

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591258

研究課題名(和文) TDP-43コンディショナルノックアウトマウスを用いたALS/FTDの病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of disease mechanism of ALS/FTD using TDP-43 conditional knockout mice

研究代表者

竹内 英之 (Takeuchi, Hideyuki)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：30362213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：FTD/ALSの原因タンパクTDP-43による神経変性の機序解明のため、神経特異的かつタモキシフェン誘導性TDP-43コンディショナルノックアウトマウスを作出し、その表現型を解析した。マウスの週齢に関わらず、TDP-43のノックアウト後、約2週間から運動異常が顕在化し、次いで認知機能の低下を認め、約5週間で衰弱死した。病理学的には海馬、脊髄の神経細胞脱落と高度のグリオシスを認めた。以上から、TDP-43のloss-of-functionがTDP-43による神経変性の一機序を担うと考えられる。

研究成果の概要(英文)：TDP-43 has been linked to the pathophysiology of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis (FTD/ALS). It is still open to debate whether TDP-43 neurotoxicity is caused by a novel toxic gain-of-function mechanism of the aggregates or by a loss of its normal function. Since TDP-43 is critical for embryonic development and fat metabolism, conventional knockout methods have failed to generate good models of TDP-43 “loss of function” model for FTD/ALS. To circumvent these problems, we developed the neuronal-specific, tamoxifen-inducible TDP-43 knockout mice. After ablation of TDP-43, mice exhibited behavioral abnormalities, cognitive dysfunction and rapid progressive motor paralysis associated with neuronal loss and massive gliosis, which resembles FTD/ALS phenotypes. This mouse model represents TDP-43 “loss of function” model for FTD/ALS. We propose that TDP-43 neurotoxicity is caused by a loss of its normal function.

研究分野：神経内科

キーワード：TDP-43 神経変性疾患 筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭葉型認知症

1. 研究開始当初の背景

近年、家族性および孤発性の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) / 前頭側頭葉型認知症 (FTD) の原因タンパクとして、RNA/DNA 結合タンパクである不均一核内リボ核酸タンパク TDP-43 が同定された。TDP-43 は生理機能として、DNA の転写制御、前駆 mRNA のスプライシングの制御、mRNA の安定化、miRNA のプロセッシングへの関与など多彩な機能が報告されているが、神経系における機能についてはほとんど未解明のままである。患者の神経細胞では、TDP-43 が核内から消失し、代わりに細胞質に異常に分布し凝集体を形成することが観察された。また、疾患モデルとして作出されたヒト TDP-43 トランスジェニックマウスにおいても、疾患類似の進行性の運動麻痺が認められ、マウスの内因性 TDP-43 が発現低下していることが示された。以上から、ALS/FTD の病態発現に TDP-43 の機能喪失が大きな役割を担っていると推察されている。

これまでに、神経細胞での TDP-43 のノックダウンにより、長大なイントロンを持つ前駆 RNA やノンコーディング RNA が選択的にダウンレギュレートされることが報告されているが、TDP-43 の機能喪失による神経変性のメカニズムについてはほとんどわかっていない。TDP-43 の機能喪失モデル生物としては、ショウジョウバエとゼブラフィッシュによる TDP-43 ノックダウンモデルで運動麻痺を来することが示されたが、TDP-43 ノックアウトマウスは胚発生初期に致死となるため、機能喪失モデルマウスの作出は難航していた。

2. 研究の目的

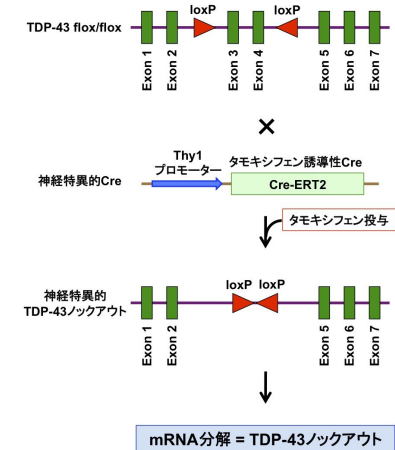
本研究では、薬剤誘導性プロモーターを用いた Cre トランスジェニックマウスを用いて、胎生致死を回避しつつ、神経系のみで TDP-43 の機能喪失を可能にする、TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスを作出する。このノックアウトマウスを用いて TDP-43 の機能喪失による神経変性の詳細なメカニズムを明らかにし、ALS/FTD に対する新たな診断・治療戦略へ向けた基盤研究を進める。

