

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24689039

研究課題名(和文) ALS 霊長類モデルによる経シナプス逆行性伝播機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of transsynaptic retrograde transport in non-human primate model of ALS

研究代表者

大久保 卓哉 (OHKUBO, TAKUYA)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：90587461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円、(間接経費) 5,940,000円

研究成果の概要(和文)：我々はカニクイザル脊髄でヒト野生型TDP-43を過剰発現することにより、世界初の霊長類ALSモデルの構築に成功した。外因性TDP-43は注入側の前角運動神経細胞だけでなく、脊髄対側および頸髄から腰髄、大脳皮質運動野のBetz細胞にまで拡がっていた。このモデルにおけるTDP-43の伝播機序を解明する目的で、pAAV-IRES-GFPベクターでヒト野生型TDP-43とGFPを脊髄で同時に過剰発現させたところ、TDP-43はGFPより広範囲に拡がっていた。TDP-43の脊髄における伝播機序としては、局所細胞間、単一motor column内、異なるmotor column間の3つが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in establishing the first non-human primate model of ALS by overexpression of wild-type human TDP-43 in the spinal cord of cynomolgus monkeys. The distribution of exogenous wild-type human TDP-43 in this model was represented not only at the anterior horn neurons injected side, but at those of the other side of the same spinal cord, at those injected side from the cervical to lumbar level and at Betz neurons in the precentral area of motor cortex. To elucidate the pathomechanism of exogenous TDP-43 propagation in this model, we designed new constructs using pAAV-IRES-GFP vector, which could express both GFP and flag-tagged human TDP-43. Exogenous TDP-43 positive and GFP negative neurons were observed at more broad range of spinal cord than GFP positive and TDP-43 negative neurons. These data might indicate that TDP-43 could propagate along the same column (intracolumn spread), among different columns (intercolumn spread) and neighboring cells (local cell-to-cell spread).

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 霊長類モデル TDP-43 経シナプス伝播 AAVベクター

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質凝集体の主成分として、核蛋白である 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 の役割は未だ明らかでない。

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、ヒトにもっと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♂)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 発現 AAV1 ($1 \times 10^{12-13}$ vg/ml, 5 μ 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 週後には完全麻痺となった。電気生理学的には手関節部正中神経刺激による短指外転筋 (APB) の誘発筋複合電位 (CMAP) は徐々に低下して 4-8 後には全例で CMAP は全く導出されなくなった。

神経病理学的には、TDP-43 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 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 の染色性はほぼ消失していた。核および細胞質の一部に細胞質顆粒状凝集体を形成し、一部に変性突起を認めた。

これらのことから、カニクイザルの脊髄前角細胞での野生型 TDP-43 の発現により、TDP-43 の細胞質への凝集と核での染色性の消失という孤発性 ALS に特徴的な TDP-43 病理を再現することができた。さらに、大脳の検索を行ったところ、Flag 染色にて注入側と対側の運動野 Betz 細胞のみ外因性 TDP-43 蛋白の発現が陽性像(核局在および細胞質異常局在とも)としてとらえられ、前頭葉、後頭葉、基底核、黒質などでは陰性であった。この現象から、TDP-43 蛋白はシナプスを介して逆行性に伝播(propagate)しているという、新しい仮説の着想に至った。

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 蛋白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、外因性 TDP-43 蛋白の発現は脊髄前角細胞のみならず、注入側と対側の大脳運動野 Betz 細胞にも発現しており、TDP-43 蛋白はシナプスを介して逆行性に伝播(propagate)している可能性が示された。本研究では、この孤発

性 ALS モデルサルを用いて TDP-43 蛋白の経シナプス逆行性輸送機序と ALS 病態の伝播様式を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GFP-TDP-43 蛋白共発現 AAV ベクターによる経シナプス逆行性伝播サルモデルの作製:

pAAV-IRES-GFP 発現ベクターを用いた Flag-TDP-43, GFP 共発現コンストラクトの作製:

CMV プロモーターによるヒト TDP-43 発現ベクタープラスミド (Invitrogen) を用いて、全長ヒト TDP-43 cDNA の N 末端を flag 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(図 1 上)。

アデノウイルスフリーのトリプル・トランスフェクション法 (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・プロットングにて発現を確認した。HEK293 細胞を 12 well プレートに播き、24 時間後に AAV 溶液を 1.0×10^{11} vg/mL または 5.0×10^{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、遠心し上清中の蛋白を抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech) (1 : 2000)、抗 Flag 抗体 (Sigma) (1 : 2000) を用いて検出した(図 1 下)。

