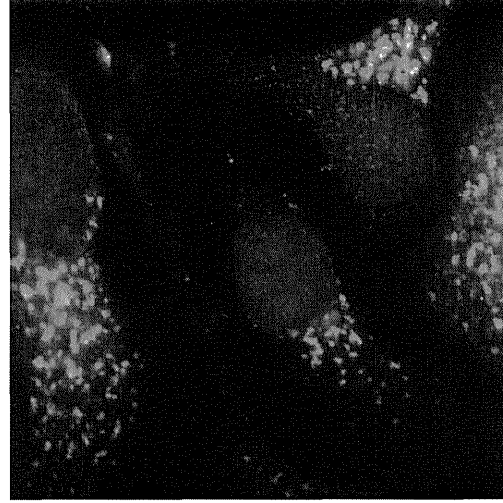
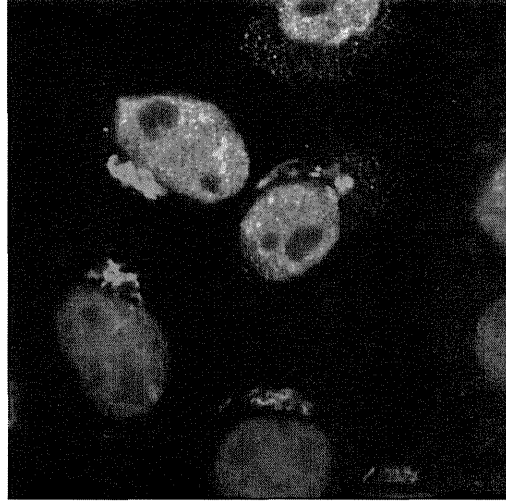
TDP-43 の発現抑制で細胞内膜器官が変化する

正常

TDP-43 KD

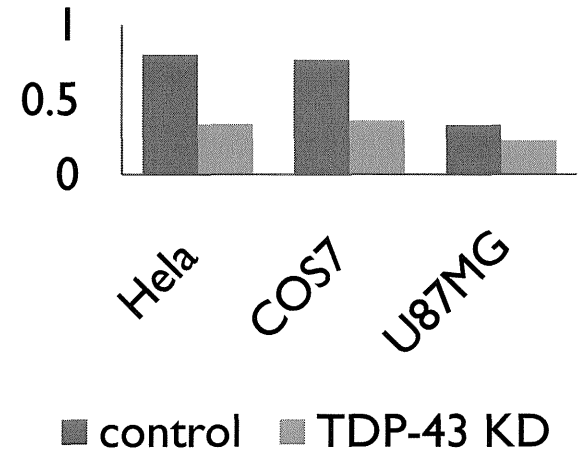
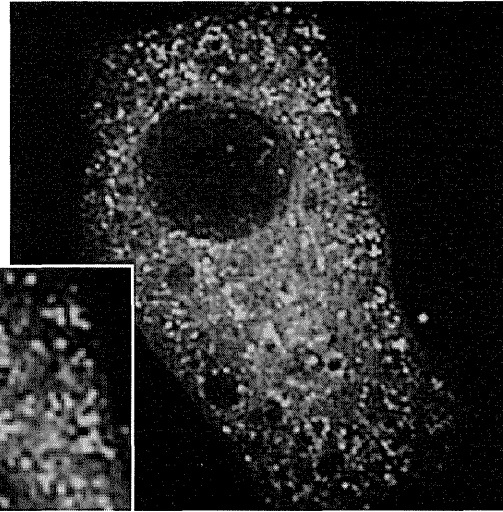
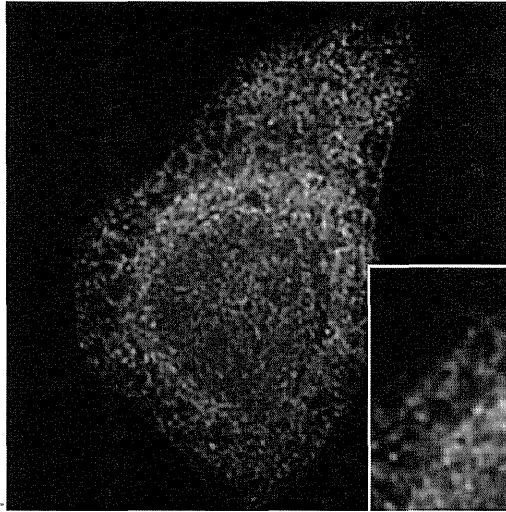
ゴルジ装置(赤)

