

博士論文 平成 29(2017)年度

筋萎縮性側索硬化症における

TDP-43 凝集体モデルの確立

要約版

慶應義塾大学大学院薬学研究科

石井智裕

## 目次

第1章.	背景.....	3
第1-1節.	研究背景.....	3
第1-2節.	緒言.....	5
第2章.	実験方法.....	7
第2-1節.	細胞培養方法.....	7
第2-2節.	1464R 安定発現株の作製.....	7
第2-3節.	組換えアデノウイルスの作製.....	7
第2-4節.	アデノウイルスによる遺伝子導入.....	8
第2-5節.	TDP-43 凝集体形成実験.....	8
第2-6節.	蛍光免疫染色法と顕微鏡による撮影方法.....	8
第2-7節.	透過型電子顕微鏡 (TEM).....	9
第2-8節.	細胞ライセートの段階的可溶化法.....	9
第2-9節.	ウエスタンブロット法.....	9
第2-10節.	培養細胞のタイムラプスイメージング.....	9
第2-11節.	細胞生存曲線と細胞生存率の解析.....	10
第2-12節.	凝集体の細胞間伝播の検証.....	10
第2-13節.	凝集体伝播の定量的解析.....	10
第3章.	結果.....	11
第3-1節.	神経幹細胞 1464R からの神経細胞の分化誘導.....	11
第3-2節.	分化 1464R 細胞へのヒト TDP-43 遺伝子の導入.....	11
第3-3節.	神経細胞内での TDP-43 凝集体の翻訳後修飾.....	12
第3-4節.	TDP-43 導入細胞内における超微形態.....	12
第3-5節.	TDP-43 凝集体の生化学的性質.....	12
第3-6節.	他のプロテアソーム阻害剤による TDP-43 凝集体形成の検討.....	13
第3-7節.	1464R 細胞における TDP-43 凝集体形成過程のタイムラプスイメージング.....	13
第3-8節.	凝集体の細胞間伝播の検証.....	16
第4章.	考察.....	18
第4-1節.	培養神経細胞モデルとしての妥当性.....	18
第4-2節.	分化 1464R 細胞内での TDP-43 凝集体形成.....	18
第4-3節.	凝集体の詳細な性質.....	18
第4-4節.	凝集体形成におけるプロテアソームの関与.....	19

第4-5節.	タイムラプスイメージングによる TDP-43 凝集体形成と細胞死 .....	20
第4-6節.	TDP-43 の凝集体の伝播.....	20
第4-7節.	結論.....	21
第4-8節.	研究倫理.....	22
第5章.	謝辞.....	23
第6章.	参考文献.....	24

## 第1章. 背景

### 第1-1節. 研究背景

ALS は上位及び下位運動ニューロンが進行性に脱落することを主徴とする神経変性疾患で、上位運動ニューロンの脱落により軸索が下降する脊髄側索部が萎縮し、下位運動ニューロン変性により脊髄前角が萎縮し、そこから投射する筋肉は群性神経原性萎縮を呈する。発症時期は60から70代が最も多く、初めは四肢の痺れから始まり、やがて運動麻痺が全身へ現れる。最終的には呼吸筋麻痺による呼吸不全で全経過が平均3-5年で死に至る。有病率は10万人あたり7-11人とされ、日本では約9,400人の患者が存在し、特定疾患にも認定されている<sup>1)</sup>。現在、有効な治療法は存在せず、治療薬には唯一リルゾールとエダラボンが承認されているが、延命効果を期待するもので、根本的な治療薬及び治療法はない。

ALS患者のうち、約10%は原因遺伝子が特定されている家族性(familial ALS; fALS)で、残りの90%は孤発性(sporadic ALS; sALS)である。fALSの原因遺伝子としては1993年、superoxide dismutase 1 (SOD1)が初めて報告された<sup>2)</sup>。SOD1の変異はfALSの約20%を占める。近年のexome sequence解析の向上により、ALS関連遺伝子は40以上報告された<sup>3)4)</sup>。しかし、その後の長い間、SOD1変異以外のALSの原因は不明であった。

