

## 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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890051

研究課題名（和文） 孤発性筋萎縮性側索硬化症ラットモデルの確立

研究課題名（英文） Establishment for rat model of sporadic amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

大久保 卓哉 (OHKUBO TAKUYA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90587461

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は進行性の運動性麻痺を呈し、死に至る悲惨な神経変性疾患の1つである。近年孤発性ALSの原因蛋白として新たにTDP-43が同定されたが、その役割はよく分かっていない。我々はラットの頸髄前角にアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターで野生型ヒトTDP-43蛋白を過剰発現させるという手法で、孤発性ALSのラットモデル作製に成功した。サルモデルと合わせ、この世界初の孤発性ALS動物モデルにより、今後孤発性ALSの病態解明を目指したい。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by progressive motor paresis. Recently transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) was newly identified as one of the targeted protein of sporadic ALS, however, their significance has not been fully elucidated. We succeeded in establishment for rat model of sporadic ALS by the method of overexpressing wild-type of human TDP-43 in spinal cords of rats by injecting adeno-associated virus vector into their cervical cords. Our animal models will 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	1230000	369000	1599000
2011年度	1130000	339000	1469000
総計	2360000	708000	3068000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ラットモデル、TDP-43

## 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蛋白凝集体の主成分として、核蛋白であるTDP-43蛋白が同定され、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TDP-43蛋白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、孤発性ALSにおいてTDP-43蛋白の増加が病態の本質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。

カニクイザル(4-10歳♂)3頭の椎弓切除後、利き手側の第6頸髄一側の前角付近にFlagでラベルしたヒト野生型TDP-43蛋白発現AAV1( $1 \times 10^{12-13}$ vg/ml, 5 $\mu$ l)を注入する

と、注入後 2-6 週後から注入側の前肢に進行性の運動麻痺が生じ、4-8 週後に完全麻痺となった。神経病理学的には、TDP-43 蛋白の発現は C2 から Th2 までの前角広範に及び、発現した野生型 TDP-43 蛋白の約 70%は前角細胞の核に過剰発現した。一方、約 30%は細胞質に異常分布しかつリン酸化されて、その神経細胞では核の内因性 TDP-43 蛋白の染色性はほぼ消失していた。核および細胞質に顆粒性凝集体を形成し、一部に変性突起 (dystrophic neurite) を認めた。

## 2. 研究の目的

カニクイザルの脊髄前角細胞での野生型 TDP-43 蛋白の発現により、TDP-43 蛋白の細胞質への異常分布と凝集、核での染色性の消失という孤発性 ALS に特徴的な病理所見を再現することができた。TDP-43 蛋白の毒性は、本来局在している核内でも過剰発現のみで十分であり、細胞質内への異常局在は必ずしも必要でないことが想定される。しかし、霊長類であるカニクイザルを用いた実験は倫理的に実験可能な頭数に制限があり、野生型 TDP-43 毒性獲得の分子機序を解析するための多数の個体を用いた実験系の確立は困難である。そこで本研究では、ラットを用いて同様の孤発性 ALS モデルの作製を試みることにした。

## 3. 研究の方法

Fisher ラット (8 週♂) 3 匹の片側椎弓切除を行い、利き手側の第 4 および第 6 頸髄左側の脊髄前角付近に Flag でラベルしたヒト野生型 TDP-43 蛋白発現 AAV ( $3 \times 10^{12-13}$ vg/ml,  $1.5 \mu\text{l}$ ) を注入し、ラットの神経症状、電気生理検査、病理組織学的検索およびウエスタンブロットによる蛋白解析を行った。

## 4. 研究成果

グリップテストにて注入後 3 週から注入側の左前肢に進行性の運動麻痺が生じ (図 1)、6 週後には左前肢は完全運動麻痺となった (図 2 : 矢印)。

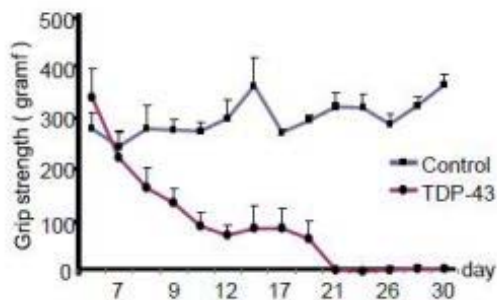


図 1 : グリップテスト



図 2 : ラットの四肢麻痺

電気生理学的には、麻痺側前肢で陽性棘波 (positive sharp wave), 線維自発電位 (fibrillation potential) が認められ、ALS 患者同様に進行性の神経原性変化を裏付ける所見が認められた。

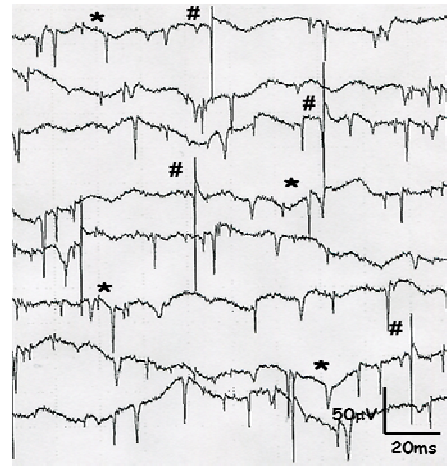


図 3 : 針筋電図

(\* : 陽性棘波, # : 線維自発電位)

病理組織学的には、前角の神経細胞における Flag 標識した外因性ヒト TDP-43 蛋白の発現は 90%以上が核に局在しており、カニクイザル同様に核での TDP-43 蛋白毒性が想定された。しかし、この核局在は前角神経細胞の内側核群および外側核群においてほぼ均一な所見であり、分布に差は認めなかった (図 4)。これは、内側核群では TDP-43 が主に核

