

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659425

研究課題名（和文）ラットを用いたTDP-43伝播モデルの作製

研究課題名（英文）Development of rat model of TDP-43 propagation

研究代表者

叶内 匡 (KANOUCHI TADASHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50345287

研究成果の概要（和文）：

flag で標識したヒト野生型 TDP-43 発現 AAV1-IRES-hrGFP ベクターをフィッシャー・ラットの第6頸髄前角細胞付近に注入することにより、TDP-43 伝播ラットモデルを作製した。注入2週後、脊髄内において hrGFP よりも外因性 TDP-43 の発現の方が広汎に認められた。このモデルにおいて外因性 TDP-43 の脊髄における伝播は、局所の細胞間での拡がりに加え、単一 motor column 内での拡がり、異なる motor column 間での拡がりの2方向の機序が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We developed rat model of TDP-43 propagation by injecting AAV1-IRES-hrGFP vector expressing flag-tagged human wild-type TDP-43 to the anterior horn of the 6th spinal cord of Fischer rat. After 2 weeks of injection, exogenous TDP-43 was expressed much more extensively than hrGFP in the spinal cord. This rat model might show three patterns of propagation mechanism of exogenous TDP-43, which are locally cell-to-cell propagation, radial propagation in one motor column, and horizontal propagation between different motor columns.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：ALS, ラット, TDP-43, 伝播

## 1. 研究開始当初の背景

TDP-43 は 2006 年に孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) の神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として同定された。ALS 症例の剖検脳において TDP-43 による細胞質内封入体が存在する神経細胞では、核蛋白である TDP-43 の核内染色性が著明に低下していることが報告されている。さらに、孤発性 ALS および家族性 ALS において、TDP-43 遺伝子の点変異が次々と報告され、変異 TDP-43 遺伝子が ALS の原因遺伝子であることが判明

しつつある。しかし、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割は明らかになっていない。AAV ベクターを用いて flag で標識したヒト野生型 TDP-43 をラットやサルの脊髄で過剰発現させることにより、我々は世界で初めて孤発性 ALS 動物モデルを構築することに成功した (Brain 2012)。

## 2. 研究の目的

野生型 TDP-43 のプリオン様の伝播が孤発性 ALS の病態の拡がりの一因になっているという仮説に基づき、この世界初の齧歯類

ALS モデルにおいて、野生型 TDP-43 の伝播機序を解明する目的で、pAAV-IRES-hrGFP ベクターを用いて flag 標識したヒト野生型 TDP-43 と hrGFP を 1 つの mRNA から同時に過剰発現させ、脊髄における TDP-43 の拡がりを解析した。

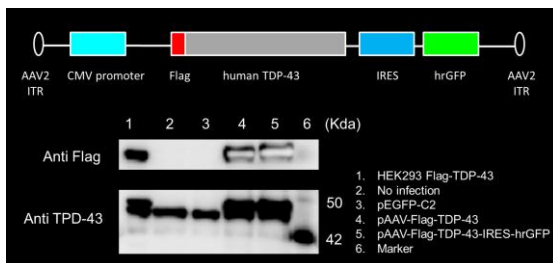
### 3. 研究の方法

#### <組換えアデノ随伴ウイルスの作製>

野生型 TDP-43 は CMV プロモーターを含む human TDP-43 発現ベクタープラスミド (Invitrogen) を用いた。この完全長 human TDP-43 cDNA の N 末端を flag (DYKDDDK) で標識したものを、AAV2 の ITR を持つプラスミド (pAAV-IRES-hrGFP; Stratagene) に組み込み、ヒト野生型 TDP-43 を発現するコンストラクトを作製した (Fig. 1)。

アデノウイルスフリー triple transfection 法 (Stratagene) により、上記の TDP-43 発現ベクタープラスミド、packaging plasmid (AAV1) および AAV ヘルパープラスミド (pHelper; Stratagene) を 1 : 1 : 1 の割合で混合し、リン酸カルシウム法にて HEK293 細胞にトランスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、ペレットを PBS で再懸濁して凍結融解し、硫酸塩析とイオデキサノール (Axis-Shield) 密度勾配超遠心法、HPLC による精製を行った。AAV プラスミドベクターのゲノム力価は TaqMan 法の定量的 PCR を用いた。