以前から、ALSでは脊髄前角運動ニューロン内にBunnie小体と呼ばれる凝集体がHE染色法により確認されることが重要な所見であった。さらに運動ニューロンの細胞体(胞体)が白く抜けたクロマトリシスや、リン酸化ニューロフィラメントの蓄積により生じる軸索腫大(スフェロイド)も特徴の一つであった。また、免疫染色法の発展により、ユビキチン陽性の封入体(凝集体)が確認され、何らかの構造物が細胞内に蓄積することがわかってきた。この神経細胞内の封入体はALSに限らず、Alzheimer病やParkinson病など、他の神経変性疾患においても報告されていた。Alzheimer病ではamyloid  $\beta$ (A $\beta$ )やtau、Parkinson病では $\alpha$ -synucleinが凝集体に含まれることがわかっている中、2006年に2つの研究グループがALS及びFrontotemporal dementia / Frontotemporal lobar degeneration (FTD/FTLD)においてTAR DNA binding protein 43kDa (TDP-43)が凝集体の主たる構成成分であることを報告した<sup>5)6)</sup>。これらの症例で、細胞質に凝集したTDP-43はリン酸化、ユビキチン化修飾を受け、さらに、特定の部位で切断され、凝集性の高いC末端断片(C terminal fragment; CTF)が凝集体に含まれることがわかった。

その後数多くの剖検例から、TDP-43の凝集体はALS患者の約97%、及びFTD患者の約45%に見られることがわかり<sup>7)</sup>、さらに2008年には初めて、fALSにおけるTDP-43の遺伝子変異が報告された。現在、TDP-43の凝集体は病理診断上最も重要な所見の一つとなり、神経変性への関与が一層強く示唆された。また、ALSにおけるTARDBP遺伝子変異は40以上にのぼり、そのほとんどはアミノ酸のC末端領域に存在する。

TDP-43 は *TARDBP* 遺伝子にコードされる 414 アミノ酸(414aa)から成る蛋白で, human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)の long terminal repeat (LTR)に結合し, 活性化する遺伝子として同定された<sup>8)</sup>. TDP-43 分子はいくつかの特徴的な配列を有する. 細胞内局在を規定する nuclear localization signal (NLS)(82-98aa) および nuclear export signal (NES)を含み, 通常では 9 割以上が核に局在し, 一部は核と細胞質の間を行き来する. また, 2 つの RNA recognition motif (RRM) (RRM1 及び RRM2)は塩基配列 UG-repeat を認識し RNA と結合する<sup>9)</sup>. そして最も特徴的なのが C 末端領域に存在する glycin rich domain (GRD) (274 - 414aa)であり, プリオン様ドメイン(prion like domain)とも呼ばれる. 後述するように, C 末端領域が凝集体形成に最も深く関与する. TDP-43 はその遺伝子配列と RNA 結合モチーフから, heterogeneous nuclear ribonucleo-proteins (hnRNPs)ファミリーに属する<sup>10)</sup>. また, TDP-43 中の RRM1(101-176 aa)及び RRM2(191-262aa)配列は, cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR)遺伝子の exon 9 のスプライシングを制御することが生理的機能として初めて報告され<sup>11)</sup>, 現在では生理的機能は多岐にわたることがわかっている. また, TDP-43 が結合する RNA の網羅的解析により, 約 4,000 種類の RNA に結合することがわかった<sup>12),13)</sup>. また, TDP-43 はスプライシングのみならず, 転写, RNA の輸送や安定化, microRNA の発現制御にも関与することがわかり, RNA プロセッシングにおける重要な分子であることが明らかとなった<sup>11),14),15),16)</sup>. 一方, TDP-43 は他の hnRNPs ファミリー分子である hnRNPA1 及び A2 と結合し, スプライシング機能の制御を行う. さらに, microRNA の成熟に必要な Drosha や Dicer と結合することも明らかとなった. このように, TDP-43 は核酸及び蛋白質の両者に結合し, RNA 代謝の重要な役割を担っている. 近年では ALS-FTD では異常な cryptic exon による TDP-43 の病態が出現することが報告され, RNA 代謝と神経変性疾患の関連性が一層注目されている<sup>17)</sup>.

TDP-43 の C 末端領域である 274-414aa は, glycine および glutamine/asparagine (Q/N)残基に富んでおり, この領域の約 80%が構造的に無秩序かつ不安定であることがわかっている.

神経変性には様々な遺伝的要因及び細胞内の機能傷害が交絡し, その病態は複雑であるにも関わらず, ALS 患者のほとんどに TDP-43 の凝集体が観察されることは驚くべきことである. これは, TDP-43 の蛋白凝集体という表現型に集約されるためと考えられる. したがって, TDP-43 の凝集体形成のメカニズムを解明することは, 病態を理解し, 治療的戦略を立てる上で不可欠である.

