

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870754

研究課題名(和文) ALSモデルマウス病態悪化過程の1細胞イメージングから行う細胞死の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of neuronal cell death in a neurodegenerative process of ALS model mice

研究代表者

原 央子(Hara, Chikako)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40528452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子であるTAR DNA Binding Protein-43(TDP-43)に注目し、筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭変性症(FTLD)で起こる異常な細胞内凝集体形成から細胞死に至る過程の時間軸解明を目指してきた。培養細胞を用いてTDP-43の異常断片化を可視化し、凝集体形成頻度の測定結果により変異型の種類によって異常度合が異なることを示唆する結果を得た。老齢ALSモデルマウス脊髄では運動ニューロンの大幅な減少とTDP-43タンパク質の異常な蓄積を検出した。細胞と生体で凝集体形成過程のいくつかの事象を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We had planned to investigate the abnormal cytoplasmic inclusion and neuronal cell death caused by TAR DNA Binding Protein-43(TDP-43) of ALS model mice. TDP-43 has been identified as a causative gene of both amyotrophic lateral sclerosis(ALS) and frontotemporal lobe degeneration(FTLD), based on the findings that cytoplasmic inclusion bodies in ALS and FTLD pathology. Details of cytoplasmic inclusion forming processes were investigated by this study. Specifically, the abnormal fragmentation of TDP-43 protein in cultured cells, the frequency of the abnormal cytoplasmic inclusions, and decrease in number of the spinal cord neuron of the adult ALS model mice were detected.

研究分野：神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 前頭側頭変性症 ALS FTLD 細胞内凝集体 神経変性

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の中には神経系細胞内に疾患特異的な封入体を形成することが特徴の場合が多くある。最近の封入体種類と神経変性疾患を調べる研究で、TAR DNA Binding Protein (TDP-43) を含むものが多く報告されている。TDP-43 を含む細胞内封入体は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、原発性側索硬化症、前頭側頭変性症(FTLD) など多種の神経変性疾患でみられ、ALS では TDP-43 変異体の種類や遺伝的背景も調べられている。

凝集体と神経細胞死の因果関係を明らかにするにはどうすればよいか。申請者が注目した TDP-43 (凝集体) と ALS (神経変性疾患) の場合、現在までに、ALS 発症者の血液や死後の病理組織などを材料にした研究で、TDP-43 を含む細胞内凝集体やニューロンの変性が明らかにされてきた。もし、徐々に変化していくニューロンとニューロン内での分子動態をリアルタイムで追跡できたら、更に多くの情報を得られる。ALS では、TDP-43 の第 6exon の 1 アミノ酸変異が多く報告されている。

本研究では、既に報告されている変異型 TDP-43 全てが 1 アミノ酸置換によるものだという事に注目した。1 アミノ酸置換なら容易に変異体を作製でき、培養細胞内で変異体 TDP-43 のリアルタイムの追跡ができる。TDP-43 は切断されたり凝集したりと複雑な動きが予想され、おそらく単純に蛍光蛋白質を融合させるだけでは追跡するために不十分である。この TDP-43 の「分子挙動の複雑さ」が、本研究代表者が以前所属していたの研究室で得た蛍光蛋白質の知識と技術とを凝集体の研究へ発展させる本研究の着想に至った経緯である。

ALS、FTLD の研究では、遺伝的背景の調査と病理検査が多くなされてきた。今後、TDP-43 変異体による凝集体を細胞レベルで調査し、細胞内シグナル伝達や細胞間作用から、ニューロン死のメカニズムを解明していく研究も望まれている。「ニューロン死」を終点として、凝集体を材料に行う本研究は、他の神経変性疾患の研究にも共通部分があるはずである。例えば TDP-43 とアルツハイマー病の関連も報告されていることから本研究から得られた結果の注目度は高いと予想した。

