

## 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15日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590925

研究課題名（和文）

ノックアウトマウスによる TDP43 の生理的機能の解明と筋萎縮性側索硬化症への応用

研究課題名（英文）

Analysis of TDP-43 functions and modeling for ALS using conditional knockout mice

研究代表者

佐藤 俊哉（SATO TOSHIYA）

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90359703

研究成果の概要（和文）：TDP-43 の生理的機能を解明し、筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデルを確立するため、TDP-43 コンディショナルノックアウト（cKO）マウスを作成した。ヘテロ欠損個体（ $Tardbp^{+/-}$ ）では、TDP-43 自身の厳密な発現制御機構により、多くの組織で mRNA 発現レベルが回復し、明確な表現型は認められなかった。しかし未受精卵では TDP-43 mRNA 発現レベルが半減し、初期胚発生にも遅延が認められたことから、ハプロ不全状態にあると考えられた。ホモ欠損個体（ $Tardbp^{-/-}$ ）が着床早期に死亡するため、NSE39-Cre マウスを用い、神経特異的 KO マウス（ $Tardbp^{flox/flox}$ 、NSE-Cre<sup>+</sup>）を作成した。神経特異的 KO マウスは、メディアン生存期間 20 日という強い表現型とともに、腰部前角運動神経細胞のクロマトリシス、ミトコンドリア形態変化など、ALS の病理学的変化の特徴を認めた。

研究成果の概要（英文）：To investigate the physiological functions of TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43), we established TDP-43 conditional knockout (cKO) mice and evaluated the validity of disease models for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). As a result of the autoregulation, TDP-43 mRNAs were recovered to wild type levels in various tissues of heterozygous TDP-43 KO ( $Tardbp^{+/-}$ ) mice. This recovery would prevent from the emergence of abnormal phenotypes. On the other hand, TDP-43 mRNA level in unfertilized oocytes obtained from heterozygous mice was reduced by half. This haploinsufficiency would account for the delay of early embryonic development. Because homozygous ( $Tardbp^{-/-}$ ) mice died by early post-implantation stage, we established neuron-specific KO ( $Tardbp^{flox/flox}$ 、NSE-Cre<sup>+</sup>) mice using NSE39-Cre mice. Neuron-specific KO mice showed severe neurological phenotypes with a median survival of 20 days. Pathologically, chromatolysis and abnormal-shaped mitochondria, characteristic features of ALS, were observed in lumbar motor neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳神経疾患、ALS、TDP-43、疾患モデル

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経特異的な変性を特徴とする神経難病である。ALS の多くは孤発性 ALS (SALS) であるが、約 1 割は家族性 ALS (FALS) として発症する。FALS の中で最も頻度が高い型が、Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子変異による ALS1 であることから、ALS 研究は SOD1 変異を中心に進められてきた。しかし ALS1 では、プリオン小体や skein-like inclusion という SALS に特徴的な病理学的所見が認められず、SALS と異なる発症機構の存在が疑われていた (Tan et al. *Acta Neuropathol.* 2004 108: 332-336)。

2006 年秋、SALS に認められるユビキチン陽性 skein-like inclusion の主要な構成蛋白として TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) が発見され、SOD1 に代わり、TDP-43 が一躍注目を集める分子となった (Neumann et al. *Science* 2006 314: 130-133, Arai et al. *BBRC* 2006 351: 602-611)。TDP-43 の蓄積は、前頭側頭葉型認知症 (FTLD) などの複数の疾患においても認められることから、当初より二次的な結果である可能性も指摘されていた。しかし ALS1 では TDP-43 陽性 skein-like inclusion は認められず、SALS と一部の FALS 症例においてのみ TDP-43 の蓄積が認められたことから、我々は TDP-43 の蓄積が二次的な結果ではないと考えていた (Tan et al. *Acta Neuropathol* 2007 113: 535-542)。この考えを証明するため、TDP-43 陽性 skein-like inclusion を認める FALS 症例を解析したところ、家系内に TDP-43 遺伝子のミスセンス変異 (Q343R) を発見した (Yokoseki et al. *Ann Neurol* 2008 63: 538-542)。さらに我々の発見と時期を同じくして、TDP-43 の変異が複数報告され、ALS の発症機序において TDP-43 が一次的な役割を担うことが明らかとなった。

