

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07979

研究課題名(和文) AAVを用いたTDP-43異常蛋白伝播の機序の解明

研究課題名(英文) Analysis for prion-like propagation of pathological TDP-43

研究代表者

永井 真貴子(Nagai, Makiko)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80420488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)はTDP-43蛋白が異常に凝集し神経細胞を伝播して細胞死が連鎖すると考えられている。アデノ随伴ウイルス(AAV)に緑色蛍光蛋白(GFP) cDNAを組み込み、嗅内皮質、内側中隔野に注入するとGFPは神経細胞体から神経線維に発現し、海馬に神経線維が投射するのが認められた。正常TDP-43 cDNAと変異型TDP-43 cDNAを組み込んだAAVを注入するとTDP-43蛋白の正常型は核、変異型は細胞質に発現し、経時的に神経細胞の変性を認めたが、投射先の海馬の細胞まで蛋白の発現を追うことができず、また海馬の細胞に異常TDP-43が伝播することはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSを含む神経変性疾患ではTDP-43などの特定の蛋白質が異常に凝集し、それが神経細胞を伝播して細胞死が連鎖すると考えられている(プリオン仮説)。本研究ではAAVを用いてマウス海馬への入力部位である嗅内皮質、内側中隔野にTDP-43を発現させ、海馬へ異常TDP-43が伝播し広がるALSモデルマウスを作成することを目的としたが達成できなかった。パーキンソン病のモデルではシヌクレイン凝集体をマウスに注入すると広範な伝播が認められるが、ALSにおけるTDP-43蛋白異常については異なった機序の検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) is the major disease-associated protein involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). It was reported that pathological TDP-43 forms aggregation as prion-like seed and spreads to the other neurons along neural pathway. In this project, we injected AAV with pathological TDP-43 cDNA in entorhinal cortex and medial septal area, the neurons there send the fibers to the hippocampus. TDP-43 protein overexpressed in the neurons of entorhinal cortex and medial septal area, but the pathological TDP-43 did not spread to the neurons of hippocampus.

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS TDP-43 AAV prion-like propagation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の剖検脳を用いた解析では、異常 TDP-43 タンパクの凝集が海馬に認められる。TDP-43 は正常では核に存在する RNA 結合タンパクで RNA 輸送や転写の調節に関与しているが、ALS 患者では細胞質に移動しリン酸化されている。ALS を含む進行性の神経変性疾患では、異常に凝集した TDP-43 などの特定の蛋白質が、神経細胞間を伝播して細胞死が連鎖すると考えられている (プリオン仮説)。

2. 研究の目的

本研究ではアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いてマウス海馬への入力部位である嗅内皮質、内側中隔野の神経細胞に異常 TDP-43 タンパクを発現させ、海馬の神経細胞へ異常 TDP-43 が伝播し、マウスの記憶障害を来す、TDP-43 伝播モデルを作成することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 緑色蛍光蛋白 (GFP) cDNA を組み込んだ AAV を作成し、脳定位固定装置を用いてマウスを保定し、嗅内皮質、内側中隔野に注入した。マウスは注入 2 週間後にパラフォルムアルデヒドを用いて還流固定し、脳切片を作成、GFP の発現分布を確認した。

(2) 正常 TDP-43 cDNA と 3 種類の変異型 TDP-43 cDNA (遺伝性 ALS 患者由来の A315T 変異、N 末あるいは C 末を除去した変異型) を組み込んだ計 4 種類の AAV を作成し、嗅内皮質、内側中隔野に注入した。それぞれの cDNA には FLAG 配列を組み込み、発現した TDP-43 が、マウスの内在性 TDP-43 と区別ができるようにした。注入後 2 週間、1 か月、2 か月後にマウス脳切片を作成し、抗 FLAG 抗体、抗 TDP-43 抗体、抗リン酸化 TDP-43 抗体で免疫染色した。

(3) (2) で作成した TDP-43 cDNA に His タグを付加してプラスミドベクターに組み込み、大腸菌に発現した TDP-43 タンパクを精製してマウス海馬に注入した。注入後 2 週間、1 か月後にマウス脳切片を作成し、免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) GFP は嗅内皮質と内側中隔野の神経細胞に発現した。神経細胞体から神経線維に分布し、海馬 (CA1, CA3, 歯状回) まで神経線維が投射するのが認められた。

(2) 正常 TDP-43 タンパクは嗅内皮質、内側中隔野の神経細胞の核に発現し、経時的に神経細胞死を認めた。変異型 TDP-43 タンパクは点変異型では核と細胞質に発現し、神経細胞死を認めた。N 末あるいは C 末を除去した変異型は細胞質のみに発現し、神経細胞死は認めなかった。細胞質に発現した変異 TDP-43 は細胞体から軸索近位部に分布したが、GFP のように投射先である海馬まで発現を追うことができなかった。また、海馬の細胞に異常 TDP-43 が伝播して神経細胞死を来すことはなかった。

(3) TDP-43 蛋白は正常型と点変異型では凝集体を形成しなかったが、N 末を除去した TDP-43 蛋白は凝集体を形成した。マウス海馬に注入すると神経細胞の変性とミクログリアの集合が認められたが注入部位以外に TDP-43 蛋白の凝集が伝播することはなかった。

(4) 本研究では異常 TDP-43 蛋白が伝播して広がる ALS モデルマウスを作成することを目的としたが達成できなかった。パーキンソン病のモデルでは α シヌクレイン凝集体をマウスに注入すると広範な伝播が認められるが、ALS における TDP-43 蛋白異常については異なった機序の

検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------