作製した AAV プラスミドベクターはウェスタンブロッティングにて発現を確認した。HEK293 細胞を 12 well プレートに捲き、24 時間後に AAV 溶液を  $1.0 \times 10^{11}$  vg/ml または  $5.0 \times 10^{11}$  vg/ml/well 添加した。48 時間後に RIPA buffer にて細胞を回収、凍結融解後、遠心し上清中のタンパクを抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech) (1 : 2000)、抗 flag 抗体 (Sigma) (1 : 2000) を用いて検出した。すべての DNA 組換え実験は東京医科歯科大学遺伝子組換え倫理委員会の承認 (承認番号 2011-075A) を得て行った。



**Fig.1 野生型 TDP-43 発現 AAV プラスミドベクター作製**

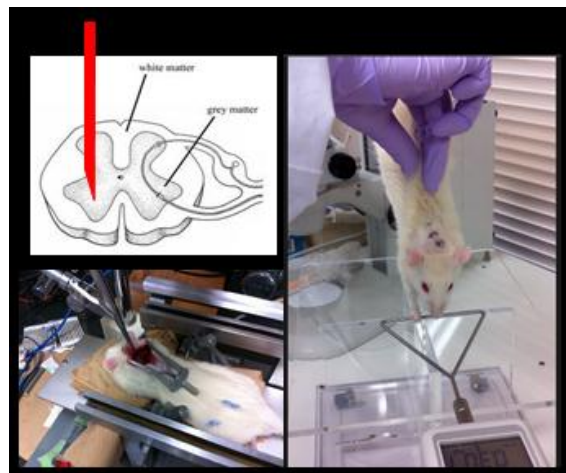
(A)野生型 TDP-43 発現プラスミドベクターのコンストラクト模式図。(B)ウェスタンブロッティングによる AAV プラスミドベクター発現確認。HEK293 細胞において野生型 TDP-43 が過剰発現している。

#### <ウイルスベクターの脊髄注入>

10 週齢雄のフィッシャー・ラット (体重 180-220g, 三協ラボ) を用い、手術は抱水クロラル (70mg/mL) とイソフルラン (持続吸入 1.5%) 麻酔下に行った。第 6 頸椎の椎弓を切除し、C7 頸髄左側の前角細胞付近に flag 標識ヒト野生型 TDP-43 発現 AAV1-IRES-hrGFP ベクター ( $3 \times 10^{12}$  vg/ml) を注入した。AAV はガラスキャピラリーを接続した 10 $\mu$ l ハミルトンマイクロシリンジを用いて 2 分かけて 1.5 $\mu$ l 注入した。注入後 3 分間待ってからシリンジを抜去した。また、ネガティブコントロールとして PBS のみを上記と同様の方法で注入した。1, 2, 4 週後にそれぞれ解剖し、握力測定、病理組織検査を行った。

#### <握力測定>

前肢筋力麻痺を評価するため、施術前と施術 1 週間後から解剖日までの握力を 1, 2 日おきに右肢、左肢それぞれ測定し、5 回試行した平均値を出した。握力測定にはラット・マウス用握力測定装置 (室町機器) を使用した。