3. 研究の方法

(1) 薬剤誘導性・神経特異的 TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスの作出

神経系の TDP-43 機能喪失モデルとして、薬剤誘導性・神経特異的 TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスを作出する。タモキシフェン誘導性・神経特異性 Cre (Thy1-Cre-ERT2) トランスジェニックマウス (Heimer-McGinn et al. Genesis 2011) と掛け合わせることで、Thy1-Cre-ERT2/TDP-43 flox ヘテロマウスを選別する。さらに、このマウスを TDP-43 flox/flox ホモマウスへ掛け合わせることで、

最終的に、タモキシフェン誘導性・神経特異性 TDP-43 コンディショナルノックアウトマウス (Thy1-Cre-ERT2/ TDP-43 flox ホモマウス) を得る。



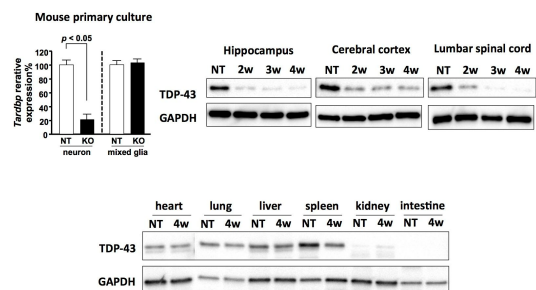
(2) TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスの表現型解析

成人の疾患である ALS/FTD の病態を再現するために、成熟期以降のマウスに対して 0.5 μmol/g 体重のタモキシフェンを 5 日間連続経口投与することで、TDP-43 ノックアウトを行い、マウスの表現型について、臨床的な病勢経過の観察や、活動量の変化や運動機能検査、記憶テストなどの行動解析、脳内マイクロダイアリシス-リアルタイム HPLC による神経伝達物質の変化量の直接解析、免疫学的手法を用いた生化学的、組織学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) 薬剤誘導性・神経特異的 TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスの作出

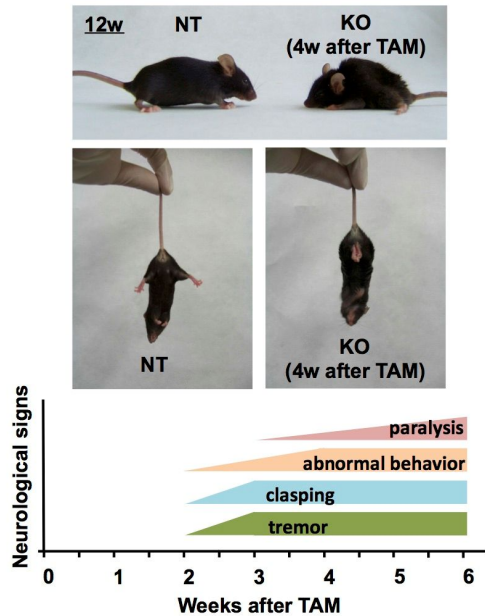
TDP-43 flox ホモマウスと Thy1.2-Cre-ERT2 マウスの交配によって、Thy1.2-Cre-ERT2/TDP-43 flox ホモマウスを作出し、5 μmol/kg のタモキシフェンを 5 日間経口投与することで、任意のタイミングで内因性の神経細胞内 TDP-43 のみのノックアウトができることを定量 PCR、免疫学的組織染色、Western blotting を用いて確認できた (図 1)。



