

201224102B

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～ 24 年度 総合研究報告書

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 | 11 |
|---|----|

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 有泉優子、伊藤岳、高橋俊昭(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. 孤発性筋萎縮性側索硬化症に関する臨床病理学的研究 | 15 |
|-----------------------------------|----|

分担研究者 高橋 均(新潟大学脳研究所病理学分野)

| | |
|---|----|
| 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 | 18 |
|---|----|

分担研究者 山中邦俊(熊本大学発生病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 | 21 |
|---------------------------------------|----|

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 | 24 |
|---------------------------------|----|

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

研究課題：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

課題番号：H22-神経・筋-一般-014

研究代表者：新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野

小野寺 理

分担研究者：

新潟大学教育研究院医歯学系 牛木 辰男

新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野 佐藤 俊哉

熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野 山中 邦俊

新潟大学脳研究所病理学分野 高橋 均

1. 研究目的

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いる。しかし、いまだ成功していない。一方、分子生物学的解析の発展により、ポリグルタミン病など、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ってきている。この事実は、従来の疾患概念を超え、分子病態に基づく病態の理解と治療方法の開発が可能となってきていることを示唆する。

この共通する分子病態という面から、運動神経疾患と細胞内膜構造（ゴルジ装置、小胞体、ミトコンドリア）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、小胞体の異常、ミトコンドリアの形態異常が指摘されて来ている。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(Yokoseki et al. Ann Neurol. 2008;63:538-542). 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 機能と細胞内小器官との関連を検討し, その細胞死への寄与について検討を加え, 共通する治療方法を探求する.

この目的のために, 研究期間内に次の3点を解析することを目標とした①ALS のモデルマウスを TDP-43 機能喪失仮説に基づき TDP-43 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作成する. ②同マウス, 患者脊髄前角細胞及び培養細胞系で細胞内膜系の微細構造の変化を走査電子顕微鏡にて解析する. この手法を開発し, それによる解析を行う. ③より簡便なモデルとして線虫 TDP-43 ホモログ欠損変異体を用いて, TDP-43 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.

2. 研究方法

A) TDP-43 欠損モデルマウスの作成

マウス TDP-43 遺伝子 (Tardbp) 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 cKO マウス (Tardbp^{+/flox}) を確立した. 次に生殖細胞系列で Cre 酵素を発現する TLGN-Cre マウスと交配させ, TDP-43 ヘテロ欠損マウス (Tardbp^{+/-}) を作成し, さらに TDP-43 の神経細胞における役割を解析するため, 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.

B) 走査電顕による観察

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. 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詳しく解析できる手法を検討した. 培養細胞を寒天等の包埋剤でブロック状にし, 上記の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. さらに, ヒトの通常の病理標本を切り出して, オスミウム浸軟処理を行うことで, 走査電顕で細胞内膜系を観察する方法を開発した.

C) 線虫モデルの作成と解析

線虫は常法に従い 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, 寿命などを測定した. 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. 線虫観察は, 微分干渉顕微鏡, 蛍光顕微鏡を用いて行った. ALS や IBMPFD 患者において同定された変異を持つように改変した疾患型線虫 VCP 遺伝子をボンバードメント法により線虫に導入した. 線虫抽出液から VCP を免疫沈降し, その後種々の抗体で相互作用因子を検討した.

(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、所属機関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。

3. 研究結果及び考察

TDP-43 欠損による細胞内膜構造の変化を検討するため、TDP-43 コンディショナルノックアウト (cKO) マウス (Tardbp^{+/flox}) を TLCN-Cre マウスと交配させ、TDP-43 ヘテロ欠損個体 (Tardbp^{+/-}) 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。しかし、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、TDP-43 ホモ欠損個体 (Tardbp^{-/-}) が胎生致死であることが判明した。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。外観上正常な TDP-43 ヘテロ欠損個体 (Tardbp^{+/-}) の各組織における TDP-43 mRNA の発現量を調べたところ、未受精卵では発現量が半減しており、初期胚発生遅延との相関が示唆された。一方、大脳 (102%)、小脳 (84%)、脊髄 (99%)、と中枢神経組織では正常近くまで mRNA が回復しており厳密な自己蛋白質量制御機構の存在を示唆した。

