

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17008

研究課題名（和文）TDP-43発現低下における、fthI mRNAへの影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of fthI mRNA in axonal parts of cortical neurons by TDP-43 knockdown

研究代表者

神野 隼輝 (Jinno, Jyunki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70839711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：定量PCR、Western Blotting、ELISAによって、TDP-43をknockdownさせることで、マウス初代培養神経細胞の軸索分画において、fthI mRNA、フェリチン重鎖が減少することを確認した。また、TDP-43をknockdownさせた神経細胞の軸索において、Fe²⁺が増加すること、神経細胞全体において、酸化ストレスが増強することを、画像的解析によって示した。LDH assay、Caspase-3タンパク質の定量を用いて、TDP-43 knockdownによって、細胞死が増強することも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症の病態に、酸化ストレスが関連していることを示すデータとして、ALS患者・モデルマウスからのサンプルにおいて、酸化ストレスのマーカーが上昇しているという報告がある。また、TDP-43は、RNA結合タンパク質として知られている。本研究では、フェリチン重鎖(fthI) mRNAを、TDP-43が軸索に輸送するmRNAの一つとして同定し、TDP-43タンパク質の発現低下によって、フェリチン重鎖が神経細胞の軸索において減少することで、酸化ストレスが増強することを示したものであり、筋萎縮性側索硬化症と酸化ストレスの関連を示唆するという点において意義があるものである。

研究成果の概要（英文）：We confirmed that fthI mRNA and ferritin heavy chain protein decrease by quantitative PCR and ELISA. Fe²⁺ increases not only in axonal fraction but whole of TDP-43 knockdown neuronal cells. We could observe enhancement of oxidative stress in TDP-43 knockdown neurons. We confirmed that cell death increased by TDP-43 knockdown using LDH assay and immunoblotting of caspase-3.

研究分野：筋萎縮性側索硬化症

キーワード：軸索輸送 酸化ストレス TDP-43 フェリチン重鎖

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先行の論文(Nagano et al., 2020)にて、TDP-43 を RNAi で knockdown させて、マウス初代培養の神経細胞の軸索分画で減少する mRNA として、マイクロアレイ解析によって、フェリチン重鎖(fthI)を同定した。フェリチン重鎖は、ferroxidase 活性によって、 Fe^{2+} を Fe^{3+} に変更し、活性酸素種の生成を抑制し、酸化ストレスを制御する作用があることから、ALS における酸化ストレスの寄与という観点から、分子生物学的な病態を、生化学的・画像的解析を用いて、行うこととした。

2. 研究の目的

ALS における病理学的指標であり、RNA 結合タンパクとしても知られている TDP-43 が、細胞内の酸化ストレスに与える影響について解析し、ALS における酸化ストレスの寄与について探索することを目的としている。

3. 研究の方法

軸索における生化学的・画像的解析を目的としており、マウス初代神経細胞の培養には、insert chamber、流体力学チャンバーを用いた。TDP-43 の knockdown は、TDP-43 の shRNA を発現するレンチウイルスを、初代培養神経細胞に感染させることで施行した。

Insert chamber を用いて、神経細胞の軸索分画のみを採取し、定量 PCR にて fthI mRNA、Western Blotting、ELISA にて、フェリチン重鎖タンパク質の、定量的解析を行った。

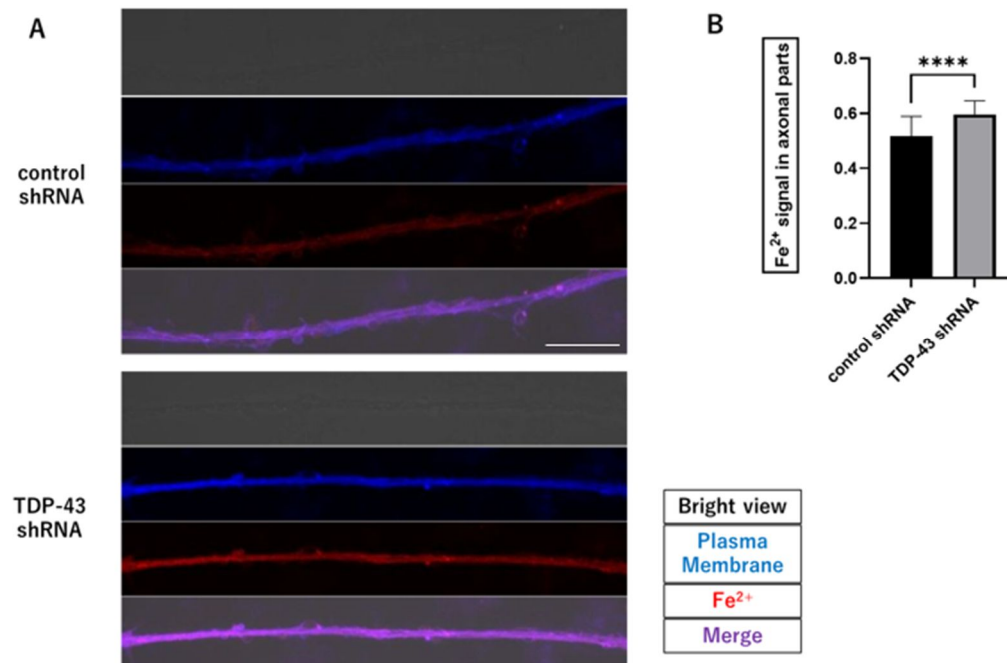
流体力学チャンバーを用いて培養した、初代培養神経細胞の軸索分画を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。画像の定量的解析のためには、 Fe^{2+} と反応して蛍光を発現する probe や、活性酸素種と反応して蛍光を発する試薬を用いた。

