	いしい　ともひろ
氏名	石井　智裕
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	博士甲第 4718 号
学位授与の日付	平成 29 年 9 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 凝集体モデルの確立
論 文 審 査 委 員	（主査）教授　三澤　日出巳（博士（薬学））
	（副査）教授　杉本　芳一（薬学博士）
	教授　齋藤　英胤（医学博士）

論文内容の要旨

【背景】筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS)は上位及び下位運動ニューロン変性を主徴とする神経変性疾患で，全身の筋肉が徐々に萎縮し，全経過を平均 3-5 年で呼吸不全により死に至る．ALS の原因は様々な説が提唱されているが，その未だ不明な点が多い．ALS のうち，約 10%が家族性で残りが孤発性である．近年，遺伝子解析技術の進歩により現在では 40 を超える ALS 原因遺伝子が同定されている．また，ALS の臨床症状も様々で，認知症を伴うケースも多数存在する．このように，ALS は症例により異なる病態や遺伝的背景を持つにも関わらず，約 97%の症例において TAR DNA binding protein 43kDa (TDP-43)が凝集体を形成するという共通の病理所見を示すことが近年明らかとなった．また，TDP-43 の凝集体は 45%の前頭側頭型認知症(Frontotemporal lobar dementia; FTD)症例，さらに一部のアルツハイマー病においても確認されている．TDP-43 の凝集体は ALS に限った所見ではないことから，現在では TDP-43 が蓄積する神経変性疾患を TDP-43 proteinopathy (TDP-43 蛋白症)と呼ぶ．蛋白凝集は他の神経変性疾患でも中心的な病理所見であり，アミロイドβ(Aβ)やα-synuclein, tau などの蛋白も認知症やパーキンソン病などの神経変性疾患で凝集することが確認されている．TDP-43 は 414 アミノ酸から成る 43kDa の蛋白で，主に核に局在し，一部が細胞質との間を行き来し RNA プロセッシングに関与する．一方，病態下では TDP-43 のほとんどが細胞質内に凝集体を形成し，リン酸化及びユビキチン化修飾を受ける．さらに TDP-43 が特定の部分で切断され，C 末端断片（C terminal fragment; CTF）が凝集体に含まれる．CTF は構造的に不安定であり，凝集性の高い配列としてよく知られている．また，凝集体形成と神経細胞死には様々なメカニズムが関与することが提唱されている．この中でも特に，蛋白分解系の破綻や小胞輸送の障害，核-細胞質輸送障害などが凝集体形成に深く関与することが報告されてきた．さらに，凝集蛋白が細胞間を伝播し新たな細胞で凝集体が形成され，神経変性が進行する凝集体

の伝播，いわゆるプリオン様仮説が提唱されている．凝集体の伝播仮説は Aβ や α-synuclein，tau などの凝集蛋白では実験的に立証されているが，TDP-43 関しては未だ不明な点が多い．現在まで，TDP-43 凝集体モデルの作製に関する多くの研究がなされているにも関わらず，適切な病態モデルはほとんどない．そこで，病態をより忠実に再現したモデルを作製することが重要視されている．本研究では，神経幹細胞を用いることで，生体に近い神経細胞の培養を確立した．神経幹細胞より誘導した神経細胞へ TDP-43 wild type (WT)及び CTF を導入し，プロテアソーム阻害剤 MG-132 で処理すると細胞質に凝集体が形成された．さらに，凝集体形成過程をタイムラプスイメージングにより観察した結果，凝集体形成と細胞死の関連性，及び凝集体の細胞間伝播が明らかとなった．

【実験方法】培養神経細胞を得るために成体ラット顔面神経核より神経幹細胞 1464R を樹立した．株化した 1464R は EGF 及び bFGF 存在下で増殖させた．この細胞を分散させ，レチノイン酸（ATRA）で分化させた後，DsRed をタグとして付加した wild type 及び CTF (208-414aa)の TDP-43 をアデノウイルスベクターにより遺伝子導入を行った（以下 TDP-43(WT+CTF)とする）．導入後，プロテアソーム阻害剤である MG-132 を最終濃度 0.5μM で 24 時間インキュベートした．この細胞について細胞免疫染色及びウエスタンブロッティングを行った．免疫染色法では，細胞を 4%PFA で固定後，TDP-43，phosphoTDP-43，Ubiquitin，TuJ1 抗体を用いて免疫染色を行った．透過型電子顕微鏡の観察のために，細胞をグルタルアルデヒド溶液で固定後，オスミウム溶液で後固定し，エポン中に包埋した．このブロックを超薄し，鉛染色後，透過型電子顕微鏡で観察した．ウエスタンブロッティングでは，細胞を界面活性剤で段階的に可溶化し，可溶性及び不溶性分画を作製した．各分画ライセートを SDS-PAGE で泳動後，PVDF 膜にブロッティングした．これを TDP-43，phosphoTDP-43 抗体で検出し，凝集体の不溶性を評価した．次に，凝集体形成を観察するためにタイムラプス蛍光イメージングを行なった．まず，tubulinβⅢプロモーター制御下で EGFP または Sirius（青色蛍光）を発現する安定発現株 1464RTBG 及び 1464RTBS を作製した．この細胞を分化させた後，EGFP または DsRed のタグを付加した WT 及び CTF を導入し，MG-132 を添加後から 15 分間隔で最長 72 時間の蛍光タイムラプスイメージングをおこなった．また，MG-132 の代わりにプロテアソームに対する shRNA(shPSMC1)をアデノウイルスベクターにより導入し，同様のタイムラプスイメージングを行なった．さらに，アストロサイト及びオリゴデンドロサイトマーカー分子である GFAP 及び CNPase プロモーター制御下で EGFP を発現する細胞株である 1464RGFAPpEGFP 及び 1464RCNPpEGFP を樹立した．これらの細胞を分化させ，同様に TDP-43(WT+CTF)を導入し，MG-132 を添加してからタイムラプスイメージングを行なった．分化ニューロンにおける凝集体の細胞間伝播を検証するため，分化 1464R 細胞へ凝集体を形成させ，1464RTBG 細胞

または 1464REGFP-TDP43.WT 細胞株と共培養を行った．2-5 日後，細胞を固定し，EGFP 陽性細胞を共焦点顕微鏡で観察した．また，定量的解析のため，EGFP または EGFP-TDP43.WT 陽性細胞内における DsRed の輝度値及び凝集体を有する細胞数を計測した．コントロールとして分化 1464R 細胞へ DsRed を発現させ，MG-132 で処理した細胞を用いた．

【結果】神経幹細胞 1464R を EGF 及び bFGF 存在下，非接着 dish 内で培養することで，neurosphere を形成し，増殖させた．この sphere を分散させ，ATRA を加えて接着条件下で 2 日以上培養することで，70-80%の細胞が神経細胞マーカーである tubulinβⅢ陽性であることを確認した．残りの細胞は Glial fibrillary acidic protein (GFAP)または O4 陽性のグリア細胞であった．一度分化させると，細胞分裂が停止し，それ以上増殖しないことを確認した．この条件では 1464R 細胞から生体に近い神経細胞を誘導することができた(分化 1464R 細胞とする)．この分化 1464R 細胞へ DsRed のタグを付加した WT 及び CTF を発現するアデノウイルスを導入すると，DsRed は核及び細胞質に局在が見られた．この系において，凝集性が高いとされる CTF を過剰発現しただけでは，明らかな凝集は見られなかった．一方，ここに MG-132 を添加すると，細胞質に粗大な凝集体が形成され，核の局在シグナルも減少した．この細胞を免疫染色により確認したところ，DsRed 陽性の凝集体はリン酸化及びユビキチン化修飾を受けていた．さらに，この凝集体の超微形態を電子顕微鏡で観察すると，粗大な凝集体は膜構造を有しておらず，主に電子密度の高い顆粒状構造物が集積したものであった．またミトコンドリアやリソソームなどの細胞内オルガネラも含まれていた．

次に凝集体を形成した細胞を Tris/TritonX-100/Sarkosyl または RIPA/Urea buffer で段階的な可溶化ライセートを調整し，ウエスタンブロッティングにより生化学的に解析した．抗 phosphoTDP-43 抗体では Triton-X や RIPA buffer 画分に陽性シグナルはあまり検出されなかったが，sarkosyl 可溶性及び不溶性画分と，Urea 可溶性画分に主に検出された．一方，抗 TDP-43 抗体では，全てのフラクションに同程度のシグナルが検出された．次に，凝集体形成と細胞死との関連性を確かめるため，タイムラプス蛍光イメージングを行った．Tubulin βⅢプロモーター制御下で EGFP を発現する 1464RTBG 安定発現株を作製し，分化後に DsRed タグを付加した TDP-43(WT+CTF)を導入した．MG-132 非存在下では，EGFP 陽性の細胞内に TDP-43 が導入されている細胞を観察終了時まで追跡することができた．一方，MG-132 を添加した直後から EGFP 陽性の神経細胞について観察すると，約 20 時間後から TDP-43 の凝集体が細胞質に充満し，粗大な凝集体となることを確認した．その後，凝集体を形成した細胞は膨化し，細胞膜の破綻による細胞死を確認した．さらに，細胞死後も DsRed 陽性の凝集体は不溶性のまま 30 時間以上その場に残留することもわかった．ほとんどの細胞がこのような過程を辿るのに対し，凝集体を形成した細胞が破裂し，放出された内容物が隣

接する細胞へ取り込まれる像をいくつか確認した. 次に，DsRed/MG-132, TDP/DMSO, TDP/MG-132 の 3 群の細胞のタイムラプスイメージングを行い，細胞死のイベントを算出し，細胞生存曲線及び細胞生存率を算出し，細胞死に関して定量的解析を行った. 生存曲線解析では，DsRed/MG-132 及び TDP/DMSO 群と比較して，TDP/MG-132 群において有意な細胞死が確認された．また，TDP/MG-132 群は，観察開始から 24 時間では細胞生存率は変わらなかったが，48 時間後においては有意な低下が見られた.

ここまで，神経細胞内における凝集体形成を見て来たが，ヒト症例では TDP-43 の凝集体はグリア細胞にも見られるため, アストロサイト及びオリゴデンドロサイト特異的プロモーター制御下で EGFP を発現する株 1464RGFAPpEGFP 及び 1464RCNPpEGFP を作製し，TDP-43 の凝集体形成についてイメージングをおこなった．両者の細胞においても細胞質内に凝集体が徐々に形成され，粗大な凝集体となり，その後細胞膜の破綻による細胞死を確認した. さらに, 稀ではあるが, 凝集した TDP-43 が隣接する細胞へ取り込まれることを確認したため, 凝集体の細胞間伝播について検証した．分化 1464R 細胞へ TDP-43 凝集体を形成させ，1464RTBG1 細胞と共培養を行うと，2 日後，EGFP 陽性細胞内に DsRed のシグナルを有する凝集体が確認できた．この DsRed の輝度値を算出し，定量化すると，コントロール群と比較して有意に高値であった．また，凝集体を形成した分化 1464R 細胞と 1464REGFP-TDP43.WT 細胞の共培養を行うと，EGFP-TDP43.WT 陽性細胞内に DsRed のシグナルが検出され，さらに一部の細胞では EGFP のシグナルの共局在が見られた．このように，伝播した凝集体と野生型 TDP-43 が共局在を示す細胞の割合は，共培養 3 日目と比べ 5 日目の方が有意に上昇した.

【考察】我々の樹立した神経幹細胞 1464R は，EGF 及び bFGF 存在下で培養することで株化細胞として用いることができた．また，ATRA により分化させることで，神経細胞を再現よく誘導することができた．分化形態の安定性や調製しやすさなどの点から，培養神経細胞モデルとして適した細胞がない中で，この細胞の有用性が示された．TDP-43 の凝集体形成に関する先行研究は多数報告されており，例えば，293 細胞へ CTF をトランスフェクションするだけで凝集体が形成される．しかしながら，本研究では，CTF の導入のみでは明らかな凝集体は確認されなかった．これは用いる細胞と遺伝子導入法の違いの可能性がある. トランスフェクションにより凝集体の前段階とも言われる stress granule が形成されることが報告されているが，本研究では CTF の導入に加え，プロテアソームを抑制することで粗大な凝集体が形成され，蛋白分解系の破綻が凝集体形成を促進することが示唆された．また，細胞質に形成された TDP-43 凝集体はリン酸化及びユビキチン化の翻訳後修飾を受けており, 超微形態においても凝集体の成分とされる顆粒状構造物とミトコンドリア, ライソソームなどのオルガネラが凝集体に引き込まれる点がヒト ALS 及び FTLD-TDP 病理に類似していた. 生化学的には,