上記の結果から、TDP-43 機能損失モデルを作成するために、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シスを認めた。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、マ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レスキューすることが出来た。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。このことは、野生型及び変異型 VCP 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。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、易凝集性の TDP-43 と同様に易凝集性を示すポリグルタミン病との関連について検討した。近年、ポリグルタミン病の一種である 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、ALS の危険因子になりうるということが報告された。我々は SCA2 患者の中枢神経系に 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。このことから 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。

4. 評価

1) 達成度について

TDP-43 欠損モデルに関しては、神経特異的 KO マウスの表現型解析を中心に行い、ALS の病理学的変化である膜構造変化を捉えることに成功した。さらに、本研究では、前角ニューロンの細胞内膜系の立体微細構造を高分解能走査電顕で解析できる手法を確立し、TDP-43 機能喪失による細胞内膜構造異常の実態を明らかにした。特にミトコンドリアの形態異常に繋げ、TDP-43 の機能がミトコンドリアの形態ダイナミクスと関与していることを示した点は重要である。本症の病態機序として以前よりミトコンドリアの関与が疑われており、この両者の関連を見いだした。またターゲットとなる分子 DLP1 の同定にも成功しており、今後同分子を制御することによる新たな治療方法の開発が臨まれる。また今回の研究を通じて、種々の材料で、走査電顕による細胞内膜構造の観察を可能とする標本作製方法を開発した。同方法により他疾患においても、より詳細な細胞内構造の観察が可能となる。線虫モデルに関しては ASL や IBMPFD のモデル線虫を作製し疾患型 VCP と TDP-43 との関連性の検討や loss-of-function のモデルである TDP-43 欠損線虫の解析に関しては目的を達成できた。以上 TDP-43 の機能喪失と細胞内膜構造との関連については、ミトコンドリア形態の異常を含め概ね目的を達成出来た。しかし、他の運動神経病へは、広げるこ

とが出来なかった点、画期的な治療法の開発のシーズは得られたが、ヒトへの応用には、今後開発したモデル動物などを用いた動物実験を経る必要がありまだ時間が必要とされる点、が反省点である。

2) 研究成果の学術的意義について

本研究により、TDP-43 機能喪失による細胞内膜の変化が、ミトコンドリアの形態異常にいたることを示唆し、そのターゲット分子としてDLP1の異常を同定し、ALS研究に新たな視点を与えた。この点で学術的意義がある。また、今後の研究に必要な走査電顕による細胞内膜構造を観察しうる顕微鏡法を確立した点にも大きな意義がある。さらにTDP-43欠損により内因性の凝集体形成能が低下し長寿命化につながる観察結果は、凝集体形成機構の解明につながる。

3) 研究成果の行政的意義について

本研究は、ALSの病態機序に基づいた画期的治療法開発への足掛かりになると考えられた。TDP-43欠損により内因性の凝集体形成能が低下し長寿命化につながる観察結果は、今後の凝集体病の治療戦略や治療薬の開発に貢献できる。これらの点から稀少難病の抜本的な解決を目指す足がかりを築いた点で行政的意義がある。

4) その他特記すべき事項について

本研究機関にヒトでの観察を念頭に、これまでのオスミウム浸軟法では細胞内の可溶性タンパク質が除去できないことから、前角ニューロンの走査電顕観察ができなかったヒトの病理標本で、細胞内膜系の走査電顕観察が可能な手法を開発した。今後本方法を用いた患者前角細胞での細胞内膜構造の解析が可能となった。

5. 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。TDP-43欠損により内因性の凝集体形成能が低下し長寿命化につながる観察結果は、今後の凝集体病の治療戦略や治療薬の開発に貢献できる。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 15 件

原著論文による発表 6 件

それ以外（レビュー等）の発表 6 件

そのうち主なもの

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)

K. Yamanaka, Y. Sasagawa, and T. Ogura. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochem. Biophys. Acta* 1823: 130-137 (2012)

Koga D, Nakajima M, Ushiki T: A useful method for observing intracellular structures of free and cultures cells by scanning electron microscopy. *J Electron Microsc* (in press)

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

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

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.

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.

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

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

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

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

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

なし

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 | 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 |
| | 小山 哲秀 | 新潟大学研究推進機構超域学術院 |
| | 伊藤 岳 | 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、さらに、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

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.

レスキュー実験には, 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

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.

次にこの変化が TDP-43 の発現により回復するかを検討するため, 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の有意な増加を認めた.

ミトコンドリアの形態異常をきたす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 blotting 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 が TDP-43 の量と相関することが示された.

