

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))

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

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、TDP-43 欠損マウスを確立した。ヘテロ欠損個体(Tardbp^{+/-})では、TDP-43 自身の厳密な発現制御機構により、多くの組織で mRNA 発現レベルが回復し、明確な表現型は認められなかった。しかし初期胚では mRNA 発現レベルが半減し、発生遅延を生じるとともに、ホモ欠損個体(Tardbp^{-/-})が着床早期に死亡することを確認した。そこで NSE39-Cre マウスを用い、神経特異的ノックアウトマウス(Tardbp^{fllox/fllox}、NSE-Cre⁺)を作成したところ、メディアン生存期間 20 日という強い表現型とともに、腰部前角運動神経細胞のクロマトリクス、ミトコンドリア形態変化を認め、ALS の病理学的変化の特徴である膜構造変化を捉えることに成功した。

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、TDP-43 の局在変化の観察から、ALS 病態の本質に TDP-43 の機能喪失が関与すると考えたため、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 病態の関係を検討した。

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 と Cre-loxP システムを用い、TDP-43

cKO マウス(Tardbp^{+fllox})を確立した。次に TLCN-Cre マウスと交配させてヘテロ欠損マウス(Tardbp^{+/-})を作成、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、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、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・考察

TLCN-Cre マウスと交配させて作成した TDP-43 ヘテロ欠損個体(Tardbp^{+/-})では、明らかな異常は認められなかったが、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、野生型個体 49 匹(65%)、ヘテロ個体 26 匹(35%)、ホモ個体 0 匹であり、TDP-43 ホモ欠損個体(Tardbp^{-/-})が胎生致死

であることが示された。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が、大脳 (102%)、小脳 (84%)、脊髄 (99%)、筋肉 (75%) など、他の多くの組織では正常近くまで mRNA が回復していた。最近になり、TDP-43 蛋白が自身の mRNA の 3' UTR に結合し、mRNA の不安定性を制御することにより、負のフィードバックループを形成していることが報告された (Ayala et al. EMBO J 2011 30: 277-288)。我々の結果は、この報告を支持するものであり、TDP-43 の厳密な発現制御機構が、細胞の増殖や生存に必須であると推察された。

次に ALS モデルとしての資質を検討するため、3 系統の 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^{flox/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、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。

神経特異的 KO マウスの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クスを認めた。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. 結論

TDP-43 ホモ欠損個体が胎生致死であることから、TDP-43 が哺乳類において必須であることが確認された。TDP-43 は mRNA レベルで厳密な発現制御を受けるため、ヘテロ欠損個体では明らかな異常を示さなかったが、神経特異的 KO マウスでは、ALS の病理学的変化を模倣できることが明らかとなり、本モデルの利用により、ALS に認められる膜構造変化の原因解明に結びつく可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 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 (2010 年 8 月 6 日、ポスター発表)

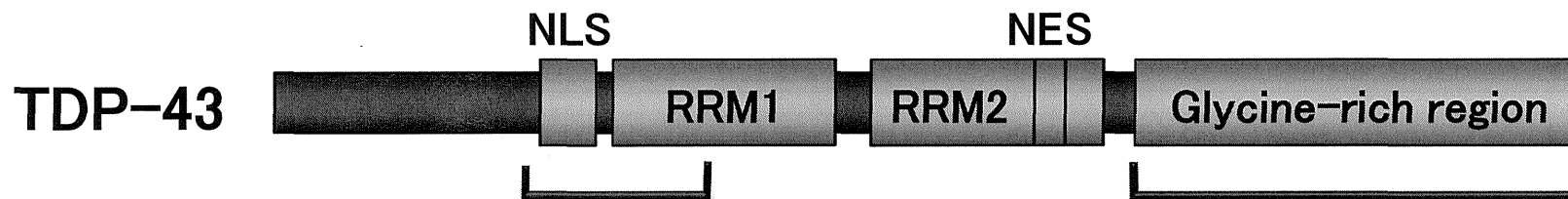
第 1 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム (2010 年 11 月 22 日、ポスター発表)

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)

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

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

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(3年分)

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。その解析には、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ある手法が必要である。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走査電子顕微鏡(走査電顕)観察するための手法を開発するとともに、それによる解析を行った。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。

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走査電子顕微鏡(走査電顕)観察するための手法を開発するとともに、それによる解析を行った。

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詳しく解析できる手法を検討した。

③細胞培養系の走査電顕観察法

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。

④ヒトの病理標本の走査電顕観察法

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、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

1) 実験動物前角ニューロンの走査電顕観察
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。

2) 同一標本の光顕・走査電顕相補解析法

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。

3) 細胞培養系の走査電顕観察法の開発

培養細胞系の細胞内膜系を走査電顕で解析するために、それを可能にする標本作製法を開発した。その結果、固定した組織片を、特殊なアガロースに包埋しブロック状にしたのちにオスミウム浸軟処理を行う方法を考案することにより、培養細胞の断面で細胞内膜系を走査電顕で明瞭に観察できることを可能にした。

4) ヒト病理標本の走査電顕観察手法の開発

ヒトの病理標本は、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。そこで、こうした病理標本について細胞内膜系の走査電顕観察ができるような、新たな手法を開発することに成功した。

D. 考察

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。ま

た、今後の培養細胞系の実験や、ヒトの病理標本の電顕観察を可能にする標本作製法を開発した点で意義がある。とくに、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。

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

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, 2011).

