

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591275

研究課題名(和文)新規の孤発性ALSマウスモデルの作製

研究課題名(英文)The production of newly ALS model mice

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経特異的プロモーターを使用し、その下流にLoxP配列で挟んだ赤色蛍光色素であるdsRed cDNAとTDP-43 cDNAを挿入したトランスジェニックマウスを作製した。マウス大脳皮質の神経細胞と脊髄前角の運動神経細胞に赤色蛍光色素の発現が見られた。VAcHt-Creトランスジェニックマウスと交配し、運動神経細胞へTDP-43を過剰発現を期待したが、発現は不十分で神経細胞死は認めなかった。正常型・変異型TDP-43cDNAを組み込んだAAV1ウイルスを作製し、マウス腰髄に注入すると運動神経細胞死が起こり、一側下肢の麻痺を呈し、筋萎縮性側索硬化症のモデルとなると考えた。

研究成果の概要(英文)：TDP-43 was identified as the major protein component of the aggregations in the affected neurons of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. We generated the transgenic mice with loxP-dsRed-loxP-TDP-43 under the control of Thy-1. This mouse expressed dsRed in neurons of brain and spinal cord. Then we crossed this mouse with VAcHt-Cre mouse, which expressed Cre in motor neurons. We expected the motor neuron deaths in the spinal cords of these double transgenic mice to use as the ALS model. These double transgenic mice did not expressed the paralysis, because the insufficiency of TDP-43 protein level. We used adeno-associated virus (AAV) vectors to overexpress the TDP-43 in the mice motor neurons. TDP-43-WT and TDP-43-A315T mice showed muscle weakness of the left hindlimb from 2 weeks of injection. We may use these mice as ALS model.

研究分野：筋萎縮性側索硬化症の病態解明

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 TDP-43 アデノ随伴ウイルス マウスモデル 脊髄前角細胞

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は 3-5 年の経過で四肢体幹の筋萎縮・球麻痺・呼吸筋麻痺が進行し死にいたる運動神経変性疾患である。運動ニューロンの細胞死がなぜ起こるのか充分には明らかにされておらず、有効な治療法は未だ確立していない。治療法の確立にはモデル動物が必要で、遺伝性 ALS のモデルとしては変異型 SOD1 遺伝子を導入したトランスジェニック動物が確立されているが、ALS 患者の 90% 以上を占める孤発性 ALS のモデルは確立されていない。2006 年、孤発性 ALS 患者の脳・脊髄運動ニューロンの細胞質に沈着する物質として TDP-43 タンパクが同定された。TDP-43 は元々細胞の核に存在するタンパクであるが、孤発性 ALS および前頭側頭型認知症の患者においては神経細胞の細胞質にリン酸化されて局在することが分かってきた。その後、TDP-43 遺伝子異常のある遺伝性 ALS の家系が発見され、TDP-43 は ALS の原因タンパクとして注目を集めている。

2. 研究の目的

(1) 患者の大多数を占める孤発性 ALS の患者の病態を反映したモデルマウスを新たに確立し、病態の解明および、今後の治療薬研究に役立てることが目的である。モデルは 2 通りの方法で作成する。一つは運動ニューロンに特異的に発現するプロモーターの下流に TDP-43 遺伝子を配置し、運動ニューロンに TDP-43 が過剰発現するトランスジェニックマウスを作成する。

(2) ALS は一部位の症状 (片側の手の筋萎縮など) で発症し、全身に筋萎縮が進行する病態であるが、これまでは原因遺伝子のトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスなど最初から全身の運動神経ニューロンを障害するモデルが作成されてきた。この研究では、アデノ随伴ウイルス (AAV) を使用し、TDP-43 が一部のニューロンにのみ過剰発現するモデルを作成し、運動ニューロン障害の伝播についても解析する。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞に蛋白の発現を誘導する、Thy-1 プロモーターの下流に、LoxP 配列で赤色蛍光色素の cDNA を挟み込み、さらに正常型および変異型 TDP-43 cDNA を挿入したプラスミド DNA を作成する。作成した DNA からトランスジェニックマウス (LoxPdsRed-TDP43) を作製する。トランスジェニックマウスの作製は北里大学医学部遺伝子高次機能解析センターの実験動物施設で行った。作成したトランスジェニックマウスは、尾から DNA を抽出し、PCR 法にて遺伝子の導入を確認した。その後、大脳・脊髄を抽出し、ウェスタンプロ