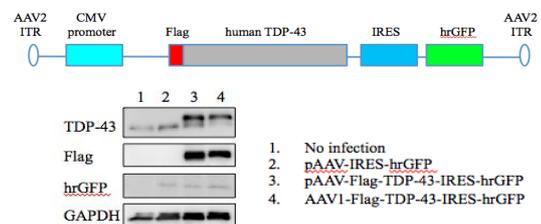


図 1. 野生型 TDP-43 発現 AAV プラスミドベクター作製

GFP-TDP-43 蛋白共発現 AAV ベクターのサルへの脊髄注入:

全身麻酔下にてカニクイザル(4-10 歳♂)の椎弓切除後、利き手側の第 6 頸髄一側の前角付近に pAAV-Flag-TDP-43-IRES-hrGFP 5 μ l を注入し、手術を終了した(図 2)。

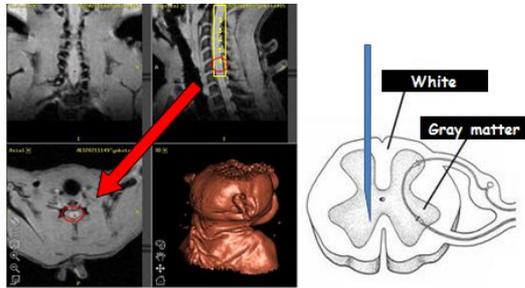


図 2 . ベクターのサル脊髄注入

サルモデルの行動解析：

近位筋（上腕二頭筋）の評価として、アップルテストに加え、上柵への掴まり行動を、ビデオ映像を元に解析し、4段階（score 3：上柵にぶら下がることができる，score 2：上柵に掴まることができるが，ぶら下がることができない，score 1：上肢挙上が可能だが，上柵に掴まることができない，score 0：上肢を挙上することができない）で評価した。

電気生理学的解析：

針筋電図(nEMG)，末梢神経伝導検査(NCS)による電気生理学的解析を行った。サルモデル脳脊髄サンプルを用いた病理組織学的・生化学的解析：

抗 Flag 抗体 (Sigma) (1:500)，抗リン酸化 S409/410 TDP-43 (Cosmo Bio) (1:500)で1次抗体反応を4，48時間行い，IgG 結合ポリマー-HRP (DAKO)で標識し，ABC ペルオキシダーゼキット (vector laboratories)とDABで発色した。免疫蛍光染色は抗 Flag 抗体で4，48時間抗体反応させ，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。蛍光顕微鏡または共焦点顕微鏡を用いて病理組織学的評価を行った。またウエスタンブロット，RT-PCRにて発現の程度，病変の拡がりを確認した。

- (2) カニクイザル大脳皮質神経初代培養への感染実験：

妊娠後 80 日の胎児から胎仔大脳皮質を採取し，分離培地 (DMEM:PBS = 1:1)で小さく断片化した。1.5 U/ml パパインで消化した大脳皮質の小片と細胞を LAB-TEK 社の 0.01%ポリ-L-リジンでコーティングされた 2 well チャンバースライドに 2.5×10^4 細胞/cm² の濃度で蒔き，細胞は B27 サプリメントを含む Neurobasal medium (Invitrogen)で培養した。7 日間培養後，サル皮質神経の初代培養に，ヒト TDP-43 発現 AAV1-IRES-GFP ベクター (1.0×10^4 vg/mL)を感染させ，7 日後に観察した。培養した細胞は 4%PFA で固定し，一次抗体として抗 Flag 抗体 (Sigma) で 4

24 時間反応させ，蛍光標識二次抗体 (Alexa Fluor 555 抗マウス IgG 抗体，Invitrogen)により可視化した。共焦点顕微鏡を用いて病理組織学的評価を行った。

- (3) GFP-TDP-43 蛋白共発現 AAV ベクターによる経シナプス逆行性伝播ラットモデルの作製：

GFP-TDP-43 蛋白共発現 AAV ベクターのラットへの脊髄注入：

フィッシャー・ラット (10 歳，オス体重 180-220 g)では，手術は抱水クロラル (70 mg/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 (3×10^{12} ， 1×10^{12} ， 1×10^{11} vg/mL)を注入した。AAV はガラスキャピラリーを接続した 10 μ l ハミルトンマイクロシリンジを用いて 1.5 μ l を注入した。また，対照として PBS のみを上記と同様の方法で注入した (図 3 左)。