TDP-43 変異を有する FALS (ALS10) 患者の病理像は、SALS と極めて類似している。これは TDP-43 が SALS の発症においても深く関与していることを示唆している。また TDP-43 は核蛋白であるが、ALS 患者の運動神経細胞では、TDP-43 が細胞質内凝集体として存在し、核から TDP-43 が消失する。この現象は、TDP-43 の局在異常すなわち機能喪失が病態の本質である可能性を示唆している。このような背景から、TDP-43 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作成を計画していたところ、2009 年になり、ALS6 の原因遺伝子として fused in sarcoma (FUS) が発見された (Kwiatkowski et al. *Science* 2009 323: 1205-1208, Vance et al. *Science* 2009 323: 1208-1211)。FUS は不均一核内リボ核酸蛋白 (hnRNP) P2 ともいわれる RNA 結合タンパク

質で、RNA 認識モチーフは一つのみであるが、機能的に TDP-43 と類似している。また正常な神経細胞において、FUS は核内に存在するが、ALS6 患者の残存する運動神経細胞では、TDP-43 と同様に細胞質内に集積することが報告された。このような類似性から、TDP-43 と FUS が持つ生理的機能の理解が重要であると考えられ、RNA 代謝の観点から ALS 研究を再構築する必要があると考えられるようになり、本研究の意義がより明確となった。

## 2. 研究の目的

ALS の病態機序を解明するためには、TDP-43 の生理的機能の理解が必須であると考えられたため、TDP-43 cKO マウスを作成して解析した。また TDP-43 の局在異常すなわち機能喪失が病態の本質であるという仮説に立ち、筋萎縮性側索硬化症モデルとしての可能性も検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) TDP-43 cKO マウスの作成

TDP-43 は、二つの RNA 認識モチーフ (RRM1、RRM2) を有する hnRNP であり、機能上重要な RRM1 と核移行シグナルをコードするエクソン 3 を置換の標的とした (図 1)。C57BL/6N 系統の ES 細胞 RENKA と Cre-loxP システムを用い、TDP-43 cKO マウス (Tardbp<sup>+/-lox</sup>) を確立した。次に TLCN-Cre マウスと交配させてヘテロ欠損マウス (Tardbp<sup>+/-</sup>) を作成、さらに TDP-43 の神経細胞における役割を解析するため、3 系統の cKO マウス、神経特異的 KO (NSE39-Cre)、前脳特異的 KO (Emx1-Cre)、運動神経特異的 KO (VAcHT-Cre.Fast) を作成した。

### (2) 初期胚の培養と解析

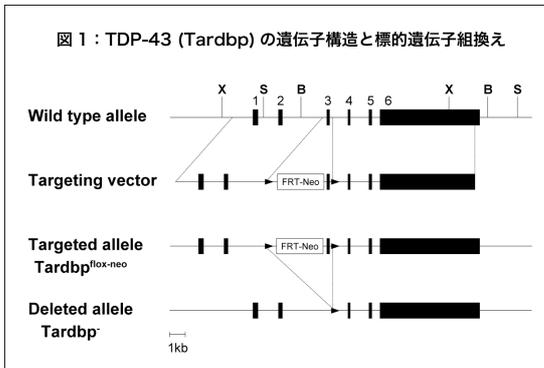
TDP-43 ヘテロ欠損 (Tardbp<sup>+/-</sup>) および野生型の雌マウスを過排卵処理し、卵管膨大部より未受精卵を採卵する。各遺伝子型の雄マウスの精巣上部尾部より精子を採取、TYH 培地中で未受精卵と体外受精させ、翌日に 2 細胞期胚 (E1.5) を取得する。2 細胞期胚以降の培養は mW 培地、胚盤胞 (E3.5) 以降の培養は ES または DME 培地を用いて行った。

未受精卵からの RNA 抽出は、既報に従い (Jeong, et al. *Mol Reprod Dev* 2005 71: 284-289)、RNase inhibitor 存在下で凍結融解を繰り返すことにより、単一卵レベルで行った。この RNA から cDNA を合成し、SYBR Green I による定量的 RT-PCR (qRT-PCR) を行った。一方、網羅的解析においては、20 個の未受精卵をプールし、WT-Ovation<sup>TM</sup> One-Direct (NuGEN) により RNA 増幅を行い、GeneChip<sup>®</sup> Mouse Genome 430 2.0 Array にて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) TDP-43 の自己発現制御機構

