

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22240039

研究課題名（和文）TDP-43過剰発現による孤発性ALSのサルモデル作製

研究課題名（英文）Development of primate model of sporadic ALS with overexpression of TDP-43

研究代表者

横田 隆徳 (TAKANORI YOKOTA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特別研究教授

研究者番号：90231688

研究成果の概要（和文）：

TDP-43は孤発性ALS患者の運動ニューロンにおける異常凝集体の主要構成成分として発見された。我々はヒト野生型TDP-43の発現AAVベクターをカニクイザル脊髄に直接注入する実験系を構築し、臨床的に進行性の筋力低下と筋萎縮を呈し、病理学的にはTDP-43の核染色低下と細胞質異常局在を示し、患者同様の病態を再現することに成功した。TDP-43の細胞質異常局在は早期または症状出現前に生じており、後期では細胞死に至っていたことから、 $\alpha$ 運動ニューロン変性との関連が示唆された。このモデルは孤発性ALSの病態解明のためのよきツールとなり得る。

研究成果の概要（英文）：

TDP-43 was found to be a major component of abnormal aggregation in the motoneuron in sporadic ALS. We injected an AAV vector expressing human wild-type TDP-43 to the spinal cord in non-human primate, cynomolgus. These monkeys developed progressive motor weakness and muscle atrophy. They also showed regional cytoplasmic TDP-43 mislocalization with loss of nuclear TDP-43 staining, reminiscent of the spinal cord pathology of patients with ALS. TDP-43 mislocalization was an early or presymptomatic event and was later associated with neuron loss. These findings suggest that TDP-43 mislocalization leads to alpha-motoneuron degeneration. This model can provide a valuable tool for studying the pathogenesis of sporadic ALS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	12,400,000	3,720,000	16,120,000
2011年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2012年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
年度			
年度			
総計	38,300,000	11,490,000	49,790,000

研究分野：総合領域

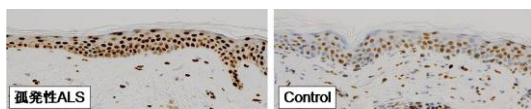
科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学，神経病理学

キーワード：神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンの細胞質に認められる不溶性タンパク質凝集体の主成分として核タンパクである TDP-43 が同定され、さらに変異 TDP-43 遺伝子が常染色体優性遺伝性家族性 ALS の原因遺伝子であることが明らかになった。しかし、孤発性 ALS の病因における野生型の TDP-43 の役割は明らかでない。

尾野らや我々は孤発性 ALS の皮膚では核の TDP-43 染色性が亢進していることを発見し（下図）、孤発性 ALS において TDP-43 タンパク量の増加が孤発性 ALS の本態に関与する可能性を想定した。そこで、ヒトに最も近縁の霊長類であるカニクイザルの脊髄に AAV ベクターを用いて過剰発現させる実験を試みた。



生検皮膚TDP-43染色  
孤発性ALS患者さんの表皮細胞では、controlの表皮細胞に比較して、核でTDP-43の染色性が顕著に亢進している(尾野精一博士より提供)。

## 2. 研究の目的

カニクイザルの頸髄前角にアデノ随伴ウイルスベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させることにより、進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 の細胞質への異常局在と凝集体形成および核の染色性低下という孤発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。一方、TDP-43 の発現は前角細胞の約 70% は本来の核に局在するが、その当該分節の骨格筋は完全麻痺となり、運動神経軸索の興奮性は電気生理学的に消失していることから、野生型 TDP-43 の核での過剰発現により運動神経軸索障害がおり得るという新規の作業仮説を立てた。本研究では、この孤発性 ALS モデルを確立し、孤発性 ALS の TDP-43 病態の本質を明らかにすることを目的とする。