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

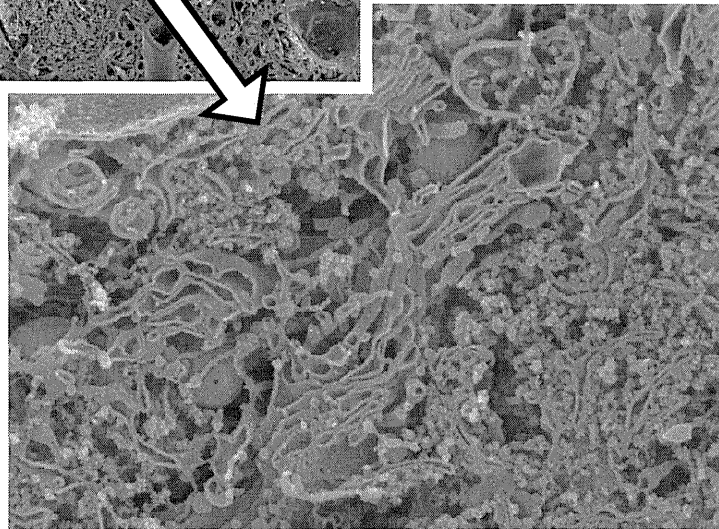
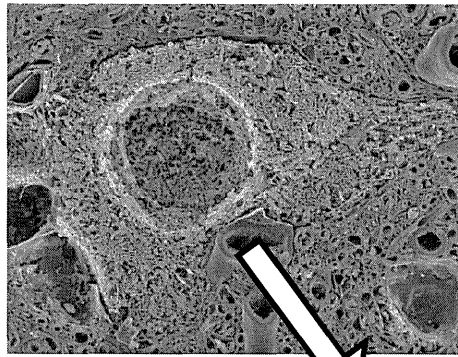
特になし。

細胞内膜構造の走査電顕による解析に関する研究

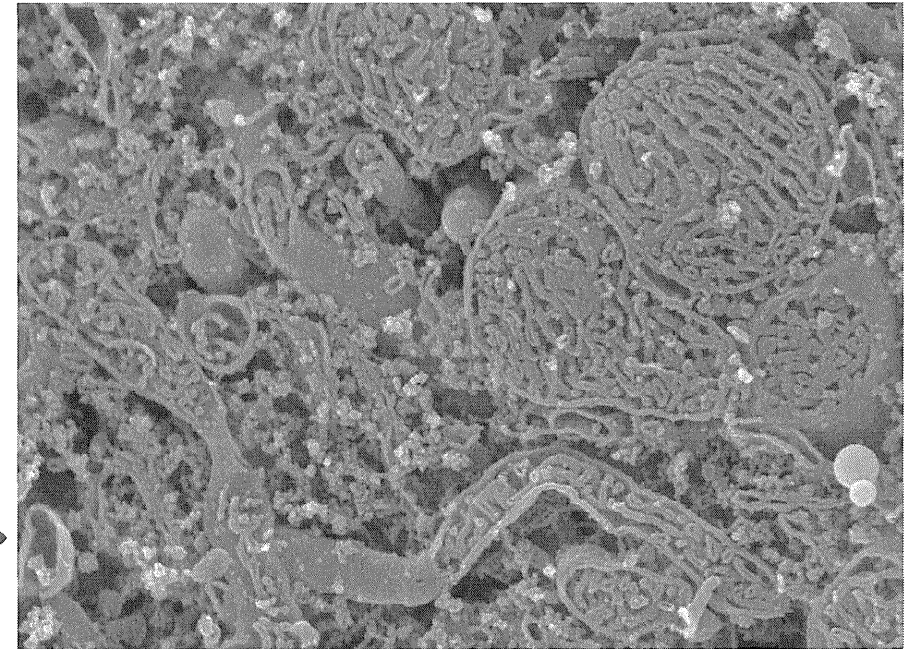
(新潟大学 牛木辰男)

細胞内膜系の
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
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
今野卓哉,石原智彦, 西澤正豊,小野寺理	【ALS-臨床と分子病態研究 の進歩】 家族性ALSALS10 (遺伝性ALS-TDP)の臨床と 病理(解説/特集)	Clinical Neuroscience	29巻9号	1019-1021	2011
Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kat o T, Watanabe N, Yamahira A, Ko ndo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, On odera O	Alteration of POLDIP3 splic ing 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, Su gai A, Kato T, K anai K, Yokoseki A, Eguchi H, Ku wabara S, Nishiza wa M, Takahashi H, Onodera O	Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GG GCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72.	J NeurolNeurosurg Psyc hiatry	Sep 25		2012

【牛木 辰男】

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, 2011).

【高橋 均】

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
5. Piao Y, Hashimoto T, Takahama S, Kakita A, Komori T, Morita T, Takahashi H, Mizutani T, Oyanagi K (2011) Survival motor neuron (SMN) protein in the spinal anterior horn cells of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 1372: 152-159
6. Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2011) Enhancement of native and phosphorylated TDP-43 immunoreactivity by proteinase K treatment following autoclave heating. *Neuropathology* 31: 401-404
7. 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
8. Ince PG, Highley JR, Kirby J, Wharton SB, Takahashi H, Strong MJ, Shaw PJ (2011) Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. *Acta Neuropathol* 122: 657-671
9. 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
10. 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
Y. Sasagawa, K. Yamanaka, Y. Saito-Sasagawa, and T. Ogura	<i>C. elegans</i> 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

