

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	石井 智裕
主論文題名： 筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 凝集体モデルの確立			
<p>(内容の要旨)</p> <p>【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、最終的に呼吸不全により死に至る。平均生存期間は発症から 3-5 年である。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。さらに、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。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 に関しては未だ不明な点が多い。TDP-43 の凝集体形成メカニズムを解明するためには病態モデルが不可欠であるが、特に培養細胞系では病態を忠実に反映したモデルは数少ない。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。また、神経細胞内の TDP-43 凝集体形成を試み、凝集体の性質について詳しく解析した。さらに凝集体と細胞死の関連性、及び凝集体の細胞間伝播に関する検証を行なった。</p> <p>【実験方法】成体ラット顔面神経核より幹細胞 1464R を樹立した。この細胞をレチノイン酸 (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) TDP-43 を発現するアデノウイルスを感染させ、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</p>			

阻害剤である MG-132 を最終濃度 0.5 μ M 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. 免疫染色法は, 細胞を 4% PFA で固定後, TDP-43, phosphoTDP-43, Ubiquitin, TuJ1 抗体を用いて行った. また, 細胞をグルタルアルデヒドで固定し, オスミウムで後固定を行なった. その後細胞をエポン中に包埋し, 超薄した切片を鉛染色し, 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, tubulin β III 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 付加後から 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) を発現するアデノウイルスを導入し, 同様の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の検証については, 以下 3 つの方法により評価を行なった. (1) 凝集体を形成した細胞を破砕し, 得られたライセートを新たな細胞へ添加した. 2 日後に細胞を固定し, 免疫染色を行なった. (2) 1464R 細胞へ TDP-43 凝集体を形成させた後, 1464RTBG 細胞を添加し, 2 日間の共培養を行なった. (3) (1) のように, 1464R 細胞へ凝集体をとりこませ, その後 1464RTBG 細胞を添加し, 2 日間共培養を行い, EGFP 陽性細胞内の凝集体について評価した.

【結果】 1464R を ATRA で処理し, 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 tubulin β III 陽性であることを確認した. 残りの細胞はアストロサイトのマーカーである GFAP またはオリゴデンドロサイトのマーカーである O4 陽性の細胞であった. この細胞へ TDP-43(WT+CTF) を導入すると, 核及び細胞質に局在が確認されたが明らかな凝集体は確認されなかった. ここへプロテアソーム阻害剤である MG-132 を付加すると, 24 時間後, 細胞質内に粗大な凝集体が形成され, リン酸化及びユビキチン化修飾を受けていた. 細胞を透過型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, 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, この細胞を界面活性剤で段階的に可溶化すると, リン酸化 TDP-43 は Triton-X や RIPA buffer, sarkosyl に対し不溶性であった. 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. 神経細胞をラベルした細胞株 1464RTBG へ WT+CTF を導入し, MG-132 を付加してからイメージングを開始した. 約 20 時間後から TDP-43 の凝集体が細胞質に徐々に充満し, 粗大な凝集体となることを確認した. その後細胞は膨化し, 細胞膜の破綻による細胞死を確認した. さらに, 細胞死後も凝集体は不溶性のまま 30 時間以上残留した. また, 稀ではあるが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事を確認した. 次に, WT へ EGFP, CTF へ DsRed のタグ

を付加し、両者を区別したところ、細胞質に形成される凝集体には WT と CTF 両者が共存していた。また、MG-132 の代わりに、プロテアソームに対する shRNA を導入したところ、核の TDP-43 が細胞質へ移行し、凝集体を形成した。グリア細胞を蛍光標識した 1464RGFAPpEGFP 及び 1464RCNPpEGFP 細胞でも同様に実験を行なったところ、アストロサイト及びオリゴデンドロサイト内に同様の凝集体を確認した。最後に、タイムラプスイメージングで観察された凝集体の取り込みについて、3つの実験により検証した。凝集体を形成する細胞からライセート新たな細胞へ添加すると、TuJ1 細胞内に TDP-43 陽性の凝集体を確認した。さらに、凝集体を形成した 1464R 細胞と 1464RTBG 細胞を共培養したところ、EGFP 陽性の細胞内に DsRed の凝集体を確認した。ライセートを取り込んだ細胞と 1464RTBG 細胞を共培養したところ、わずかではあるが、EGFP 陽性の細胞内に凝集体を観察した。コントロールで使用した DsRed に対して、どの実験においても細胞内の凝集体数及び取り込んだ細胞内の DsRed の輝度値が有意に高かった。

【考察】株化神経幹細胞 1464R を分化させることで、生体に近い神経細胞を再現よく誘導することができた。凝集体形成は、CTF の導入のみならず、蛋白分解系を抑制することにより促進されることが示された。MG-132 の代わりに、他のプロテアソーム阻害剤 lactacystin や epoxomicin, ALLN またはプロテアソームに対する shRNA を用いても同様に凝集体が形成され、プロテアソーム阻害による共通の効果であることが確認された。また、細胞質に形成された粗大な凝集体は翻訳後修飾から超微形態に至るまで、ヒト ALS 及び FTLTDP 症例に類似していた。培養細胞のタイムラプスイメージングでは、TDP-43 の細胞質凝集体と細胞死の関連性が明らかとなった。わずかに観察された凝集体の取り込みは、凝集体形成細胞との共培養系により明らかとなった。今後は凝集体の細胞死の機構と凝集体の取り込み機構について詳細に調べることが課題である。

【結論】TDP-43 の病理をより忠実に反映する培養細胞モデルを作製した。また、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示唆された。