<図 1 : TDP-43 発現解析>

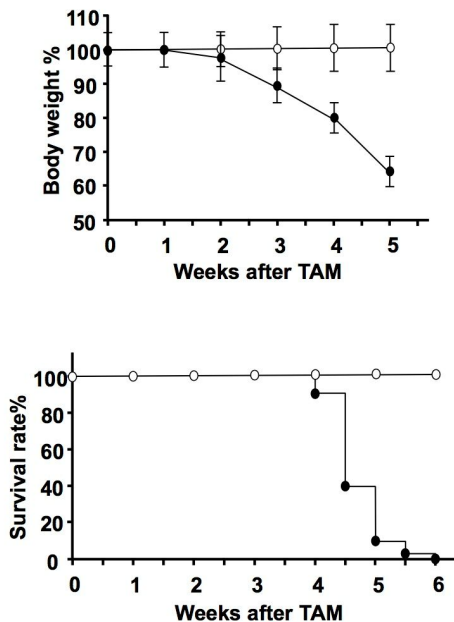
(2) TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスの表現型解析

マウスの週齢に関わらず、TDP-43 のノックアウト後、約 2 週間から振戦、claspings といった運動異常が顕在化し、次いで認知機能の低下を認めた (図 2)。



<図 2 : ノックアウトマウスの表現型>

4 週目からは麻痺と筋萎縮が顕著となり、



約 5 週間で衰弱死した (図 3)。病理学的には海馬、脊髄の軽度の神経細胞脱落と高度のグリオーシスを認めた。

<図 3 : マウス体重推移と生存曲線>

本モデルが FTL/ALS の表現型を再現することから、TDP-43 の loss-of-function が TDP-43 による神経変性の一機序を担うと考えられた。

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 6 件)

Doi Y, Takeuchi H, Horiuchi H, Hanyu T, Kawanokuchi J, Jin S, Parajuli B, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A: Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. PLoS One 8(4): e61988, 2013.

Parajuli B, Sonobe Y, Horiuchi H, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A: Oligomeric amyloid induces IL-1 processing via production of ROS: implication in Alzheimer's disease. Cell Death and Disease 4: e975, 2013. 査読あり

Takeuchi H: Roles of glial cells in neuroinflammation and neurodegeneration. Clinical and Experimental Neuroimmunology 4(suppl.1): 2-16, 2013.. 査読あり

Cheng Y, Takeuchi H, Sonobe Y, Jin S, Wang Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A: Sirtuin 1 attenuates oxidative stress via upregulation of superoxide dismutase 2 and catalase in astrocytes. Journal of Neuroimmunology 269(1-2):38-43, 2014. 査読あり

Takeuchi H, Suzumura A: Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases. Frontiers in Cellular Neuroscience 8:189, 2014. 査読あり

Horiuchi H, Parajuli B, Wang Y, Azuma YT, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A: Interleukin-19 acts as a negative autocrine regulator of activated microglia. PLOS ONE 9(12): e115981, 2015. 査読あり

[学会発表](計 2 件)

TAKEUCHI Hideyuki, HORIUCHI Hiroshi, MIZOGUCHI Hiroyuki, SUZUMURA Akio, KWONG Linda, TROJANOWSKI John, LEE Virginia: Ablation of neuronal TDP-43 develops FTL/ALS phenotypes in mice. Neuroscience2013, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2013.11. (San Diego, USA)

竹内英之, 金世杰, 溝口博之, 堀内浩, 水野哲也, 錫村明生, John Trojanowski,

Virginia Lee : 薬剤誘導性神経特異的
TDP-43 ノックアウトマウスはFTLD/ALS
の表現型を呈する. 第55回日本神経学
会総会, 2014.5. (福岡)

〔図書〕(計 2件)

Takeuchi H: Glial communication via
gap junction in neuroinflammation.
Neuron-Glia interaction in
Neuroinflammation. Advances in
Neurobiology 7:119-133, Springer
(Berlin), 2013.

Takeuchi H: Microglia and glutamate.
Advances in Neuroimmune Biology
4:77-83, IOS Press, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: グリチルレチン酸誘導体及びその利用
発明者: 竹内 英之, 錫村 明生
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2013-243130
出願年月日: 2013年11月20日
国内外の別: 国内

名称: Glycyrrhizic acid derivatives and
their usage
発明者: 竹内 英之, 錫村 明生
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/080732
出願年月日: 2014年11月20日
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 英之 (TAKEUCHI, Hideyuki)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 30362213