ラットモデルの行動解析：

施術後 1，2 週でそれぞれ解剖し，握力測定 (GSM：Grip Strength Measurement)，病理組織検査を行った。前肢筋力を評価するため，施術前と施術 1 週間後から解剖日までの握力を 2，3 日おきに右肢，左肢それぞれ測定し，平均値を算出した。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 (図 3 右)。

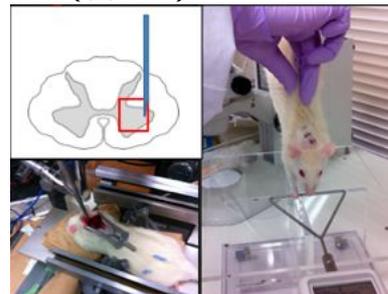


図 3 . AAV ベクターラット脊髄注入 AAV 注入部位模式図 (左上図)。手術の様子 (左下図)。握力測定 (右図)

ラットモデル脳脊髄サンプルを用いた病理組織学的・生化学的解析：サルモデルと同様に解析を行った。

(倫理的配慮)サルの実験は，独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学研究センターの動物実験委員会の承認 (DS20-45 DS21-19, DS24-20, DS25-22)，ラットの実験は，東京医科歯科大学動物実験委員会の承認 (0130114A, 0140232A)，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 (2011-074C2)を得て行い，動物に苦痛を与えないよう最大限に配慮し，発症後

は必要最小限の期間で安楽殺して神経病理学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) カニクイザル大脳皮質ニューロン初代培養への感染実験

サル皮質ニューロンの培養細胞を用いて、GFP と Flag-TDP-43 の感度に差がないかどうかを検討した。結果、Flag-TDP-43 (赤) が核局在している細胞には、GFP (緑) が細胞質に局在していた。このことから、GFP の感度が Flag-TDP-43 の感度に劣ることはないと考えられた (図 4)。

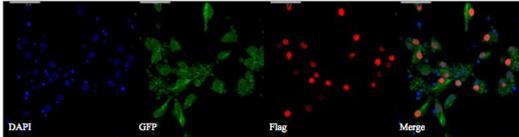


図 4. ヒト TDP-43 発現 AAV1-IRES-hrGFP を感染させたサル皮質ニューロン (赤: Flag-TDP-43, 緑: GFP, 青: DAPI)

(2) GFP-TDP-43 蛋白共発現 AAV ベクターによる経シナプス逆行性伝播ラットモデルの検討:

第 7 頸髄左側に TDP-43 を過剰発現させ、施術後 2 週で解剖したラットのウイルスベクター注入側前肢は、最も高濃度の 3.0×10^{12} vg/mL のラットのみ、3 匹中 2 匹が進行性の麻痺を呈した。一方、PBS 対照群では、注入側、反対側ともに筋力低下は見られなかった (図 5)。

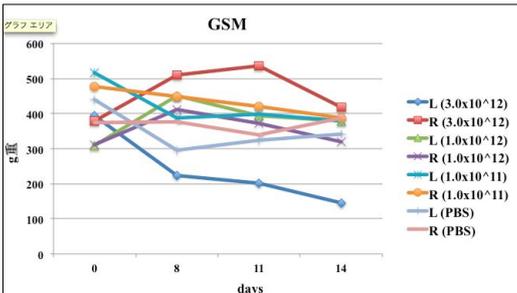


図 5. GFP-TDP-43 過剰発現ラットにおける GSM 変化: 左側頸髄に TDP-43 を過剰発現させ、施術後 2 週で解剖したラット (3.0×10^{12} , 1.0×10^{12} , 1.0×10^{11} vg/mL 各濃度 1 匹ずつ) の左右前肢の GSM。

抗 Flag 抗体による免疫染色では、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限局し、ほとんどが核局在だが、一部は細胞質にも局在していた。外因性 TDP-43 の拡がりは、1 週では注入部位の C7 レベルに限局するも、2 週では C2 から Th11 レベルまで広汎に拡がっていた。また、注入反対側でも外因性 TDP-43 の発現が確認された (図 5)。

さらに、ウイルスベクター濃度 3×10^{12} , 1×10^{12} , 1×10^{11} vg/mL をそれぞれ注入した

ところ、 1×10^{11} vg/mL では発現が認められず、濃度が濃くなるにつれて外因性 TDP-43 の拡がりがみられた。一方で、GFP の拡がりは 1 週では認められず、2 週では注入部位の C7 に限局していた。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 (図 6)。