2. 研究の目的

「凝集体」に起因する神経変性疾患は、病態の指標とされ細胞死につながる異常な変化と捉えられている。ALS、パーキンソン病、ピック病、FTLD、アルツハイマー病などがある。これらの疾患研究において、

「凝集体」の存在自体は患者組織切片などにより調べられてきたが、凝集体形成過程や、凝集体が神経変性へ及ぼす直接的な影響については未解明な事象が多い。「凝集体」は、神経を保護したり神経変性を遅らせたりするための防御策ではないのか？本研究では「凝集体」とニューロン死の時間軸に着目し、凝集体形成からニューロン死までのイベントを、蛍光蛋白質の機能と顕微鏡技術とを駆使したライブイメージングで調べていく。ここに、本研究の目的を「ALS モデルマウス病態変化過程の 1 細胞イメージングから行う細胞死の解明」と位置付けた。

本研究では、TDP-43 に着目した。TDP-43 は FTLD で凝集体形成が最初に見出され、最近では ALS の患者組織で、その後アルツハイマー病でも凝集体形成が報告されている(文献)。よって、TDP-43 は、FTLD、ALS、アルツハイマー病の神経変性に大きくかかわっていると考えられている。近年、ALS 患者の遺伝子から TDP-43 のアミノ酸変異が報告されており、この TDP-43 の変異が原因で細胞内に凝集体が形成されてニューロン死に至ると考えられている。

凝集体には TDP-43 の他にも複数同定されているが、凝集体が細胞へ与える影響は具体的になっていない。TDP-43 にはカスパーゼによって切断される部位が複数あり、細胞内での挙動は複雑であることが予想される。そして神経変性は長い時間掛けて緩やかに起こるため変化の検出が難しい。詳細を調べるには、長期間の細胞イメージングにより TDP-43 凝集体を可視化し、TDP-43 凝集体の形成と神経変性の開始、そしてニューロン死への関わり方を明らかにしていく必要がある。

具体的には、本研究課題において「細胞内変化」の事象、すなわち(A)TDP-43 のリン酸化、(B)TDP-43 の断片化、(C)断片化された TDP-43 のユビキチン化、(D)細胞内凝集体形成の事象の順序を明確にし、ALS モデルマウスの病態悪化過程との比較により「生体変化」と「細胞変化」の時間軸の照合を行う。「生体変化」としては健康な人と変わらない時期において「細胞内変化」では何が起きているのかを調べることを目的とした。

TDP-43 を例に凝集体に関わる細胞内分子や周囲の細胞などを含めた細胞外の因子を調べ、神経変性疾患における「凝集体」の意味の解明を目指して本研究を進めてきた。

3. 研究の方法

「凝集体」に起因する神経変性過程を可視化するために、プローブ開発からイメージング解析まで行った。培養デッシュの細胞で凝集体の形成は起こるだろうか、それによりニューロン死は引き起こされるのだろうか。この現象の再現を培養デッシュで試みた実験を本研究の基盤として、3年間の研究を進めてきた。

ALS モデルマウスの神経細胞で、長時間の凝集体イメージングを行い、TDP-43 変異体の挙動を調査した。更に、1細胞の解析からもう一度 *in vivo* の解析へ戻り、ALS モデルマウスの病態悪化に伴う神経変性程度を免疫染色やウエスタンブロット、RT-PCT などにより調査した。

ALS と凝集体形成と神経変性との時間軸について1細胞の凝集体形成過程から *in vivo* の ALS 病態までの結果を総合して考察し、本研究のまとめとした。