N-アセチルガラクトサミン転移酵素2



小胞体(緑)

calreticulin



厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野))

分担研究報告書

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

原発性側索硬化症: その神経病理と生化学的所見について

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	小阪崇幸、付 永娟	同 病理学分野
	志賀 篤、柿田明美	
	小野寺理	同 分子神経疾患資源解析学分野
	西澤正豊	同 神経内科学分野

研究要旨

2006年、神経細胞内ユビキチン封入体を示す前頭側頭葉変性症(FTLD)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)に共通の病的タンパクとして新たに TDP-43 が同定された。今回われわれは、臨床病理学的に原発性側索硬化症(PLS)の特徴を示した2剖検例について、病的 TDP-43 (pTDP-43)沈着の広がりとその程度、さらにその生化学的プロファイルについて解析した。その結果、PLSは上位運動ニューロン症状を初発・主症状とし、剖検時、下位運動ニューロンはほぼ保たれ、高度に上位運動ニューロンを侵す ALS の病態に、FTLD-TDP とそれに酷似する生化学的所見を伴うユニークな TDP-43 プロテノパチーである可能性が示された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位および下位運動ニューロン(UMN and LMN)を侵すもっとも知られた運動ニューロン疾患である。一方、原発性側索硬化症(PLS)は臨床的にUMNのみを侵す運動ニューロン疾患として定義されているが、病理学的には、ユビキチン免染導入以来、UMNに加えLMNにも変性を認める例や大脳の萎縮(前頭側頭葉変性)が明らかな例などの報告がみられ、純粋な病理型としてのPLSの存在は否定的である。2006年、神経細胞内ユビキチン封入体を示す前頭側頭葉変性症(FTLD)およびALSに共通の病的タンパクとして新たにTDP-43が同定された。本研究の目的は、PLSとALSあるいはFTLDとの関係を明らかにすることである。

B. 研究方法

臨床病理学的に PLS の特徴を示した2剖検例(死亡時60歳、女性、全経過6年4ヶ月;同82歳、女性、全経過7年4ヶ月)について、病的 TDP-43 (pTDP-43)沈着の広が

りとその程度、さらにその生化学的プロファイルについて解析した。抗体は主にリン酸化 TDP-43 に対するマウスモノクローナル抗体 (pS409/410; Cosmo Bio Co. Ltd, Tokyo, Japan; 1:5000) を用いた。なお、両例に TDP-43 遺伝子異常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

両例において、もっとも強い変性を示した中心前回を含む前頭側頭葉皮質のII-IIIおよびV-VI層に多数のpTDP-43陽性神経細胞胞体内封入体(NCIs)と大小の陽性突起(DNs/NTs)が認められた。同様の所見は皮質下灰白質の扁桃体、線条体にも観察された。一方、そのようなpTDP-43病変はほんの1-2個のLMNに認められるのみであった。変性の程度や陽性構造物の出現頻度を半定量

的に評価したところ、前頭側頭葉、特に motor、premotor に最も高度の変性を認め、陽性構造物も相関して多かった。脊髓前角には、ほとんど変性を認めず、封入体も根気よく探してわずかに認められた程度だった。pTDP43 イムノブロットでは、その大脳皮質に～25-kDa バンドを認めたが、脊髓では検出できなかった。両例において、その皮質の pTDP-43 のバンドパターンは FTLD で報告されてきたパターンに類似しており、ALS のそれとは明らかに異なっていた。