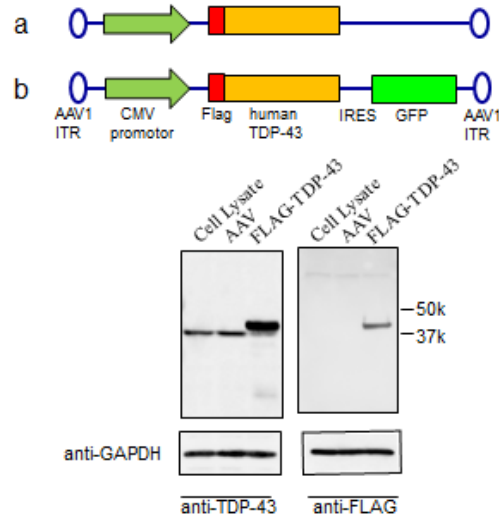
## 3. 研究の方法

**1) TDP-43 過剰発現による ALS サルモデルの確立 (木村, 内原, 横田) :** 発現ベクターの投与量を調節 ( $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ) や、各種血清型 (AAV1, 2, 8, 9) の選択により運動麻痺の進行がより緩徐な実際の患者病態に類似した孤発性 ALS モデル作製を行う。また、AAV はアフィニティーカラムやゲル濾過 HPLC を用いたベクターの精製の最適化を行う。

カニクイザル 4 頭に対して麻酔下に椎弓切除術を行い、第 6 頸髄の利き手側の前角細胞付近に Flag で標識したヒト野生型 TDP-43 発現 AAV1 ベクター ( $3-10 \times 10^{12}$ vg/ml, 5 $\mu$ l) を注入した (下図 a)。また、このサルにとって外因性の野生型ヒト TDP-43 が脊髄内でどのように拡がっているかを確認する目的で、同

様の手法を用い、Flag で標識したヒト野生型 TDP-43 発現 IRES-hrGFP AAV1 ベクターを注入する (下図 b)。行動解析、電気生理学的検査を行い、注入 2-4 週後に解剖し、病理組織検査、Western-blot 解析を行う。

## 3) 核内 TDP-43 毒性の機序の検討 (漆谷,



**横田) :** TDP-43 の局在変化と神経細胞死との関連において、TDP-43 の核外脱出が ALS の病態生理にいかなる影響をもたらすかを検討するため、核移行シグナルを変異させた TDP-43 (NLS 82-83 LQ 変異体) を構築し、培養細胞で TDP-43 が細胞質のみに発現することを確認する。さらに加えて核脱出シグナル (NES : 248-250 L/IL) も変異させた TDP-43 発現 AAV ベクターを作製し、培養細胞およびラット脊髄前角細胞にてその TDP-43 局在変化を検証する。

**4) TDP-43 過剰発現による運動軸索膜興奮性障害の病態生理を検索 (桑原) :** 1990 年代後半に英国国立神経研究所の Hugh Bostock 教授と共同研究者である桑原博士により開発された軸索興奮性測定法は、非侵襲的にイオンチャンネル機能を測定する画期的手法である。桑原博士はこれまでにこの方法を用いて孤発性 ALS 患者において軸索 K 電流が低下していること、および持続性 Na 電流が増加していることを明らかにしてきた (Brain 2003, 2006; Ann Neurol 2002, 2004)。

カニクイザル ALS モデルでの正中神経手首部の運動神経軸索において、持続性 Na 電流、一過性 Na 電流、fast K 電流、slow K 電流の 4 種のイオン電流を評価する測定方法を確立する。

**5) 強発光性変異体カイアシルシフェラーゼを利用したヒト髄液由来エクソソームの高感度検出法の開発に向けた検討 (樋口) :** 髄液中のエクソソームを介した外因性 TDP-43 の中枢神経系伝播の可能性を考え、髄液中の微量エクソソーム及び TDP-43 の定量系の構

築のため高感度 ELISA アッセイ系を構築する。

#### 4. 研究成果

1) TDP-43 過剰発現による ALS サルモデルの確立 (木村, 内原, 横田): 左側頸髄に野生型 TDP-43 を発現させたカニクイザルでは, 2 週目より進行性の麻痺を呈し, 対側にも僅かな麻痺が及んだ。4 週後のカニクイザルでは, 左前肢屈曲位, 左手完全麻痺を呈し, 骨格筋 MRI でも筋萎縮の進行を認めた (図 1)。

電気生理学的には, ベクター注入側前肢にて, 孤発性 ALS 患者同様に遠位から始まる神経原性変化を認めた。手関節部正中神経刺激による短母指外転筋 (APB) の誘発筋複合電位 (CMAP) は進行性に低下し, 4-8 週後には全例で CMAP は全く導出されなくなった (図 2)。