TDP-43 cKO マウス (*Tardbp*<sup>+/-flox</sup>) を TLCN-Cre マウスと交配させ、TDP-43 ヘテロ欠損個体 (*Tardbp*<sup>+/-</sup>) を作成した。ヘテロ個体には明らかな異常が認められなかったため、各組織における TDP-43 mRNA の発現量を調べたところ、大脳 (102%)、小脳 (84%)、脊髄 (99%)、筋肉 (75%) など、殆どの組織では正常近くまで mRNA が回復していた。



我々が使用したコンストラクトを図 1 に示したが、エクソン 3 を標的としているため、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構を受け、ヘテロ個体では約 50% の発現量になることが想定される。しかし実際には TDP-43 mRNA の回復を認めたことから、TDP-43 の自己発現制御機構 (オートレギュレーション) の存在が示唆された。最近になり、TDP-43 蛋白が自身の mRNA の 3' UTR に結合し、mRNA の不安定性を制御することにより、負のフィードバックループを形成していることが報告された (Ayala et al. EMBO J 2011 30: 277-288)。我々の結果は、この報告を支持するものであり、この自己発現制御機構により、ヘテロ欠損個体では明確な表現型が認められないものと推察された。

##### (2) 母性効果遺伝子としての TDP-43

TDP-43 ヘテロ欠損個体 (*Tardbp*<sup>+/-</sup>) 同士の自然交配を行い、その分離比を検討したところ、野生型個体 49 匹 (65%)、ヘテロ個体 26 匹 (35%)、ホモ個体 0 匹であり、TDP-43 KO マウス (*Tardbp*<sup>-/-</sup>) が胎生致死であることが示された。そこで体外受精法と初期胚培養を組み合わせ、死亡時期の決定を行った。胚発生が停止するのは、着床直後 (E4.5~5.5) と考えられたが、体外培養の結果からは、遺伝子型によらず、初期卵割時から発生遅延が生じることが示された。

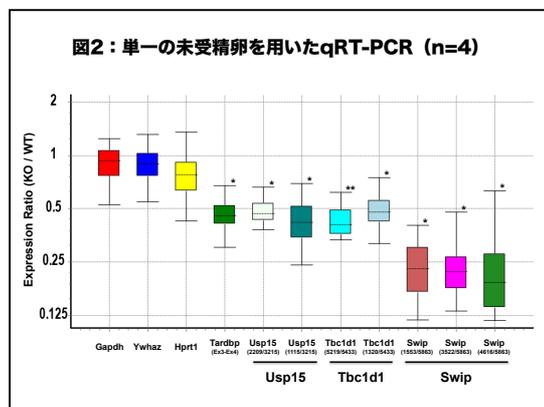
一般的に初期胚発生に必要な分子は、mRNA あるいは蛋白として未受精卵内に蓄えられ、胚盤胞 (E3.5) までの発生に必要な量が確保されている。プレリナリーな結果ではあるが、ホモ欠損 (*Tardbp*<sup>-/-</sup>) 胚であっても、胚盤胞以降の発生を認め、TDP-43 蛋白の存在を

免疫染色レベルで確認した。そこで定量的な解析を行うため、単一卵レベルでの qRT-PCR 法を確立し、未受精卵における TDP-43 mRNA を測定したところ、ヘテロ欠損メス由来の卵では、単一卵レベルでの発現が 45% と低く

(図 2)、自己発現制御機構が不十分であることを発見した。この結果は、TDP-43 が母性効果遺伝子であり、ヘテロ欠損メス由来の初期胚ではハプロ不全となっており、その結果として胚発生の遅延が生じている可能性が高いと考えられた。