D. 考察・結論

2003 年、当教室では臨床的に PLS と診断された 1 剖検例について報告した (Tan et al. *Acta Neuropathol* 105: 615-620, 2003)。非常に強い上位運動ニューロンの変性に加え、ごく少数ではあったが、ALS の細胞病理学的指標とされる ブニナ小体やユビキチン陽性、タウ、シヌクレイン陰性の封入体を認め、さらには FTLD-U の所見を併せ持った非常に興味深い症例だった。3 年後の 2006 年、この FTLD-U と ALS に共通して認められるユビキチン陽性、タウ、シヌクレイン陰性の封入体の主要構成蛋白として、TDP-43 が同定された。その結果、FTLD と ALS は TDP-43 proteinopathy というスペクトラムの中で、議論されるようになった。しかし、我々の知る限り、PLS における TDP-43 を用いた詳細な検討はいまだなされていない。

今回の我々の 2 剖検例 (その 1 例は、上記 Tan et al. によって報告された例である) における病理組織学的な検討では、変性の程度や陽性構造物の出現頻度は、前頭側頭葉、とくに motor、premotor に最も高度の変性を認め、陽性構造物も相関して多数認められた。一方、脊髓前角には、ほとんど変性を認めず、封入体も根気よく探してわずかに認めた程度で、通常の ALS で認められるような LMN の変性は認められなかった。しかし、少数ながらも LMN に ALS の細胞病理学的指標とされる Bunina 小体や pTDP-43 陽性封入体が認められた点は興味深い所見と考えられた。

FTLD の側面から 2011 年に統一された FTLD-TDP の病理組織学的分 (Mackenzie et al. *Acta Neuropathol* 122: 111-113, 2011)

を用いて検討すると、今回の 2 例はいずれも Type A に近く、少なくとも通常の ALS にて認められる Type B とは異なっていた。加えて、生化学的プロファイルについての検討においても、皮質の TDP-43 のバンドパターンは、sFTLD-TDP で報告されてきたパターンに類似しており、ALS のそれとは明らかに異なっていた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Kosaka T, Fu Y-J, Shiga A, *et al.* Primary lateral sclerosis: upper-motor-predominant amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobar degeneration - immunohistochemical and biochemical analyses of TDP-43. *Neuropathology* 32: 373-384, 2012

2. Tada M, Coon EA, Osmand AP, *et al.* Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. *Acta Neuropathol* 124: 749-760, 2012

2. 学会発表

1. Kosaka T, Fu YJ, Shiga A, *et al.* Primary lateral sclerosis: an immunohistochemical and biochemical study of pathological TDP-43 in two cases: The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, 5-7 September 2012, Manchester, UK

2. Takahashi H. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis - Discovery of TDP-43 and after that -. Seoul Neuropathology Forum - The Neuropathology Study Group of the Korean Society of Pathologists, 8 December 2012, Seoul, Korea