ット法で赤色蛍光色素蛋白の発現を確認した。また、大脳・脊髄を 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、組織学的に神経細胞への赤色蛍光色素蛋白の発現を確認した。続いて VACHT-Cre マウス (Misawa H et al. Genesis 2003) を交配した。VACHT-Cre マウスは、運動ニューロンに特異的に Cre タンパクが発現するマウスである。作製した LoxPdsRed-TDP43 トランスジェニックマウスは VACHT-Cre マウスと交配することで LoxP 配列に挟まれた赤色蛍光色素 cDNA がはずれ、TDP-43 タンパクが過剰発現する仕組みである。つまり交配により運動ニューロン特異的に TDP-43 の過剰発現が認められると考えられる。海外ですでに TDP43 発現トランスジェニックマウスの作製が発表されているが、発現が過剰で若いうちに死んだり、発症しなかったり治療薬開発の良いモデルはまだ開発されていないため海外とは異なったアプローチでモデルマウスを作製した。

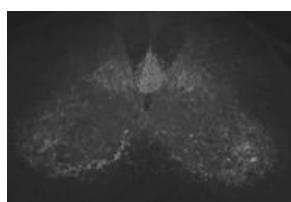
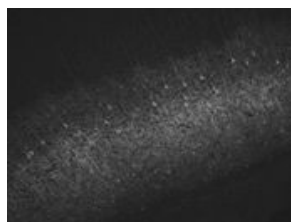
(2) AAV プラスミドベクターに正常型 TDP-43 (TDP-43^{WT})、変異型 TDP-43 (TDP-43^{A315T})、C 末端 TDP-43 (TDP-43^{CTF}) の cDNA を組み込み、プラスミドベクターの作製を行った。作製したプラスミドベクターから AAV ウィルスを精製し力価を測定する。AAV の作製はこれまで AAV の作製経験がある研究員の仁平 (Adeno-associated viral vector-mediated gene transduction in mesencephalic slice culture. J Neurosci Methods. 2011) が行った。また、大学院生の川浪が研究代表者の指導で研究の一部を行った。

作製した AAV はガラスマイクロピペットを用いて片側腰髄の前角に注入した。方法は、マウスの背側から皮切を行い、実体顕微鏡下で腰椎を一部除去し脊髄を露出した。ガラスマイクロピペットを脊髄前角まで進め、マイクロインジェクターを用いて 1 μ l の AAV 溶液を注入した。コントロールとして AAV-GFP を用いたが、脊髄神経細胞に効率よく感染し、細胞体・軸索・樹状突起に緑色蛍光蛋白を発現した。TDP-43 を組み込んだ AAV により腰髄の脊髄前角の運動ニューロンに TDP-43 タンパクが過剰に発現し細胞死が起こり、一側下肢の麻痺が生じたため、ロタロッドなどを用いて運動機能を評価した。また 2, 4, 8, 12 週後に 4% パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定し、脳・脊髄組織を摘出して病理解析を行った。病理解析では蛋白の過剰発現によるニューロンの神経変性の経過について検証した。

4. 研究成果

(1) 神経特異的 Thy-1 プロモーターを使用し、

その下流に LoxP 配列で挟んだ赤色蛍光色素である dsRed cDNA と TDP-43 cDNA を挿入したトランスジェニックマウスを作製した。作成したトランスジェニックマウスは、尾から DNA を抽出し、PCR 法にて遺伝子の導入を確認し、3 系統を樹立した。作成したマウス



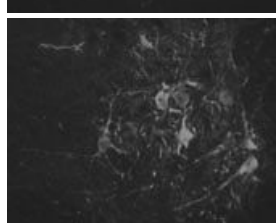
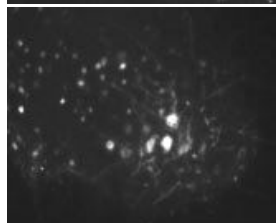
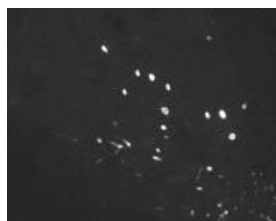
大脳・脊髄を 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、組織学的に解析したところ、大脳皮質（左図上段）の神経細胞と脊髄の皮質脊髄路および前角の運動神経細胞（左図下段）に赤色蛍光色素蛋白の発現を確認した。続いてこの作成したトランスジェニ

ックマウスと VChT-Cre トランスジェニックマウスを交配し、運動神経細胞へ TDP-43 蛋白の過剰発現を期待したが、発現は不十分で神経細胞死は認めなかった。

(2) 正常型 TDP-43(TDP-43^{WT})、変異型 TDP-43(TDP-43^{A315T}) C 末端 TDP-43(TDP-43^{CTF}) cDNA を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV) を作製した(下図)。