4. 研究成果

まず、「細胞変化」を検出するために行ったそれぞれの実験についての成果を以下に述べる。培養デッシュにおいて細胞内凝集体に起因するニューロン死を再現することを目標とした課題においては、培養皿中の凝集体形成が起こったニューロンを追跡し続けるところが困難であり、凝集体形成と細胞死とを一連の現象として捉えるまでには至らなかったものの、細胞内凝集体に含まれる TDP-43 が断片化された状態であることがわかった。TDP-43 の C 末端と N 末端に別の色の蛍光蛋白質を融合させた TDP-43 断片化インディケータの遺伝子コンストラクトを作製し、これを HeLa 細胞に導入して発現させたところ、核移行シグナルを有する TDP-43 が核内に局在するので、核では2色の蛍光蛋白が発現していた。一方で、TDP-43 が断片化した後は片方または両方の蛍光蛋白質から切り離された状態になり、核移行シグナルを含まない領域は細胞質にも漏れ出てくることを可視化でき、その細胞質内凝集体は単色だった。そのことから、細胞で発現した TDP-43 は核内で少なくとも2つまたはそれ以上に断片化し、断片が細胞質へ漏れ出て凝集体を形成すると推測できた。

また、変異型 TDP-43 を複数種類比較して凝集体形成度合いを調べたところ、変異型 TDP-43 の遺伝子を HeLa 細胞へ導入した場合には、A382T(382番目のアラニンがトレオニンに変異した遺伝子)の変異型で高頻度に細胞内凝集体形成が起こる結果を得た。これは凝集体形成の研究を効率よく行うためにも有用であり、凝集体の性質の

詳細を調べるためにも有用な情報を得たと考えている。

in vitro ニューロン死カスケードの開始を知らせるプローブ開発と長時間イメージングによるニューロン死の調査を進めていたが、本研究期間中には、ニューロン死を培養デッシュ上で再現することができなかった。ニューロン死を捉えられなかったものの、その検討の過程では注目すべき現象をいくつか発見した。ALS モデルマウスより採取した神経細胞に接触している支持細胞の TDP-43 発現量が多かったことも研究の過程で発見した注目すべき現象であると考えている。この発見も本研究の成果とし、今後の ALS 研究に生かして行きたい。

次に「生体変化」として ALS モデルマウスを用いて行った実験の成果を以下に述べる。ALS モデルマウスの「生体変化」を個体で調べるために、2ヶ月齢、4-5ヶ月齢、7-8ヶ月齢、22ヶ月齢のモデルマウスから脳脊髄を採取し、主に病理染色と免疫染色、ウエスタンブロットにより、生体変化を調査した。

まず、一般病理染色用に、脳から脊髄を16ブロックに分け、4ヶ月齢、8ヶ月齢のモデルマウス4匹ずつの切片を作製し、HE染色と神経特殊染色(KB染色、Bodian染色)を行い、観察したところ、野生型とALSモデルマウス2種類との間で、目に見える有意な神経前角の神経細胞死の検出はなく、蛍光抗体染色を用いてより詳細に調べる必要があることがわかった。

そこで、22ヶ月齢のモデルマウスから脳脊髄を採取し、頸椎膨大部周辺の脊髄切片を運動ニューロンのマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼ抗体(anti-ChAT)で染色したところ、野生型マウスとALSモデルマウスの間で脊髄前角の運動ニューロンの大幅な減を検出した。また、TDP-43タンパク質の異常な細胞内蓄積も検出し、8ヶ月齢のALSモデルマウスにおいてはTDP-43陽性の細胞内凝集体が検出された。更に若い月齢のALSモデルマウスでも解析を行っていく必要があると考え、現在2ヶ月齢、4-5ヶ月齢、7-8ヶ月齢のマウスからの脳脊髄採取を終えたところである。

「細胞変化」と「生体変化」との時間軸の照合は本研究の開始当初の大目標には至っていないが、それぞれの事象や時間軸で明らかにできたこともあり、研究過程で予期せぬ発見もあったことから、本研究はおおむね順調に研究が進展したと考えている。現在、組織切片の蛍光抗体染色後の論文報告準備を進めている。

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)