F. 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)

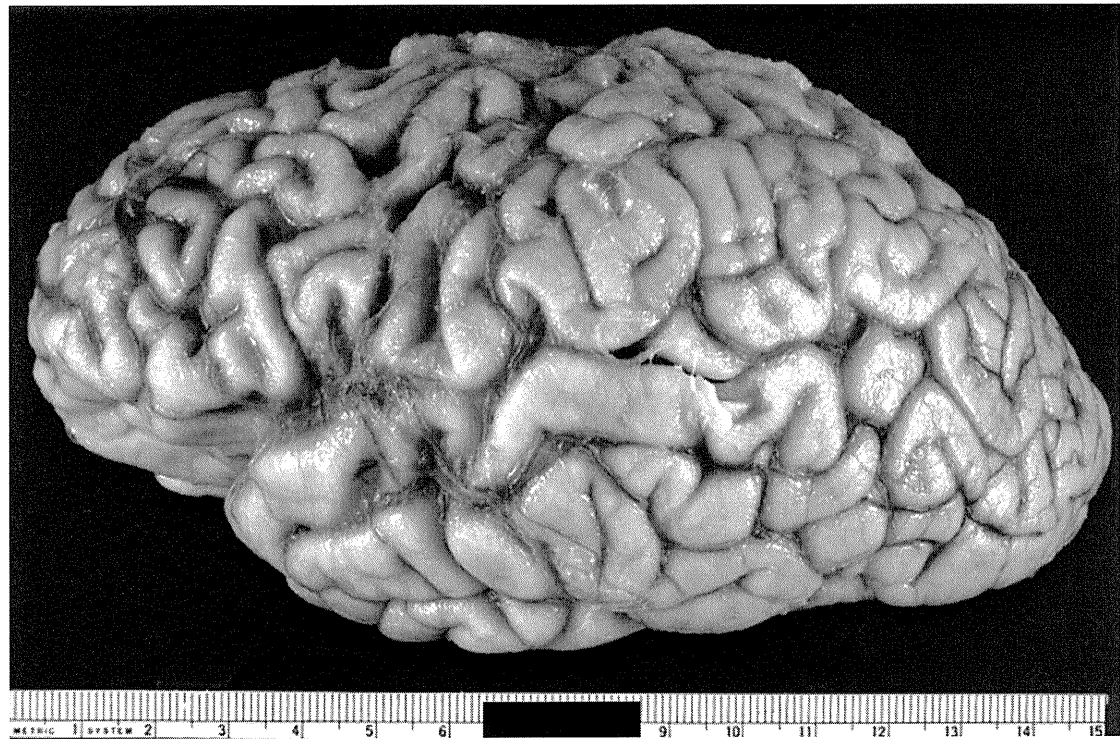
なし

G. 健康危険情報

なし

原発性側索硬化症 Primary lateral sclerosis

上位運動ニューロン症状を初発・主症状とし、下位運動ニューロンはほぼ保たれ、しばしば前頭側頭葉変性を伴うALSの1特殊型と考えられるTDP-43プロテインパチーである。



画像および剖検所見：前頭側頭葉（前頭葉＞側頭葉）の萎縮が明らかで、とくに中心前回（運動野）にもっとも強い。前頭側頭葉変性の所見を示すが、それは中心前回に始まり、前頭葉前方部へ、および側頭葉前内側部へ進展していくように思われる。

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-43 欠損変異体を解析し、TDP-43 欠損が運動能の低下や長寿命化を引き起こすことがわかった。また、TDP-43 欠損によりポリグルタミン凝集体形成による細胞毒性を抑制できることを見いだした。さらに TDP-43 と同様に ALS の原因因子でもあり、TDP-43 と同様な機能を持つと考えられている FUS についても同様な解析を行ったところ、FUS 欠損によっても運動能の低下や長寿命化が観察された。ところが、ポリグルタミン凝集体形成による細胞毒性は FUS 欠損によっては抑制されなかった。

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。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。

本年度は TDP-43 機能喪失とこれらの疾患との関連を求めて、線虫 TDP-43 欠損変異体を用いて、TDP-43 消失が線虫の運動・老化・寿命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 と同様に ALS の原因因子でもあり、TDP-43 と同様な機能を持つと考えられている FUS についてもこれらに対する影響を明らかにすることも目的とした。さらには、易凝集性の TDP-43 や FUS の欠損がポリグルタミン凝集能に及ぼす影響を明らかにすることも目的とした。

B. 研究方法

線虫は常法に従い 20°C および 25°C で培養し、運動能および寿命を測定した。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。線虫観察は、微分干渉顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いて行った。

C. 研究結果

線虫 TDP-43 欠損変異体および FUS 欠損変異体は野生体と比べて、運動能の低下や長寿命化が観察された。運動能の低下は、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が、TDP-43 欠損が運動ニューロンの形成におよぼす影響は観察されなかった。