TDP-43 が凝集体に含まれ, さらに fALS において *TARDBP* 遺伝子変異が報告されて以来, TDP-43 の凝集体モデルを作製するための研究が数多くなされてきた. 野生型及び変異型 TDP-43 を発現するトランスジェニックマウスは特に精力的に行われ, その表現型や病態が調べられた<sup>18),19),20),21)</sup>. しかしながら, 表現型の一部は ALS の病理と一致するものの, 忠実に反映するモデルの作製には至っていないのが現状である. これらの研究報告から, 単に TDP-43

を発現させただけでは病態が再現できないことがわかってきた<sup>7),22)</sup>。一方、培養細胞系では、293細胞の他、神経細胞株であるSH-SY5YやNeuro2a, NSC-34を用いてTDP-43 CTFを発現させ、凝集体が形成される報告があるものの病理モデルを忠実に反映したものは数少ない。培養細胞では、生体内のニューロンに近い細胞を樹立することが、病態の反映とニューロンの脆弱性の観点から必要とされる。現に、上記の神経細胞株は生体内のニューロンとは性質が大きく異なることがわかってきており、神経細胞モデルとしての妥当性が疑問視されている<sup>23),24)</sup>。

近年では神経変性を考える上でもう一つ重要な概念である、プリオン様仮説が注目されている。この仮説は、凝集蛋白の細胞間伝播が進行性の神経変性を説明するメカニズムとして提唱され、クロイツフェルトヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)などで知られているプリオン病の病態に基づいている。プリオン病では、何らかの原因で異常型コンフォメーションとなったプリオン蛋白が細胞外へ放出され、正常な細胞へ取り込まれ、正常型コンフォメーションのプリオンと相互作用し、正常型を異常型へ変え、新たな凝集体を形成する。異常型プリオンが凝集体を形成、細胞間を伝播することが連鎖的に進行し、その結果、進行性の神経変性が生じる。さらに、プリオン蛋白のみならず、A $\beta$ , Tau,  $\alpha$ -Synuclein, SOD1, Huntingtin など、他の神経変性疾患で見られる凝集蛋白もプリオン様伝播すると考えられており、実験的に立証されてきた<sup>25),26)</sup>。このように、プリオン様仮説は、神経変性疾患全般に共通するメカニズムである。しかしながら、2006年の報告以降、凝集したTDP-43の細胞間伝播に関する報告はほとんどない。最近では、正常型TDP-43がexosomeを介して細胞間を伝播すること<sup>27)</sup>、ALS患者由来の凝集したTDP-43が細胞内に取り込まれ、鋳型となり凝集体を形成することが報告されたが<sup>28)</sup>、凝集したTDP-43が細胞間を伝播する直接的な証拠には至っていない。この点からも、よりヒトの症例を反映した凝集体モデルの必要性が考えられる。

この様な背景を踏まえ、本研究では、培養細胞及び成体マウスにおけるTDP-43凝集体モデルの作製を新たに作製し、凝集体形成と神経細胞死及び凝集体の細胞間伝播の可能性について検討した。

## 第1-2節. 緒言

これまで、ALS関連遺伝子の他、蛋白分解系の関与に着目し、運動ニューロン内のTDP-43, FUS, SOD1凝集体モデルの作製を目指し、研究を進めてきた。凝集体を形成する野生型および変異型TDP-43やFUSに加え、オートファジーやプロテアソームの分子に対するshRNAを発現する組換えアデノウイルスを顔面神経に接種すると、顔面神経核運動ニューロン内に凝集体が形成されることを報告した<sup>29)</sup>。さらに、凝集体の超微形態を観察したところ、細胞質に形成された凝集体は直径20-30 nmの顆粒状線維状構造物であり、ヒトALS症例に近い形態

であることがわかった。本研究では、培養神経細胞系において同様の凝集体形成を試みた。まず神経細胞モデルを作製するため、成体ラット顔面神経核より神経幹細胞 1464R を樹立した。この細胞をレチノイン酸条件下で分化させると、約 80%の細胞が神経細胞マーカー分子である tubulin $\beta$ III 陽性であった。分化 1464R 細胞へ DsRed をタグとして付加した WT 及び CTF の TDP-43 を発現するアデノウイルスを導入し、プロテアソーム阻害剤である MG-132 を加えると細胞質内に粗大な凝集体が形成された。この凝集体はリン酸化及びユビキチン化修飾を受けており、超微形態では顆粒状構造物の集積であることがわかった。また、この凝集体は界面活性剤に対して不溶性の性質を示し、生化学的にも不溶性であった。次に、凝集体形成過程と細胞死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なった。MG-132 存在下では、TDP-43 の凝集体は細胞質に徐々に充満し、粗大な凝集体が形成された。その後、細胞は膨化し、細胞膜破綻による細胞死を観察した。また、稀ではあるが細胞外に凝集体が放出され、隣接する細胞へ取り込まれることを確認した。この現象を検証するため、凝集体形成細胞から得たライセート添加実験や凝集体形成細胞との共培養実験を行った結果、凝集した TDP-43 の細胞間伝播及びそのシード能の可能性が示唆された。以上の結果を 2017 年 6 月に PLoS One へ報告した<sup>30)</sup>。したがって、要約版へのデータの掲載は割愛する。

## 第2章. 実験方法

### 第2-1節. 細胞培養方法

#### 神経幹細胞 1464R

神経前駆細胞 1464R は成体ラット Fisher 344 の顔面神経核より樹立した<sup>29)</sup>. この細胞の増殖・維持は, poly-2-hydroxyethyl methacrylate (Poly-HEMA) (SIGMA) コーティングした 100 mm dish を用いて, 1% B27/ 2 mM Glutamine/ 1× pen-str/ 10 ng/ml EGF/ 10 ng/ml bFGF in Neurobasal medium (NBB-FE) 培地中で行なった. この細胞を分化させる際は, スフィアを物理的に分散させ, 5% FBS/ 1%B27/ 0.5% N2/ 1× pen-str/ 1 μM ATRA in F12 medium (FFNB-R) 培地中に懸濁し, 適当な細胞数を poly-L-lysine コートしたディッシュまたはカバースリップに播いた. 播種後, 2-3 日間培養した細胞を分化 1464R 細胞とし, 培養神経・グリア細胞系として使用した.

### 第2-2節. 1464R 安定発現株の作製

NBB-FE 中で培養した 1464R 細胞へ薬剤耐性遺伝子を含む目的のプラスミドをトランスフェクションし, 600 μg/ml の G418 により安定発現株を作製した. 樹立した細胞株の一覧を **Table 1** に示す.

**Table 1 1464R 安定発現株一覧**

名称	プロモーター	蛍光蛋白質	ラベリング細胞	薬剤耐性遺伝子
1464RTBBpG	TubulinβIII <sup>31)</sup>	EGFP	Neuron	Neomycin
1464RTBBpS	TubulinβIII	Sirius <sup>32)</sup>	Neuron	Neomycin
1464RGFAPpG	GFAP <sup>33)</sup>	EGFP	Astrocyte	Neomycin
1464RCNPpG	CNPase <sup>34)</sup>	EGFP	Oligodendrocyte	Neomycin

### 第2-3節. 組換えアデノウイルスの作製

組換えアデノウイルスは, pAxCawtit2 または pAxCwit2 ベクター (TaKaRa 社から購入) に目的配列を挿入し, これを 293 細胞へトランスフェクションすることで作製した. 293 細胞に感染させ, ウイルスを継代し, 3 次ウイルス溶液を実際の遺伝子導入実験に用いた.



**Table 2** 作製した組換えアデノウイルスベクター

Name	Promoter	Gene of interest
AxCADsRTDP43.WT	CAG	DsRed-humanTDP43 WT (1-414aa)
AxCADsRTDP43.CTF	CAG	DsRed-humanTDP43 C terminal fragment (208-414aa)
AxCAEGFPTDP43.WT	CAG	EGFP-humanTDP43 WT (1-414aa)
AxCAEGFPDP43.CTF	CAG	EGFP-humanTDP43 C terminal fragment (208-414aa)
AxCADsRed	CAG	DsRed
AxshNC / EGFP	U1 / CMV	shRNA for non-coding, EGFP
AxshPSMC1/EGFP	U1 / CMV	shRNA for PSMC1, EGFP

**第2-4節. アデノウイルスによる遺伝子導入**

少なくとも2日以上培養した分化1464R細胞へ作製した3次ウイルス(**Table 2**)を multiplicity of infection (MOI)が50となるように加え、37°Cで1時間インキュベートすることで遺伝子導入を行なった。

**第2-5節. TDP-43 凝集体形成実験**

分化1464R細胞または分化1464R安定発現株へAxCATDP43.WT及びAxCATDP43.CTFを導入し2日後、培地交換とともにMG-132を最終濃度0.5 μMとなるように加えた。コントロールには同容量のDMSOを加えた。今回の系では、MG-132処理24時間後の細胞を凝集体形成細胞とした。

**第2-6節. 蛍光免疫染色法と顕微鏡による撮影方法**

カバースリップ上で培養した細胞を4% PFAで室温20分間固定した。その後、固定した細胞を-20°Cに冷やしたmethanol中で10分間処理したのち、1×PBS (-)で洗浄し、5% NGS/PBS溶液(ブロッキング溶液)でブロッキングを室温で20分行った。ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を室温で1時間または4°Cで一晩インキュベートした。細胞を1×PBS (-)で洗浄後、ブロッキング液で希釈した蛍光標識二次抗体を室温で45分から1時間インキュベートした。洗浄、核染後に細胞をgelvatolで封入し、OLYMPUS AX80またはTCS SP8 confocal microscopyで観察、撮影した。

## 第2-7節. 透過型電子顕微鏡 (TEM)

アクラフィルム上で培養した細胞を 3%グルタルアルデヒド水溶液で固定し, 1% オスミウム液中で後固定した後, 脱水した細胞をエポン溶液中で包埋した. 超薄切片を酢酸ウラニル水溶液, 酢酸鉛染色液で染色後, 透過型電子顕微鏡で 1,000 倍, 3,000 倍, 10,000 倍の倍率で撮影した. 撮影後のデータをタイリングし, tif 画像に変換した.

## 第2-8節. 細胞ライセートの段階的可溶化法

細胞を Tris buffer (1×protease inhibitor + 5 mM NaF + 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)でチューブへ回収し, ソニケーションを行なった. これを 100,000 ×g で遠心後, 上清を回収し Tris soluble fraction とした. また, ペレットに 1% TritonX-100 を含む Tris buffer を加え, 再びソニケーションを行い, 100,000 ×g で遠心後, 上清を回収し Triton-X 100 soluble fraction とした. 残ったペレットへ 1% sarkosyl を含む Tris buffer を加え, ソニケータで細胞を破碎した. 溶液を 37°C で 30 分間インキュベート後, 100,000 ×g で遠心し, 上清を sarkosyl soluble fraction として回収した. ペレットへ 1×sample buffer を加え, ソニケータで細胞を破碎し, これを sarkosyl insoluble fraction とした. 同様に, RIPA/Urea 分画においても同様の手法によりライセートを作製した. 得られた Tris soluble, TritonX-100 soluble, sarkosyl soluble, RIPA soluble 分画ライセートは, BCA assay kit (Thermo 社)を用いて蛋白濃度を測定した.

## 第2-9節. ウェスタンブロット法

分画ライセートを 10-20 μg を 10% polyacrylamide gel で SDS Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)を行なった. 泳動後, 蛋白は PVDF 膜へ転写し, メンブレンを 5% skim milk/ TBS-T 中でブロッキングを行なった. 5% skim milk/ TBS-T に希釈した 1 次抗体をメンブレンにあて, 4°C で一晩反応させた. 翌日, メンブレンを TBS-T で洗浄し, HRP 標識 2 次抗体を室温で 1 時間あてた. メンブレンを TBS-T で洗浄後, ECL 反応溶液 (GE Healthcare 社)で化学発光シグナルを Ez-Capture (ATTO)で検出した.

## 第2-10節. 培養細胞のタイムラプスイメージング

1464R 安定発現株を Poly-L-lysine コーティングした CELLVIEW glass bottom dish (Greiner 社)中で分化させ, アデノウイルスによる遺伝子導入を行い, 一晩培養した. 翌日, 培地を交換し, 0.5 μM となるように MG-132 を付加後, Deltavision microscopy (GE healthcare 社)にセットし, 1-2 時間以内にタイムラプス観察を開始した. タイムラプスプログラムは, 15 分または 20 分間隔で記録場所を撮影し, 最長 72 時間撮影を行なった. 観察は全て 60 倍油浸レンズ

(PlanApoN 60×, oil, N.A.=1.42)を使用した. なお, Sirius(青色蛍光蛋白)をレポーターとして用いた場合には, sirius の観察はイメージングの直前に1度だけ行った.

### 第2-11節. 細胞生存曲線と細胞生存率の解析

タイムラプス蛍光イメージングの画像を元に, 細胞死のイベントを記録し, 細胞生存曲線を描いた. 細胞死を観察した場合を1とし, その時間を記録した. 72時間の観察終了まで生存していた場合または観察中, 生細胞が観察領域外へ移動し, 解析できなかった場合を打ち切り0とした. 各群において合計個の細胞を解析し, Kaplan-Meier 生存曲線を作成した. また, 生存時間の統計学的有意性は Log-Rank 検定により判定した.

### 第2-12節. 凝集体の細胞間伝播の検証

分化 1464R 細胞へ AxCADsR-TDP43.(WT+CTF)を導入後, 0.5  $\mu$ M MG-132 を付加して凝集体を形成させた. この細胞をセルスクレーパでかき集め, ソニケーションしたものを細胞ライセートとした. このライセートを播種先の細胞数と同数の容量となる分だけ, 別に用意した 1464R 細胞へ添加した. 添加し, 24 時間後に培地を交換し, さらに 24 時間インキュベートした細胞を解析に用いた. さらに, この細胞へ 1464RTBG1 細胞を加え, 共培養を 2 日間行い, 解析も行なった. 一方で, 凝集体を形成させた細胞へ 1464RTBG1 細胞または 1464REGFP-TDP43.WT 細胞をそれぞれ 1:1 または 10:1 の比率で加え, 共培養を 2-5 日間行なった. それぞれの細胞対し, 免疫染色を行い, TCS SP8 共焦点顕微鏡(Leica 社)で撮影した.

### 第2-13節. 凝集体伝播の定量的解析

定量解析には画像解析ソフト ImageJ (ver1.49)を使用した. 1464RTBG1 細胞の EGFP 陽性領域または 1464R 細胞の TuJ1 陽性領域を region of interest (ROI)として記録し, DsRed の輝度値と凝集体の個数を計測し, ヒストグラム及びグラフとして示した. さらに, 群ごとに凝集体陽性(1 つ以上の凝集体が存在する)細胞と陰性細胞へ分類し, 2×2 のクロス表を作成し, Fisher の正確度検定により, 凝集体の取り込みの有意性を判定した.

## 第3章. 結果

### 第3-1節. 神経幹細胞 1464R からの神経細胞の分化誘導

まず初めに, 作製したラット神経幹細胞株 1464R の分化条件を検討した. 1464R は EGF 及び bFGF 存在下で neurosphere として増殖させることが可能である一方, sphere を機械的に分散させ, PLL コート上のカバーガラスに播種し, FFNB-R 培地中で 2 日間培養し, 細胞をマーカー分子で染色したところ, 約 80%の細胞が Tubulin $\beta$ III (TuJ1 抗体)陽性であり, 残りは GFAP または O1 陽性であった<sup>29)</sup>. この3つのマーカーのうち, 2つ以上のマーカーが共陽性の細胞は存在しなかった. 分化に要する時間を検討したところ, TuJ1 細胞が優位となるまでに 2 日以上要することがわかった. 分化後の細胞の population が変化することはなかった. 本研究では FFNB-R 培地で 2-3 日間分化誘導した細胞を分化ニューロン(分化 1464R)として使用した.

### 第3-2節. 分化 1464R 細胞へのヒト TDP-43 遺伝子の導入

分化 1464R 細胞へ MOI=50 となるように AxDsR-TDP43.WT(DsR-WT)または AxDsR-TDP43.CTF(DsR-CTF), 及びその両方(DsR-(WT+CTF))を感染させた. 2 日後に細胞を観察したところ, 全ての条件において約 70%の TuJ1 陽性ニューロンで DsRed のシグナルが観察された. WT を導入したほぼ全ての細胞で DsRed のシグナルが核に局在した. CTF 導入細胞では DsRed のシグナルは細胞質に優位に存在し, いくつか顆粒状構造物の形態も観察された. CTF を発現させるだけで細胞質へ凝集体が形成される報告もあるが<sup>35),36)</sup>, 分化 1464R 細胞へ CTF を導入した際には粗大な凝集体は確認されなかった. 一方, この導入した細胞をプロテアソーム阻害剤である MG-132 を 0.5  $\mu$ M で 24 時間処理した. WT を導入した細胞は, 局在の変化も見られなかったが, pTDP-43 抗体に対して多少陽性を示した. CTF においては pTDP-43 抗体も多少反応し, DsRed シグナルも小さな凝集を形成する様に見えた. 最も顕著であったのが, WT と CTF を共導入した細胞で, DsRed 陽性の大きな凝集体が細胞質に形成され, pTDP-43 抗体に対して強陽性であった(文献 30 Figure1 及び S1 Fig).

凝集体形成が DsRed のタグの影響であることが懸念されるため, EGFP タグを付加した AxEGFP-TDP43.WT(EGFP-WT)または AxEGFP-TDP43.CTF(EGFP-CTF), 及びその両方(EGFP-(WT+CTF))を感染させ, DMSO または MG-132 で処理した細胞を観察した. EGFP のタグを付加した際も, EGFP-(WT+CTF)に MG-132 を付加した細胞で粗大な凝集体が観察され, pTDP-43 抗体に強陽性を示し, その他の条件では顕著な凝集体形成は見られなかった(文献 30 S2 Fig).

これらの結果から, TDP-43 の凝集体形成がそのアミノ酸配列により生じたものであり, タグによる現象ではないことがわかった. 後述する実験では, 凝集体形成は DsR-(WT+CTF)を導入し, MG-132 で処理した細胞である.

### 第3-3節. 神経細胞内での TDP-43 凝集体の翻訳後修飾

ヒト ALS 剖検脳における凝集した TDP-43 はリン酸化, ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることが知られている<sup>37)</sup>. 先程と同様, 一方 MG-132 存在下では, 抗 TDP-43 抗体及び抗 pTDP-43 抗体, 抗 Ubiquitin 抗体共に強陽性で, DsRed 陽性の凝集体と局在が一致した. 抗 pTDP-43 抗体に対する染色性は CTF 単独に比べ, WT 及び CTF の両者を導入した時の方が強い反応を示した(文献 30 Figure 1).

### 第3-4節. TDP-43 導入細胞内における超微形態

次に, 凝集体の超微形態を観察するため, DsR-(DsR-(WT+CTF))を導入し, DMSO 及び MG-132 で処理した分化 1464R 細胞を透過型電子顕微鏡(TEM)により観察した. DMSO を加えたコントロール細胞では, 超微形態の観察においても細胞質に粗大な凝集体は確認されず, さらに強拡大画像ではオルガネラの形態も正常であった. 一方, MG-132 で処理した細胞群では, 境界明瞭だが境界部に膜構造を持たない粗大な凝集体が観察された. また, 凝集体にはミトコンドリアやライソソームなどのオルガネラも引き込まれていた. これらの特徴は, ヒト ALS 症例で見られ, 超微形態レベルにおいても凝集体の性質が類似することが示された(文献 30 Figure 2).

### 第3-5節. TDP-43 凝集体の生化学的性質

次に, 凝集体の界面活性剤に対する可溶性を詳細に調べるため, TDP-43 非導入細胞へ MG-132 処理した細胞, WT と CTF を導入後に DMSO で処理した細胞及び WT と CTF を導入後に 0.5  $\mu$ M MG-132 で 24 時間処理した細胞の 3 群を Tris, 1% TritonX-100, 1% sarkosyl buffer の順に段階的に可溶化した. 全ての画分を SDS-PAGE 後, ウェスタンブロッティング法により解析した. 抗 pTDP-43 抗体で検出したところ, pTDP43 は WT と CTF を導入し, MG-132 で処理した細胞の sarkosyl 可溶性画分及び sarkosyl 不溶性画分にのみ検出された. さらにこの 2 つのフラクションを見ると, TDP-43 のリン酸化反応は CTF 優位に生じており, WT のシグナルはほとんど検出されなかった. 同じメンブレンを TDP-43 に対する抗体でシグナルを検出した. WT と CTF を導入した細胞では, WT 及び CTF は Tris, Triton, sarkosyl 可溶性区分及び sarkosyl 不溶性画分の全てに含まれることがわかった. また, フラクションに含まれる TDP-43 の発現量の顕著な優位性は確認されなかった. 次に, これらの 3 種類の細胞を 0.1% SDS を含む RIPA buffer, 7 M urea 及び 2 M Thiourea を含む urea buffer の順に段階的に可溶化させ, RIPA 可溶性画分と urea 可溶性画分に対してウェスタンブロッティングを行った. 抗 pTDP-43 抗体を用いたところ, WT と CTF を導入後, MG-132 で処理した細胞において, urea

可溶性画分で優位にシグナルが確認され、RIPA 可溶性画分ではその 1/10 以下であった。一方で、抗 TDP-43 抗体では導入した TDP-43 のシグナルは RIPA 可溶性及び urea 可溶性画分で同程度に検出された。これらの結果から、形成された TDP-43 の凝集体は RIPA buffer に対し難溶性であることが示された(文献 30 Figure 3)。

### 第3-6節. 他のプロテアソーム阻害剤による TDP-43 凝集体形成の検討

MG-132 はプロテアソーム阻害の他、様々な作用があることが知られている。特に、特定の kinase を活性化する作用が報告されているため、他のプロテアソーム阻害剤を用いることで TDP-43 の凝集体形成がプロテアソーム阻害による特異的な効果であることを検証した。分化 1464R 細胞へ WT 及び CTF を導入後、MG-132 の代わりに 1.0  $\mu$ M Lactacystin (LC) 及び 0.1  $\mu$ M Epoxomicin (EPMN), 26  $\mu$ M ALLN で処理し、sarkosyl soluble 及び sarkosyl insoluble フラクションを作製し、ウエスタンブロットニングにより解析した。抗 pTDP-43 抗体では MG-132 で処理した時と同様、LC 及び EPMN, ALLN で処理した細胞にも CTF 優位なリン酸化が確認された。また、抗 TDP-43 抗体を用いたところ、全ての条件において TDP-43 の発現量に変化は見られなかった。また LC を 24 時間処理した細胞を固定し、免疫染色を行なったところ、WT 及び CTF が導入されたほとんどの細胞において、MG-132 を処理した時と同様、細胞質に凝集体が形成された。さらに 1.0  $\mu$ M LC を 24 時間処理し、これらの結果より、細胞質に形成された TDP-43 凝集体はプロテアソーム阻害の際に特異的な現象であることが示唆された(文献 30 S3 Fig)。