精製した AAV をガラスマイクロピペットを用いて片側腰髄の前角に注入した。AAV は in vivo で 7-10 日後に蛋白発現を来すため、2



週間後から AAV を注入したマウスを 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、脊髄組織を取り出した。脊髄はクライオスタットで薄切後、免疫染色し、脊髄前角の運動神経細胞に TDP-43 蛋白の発現を確認した。TDP-43^{WT} 蛋白は主に核内(左図上段)に、TDP-43^{A315T} 蛋白は核と細胞質(左図中段)に、TDP-43^{CTF} 蛋白は主に細胞質(左図下

段)に発現が認められた。TDP-43 の過剰発現



ではマウスの運動神経細胞死が起こり、一側下肢の麻痺(左図)が出現した。細胞死は核内に発現が認められた、正常型 TDP43 および A315T-TDP43 で急速に起こり、一方 TDP43-C 末端断片は細胞質に発現が認められ、細胞変性は緩徐に起こった。正

常型・変異型 TDP-43cDNA を組み込んだ AAV1 ウイルスを作製し、マウス腰髄に注入すると運動神経細胞死が起こり、一側下肢の麻痺を呈し、筋萎縮性側索硬化症のモデルとなると考えた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Kawanami A, Nagai M, Nihira T, Ogino M, Nishiyama K. Clinicopathological examination of optineurin-immunoreactive inclusions in patients with sporadic ALS. *The Kitasato Medical Journal*. 査読有 2015;45(1):21-28. <http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KMJ45-1/KMJ45-1p021-028.pdf>

Ohta E, Nihira T, Uchino A, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Takahashi K, Hayakawa H, Nagai M, Ohshima M, Ryo M, Ogino M, Murayama S, Takashima A, Nishiyama K, Mizuno Y, Mochizuki H, Obata F, Okano H. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagami-hara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3 signaling pathway. *Hum Mol Genet*. 査読有 2015 ; 24(17): 4879-900. doi:10.1093/hmg/ddv212.

Hayakawa H, Nagai M, Kawanami A, Nakata Y, Nihira T, Ogino M, Takada M, Saido T, Takano J, Saegusa M, Mikami T, Hamada J, Nishiyama K, Mochizuki H, Mizuno Y. Loss of DARPP-32 and calbindin in multiple system atrophy. *J Neural Transm* 査読有 2013; 120(12):1689-98. doi:10.1007/s00702-013-1039-4.

永井真貴子, 西山和利. 筋萎縮性側索硬化症の病態解明と治療戦略. *北里医学*. 査読無 2012 ; 42(2) : 85-93. <http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KI42-2/42-2p085-093.pdf>

Nakata Y, Yasuda T, Fukaya M, Yamamori

S, Itakura M, Nihira T, Hayakawa H, Kawanami A, Kataoka M, Nagai M, Sakagami H, Takahashi M, Mizuno Y, Mochizuki H. Accumulation of -Synuclein Triggered by Presynaptic Dysfunction J Neurosci. 査読有 2012;32(48):17186-96.doi: 10.1523/JNEUROSCI. 2220-12.2012.

- (2)研究分担者
なし ()
- (3)連携研究者
なし ()
- (4)研究協力者
仁平 友子 (NIHIRA, Tomoko)
川浪 文 (KAWANAMI, Aya)

〔学会発表〕(計 6 件)

永井真貴子, 認知症を伴った筋萎縮性側索硬化症剖検脳の免疫組織学的検討, 第56回日本神経学会学術大会, 2015.5.22, 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市).

Nagai M, Phosphorylation of TDP-43 is associated with TDP-43 insolubility and causes the neurodegeneration in mouse spinal cord.FENS 2014, 2014.7.10, Milano(Italy).

永井真貴子, ALS マウスモデルにおけるミトコンドリア動態の解析, 第55回日本神経学会学術大会, 2014.5.21, 福岡国際会議場(福岡県福岡市).

Nagai M, C-terminal fragment of TDP-43 induce chronic motor neuron degeneration in mouse spinal cord, Neuroscience 2013, 2013.11.11, San Diego (USA).

永井真貴子, TDP-43 の C 末端断片発現 ALS モデルマウスの作製, 第54回日本神経学会学術大会, 2013.5.30, 東京国際フォーラム(東京都千代田区).

永井真貴子, TDP43 発現 ALS マウスモデルの作製, 第53回日本神経学会学術大会 2012.5.24, 東京国際フォーラム(東京都千代田区).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.khp.kitasato-u.ac.jp/ska/shinkein/index.html>

6. 研究組織

(1)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