易凝集性の TDP-43 の欠損がポリグルタミン凝集能に影響を及ぼすかどうかを調べた。ポリグルタミン (鎖長 40) 凝集体形成線虫に TDP-43 欠損を導入すると、凝集体形成能が有意に低下し、長寿命化が観察された。但し、ポリグルタミンの発現自体には影響は認められなかった。TDP-43 と同様な機能を持つ FUS についても、これらと同様な検討を行った。線虫 FUS 欠損変異体は線虫 TDP-43 欠損変異体とほぼ同様な表現型を示したが、ポリグルタミン凝集体形成能に及ぼす影響は異なっていた。TDP-43 欠損では、凝集体形成能が有意に低下し、長寿命化が観察されたのに対し、FUS 欠損では、凝集体形成能が有意に亢進し、長寿命化が観察されなかった。

D. 考察

TDP-43 欠損や FUS 欠損により長寿命化が観察されたことから、これらの因子は寿命決定経路に負に作用することが示唆された。

ポリグルタミン凝集体形成によって観察される表現型が TDP-43 欠損によって抑制されたことから、ポリグルタミン凝集体形成による細胞毒性に TDP-43 が強く関わっていることが示唆される。

E. 結論

線虫において TDP-43 欠損や FUS 欠損が運動能の低下や長寿命化を引き起こすことが明らかになった。また、TDP-43 欠損によりポリグルタミン凝集体形成による細胞毒性が抑制されることを見いだした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