**Fig. 2 AAV インジェクション**

AAV 注入部位模式図 (左上図)。脊髄背側から前角付近に注入。手術の様子 (左下図)。握力測定 (右図)。

#### <病理組織解析>

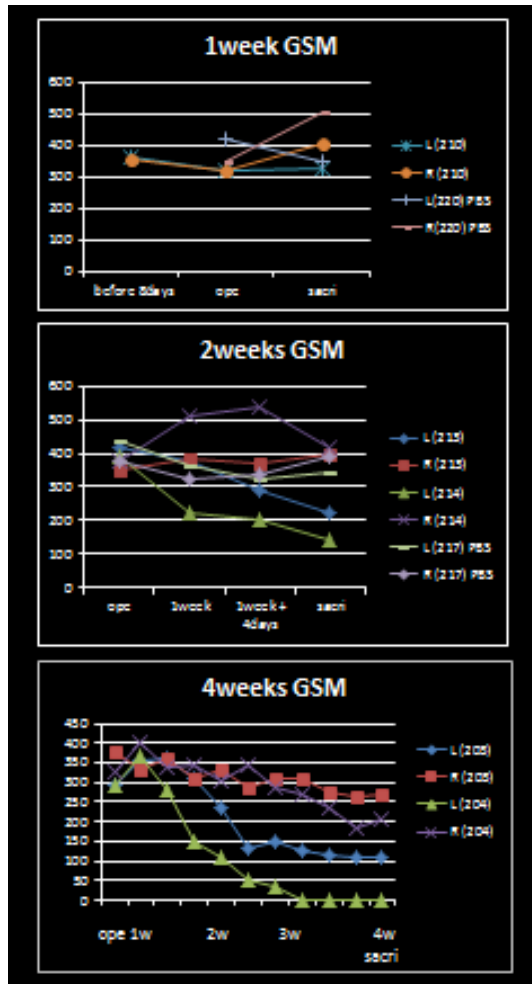
解剖はすべてソムノペンチル (0.3ml/200g) 麻酔下で行った。リン酸緩衝液灌流を行い摘出した脊髄は 4%PFA で固定、20%スクロースで置換し、クライオスタットで 50 $\mu$ m 厚の凍結切片を作成した。脊髄切片は抗 flag 抗体 (1:500, Sigma) で 4 $^{\circ}$ C 一晚抗体反応させ、ABC ペルオキシダーゼキット (vector laboratories) とジアミノベンジジン基質による免疫染色を行った。

免疫蛍光染色では抗 flag 抗体で 4 $^{\circ}$ C 二晩抗体反応させ、蛍光標識二次抗体 (Alexa Fluor 546 抗マウス IgG 抗体, Invitrogen) により可視化した。蛍光顕微鏡 (Olympus) または共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて病理組

織学的評価を行った。

#### 4. 研究成果

左側頸髄に TDP-43 を過剰発現させたラットのウイルスベクター注入側前肢は 2 週間後から進行性の麻痺を呈し、4 週間後には完全麻痺となった。反対側は 4 週でわずかに握力低下しており、ALS 様の病態の拡がりが見られた。一方、PBS コントロールでは、注入側、反対側ともに筋力低下はなかった (Fig. 3)。

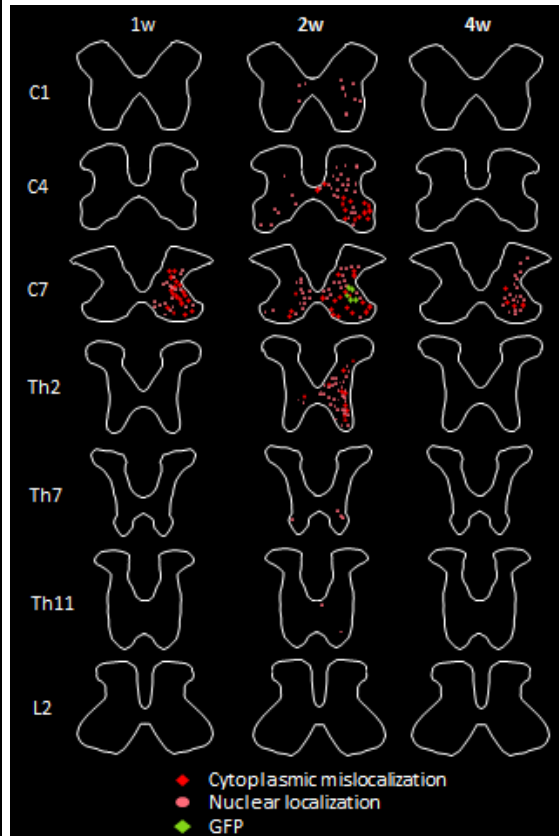


**Fig. 3** 野生型 TDP-43 過剰発現ラットにおける神経症状出現

左側頸髄に TDP-43 を過剰発現させたラット両前肢の術後 1, 2, 4 週間までの握力測定 (GSM) スコア。TDP-43 注入側で進行性に機能低下が見られ (2 週 #213, #214), 4 週間後には完全麻痺を示した (#204)。反対側は 4 週でわずかにスコアが低下した (#203, #204)。一方、PBS コントロール (#217, #220) では、注入側、反対側ともにスコアの低下はなかった。