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るれば, 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

TDP-43 がミトコンドリアの形態維持に深く関与していることが示された。またこの機序に DLP1 のリン酸化が関与している可能性が示された。

F. 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)

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

なし

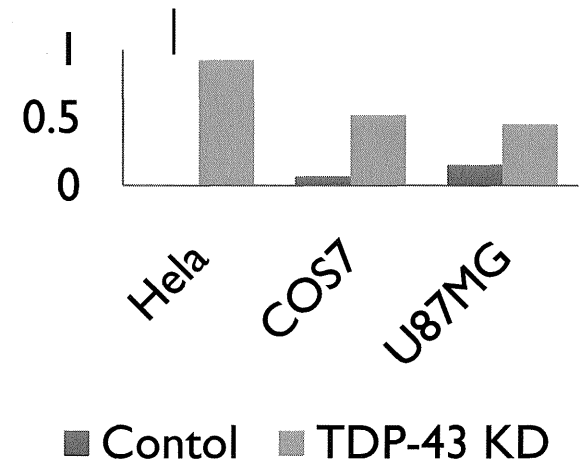
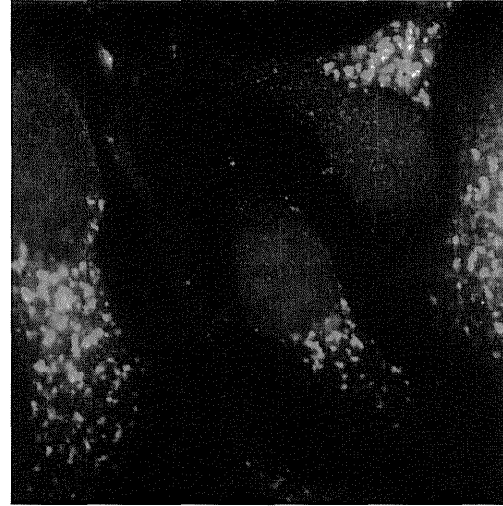
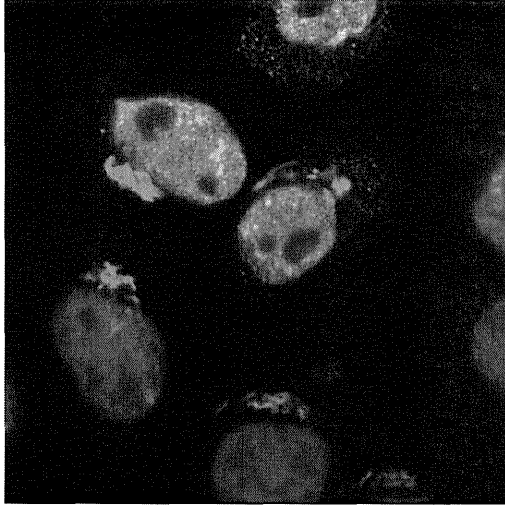
TDP-43 の発現抑制で細胞内膜器官が変化する

正常

TDP-43 KD

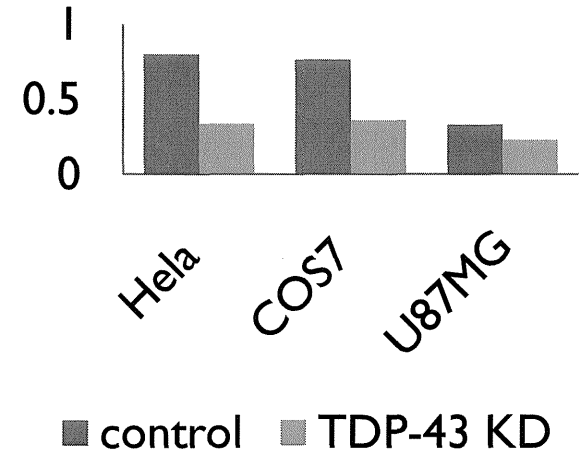
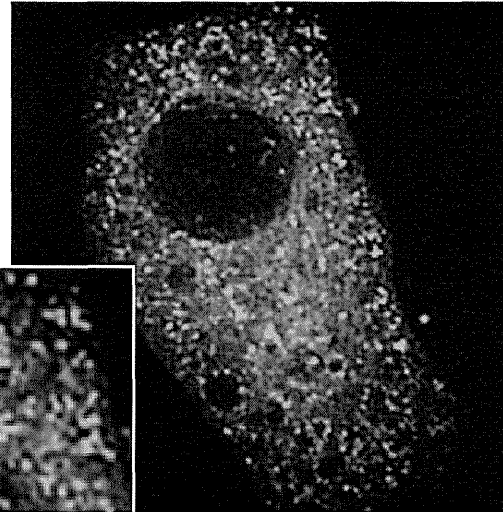
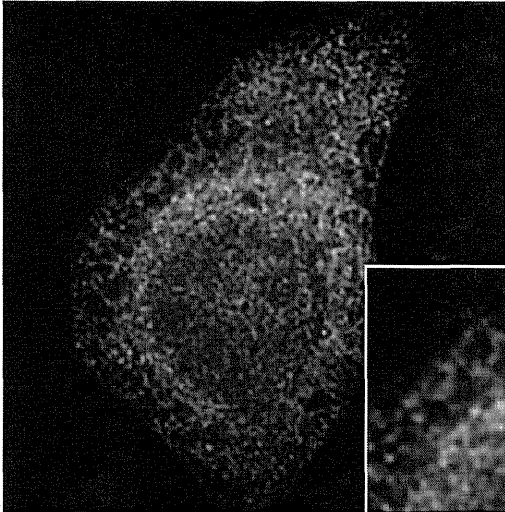
ゴルジ装置(赤)

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)

総合分担研究報告書

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

孤発性筋萎縮性側索硬化症に関する臨床病理学的研究

分担研究者 高橋 均 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

我々は、平成22～24年度、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) について、その病態解明を指向した臨床病理学的研究を行った。その結果、以下の結論を得た。1) ALS は、高齢者で増加する嗜銀顆粒性認知症(argyrophilic grain disease: AGD)を合併し易い病態と考えられる。2) spinocerebellar atrophy type 2 (SCA2)の原因蛋白である ataxin 2(ATX2)の polyQ 鎖の intermediate expansions が孤発性 ALS の危険因子であるとの報告があるが、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。3) 原発性側索硬化症(primary lateral sclerosis; 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、前頭側頭葉変性(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 プロテインパッチーであると考えられた。

1. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)とその病的蛋白である TDP-43 について、剖検例を対象に ALS の病態解明を指向した神経病理学的研究を行った。

2. 研究方法

当脳研究所で収集・保存・管理されている剖検例 (ALS および関連疾患) を対象に TDP-43 異常の存在を免疫組織化学および生化学的に検討し、その病態への関連を考察した。

(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。

3. 研究結果及び考察

1) 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(AGD)の共存の有無を検討した結果、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。この出現頻度から、「ALS では AGD を合併し易い」と判断された。

2) Spinocerebellar atrophy type2 (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。このことより、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。

3) 原発性側索硬化症(PLS)は臨床的に上位運動ニューロンのみを侵す疾患として定義されが、臨床病理学的に PLS の特徴を示した 2 剖検例について、病的 TDP-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系を侵す ALS の病態に FTLD-TDP を伴う臨床病理学的にユニークな TDP-43 プロテインパッチーであ

る」との結論に至った。

4. 評価（研究成果）

1) 達成度

ALS とタウオパチー（高齢者認知症である AGD）、ポリグルタミン病との関わり、さらに原発性側索硬化症の疾患概念について検討し、全てについて有意な結果を得ることができ、また英文論文として報告することができた。

2) 研究結果の学術的意義について

今回、剖検例を対象として得られた神経病理学的知見は、今後の ALS の病態解明にむけて、及び今後の ALS 医療の実地において、極めて有用な学術的意義をもつものである

3) 研究成果の行政的意義について

上記の学術的意義と重複するが、本知見は日本の医療行政、つまり ALS 患者の診断の向上に直接的に寄与するものである。一方で、その病態解明、治療法開発には、さらなる神経病理学的研究の進展と、多くの ALS 剖検脳収集の必要性を提示するものである

4) その他特記すべき事項について

特になし

5. 結論

1) ALS は AGD を共存し易い病態にある。

2) 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ある。

3) 原発性側索硬化症 (PLS) は TDP-43 異常蓄積を示す ALS の 1 特殊型であり、しばしば前頭側頭葉変性症を伴う。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 5 件