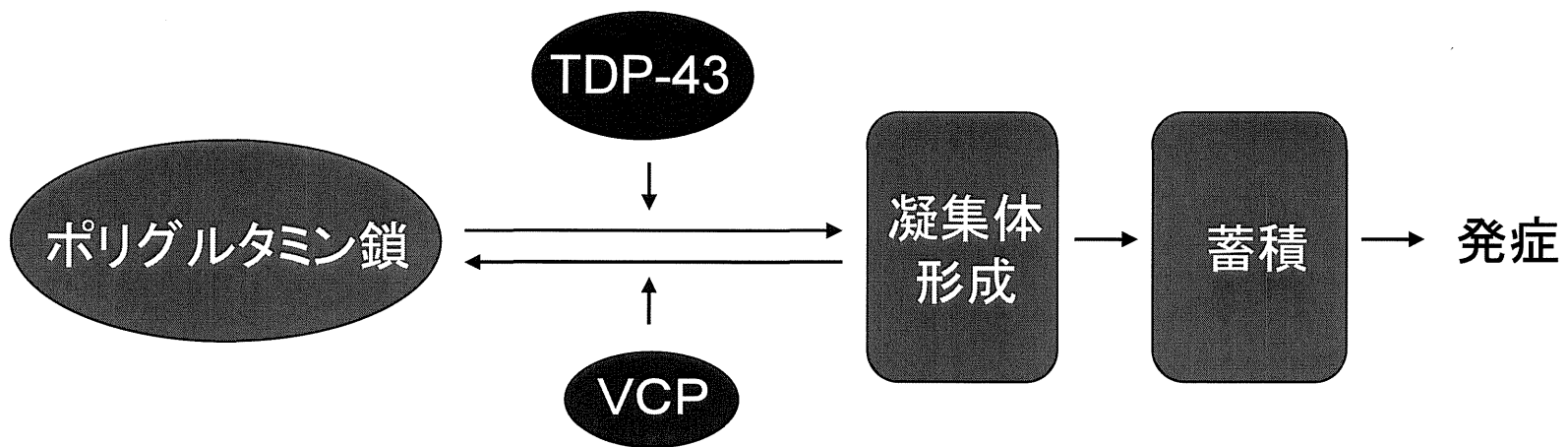
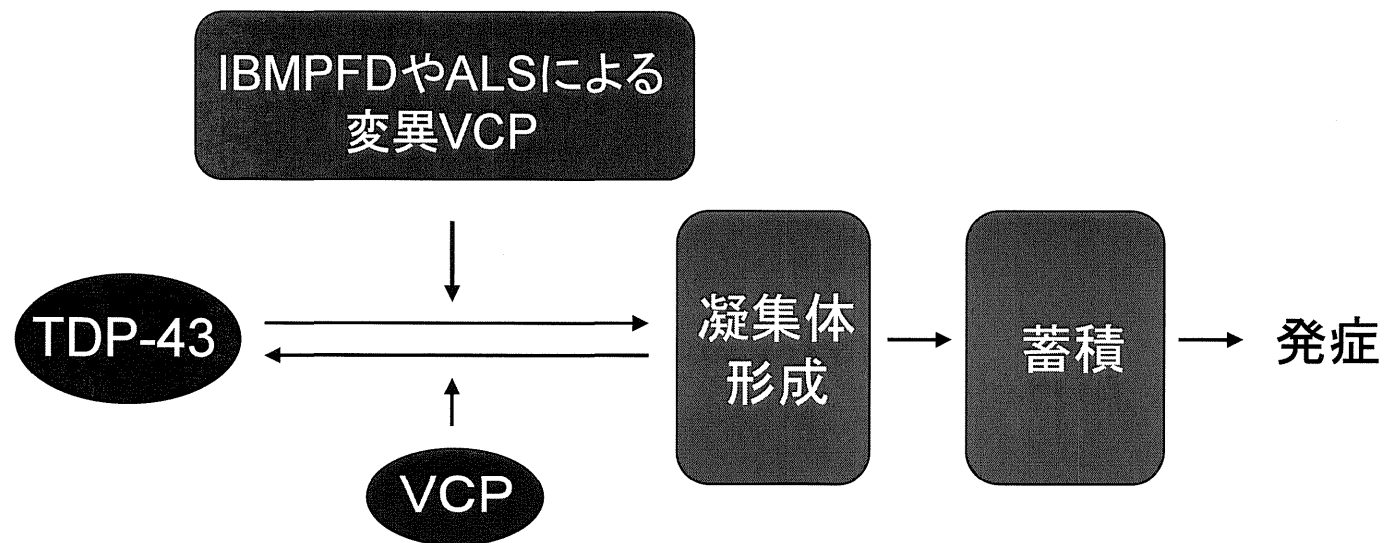
2. 学会発表

なし

H. 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



厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野))

分担研究報告書

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

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

TDP-43 のホモ欠損個体 ($Tardbp^{-/-}$) が胎生致死となるため、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、各系統の予備検討から、運動神経細胞の変化が最も明瞭な神経特異的 KO マウス ($Tardbp^{lox/flox}$ 、NSE-Cre⁺) を主たる解析対象として検討を進めた。神経特異的 KO マウスは、メディアン生存期間が 20 日という強い表現型を示し、病理学的解析では、下位運動神経細胞の数に変化はないものの、運動神経細胞は萎縮性で、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の初期変化であるクロマトリシスやゴルジ体容積の減少を認めた。またミトコンドリア形態変化も確認し、TDP-43 の機能喪失により運動神経細胞内の膜構造変化が生じることを証明した。さらに cKO マウスを発展させ、真の ALS モデル開発するため、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も進めている。現在までに 8 系統のマウスを樹立し、その表現型解析を進めている。

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 ($Tardbp^{lox/flox}$) 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も着手した。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

前年度に作成した 3 系統の cKO マウスの予備検討から、運動神経細胞の変化が最も明瞭な神経特異的 KO マウス (Tardbp^{fllox/fllox}、NSE-Cre⁺) を主たる解析対象として検討を進めた。なお本系統は、遺伝的背景により死亡時期が異なり、C57BL/6 背景では周産期致死となることが判明したため、解析には SJL 系統への戻し交配群 (N2 世代) を用いた。神経特異的 KO マウスは、ほぼメンデル則に従って出生するが、徐々に体重差が現れ、P10 での体重は、野生型が 6.1~7.0g、ホモ個体が 3.6~4.8g と明らかな低下を示し、メディアン生存期間は 20 日であった。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大脳皮質広範に認められ、前角運動神経においても、半数以上が TDP-43 を喪失していると推定された。