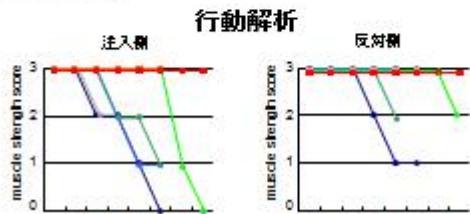
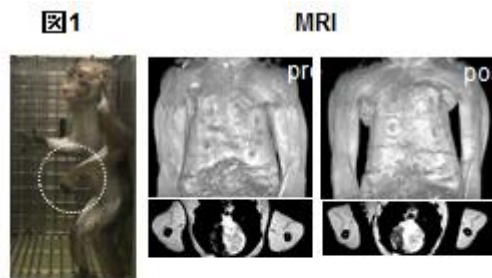
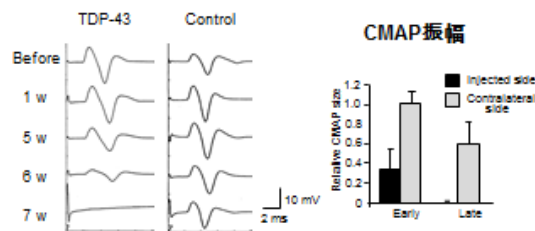
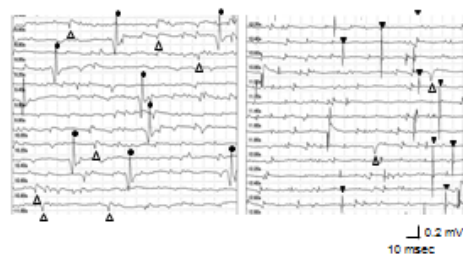


図2 正中神経刺激によるAPBのCMAP



注入側前肢の針筋電図

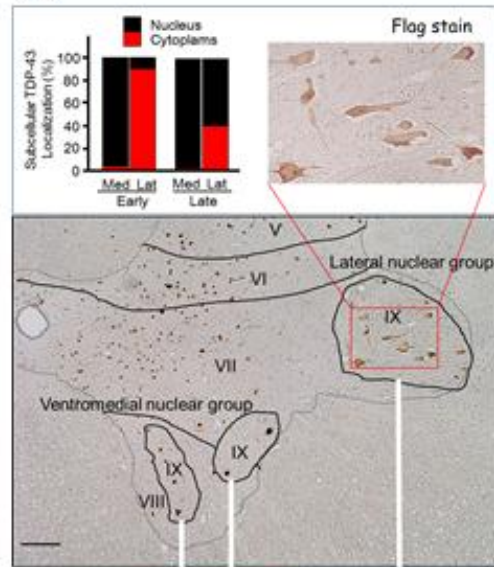


病理組織学的には, 脊髓前角のほぼすべての外側核群の神経細胞で TDP-43 の核から細胞質への局在の変化を示し, 経過進行とともに細胞は脱落し, 萎縮した。一方, 脊髓前角の内側核群の大型神経細胞では TDP-43 の過剰発現は核に局限して末期でも細胞脱落は

明瞭でなかった。外側核の  $\alpha$  運動ニューロンは上肢遠位の手内筋を支配する一方, 内側核  $\alpha$  運動ニューロンは躯幹筋を支配することから, TDP-43 過剰発現の病態は運動ニューロンに特異的で,  $\alpha$  運動ニューロンの中でも上肢遠位筋支配の神経細胞優位な TDP-43 病態と機能異常を示した (図 3)。

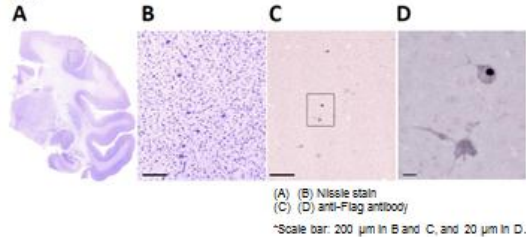
さらに, Flag-TDP が注入部周辺の前角細胞だけでなく, そこへ軸索を送っていると考えられる Betz 巨細胞にも発現していることを示した。外因性の Flag-TDP-43 は注入部位周辺の前角細胞の核から細胞質へ局在するが, 更に Betz 細胞へこの変化が選択的に拡大していることを初めて示した (図 4)。

図3



	Axial muscles	Distal hand muscles
Axon length	short	long
Motoneuron	slow	Fast-fatigue