原著論文による発表 15 件

それ以外（レビュー等）の発表 1 件

そのうち主なもの

論文発表

1) 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

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

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

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

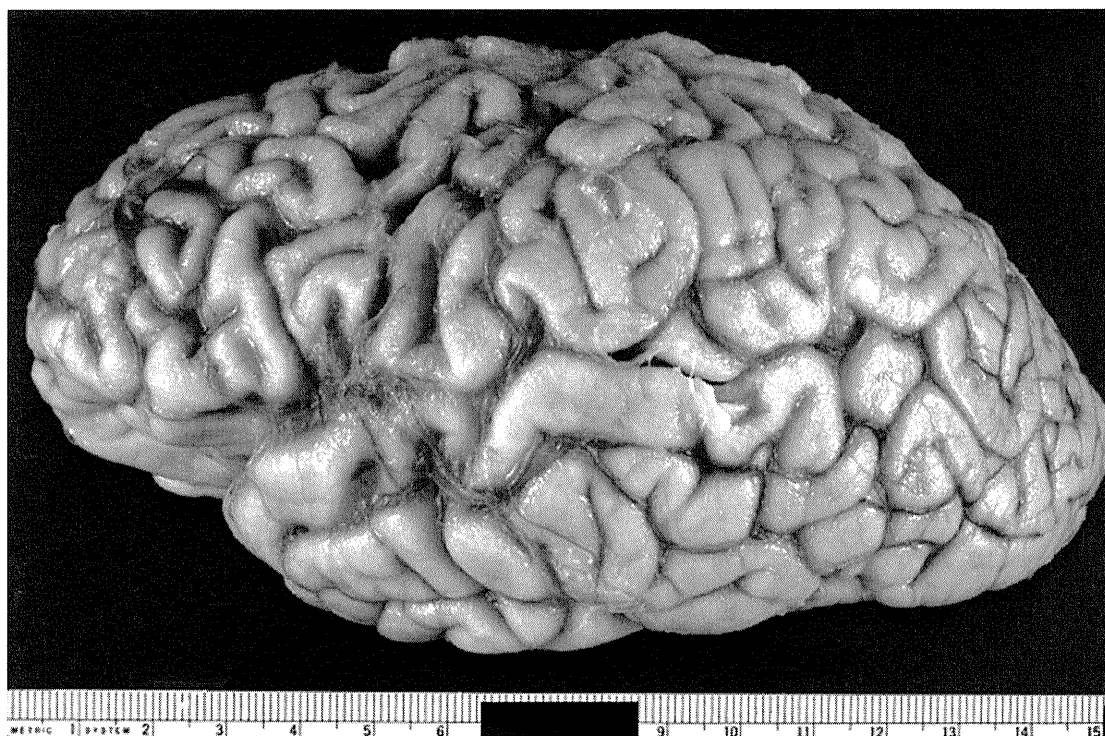
2) Takahashi H. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis - Discovery of TDP-43 and after that -. Seoul Neuropathology Forum - The Neuropathology Study Group of the Korean Society of Pathologists, 8 December 2012, Seoul, Korea

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

特になし

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)

総合分担研究報告書

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。IBMPFD や ALS の原因となる変異を導入した p97 を発現する線虫を作製し、免疫沈降法により 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。TDP-43 欠損や FUS 欠損により運動能の低下や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る。ポリグルタミン凝集体形成による細胞毒性が TDP-43 欠損によって抑制された。

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。疾患型 p97 を発現する線虫を作製し、変異 p97 と TDP-43 蓄積との関連を明らかにすることを目的とする。また、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 欠損が線虫の発生・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。最後に 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 についてもこれらに対する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、成長速度、産卵数、胚性致死率、雄出現率、寿命などを測定した。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。線虫観察は、微分干渉顕微鏡、蛍光顕微鏡

を用いて行った。ALS や IBMPFD 患者において同定された変異を持つように改変した疾患型線虫 p97 遺伝子をボンバードメント法により線虫に導入した。線虫抽出液から p97 を免疫沈降し、その後種々の抗体で相互作用因子を検討した。

C. 研究結果

ヒトの R93C および R159H に相当する変異をもつ線虫 p97 を発現する線虫を確立した。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。TDP-43 の発現量変化や蓄積も観察されなかった。免疫沈降実験において、TDP-43 は野生型及び変異型 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、これらの相互作用は認められなかった。

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。FUS 欠損変異体においても、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。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

免疫沈降実験および酵母ツーハイブリッド実験の結果より、TDP-43 と p97 との相互作用は認められなかったことから、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が示唆される。

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

野生型及び変異型 p97 と TDP-43 との安定な複合体形成は観察されなかった。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

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)

K. Yamanaka, Y. Sasagawa, and T. Ogura. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochem. Biophys. Acta* 1823: 130-137 (2012)

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

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.

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., 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

なし