リン酸化 TDP-43 が Triton-X100 や RIPA 画分に少なかったことから, 不溶性の性質を示すことがわかった．さらに，リン酸化修飾は CTF 優位に起こることがわかった．免疫染色の結果，細胞質の凝集体がリン酸化 TDP-43 抗体陽性であり，凝集体には WT よりも CTF が多く含まれていたため，CTF のリン酸化バンドが強く検出された可能性がある．

一方，タイムラプスイメージングは，細胞内の一連のイベントを経時的に確かめるために有用なツールである．本研究では，TDP-43 の凝集体形成と神経細胞死の関連性が明らかとなった．凝集体は細胞質に徐々に充満することにより形成されること，細胞死はおもに，細胞膜の破綻とともに起こることがわかった．また，細胞死後も凝集体はその場に 30 時間以上もの間残存していた．さらに，グリア細胞内凝集体（Glial cell inclusion; GCI）についても再現することができ，神経細胞と同様に細胞死を誘導することがわかった．MG-132 はプロテアソーム阻害剤として知られる一方，一般的に使用する濃度 10 μM では細胞死を誘導することが懸念されている．しかし，今回使用した濃度 0.5 μM の濃度では，MG-132 による細胞死の影響は少ないと考えている．一方，凝集体形成細胞と正常な細胞との共培養では，凝集体が正常な細胞へ取り込まれ，正常細胞内の野生型 TDP-43 を巻き込んだ凝集体シグナルが検出された. これは凝集体のシード能を示唆すると考えられるが, 伝播した凝集体のさらなる粗大化は確認されていないため，今後検討する必要がある．

【結論】TDP-43 の病理を忠実に反映する培養細胞モデルを作製し，凝集体形成と細胞死の関連性, 及び凝集体の細胞間伝播を新たに明らかにした. この系を用いることで, TDP-43 の凝集体伝播メカニズムの解明や ALS の病態進行を抑制する創薬スクリーニングへ応用することが期待できる．

論文審査結果の要旨

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭型認知症（FTD）の変性神経細胞において観察されるユビキチン陽性封入体の主要構成タンパク質であり、病理診断のマーカーとしての有用性が確立している。TDP-43 は不均一核内リボ核酸タンパク質(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins：hnRNP）の一種で、通常は核に局在する。ところが病態下においては、本来は核に局在するはずの TDP-43 が、残存する運動ニューロンやグリア細胞の細胞質や突起内に封入体として蓄積することが観察される。TDP-43 の細胞質への移行と凝集体形成については、培養細胞やモデル動物を使って様々な解析がなされているが、病気の原因であるか結果であるかについては専門家の間でも議論が分かれている。また、病気の進行に伴い TDP-43 の凝集体が細胞間を伝播し

て疾患が拡がる「プリオン様伝播仮説」が唱えられているが、その証拠蓄積は十分ではないと考えられている。

本博士論文において申請者は、損傷運動神経核から独自に開発したラット神経幹細胞(1464R) を用い、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに特異的に分化させる条件を確立した。また、この細胞系にアデノウイルスベクターを用いて TDP-43 及びその C 末端断片を高効率に発現させ、プロテアソーム阻害剤を投与することで、ヒト病態と類似の性状を備えた TDP-43 凝集体の作製に成功した。このモデル細胞系をタイムラプスイメージング法で詳細に解析することにより、申請者は、①プロテアソーム阻害が TDP-43 凝集体の形成のトリガーとなること、②TDP-43 の凝集体形成は細胞死の原因となる可能性が高いこと、③細胞外に放出された TDP-43 凝集体が隣接する細胞に取り込まれて新たな凝集体形成のシードとなること、などを示した。さらに上記の知見を踏まえ、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、ラットの運動神経にヒト病態と類似した TDP-43 凝集体の in-vivo 形成させることにも成功している。以上は、TDP-43 の病態形成メカニズムに重要な知見を加えるとともに、今後の病態解析や創薬に有用な細胞および動物モデルを提供するものであると評価できる。

申請者は、上記の結論を得るため、様々な実験手法を組み合わせた厚みのある解析を綿密に行ったことが高く評価された。事前の試問や発表会での質問に対しての応答は概ね妥当であった。今回の研究結果のモデルとしての限界やヒト病態へ外挿可能性など、自らの研究の位置づけについても正しく理解していることが示された。

以上より、申請者は博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判断した。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

Tomohiro Ishii, Emiko Kawakami, Kentaro Endo, Hidemi Misawa, Kazuhiko Watabe. Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. *PLOS One*. 2017;12(6): e0179375.