##### (3) TDP-43 が制御する遺伝子群の検索

TDP-43 の自己発現制御機構は、神経系では厳密であるが、TDP-43 ヘテロ欠損個体由来の未受精卵では機能せず、ハプロ不全になっていることを発見した。そこで TDP-43 の制御下にある遺伝子を検索するため、未受精卵から Ribo-SPIA 法を用いて全 mRNA を増幅し、GeneChip による網羅的解析、qRT-PCR 法による候補遺伝子の絞り込みを行い、3 種の発現低下遺伝子 (*Tbc1d1*、*Usp15*、*Swip*) を得た (図 2)。再現性を確認するため、TDP-43 をノックダウンしたマウス胎児線維芽細胞 (MEF) およびヒト培養細胞 (HeLa、SH-SY5Y) を使い、qRT-PCR 法を行ったところ、マウス由来の細胞では同様に 3 種の遺伝子の発現低下を認めたが、ヒト由来の細胞では *Tbc1d1* の発現低下のみを認めた。この結果から、TDP-43 の機能には強い種差があり、慎重な解釈を要することが判明した。



##### (4) TDP-43 cKO マウスの解析

TDP-43 KO マウスが胎生致死となるため、3 系統の TDP-43 cKO マウスを作成し、ALS モデルとしての資質を検討した。各系統の予備検討から、運動神経細胞の変化が最も明瞭な神経特異的 KO マウス (*Tardbp*<sup>flox/flox</sup>、NSE-Cre<sup>+</sup>) を主たる解析対象として検討を進めた。神経特異的 KO マウスは、ほぼメンデル則に従って出生するが、徐々に体重差が現れ、P10 での体重は、野生型が 6.1~7.0g、ホモ個体が 3.6~4.8g と明らかな低下を示し、メディアン生存期間は 20 日であった。大脳

の形態観察では、脳梁欠損を伴う広範な大脳萎縮を呈していた。TDP-43 の免疫染色では、核の染色性を失った神経細胞が大脳皮質広範に認められ、前角運動神経においても、半数以上が TDP-43 を喪失していると推定された。

神経特異的 KO マウスの腰部前角運動神経を対象として、定量的な病理学的解析を進めた。運動神経細胞の数（野生型 28.5、変異型 30.8）には変化がなかったが、運動神経は萎縮性（野生型 462.0  $\mu\text{m}^2$ 、変異型 352.8  $\mu\text{m}^2$ ）であり、ニッスル染色でも 37.5%の細胞にクロマトリシスを認めた。そこでゴルジ体の崩壊を検討するため、運動神経のゴルジ体を立体的に再構築し、その容積を推定したところ、ゴルジ体容積の明らかな減少（野生型 321.9  $\mu\text{m}^3$ 、変異型 160.8  $\mu\text{m}^3$ ）が認められた。

チトクローム C の免疫染色では、ゴルジ体の変化に加え、ミトコンドリア形態の異常も疑われた。そこで走査型電子顕微鏡を用い、運動神経のミトコンドリアを観察したところ、ミトコンドリアの膨化、クリステの増加など、明らかな構造の異常を認めた。また脊髄を用いた検討では、ATP 産生量は 76.7%に低下していたが、定量的 PCR によるミトコンドリア DNA 量には変化がないことから、ミトコンドリアの量には変化がないものの、形態および機能の異常が存在すると考えられた。

このように神経特異的 KO マウスは、運動神経以外にも広範な領域に変化を認めることから、真の ALS モデルとはいえない面もある。しかし運動神経の変化に注目すると、ALS の病理学的変化の特徴である、クロマトリシス、ミトコンドリア形態変化などの膜構造変化を認め、共通する病態機序の存在も示唆された。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 佐藤俊哉 「Zinc Finger Nuclease を用いた TDP-43 遺伝子改変マウスの作成」第 42 回新潟神経学夏期セミナー、2012 年 8 月 4 日、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター（新潟県）
- ② 廣川祥子 「The alternative splicing variants of TDP-43 mRNA in mouse」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜（神奈川）
- ③ 廣川祥子 「ALS 関連タンパク質 TDP-43 の

初期胚発生への寄与」第 1 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2010 年 11 月 22 日、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター（新潟県）

- ④ 廣川祥子 「ALS 関連タンパク質 TDP-43 の初期胚発生への寄与」第 40 回新潟神経学夏期セミナー、2010 年 8 月 6 日、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター（新潟県）

〔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  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 俊哉 (SATO TOSHIYA)  
新潟大学・脳研究所・助教  
研究者番号：90359703

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

小野寺 理 (OSAMU ONODERA)  
新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号：20303167

##### (4) 研究協力者

廣川 祥子 (SACHIKO HIROKAWA)  
新潟大学・脳研究所・技術職員