図4



Western-blot の結果からは, 外因性 TDP-43 は内因性 TDP-43 よりも不溶性であり (図 5A), Triton 可溶性分画に約 30kDa の断片化は認められるものの, ALS 患者で見られるような C 末断片 (CTF-25kDa) は認められなかった (図 5B)。また, リン酸化は発症早期では認められず, 発症後 2 週以降の後期から認められた (図 6)。以上より, TDP-43 の断片化やユビキチン化は発症には必須でなく, リン酸化は後期のイベントであることを明らかにした。



図5A

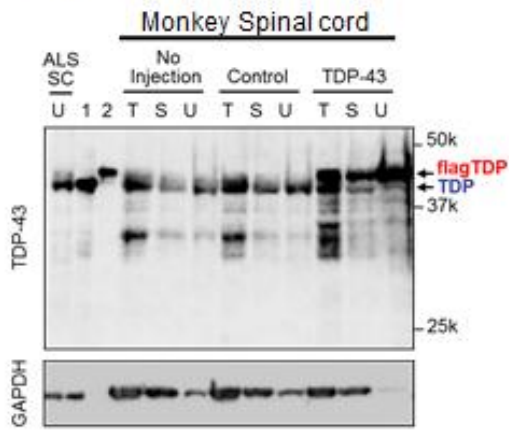


図5B

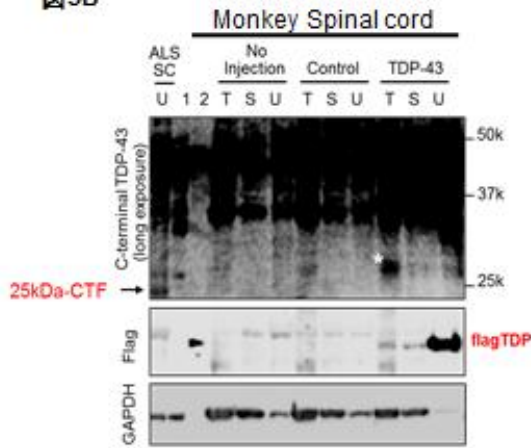
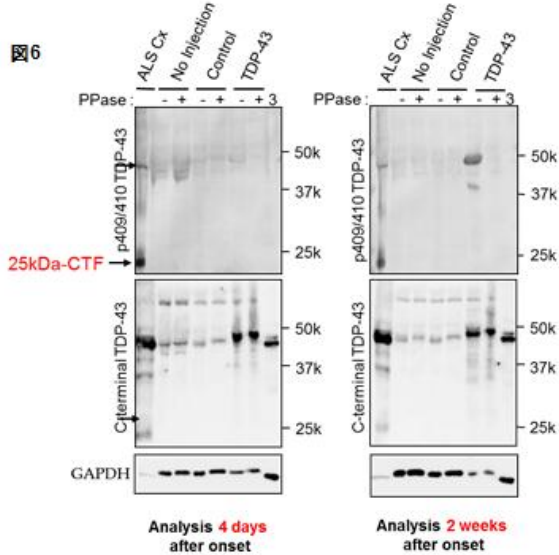
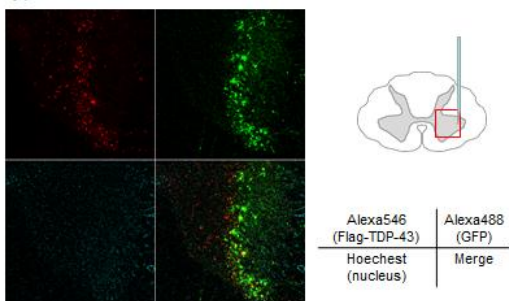


図6



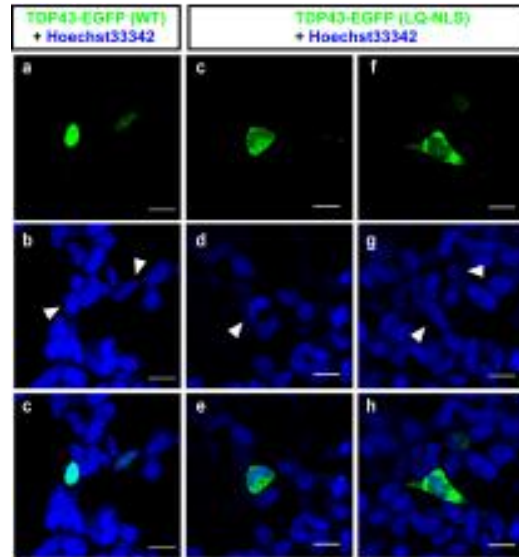
また、ヒト野生型 TDP-43 発現 AAV1-IRES-hrGFP ベクターの注入実験では、注入側 C6 椎体レベルにおいて、局所では注入部位から同心円状に GFP が拡がり、そのさらに外周に TDP-43 が拡がっており (図 7)、グリア細胞や神経細胞を介した TDP-43 の伝