Hasegawa M., Hara-Miyauchi C., Ohta H., Sakimura K., Okano H., Okano H. J. Analysis of RNA metabolism in peripheral WBCs of TDP-43 KI mice identifies novel biomarkers of ALS. *Neuroscience Research* 2015, Dec 7 [Epub ahead of print]

Kobayashi R., Takahashi-Fujigasaki J., Shiozawa S., Hara-Miyauchi C., Inoue T., Okano H. J., Sasaki E., Okano H. a-Synuclein aggregation in the olfactory bulb of middle-aged common marmoset. *Neuroscience Research* 2015, Nov 28 [Epub ahead of print]

[学会発表](計10件)

原央子、岡野ジェイムス洋尚

TAR DNA binding protein-43(TDP-43)に変異を持つ筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭変性症の動物モデル

成体脳ニューロン新生懇談会 2014年12月東京大学柏の葉キャンパスフューチャーセンター Oral session

原央子、伊達悠岳、長谷川実奈美、小林玲央奈、藤ヶ崎純子、向後直美、佐野千枝、小林祐樹、鈴木則宏、糸原重美、岡野栄之、岡野ジェイムス洋尚

Multimodal and exclusive pathology between ALS and FTLN caused by TDP-43 mutations
第37回日本神経科学会 poster session

長谷川実奈美、原央子、岡野ジェイムス洋尚
ALS発症における末梢血中バイオマーカーの検索
第37回日本神経科学会 poster session

小林玲央奈、原宮内央子、小澤史子、高橋 藤ヶ崎純子、岡原純子、佐々木えりか、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之

変異型 a-Synuclein トランスジェニックマウスモデルにおけるレビー小体の検索
第37回日本神経科学会 poster session

C.HARA-MIYAUCHI, Y.DATE, M.HASEGAWA, R.KOBAYASHI, J.FUJIGASAKI, N.KOGO, C.SANO, Y.KOBAYASHI, N.SUZUKI, S.ITOHARA, H.OKANO, H.J.OKANO

Multimodal and exclusive pathology between ALS and FTLN caused by TDP-43 mutations. Society for Neuroscience 2014. NOV. 16, Washington, poster session

M. HASEGAWA, C. HARA-MIYAUCHI, H. J. OKANO

Development of biomarkers in peripheral blood cells of ALS model mice. Society for Neuroscience 2014. NOV. 16,

Washington, poster session

R.KOBAYASHI, C.HARA-MIYAUCHI, F.OZAWA, K.TAKAHASHI-FUJIGASAKI, J.OKAHARA, E.SASAKI, H.J.OKANO, H.OKANO

Searching for a Lewy body in a mutated a-Synuclein(A30P) transgenic marmoset. Society for Neuroscience 2014. NOV. 17, Washington, poster session

小林玲央奈、原(宮内)央子、小澤史子、岡原純子、佐々木えりか、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之
TDP-43 プロテノパチーモデルマウスモットの作出 Establishment of a new marmoset model of TDP-43 proteinopathy 第36回日本神経科学会 poster session

Chikako Hara-Miyauchi, Ygaku Date, Minami Hasegawa, Reona Kobayashi, Junko Fujigasaki-Kobayashi, Naomi Kogo, Chie Sano, Yuki Kobayashi, Norihiro Suzuki, Kenji Sakimura, Shigeyoshi Itoharu, Hideyuki Okano, Hiroataka James Okano
Multimodal and exclusive pathology between ALS and FTLN caused by TDP-43 mutations. 2015年再生医療学会 2015.03.19-21

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND/OR FRONTOTEMPORAL LOBAR DEGENERATION MODEL MOUSE
発明者: OKANO Hideyuki, OKANO James Hiroataka, MIYAUCHI Chikako
権利者: Keio University
種類: PCT
番号: 13796611.5-1405 PC/JP2013065029
出願年月日: 2013.05. 30
国内外の別: 国外(PCT出願、各国移行手続き完了)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 央子 (HARA CHIKAKO)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40528452

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし