

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09532

研究課題名(和文)新規ウイルス投与法によるALS局所モデルと治療法の探索:TDP43断片化の病理

研究課題名(英文)A Novel Viral Administration Method for Local ALS model and therapy: Pathology of TDP43 fragmentation

研究代表者

神里 興太(Kamizato, Kota)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10554454

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):1)ヒト神経芽細胞腫培養細胞、マウス初代神経培養細胞を用いた遺伝子発現実験およびタンパク発現実験のためにユビキチンをプロモーターとしたアデノ関連ウイルスセロタイプウイルスを作成し、TDP-43発現を確認した。
2)予備実験としてラット軟膜下投与による緑色蛍光タンパク(GFP)を誘導する実験を実施し野生型SD系ラット脊髄に軟膜下投与した。免疫組織学的検討でGFPの強力な発現を確認できた。
作成したAAV9-Syn-pTDP43を軟膜下に投与し、タンパク発現と神経細胞死の組織学的評価を実施した。免疫組織学的検討において、神経細胞死を確認することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄における新たな遺伝子導入技術である軟膜下投与法による遺伝子導入を試みた。我々のこれまでの研究と同様に確実な遺伝子導入を行うことが可能であった。さらに手術手技による神経障害を生じなかったことから、手技の安全性に関して確認することができた。確実な遺伝子治療のためにもターゲットとなる遺伝子の選定が重要であることが確認された。

研究成果の概要(英文):1) Adeno-associated virus serotype virus with ubiquitin as promoter was generated for gene expression and protein expression experiments using cultured human neuroblastoma cells and primary mouse neural culture cells. And TDP-43 expression was confirmed.
2) As a preliminary experiment, we conducted an experiment to induce green fluorescent protein (GFP) by subchondral injection into the spinal cord of wild-type SD rats. Immunohistological examination confirmed strong expression of GFP.
Subchondral injection of AAV9-Syn-pTDP43 was performed for histological evaluation of protein expression and neuronal cell death. Neuronal cell death could not be confirmed in immunohistological examination.

研究分野：神経科学

キーワード：軟膜下投与

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は国内に 9950 名 (平成 26 年度) の患者があり、予後不良の神経変性疾患である。transactive response DNA binding protein of 43kDa (TDP-43) が見出された。TDP-43 を 1 次的な病因とする ALS において、発症が TDP-43 の毒性機能獲得によるものなのか正常機能喪失なのか現在も検討が進められている。TDP-43 はスプライシングに関与することが言われており、単純な過剰発現/発現抑制は致死性であり遺伝子改変動物の確立が難しい。

一方、近年の培養細胞を用いた報告 (Hum Mol Genet 2009) で凝集しやすい TDP-43 の断片化した C 末端が細胞質に増加することで全長 TDP-43 が細胞質へ移動し凝集体に取り込まれることが示され、断片化した TDP-43 C 末端増加が病因の一端であることが示唆されているが成熟した個体での検討がなされていない。

そこには、TDP-43 に着目した ALS 動物実験の難しさがある。TDP-43 は RNA のスプライシングに関連しており、過剰発現・発現抑制どちらも神経細胞死をきたすため、培養細胞での検討は容易であるがこれまでの SOD1 に対する ALS 研究と異なり動物モデルでの検討は進んでいない。今回本申請において TDP-43 を標的分子とした動物モデルを作成し、ALS の病態を解明、治療法を探索する。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は「脊髄局所における断片化 TDP-43 C 末端によるラット ALS 発症モデルを作成し、その治療法を探索する」ことである。

具体的ステップとしては (1) 脊髄局所における断片化 TDP-43 C 末端の発現を増加させることでラット ALS モデルを確立、(2) 神経細胞死による運動機能変化と病理学的検討、(3) 断片化 TDP-43 C 末端発現を抑制することによる ALS 病状進行停止を模索する。

3. 研究の方法

軟膜下投与による TDP-43 断片化 C 末端遺伝子導入の試みとその評価

ウイルスベクター作成：

使用する断片化 C 末端プラスミドは、ヒト神経芽細胞腫培養細胞を用いて効果を判定したのち、AAV9 を作成する。神経細胞に特異性を高めるため synaptophysin をプロモーターとして作成する計画である。本申請では TDP-43 変異による ALS の患者の遺伝子情報を受けて C 末端の断片化 TDP-43 (pTDP43) をターゲットとし AAV9-Syn-pTDP43 を作成する。

ラット軟膜下投与による TDP-43 断片化 C 末端遺伝子導入と電気生理学的評価

雄性ラット下部胸椎椎弓切除を全身麻酔下に施行する。具体的には全身麻酔施行後、脊椎を固定し、胸椎 Th11/12 椎弓切除術を施行する。切除部分の硬膜切開を行い、脊髄を露出した脊髄表面を覆う軟膜を切開した後、投与用鈍針を軟膜下挿入する。その後、AAV9-Syn-pTDP43 を注入する。

下肢運動機能と電気生理学的検査 (muscle fibrillation) の評価を行う。下肢における muscle fibrillation が確認できた際に病理学的検討を行う。

ラット脊髄の免疫組織学的評価など

電気生理学的変化が認められた場合、その前後の時期も含め脊髄の病理学的変化を免疫組織学的に評価する。脊髄運動神経減少率と TDP-43 の分布を評価する。

断片化 TDP-43 C 末端発現抑制による ALS 症状の進行抑制

上記及びにより発症初期に遺伝子発現の抑制を試みる (作成した AAV9-Syn-pTDP43 により導入された C 末端の断片化 TDP-43 遺伝子対するアンチセンスを用いる)。発症初期に遺伝子治療を実施することで ALS の病状進行を抑制できるか検討し、新たな治療戦略を模索する。

4. 研究成果

1) 「TDP-43 断片化 C 末端遺伝子を神経細胞においての誘導するためのウイルスベクターの作成」のために synaptophysin をプロモーターとしてアデノ関連ウイルスセロタイプ 9 を作成した (AAV9-syn-pTDP43)。ヒト神経芽細胞腫培養細胞、マウス初代神経培養細胞を用いた遺伝子発現実験およびタンパク発現実験のためにユビキチンをプロモーターとしたウイルス (AAV9-UBI-pTDP43) を作成し、その発現を検討した。pTDP43-mRNA が上昇していることを確認できた。一方、ウェスタンブロッティングによるタンパク発現を確認した。

2) 「ラット軟膜下投与による TDP-43 断片化 C 末端遺伝子導入と電気生理学的評価」のために、予備実験として緑色蛍光タンパク (GFP) を誘導する実験を実施し SD 系ラット脊髄に軟膜下投与した。投与後 6-8 週後における免疫組織学的検討で GFP の強力な発現を確

認できた。

今年度、作成した AAV9-Syn-pTDP43 を軟膜下に投与し、タンパク発現と神経細胞死の組織学的評価を実施した。免疫組織学的検討において、想定していた pTDP43 発現を認めたが、神経細胞死を確認することができなかった。

遺伝子組み換えマウス pTDP43 による神経細胞死に関する検討検討を開始した。同時に、より導入効率の良いベクター開発を開始した。

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
研究分担者	垣花 学 (Kakinohana Manabu) (20274897)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	

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