図7



播が示唆された。現在脊髄全体の拡がりについて解析中である。

3) 核内 TDP-43 毒性の機序の検討 (漆谷, 横田): 核移行シグナルを変異させた TDP-43(NLS 82-83 LQ 変異体)を構築し、培養細胞で TDP-43 が細胞質のみに発現することを確認した (下図)。また核脱出シグナル (NES: 248-250 L/IL) も変異させた TDP-43 発現 AAV ベクターを作製し、培養細胞およびラット脊髄前角細胞にてその TDP-43 局在変化を検証した。さらに、ヒト神経細胞腫 (SHSY-5Y) において同様に野生型、核移行シグナル、核脱出シグナルの変異型 TDP-43 をテトラサイクリンによって発現が誘導できる Tet-on システムを構築した。



4) TDP-43 過剰発現による運動軸索膜興奮性障害の病態生理を検索 (桑原): カニクイザル ALS モデルにおいて、正中神経運動軸索で閾値追跡法による興奮性測定を行い、ALS 患者における所見と比較検討した。持続性 Na 電流、一過性 Na 電流、fast K 電流、slow K 電流の 4 種のイオン電流を評価し、ヒト ALS 患者で認められる軸索興奮特性の変化と類似の変化である持続性 Na 電流の増加と fast K 電流・slow K 電流の低下の所見が得られつつあり、脊髄にベクターを注入したことによる非特異的变化であるかについて、注入と対側の正中神経における所見と比較検討中である。TDP-43 ベクターによる特異的变化であることが確認されれば、これらの結果は当実験系のヒト ALS の疾患モデルとしての妥当性を支持する所見であると考えられる。

5) 強発光性変異体カイアシルシフェラーゼを利用したヒト髄液由来エクソソームの高

**感度検出法の開発に向けた検討（樋口）**：強発光性カイアシルシフェラーゼ (GL) に着目し、ALS 患者髄液中に微量に存在するエクソソームを高感度かつ定量的に検出・測定する技術開発を目的とする検討を行った。具体的には、エクソソームの表面抗原分子に対するビオチン標識抗体と GL 融合ストレプトアビジンを髄液中にて反応させた後、エクソソーム画分を精製し、精製エクソソーム画分中の GL 活性を測定した。

現段階では、精製エクソソーム画分に有意な GL 活性は検出されておらず、表面抗原分子抗体の適切な選択が必要と考えられる。本方法によれば、より簡便で高感度なエクソソーム定量法を確立できるものと確信しており、今後も引き続きアッセイ系の開発を進めたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 37 件)

1. Kuwabara S. Inward rectifying channels as targets for treatment. The Journal of Physiology, 査読有, vol. 588, 2010, pp. 2523.
2. 横田隆徳, 笹栗弘貴. TDP-43 のげっ歯類、霊長類動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル. 神経内科, 査読無, vol. 76, 2011, pp. 275-280.
3. 笹栗弘貴, 横田隆徳, 水澤英洋. ALS-TDP の動物モデル. Clin Neurosci 別冊, 査読無, vol. 29, 2011, pp. 1024-1027.
4. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Ono F, Sakaue F, Hirai T, Tajiri M, Kanai K, Ohkubo T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Ueno T, Sunaga F, Ikeda S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Kusano K, Enomoto M, Yokota S, Hirai Y, Yasutomi Y, Kuwabara S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of wild-type TDP-43. Brain, 査読有, vol. 135, 2012, pp. 833-846. doi: 10.1093/brain/awr348
5. Kanouchi T, Ohkubo T, Yokota T. Can regional spreading of amyotrophic lateral sclerosis motor symptoms be explained by prion-like propagation? J Neurol Neurosurg Psychiatry, 査読有, vol. 83, No. 7, 2012, pp. 739-745. doi: 10.1136/jnnp-2011-301826. Epub 2012 Apr 27