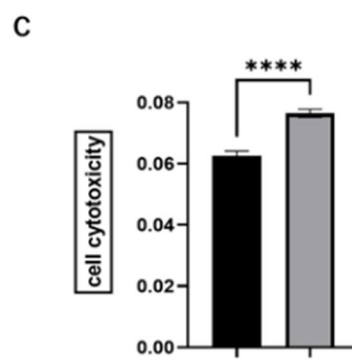
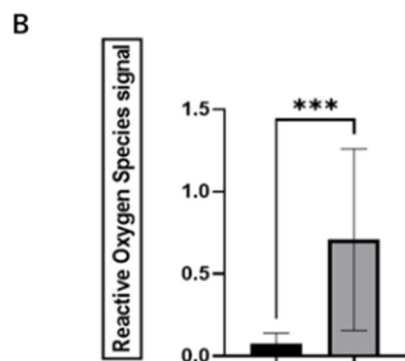
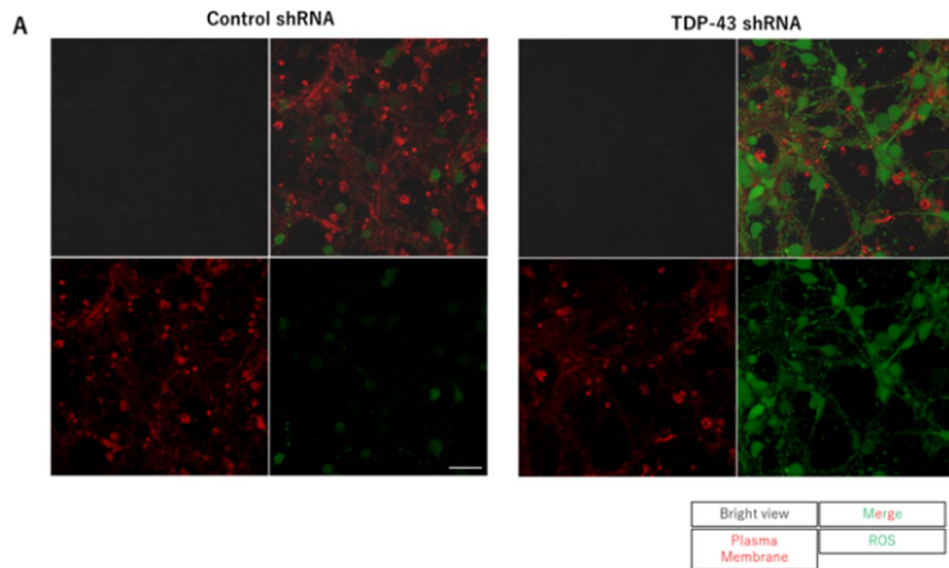
4. 研究成果

定量 PCR、Western Blotting、ELISA によって、TDP-43 を knockdown させることで、マウス初代培養神経細胞の軸索分画において、fthI mRNA、フェリチン重鎖が減少することを確認した。

また、TDP-43 を knockdown させた神経細胞の軸索において、 Fe^{2+} が増加すること、神経細胞全体において、酸化ストレスが増強することを、画像的解析によって示した。

LDH assay、Caspase-3 タンパク質の定量によって、TDP-43 knockdown によって、細胞死が増強することも示した。





5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nagano S, Jinno J, Mochizuki H, Araki T.
2. 発表標題 TDP-43 controls ribosomal RNA maturation by regulating the function of ribosomal proteins.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------