脊髄において、前角細胞に TDP-43 が発現していることを確かめた。抗 flag 抗体により免疫染色を行うと、注入部位付近のほぼ全ての脊髄前角細胞に対し染色性が認められ、外因性 TDP-43 が過剰発現していた。外因性 TDP-43 は後角や中間外側核での発現は稀で、脊髄前角細胞では運動神経細胞にほぼ局限

していた。外因性 TDP-43 の拡がりには、1 週では注入部位の C7 に局限するも、2 週では C2 から L2 までの広汎に拡がっており、4 週では C4 から C7 までに拡がりはやや縮小していた。また、注入反対側でも外因性 TDP-43 の発現が確認された (Fig. 4)。一方で、GFP の拡がりには 1 週および 4 週では注入部位に留まり、2 週では 1 例が C4 から Th2 まで拡がっていた。GFP に比べて外因性 TDP-43 の拡がりが広範囲にわたっており、この結果はウイルスによらない外因性 TDP-43 の脊髄内伝播の可能性を示唆している。



**Fig. 4** 脊髄における外因性 TDP-43 と GFP の拡がり

頸椎 C1 から腰髄 L2 までの脊髄灰白質部分の模式図。免疫染色による外因性 TDP-43 発現細胞と GFP 発現細胞がみられた位置をプロットした (赤: 外因性 TDP-43 発現細胞, 緑: GFP 発現細胞)。注入部位の C7 を中心に広範囲に外因性 TDP-43 が発現している。

外因性 TDP-43 は垂直方向により遠位に拡がっており、motor column を介した伝播の可能性が示唆された。垂直方向の拡がりには motor column 内で一部は連続して発現していたが、非連続な部分もあった。また、C6 のウイルス注入部位付近では神経細胞だけでなくグリア細胞核内にも flag-TDP-43 の発現を認め、ウイルス濃度の高い部位では局所のグリア細胞間あるいはグリア-神経細胞間での伝播の可能性が考えられた。外因性 TDP-43 陽性神経細胞の脊髄における伝播は、

局所の細胞間での拡がり、単一 motor column 内での拡がり、異なる motor column 間での拡がりの 2 方向の機序が考えられた (Fig.5).

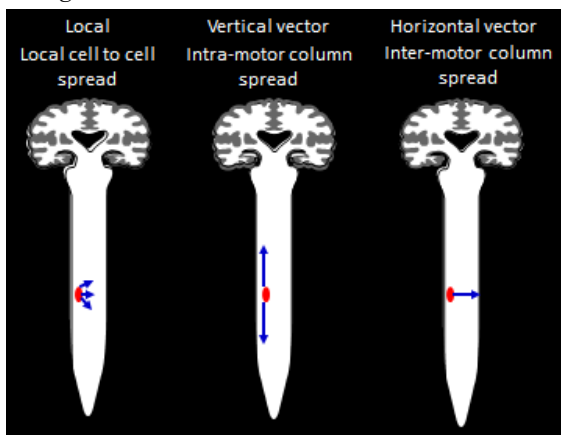


Fig. 5 脊髄における伝播機序

## 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 1 件)

1. 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. 2012; 83: 739-45.

[総説] (計 1 件)

1. 叶内匡, 大久保卓哉, 横田隆徳, 鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一, 川原信隆・編. 神経変性の propagation. Annual Review 神経 2014. (株)中外医学社, (印刷中)

[学会発表] (計 0 件)

なし

[図書] (計 0 件)

なし

[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

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

叶内 匡 (KANOUCHI TADASHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 50345287

(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・教授  
研究者番号: 90231688

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