次に下位運動神経における変化を検討するため、腰部前角運動神経を対象として、定量的な病理学的解析を進めた。運動神経細胞の数 (野生型 28.5、変異型 30.8) には変化がなかったが、運動神経細胞は萎縮性 (野生型 462.0 μm^2 、変異型 352.8 μm^2) であり、ニッスル染色でも 37.5% の細胞にクロマトリシスを認めた。そこでゴルジ体の崩壊を検討するため、運

動神経のゴルジ体を立体的に再構築し、その容積を推定したところ、ゴルジ体容積の明らかな減少 (野生型 321.9 μm^3 、変異型 160.8 μm^3) が認められた。

チトクローム C の免疫染色では、ゴルジ体の変化に加え、ミトコンドリア形態の異常も疑われた。そこで走査型電子顕微鏡を用い、運動神経のミトコンドリアを観察したところ、ミトコンドリアの膨化、クリステの増加など、明らかな構造の異常を認めた。また脊髄を用いた検討では、ATP 産生量は 76.7% に低下していたが、定量的 PCR によるミトコンドリア DNA 量には変化がないことから、ミトコンドリアの量には変化がないものの、形態および機能の異常が存在することが示された。

D. 考察と結論

神経特異的 KO マウスの解析は、TDP-43 の生理的機能の理解を深め、TDP-43 の機能喪失による膜構造変化の解析に有用であった。しかし cKO マウスは、真の ALS モデルにはなり得ないため、TDP-43 の C 末領域に存在する Glycine-rich region (GRR) に着目し、新しい戦略を立てた。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 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用い、GRR の機能解析を進める必要があると考へ、最近開発された ZFN を用い、GRR 部分欠損マウスの作成を進めている。現在までに 8 系統のマウスを樹立し、表現型解析を進めている。

D. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

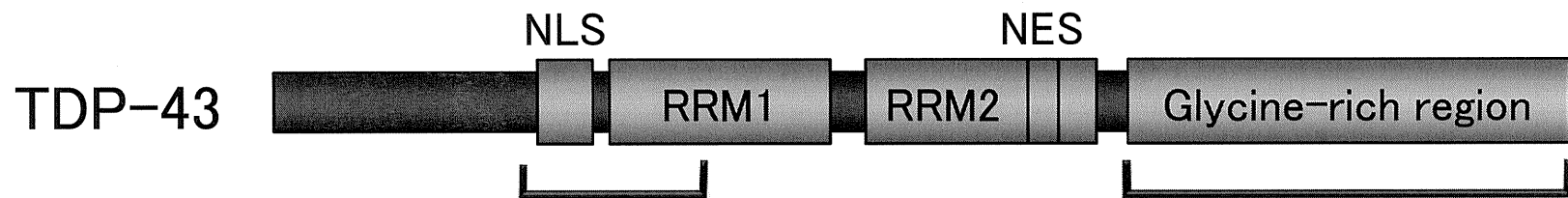
第 42 回新潟神経学夏期セミナー (2012 年 8 月 4 日、ポスター発表)

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



Exon 3 を標的

Exon 6 を標的

Cre-loxP
TLCN-Cre

Cre-loxP
NSE39-Cre

Zinc Finger
Nuclease

全身性TDP-43
欠損マウス

神経特異的TDP-43
欠損マウス

TDP-43機能
改変マウス

TDP-43自身の厳密な
発現制御機構の理解

ALS病理像に類似した
膜構造変化の確認

8系統の樹立と
表現型解析

TDP-43機能の理解に基づいた真のALSモデルの確立