[学会発表] (計 44 件)

1. 大久保卓哉, 内田あずさ, 笹栗弘貴, 木村展之, 田尻美緒, 久保寺隆行, 内原俊記, 水澤英洋, 横田隆徳. 細胞内異常局在を呈した野生型 TDP-43 過剰発現による ALS 霊長類モデル Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of wild-type TDP-43. 第 34 回日本神経科学大会, 2011. 9. 17, 東京
2. 佐野達彦, 上野智美, 内田あずさ, 内原俊記, 大久保卓哉, 水澤英洋, 横田隆徳. 上肢完全麻痺を示した孤発性筋萎縮性側索硬化症における脊髄前角細胞での TDP-43 の細胞内局在. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011. 5. 18, 愛知
3. 大久保卓哉, 田尻美緒, 内田あずさ, 須永史子, 平井高志, 澁谷和幹, 金井数明, 桑原聡, 水澤英洋, 横田隆徳. 孤発性筋萎縮性側索硬化症のラットモデル作製. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011. 5. 18, 愛知
4. Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of wild-type TDP-43. The 63rd AAN Annual Meeting, 2011. 4. 14, Honolulu
5. Ohkubo T, Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Kubodera T, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of wild-type TDP-43. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, 2011. 9. 14-17, Yokohama
6. Mizusawa H, Sasaguri H, Ohkubo T, Yokota T. Regional cytoplasmic TDP-43 mislocalization is recapitulated in non-human primate mimicking ALS. The 64th AAN Annual Meeting, 2012. 4. 26, Morial Convention Center, New Orleans, USA
7. 大久保卓哉, 田尻美緒, 関口輝彦, 笹栗弘貴, 木村展之, 内原俊記, 水澤英洋, 横田隆徳. TDP-43 過剰発現霊長類モデルにおける TDP-43 の拡がり. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012. 5. 23, 東京国際フォーラム
8. Yokota T. Non-Human Primate Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis with Cyto-plasmic Mislocalization of TDP-43. 5th International Symposium on Primate Research KUNMING 2012, 2012. 8. 21, Howard Johnson Tropical Garden Plaza Kunming
9. 田尻美緒, 大久保卓哉, 木村展之, 川上ちひろ, 寺岡静香, 内原俊記, 水澤英洋, 横田隆徳. ALS 霊長類モデルにお

ける TDP-43 の拡がり Propagation of TDP-43 in non-human primate model of ALS. 第 35 回日本神経科学大会, 2012. 9. 19, 名古屋国際会議場

10. Ohkubo T, Tajiri M, Uchida A, Kimura N, Sasaguri N, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. WIP1401 Non-Human Primate Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis with Cytoplasmic Mislocalization of TDP-43. 2012 Annual Meeting of the American Neurological Association, Boston
11. Tajiri M, Ohkubo T, Kimura N, Kawakami C, Teraoka S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Propagation of TDP-43 in non-human primate model of ALS. Society for Neuroscience 2012, 2012. 10. 15, New Orleans

[図書] (計 2 件)

1. 久保寺隆行, 仁科一隆, 横田隆徳, 中外医学社, 神経筋疾患の RNAi 治療の展望. Annual Review 2011 神経, 2011, 42-52.
2. 横田隆徳, 仁科一隆, シーエムシー出版, RNAi の神経疾患への応用. RNA 工学の基礎と応用, 2011, 42-52.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
なし

○取得状況 (計 0 件)  
なし

[その他]

ホームページ等:

<http://www.tmd.ac.jp/press-release/20120118/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 隆徳 (YOKOTA TAKANORI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 90231688

### (2) 研究分担者

内原 俊記 (UCHIHARA TOSHIKI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号: 10223570

漆谷 真 (URUSHIDANI MAKOTO)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・准教授

研究者番号: 60332326

木村 展之 (KIMURA NOBUYUKI)

独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センター・研究員

研究者番号: 80392330

桑原 聡 (KUWABARA SATOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 70282481

樋口 理 (HIGUCHI OSAMU)

独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター・免疫ゲノム医科学研究室・室長

研究者番号: 50361720

### (3) 連携研究者

なし