

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

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。本年度は昨年度までに確立した細胞内膜系を解析する手法を、TDP-43 の KO マウス解析に用いて、内膜系の構造変化を光学顕微鏡と走査電子顕微鏡により詳しく解析し、とくにミトコンドリアの構造変化の存在を明らかにした。この知見は、今後の運動神経病の病原因解明に重要な視点を与えるものである。

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、昨年度までに開発した各種観察法を用いて、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した。

B. 研究方法

①オスミウム浸軟法による走査電顕観察法

実験動物(ラットおよびマウス、正常群と KO マウス)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脊髄前角を凍結切断し、0.1%四酸化オスミウムで浸

軟処理を行うことで、細胞内膜系の走査電顕観察を行った。

②同一標本の光顕・走査電顕相補解析法

上記の方法で固定した実験動物の組織片について、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、前角ニューロンの細胞内膜系を免疫組織化学所見と走査電顕所見を結び付けて、詳しく解析した。

(倫理面への配慮)

今回の研究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

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。レーザー共焦点顕微鏡の解析と組み合わせると、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た。

正常(コントロール)マウスの前角ニューロンとTDP-43のKOマウスの内膜系をこの方法で比較検討すると、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が、ミトコンドリアの構造には大きな変化がみられた。すなわち、KOマウスの前角ニューロンにおいては、巨大化したミトコンドリアやいびつなミトコンドリアが多くみられた(図1、図2)。

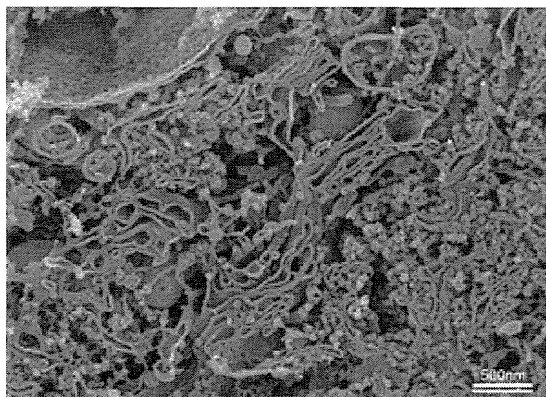


図1. コントロールマウスの前角ニューロン

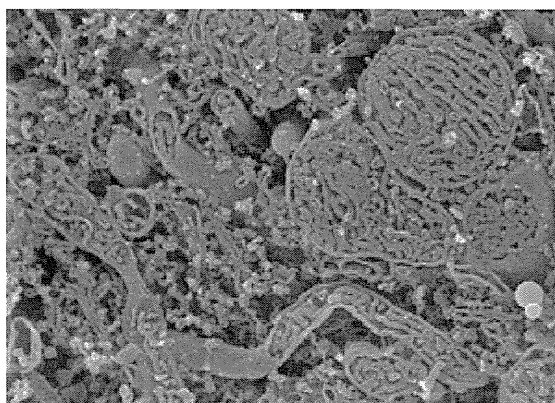


図2. KOマウスの前角ニューロン

上記のKOマウスでは、すべての前角ニューロンが機能欠損を起こすと限らないので、TDP-43の免疫染色切片の隣接ブロックを走査電顕で観察する手法を開発した。

また、光学顕微鏡的にCyt Cの免疫組織化学を試み、この走査電顕での所見の裏付けを行った。その結果、従来の固定法では、ミトコンドリアが破壊されやすいため、光学顕微鏡での解析が難しかったことが明らかになった。

#### D. 考察

本研究により、TDP-43機能喪失による細胞内膜の変化が、ゴルジ装置よりはミトコンドリアの異常にあることを示唆した点で、ALS研究に新たな視点を与えた。この点で学術的な意義がある。また、今後の研究に必要な顕微鏡法を確立した点にも大きな意義がある。

#### E. 結論

本研究では、ALSの発生機序を解明するために、TDP-43の発現とそれに関連した細胞の機能欠損について、電子顕微鏡レベルで細胞内膜系を解析し、細胞小器官における構造機能異常の現象を解明することを可能にした。これらの研究成果は、ALSの病因解明に役立つとともに、新たな治療法の開発のための基礎データとして役立つことが期待される。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### 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)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