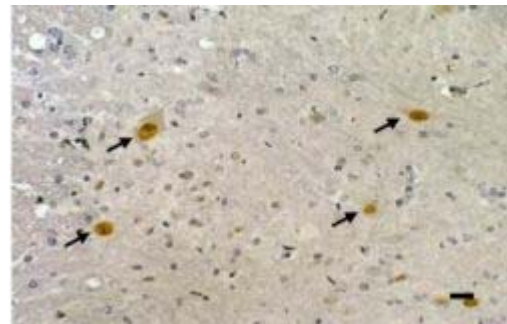


図 4 : 抗 Flag 抗体染色

に局在し、外側核群では細胞質に異常局在するサルモデルとは異なる所見であり、同じ phenotype を示す動物モデルでありながら種差を反映しているものと考えられた。また、ユビキチン化やリン酸化は発症後期に認められた (図 5)。

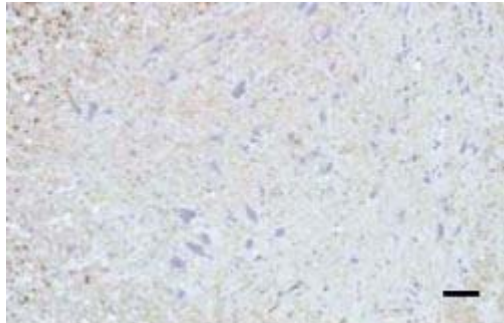


図 5 : 抗 SMI 抗体染色

ウェスタンブロットの結果でも、注入した外因性 TDP-43 のみが一部リン酸化されているだけであり、25kDa の C 末断片は認めなかった (図 6)。

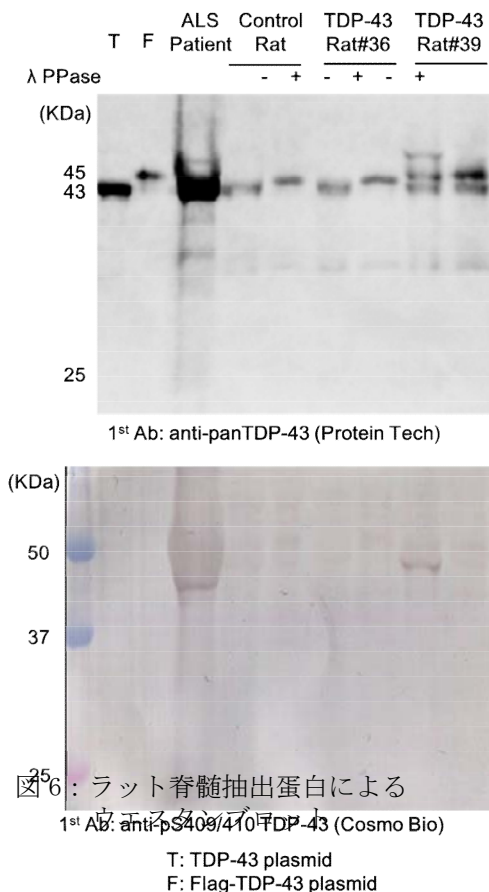


図 6 : ラット脊髄抽出蛋白による

以上から、リン酸化は発症早期において注入した外因性 TDP-43 の一部で認められるだけであり、病的とされる TDP-43 蛋白のリン酸化は病初期には必須でない可能性がある

と考えられた。

今後、この動物モデルを用いて、SALS の病態解明、治療法開発を目指したい。

#### 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 2 件)

1. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ono F, Ohkubo T, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Ueno T, Yamamoto M, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Yasutomi Y, Mochizuki H, Uchihara T, Kuwabara S, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain*. 2012; 135:833-46.
2. Kanouchi T, Ohkubo T, Yokota T. Can regional spreading of ALS motor symptoms be explained by prion-like propagation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 (*in press*)
3. 大久保卓哉, 水澤英洋. プリオン病とパーキンソン病. *Frontier in Parkinson Disease*. 2011; 4:196-200.

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 大久保卓哉, 田尻美緒, 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. 孤発性筋委縮性側索硬化症のラットモデル作製 (第 2 報). 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 18.
- ② 佐野達彦, 大久保卓哉, 上野智美, 内田あずさ, 内原俊記, 水澤英洋, 横田隆徳. 上肢完全麻痺を示した孤発性筋委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. 名古屋. 2011. 5. 18.
- ③ 横田隆徳, 内田あずさ, 笹栗弘貴, 田尻美緒, 佐野達彦, 内原俊記, 大久保卓哉, 水澤英洋. TDP-43 過剰発現による孤発性 ALS モデルの作製. 第 52 回日本神経学会学術大会. 名古屋. 2011. 5. 19.
- ④ 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. Yokohama. Sep 14-17<sup>th</sup> 2011.
- ⑤ Tajiri M, Sakaue F, Ohkubo T, Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Mizusawa H,

Yokota T. The truncation and phosphorylation of TDP-43 is not prerequisite for motoneuronal degeneration in non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Neuroscience Society. Yokohama. Sep 14-17<sup>th</sup> 2011.

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕なし

○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

大久保 卓哉 (OHKUBO TAKUYA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科脳神経病態学・助教

研究者番号：90587461

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

横田 隆徳 (YOKOTA TAKANORI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科脳神経病態学・教授

研究者番号：90231688

内原 俊記 (UCHIHARA TOSHIKI)

東京都医学総合研究所・脳病理形態研究  
室・室長

研究者番号：10223570