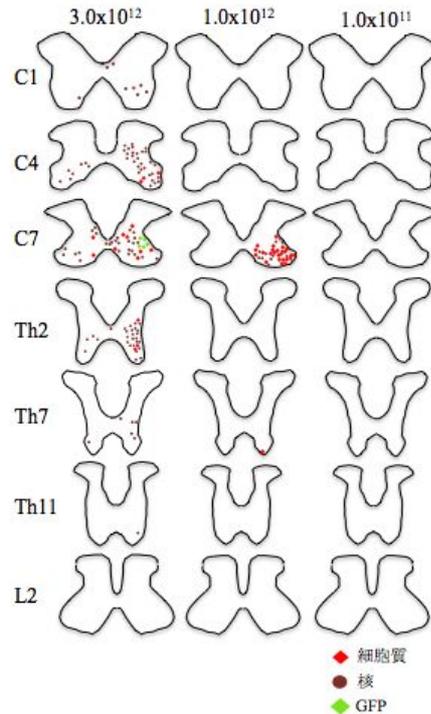


図 6. 脊髄における外因性 TDP-43 と GFP の拡がり (Flag-DAB 染色):

C1 頸椎から L2 腰髄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 (赤: Flag-TDP-43 細胞質局在, 茶: Flag-TDP-43 核局在, 緑: GFP 発現細胞)。 3.0×10^{12} vg/mL では注入側 C7 を中心に広範囲に外因性 TDP-43 が発現している。

(3) GFP-TDP-43 蛋白共発現 AAV ベクターによる経シナプス逆行性伝播サルモデルの検討:

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、左手指筋の完全麻痺を呈した (図 7)。

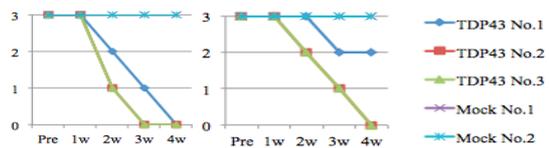


図 7. GFP-TDP-43 過剰発現カニクイザルにおける行動解析スコア: 左右前肢の術後 4 週までの行動解析スコア (0-4)。左下図が注入側、右下図が対側。

病理組織学的には、カニクイザルにおいても抗 Flag 抗体により免疫染色を行うことで外因性 TDP-43 の発現部位を確認した (図 8). ウイルス注入部位に近いレベルでは、外因性 TDP-43 の細胞質への異常局在を一部認めたが、遠位部での局在はほぼ核に限局していた (図 8-A,B). また、共発現させた GFP 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 とグリア細胞が拡がっていた (図 8-C).

ラット同様、運動神経細胞にはほぼ限局しており、後角や中間外側核での発現は認めなかった。また、垂直方向の拡がりには motor column 内で連続して発現していたが、対側の内側核の発現は認めず、外側核の発現は非連続していた (図 8-A).

さらに、ALS の病理学的特徴とされている TDP-43 の抗リン酸化 TDP-43 抗体染色では、TDP-43 過剰発現のカニクイザルの前角細胞において、リン酸化された TDP-43 は核に局在していた (図 8-D).

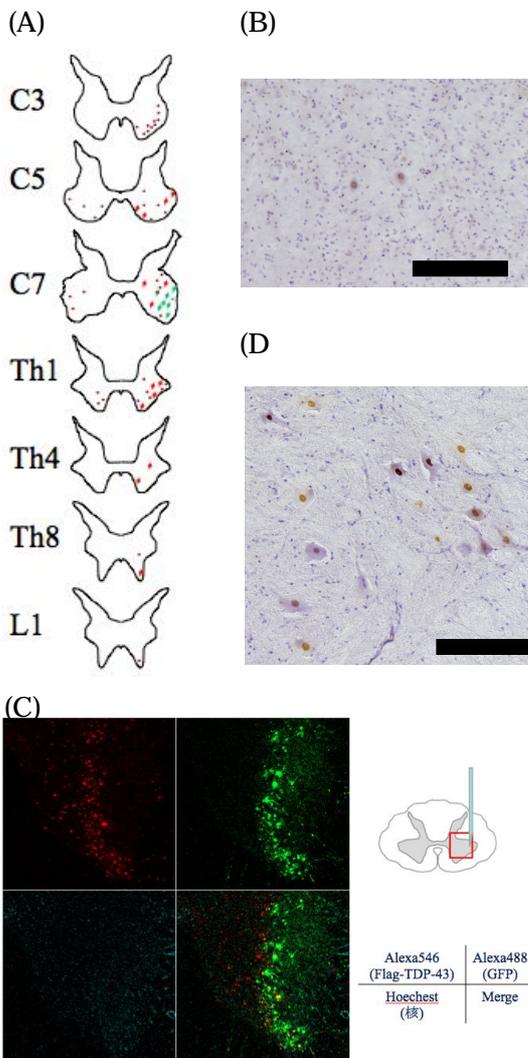


図 8. 脊髄における外因性 TDP-43 と GFP の拡がり:

(A) C3 頸椎から L1 腰髄までの脊髄灰白質部分の模式図 (Flag-DAB 染色). 免疫染色による外因性 TDP-43 発現細胞と GFP 発現細胞が見られた位置をプロット (赤: Flag-TDP-43 細胞質局在 (グリア細胞を含む), 茶: Flag-TDP-43 核局在, 緑: GFP). (B) 抗 Flag 抗体による脊髄 C5 の免疫染色 (scale bar: 200 μ m) (C) 蛍光染色 (赤: Flag-TDP-43, 緑: GFP, 青: 核, 黄色: 混合). 注入部位から同心円上に GFP, その外側に Flag-TDP-43 が拡がっている (D) 抗リン酸化 TDP-43 抗体による脊髄 C5 の免疫染色 (scale bar: 200 μ m)

(4) 考察

ラット及びサルいずれのモデルにおいても、ウイルス注入部位に近い部分では Flag-TDP-43 の細胞質への異常局在を一部認めたが、遠位部での局在はほぼ核に限局していた。また、共発現させた GFP 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 とグリア細胞が拡がっており、グリア細胞や神経細胞を介した TDP-43 の細胞間伝播が示唆された。外因性 TDP-43 (Flag-TDP-43) の発現はウイルス注入側の局所だけではなく、脊髄広範に認められた。ラット、カニクイザル共に、外因性 TDP-43 の発現部位は運動神経にはほぼ限局しており、後角や中間外側核での発現は認められず、motor column 内の垂直方向および motor column 間での水平方向の拡がりが見られた。これらのことから外因性 TDP-43 は motor column 内の垂直方向および motor column 間での水平方向、そしてグリア細胞 - 神経細胞間での 3 つの異なる機序で伝播していく可能性が考えられた (図 9)。

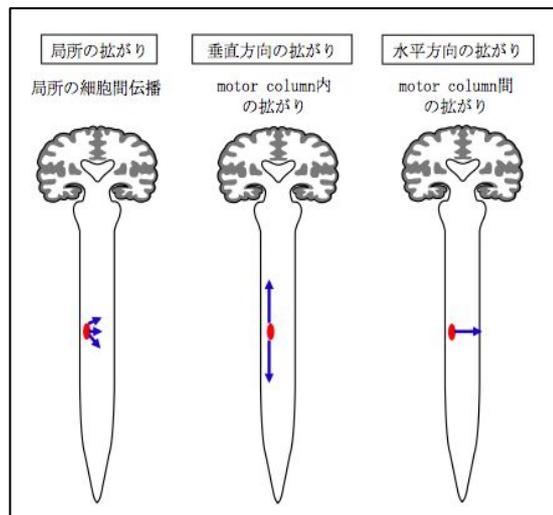


図 9. 外因性 TDP-43 の伝播機序の模式図

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. doi: 10.1136/jnnp-2011-301826.(査読有)

[学会発表](計 5件)

1. 大久保卓哉, 田尻美緒, 関口輝彦, 寺岡静香, 木村展之, 内原俊記, 水澤英洋, 横田隆徳. 霊長類 ALS モデルにおける TDP-43 の拡がり. 第 54 回日本神経学会学術大会. 東京. 2013.5.31.
2. Ohkubo T, Sasaguri H, Tajiri M, Kimura N, Ono F, Hirai T, Enomoto M, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. Society for Neuroscience (SFN) 2012. New Orleans. Oct 15, 2012.
3. 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 (SFN) 2012. New Orleans. Oct 15, 2012.
4. Ohkubo T, Tajiri M, Uchida A, Kimura H, Sasaguri N, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. 2012 Annual Meeting of the American Neurological Association (ANA), Boston. Oct 8, 2012.
5. 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. 名古屋. 2012. 9. 19.

[図書](計 1件)

1. 関口輝彦, 阿部圭輔, 大久保卓哉, 叶内匡, 横田隆徳. 編集: 鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一, 川原信隆. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における疾患の発症と病態進展機序. In: Annual Review 2014 神経. 中外医学社, 27-36. 2014.1.

[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: 特記事項なし

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・助教
研究者番号: 90587461

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

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

木村 展之 (KIMURA NOBUYUKI)
国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター・室長
研究者番号: 80392330