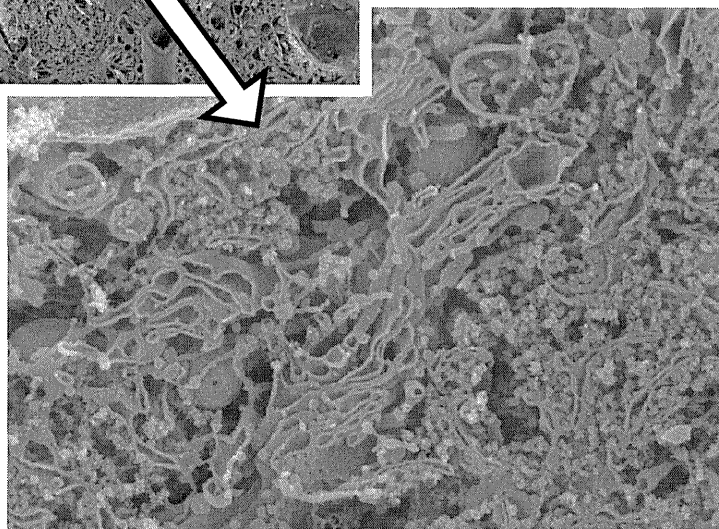
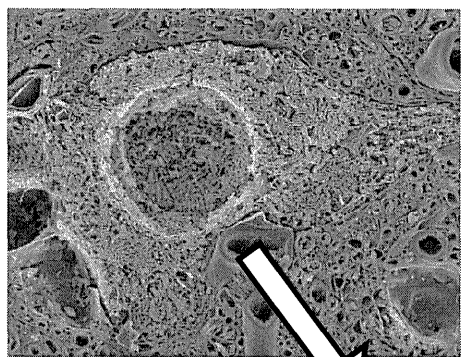
なし

# 細胞内膜構造の走査電顕による解析に関する研究

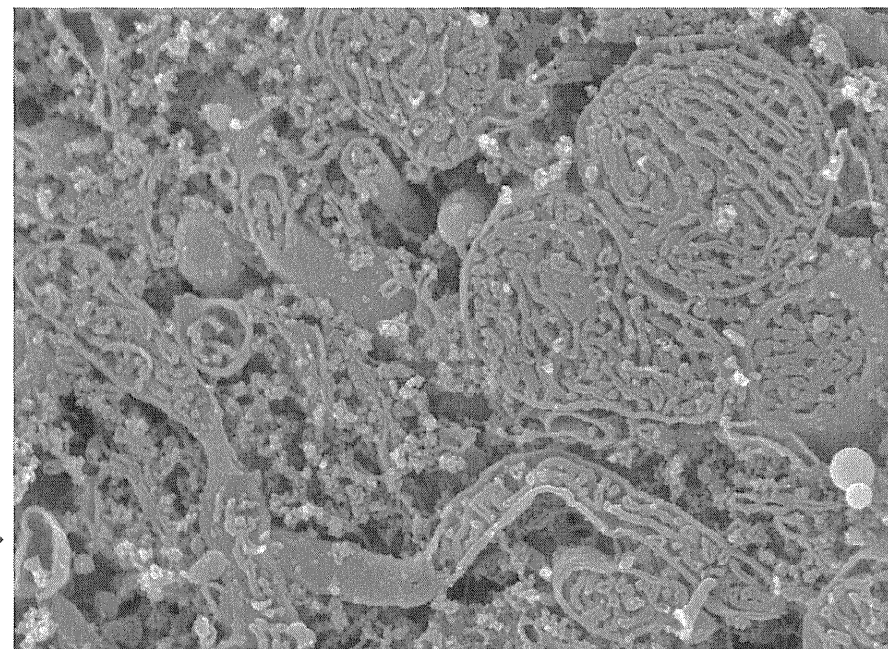
(新潟大学 牛木辰男)

細胞内膜系の  
構造変化から  
病態を探る

高倍率による細胞内膜系の立体観察



コントロールマウスの脊髄運動  
ニューロンの細胞内微細構造



TDP-43ノックアウトマウスの脊髄運動  
ニューロンの細胞内微細構造

ミトコンドリアの形態異  
常の出現

### Ⅲ 研究成果の刊行に 関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

【小野寺 理】

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	7(8):	e43120	2012
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 GGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72.	J NeurolNeurosurg Psychiatry	Sep 25		2012

【高橋 均】

1. 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. *NeuropatholApplNeurobiol* 38: 54-60
2. Kosaka T, Fu Y-J, Shiga A, Ishidaira H, Tan C-F, Tani T, Koike R, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Primary lateral sclerosis: upper-motor-predominant amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobar degeneration - immunohistochemical and biochemical analyses of TDP-43. *Neuropathology* 2012; 32: 373-384

【山中 邦俊】

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Yamanaka, Y. Sasagawa, and T. Ogura	Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions	Biochem. Biophys. Acta	1823	130-137	2012