### 第3-7節. 1464R 細胞における TDP-43 凝集体形成過程のタイムラプスイメージング

次に、凝集体が及ぼす細胞への影響を検討した。凝集体は細胞毒性を示し、細胞死を誘導すると考えられているが、細胞への保護作用を示すと提唱する報告もある<sup>38)</sup>。そこで、凝集体形成と細胞死の直接的な関連性を確かめるため、生細胞のタイムラプス蛍光イメージングを検討した。生細胞観察のためには分化したニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを蛍光標識する必要があるため、細胞特異的プロモーター制御下で蛍光蛋白を発現する 1464R 細胞の安定発現株の作製を試みた(Table 1)。まず、樹立した細胞のうち、1464RRTBG1 細胞株を FFNB-R 培地中で分化後、AxCADsRTDP43.WT 及び AxCADsRTDP43.CTF を導入した。導入翌日、最終濃度 0.5  $\mu$ M MG-132 を含む FFNB-R 培地に交換し delatavision 顕微鏡によるタイムラプスイメージングを間隔 15 分または 20 分、観察時間は最長 72 時間行なった。コントロール群では、観察開始から 72 時間、1 細胞を追跡する事が可能であった。EGFP 陽性細胞内における DsRed のシグナルは核に局在し、タイムコースを通して局在の変化は確認されなかった(文献 30 Figure 4b, t=00:00:00 から 58:00:00)。次に MG-132 存在下で観察したところ、

時間経過とともに DsRed のシグナルが細胞質へ徐々に充満し始めた(文献 30 Figure 4c, t=12:00:00 から 24:00:00). その後, 小さな凝集が細胞質に集積することで粗大な凝集体が形成された(t=24:00:00 から 42:00:00). さらに細胞は膨化し, やがて細胞膜破綻による細胞死を観察した(t=24:00:00 から 53:00:00). 細胞死の際, 形質膜が破綻するため, EGFP の蛍光が消失することがわかった. 一方, 凝集 TDP-43 細胞死後もシグナルが観察され, 凝集体の形態を保持したまま, その場に残留することがわかった(文献 30 Figure 4c, t=38:00:00 から 62:00:00). このことから, 標識した EGFP は細胞外へ放出されると可溶性のためシグナルが消失するのに対し, 凝集した TDP-43 は不溶性のため, シグナルが消失しないことがわかった. MG-132 存在下では, 大部分の細胞が同様の経過を辿り, 細胞死に至ることが明らかとなった. この結果を定量的に解析するため, DsRed または TDP-43(WT+CTF)を導入し, DMSO または MG-132 で処理した合計 3 種類の細胞群, DsRed/MG-132 及び TDP/DMSO, TDP/MG-132 について, ラプスイメージングを行い, 各群約 100 の細胞について, 細胞死のイベントを記録した. 経時的な細胞死イベントを Kaplan-Meier 法による生存曲線で表し, Log Rank 検定により解析すると, TDP/MG132 群は他の 2 群に比べ, 有意な細胞死のイベントが生じていた(文献 30 Figure 4e, DsR/MG-132 vs TDP/MG-132;  $p < 0.0001$ , TDP/DMSO vs TDP/MG-132;  $p < 0.0001$ ). また, 各群 0 時間の細胞数に対し, 24 時間及び 48 時間後の細胞生存率を算出した結果, DsR/MG-132 群では 24 時間後で 90 %, 48 時間後で 84 %, TDP/DMSO 群では 24 時間後で 89 %, 48 時間後で 85 %, TDP/MG-132 群では 24 時間後で 81 %, 48 時間後で 54 %であり(文献 30 Figure 4f), 24 時間後では, 3 群間における細胞生存率に有意な変化は見られなかったが (DsR/MG-132 vs TDP/DMSO;  $p > 0.99$ , DsR/MG-132 vs TDP/MG-132;  $p = 0.11$ , TDP/DMSO vs TDP/MG-132;  $p = 0.15$ , two-way ANOVA with Sidak's multiple adjustment test), 48 時間後では TDP/MG-132 群で他の 2 群と比較して有意な細胞生存率の減少が確認された (DsR/MG-132 vs TDP/DMSO;  $p = 0.99$ , DsR/MG-132 vs TDP/MG-132;  $p < 0.0001$ , TDP/DMSO vs TDP/MG-132;  $p < 0.0001$ , two-way ANOVA with Sidak's multiple adjustment test).

一方, タイムラプスイメージングにより, 興味深い現象が観察された(文献 30 Figure 4d). MG-132 存在下において細胞質に凝集体が形成され始めるが, 細胞が破裂し(t=11:00:00), 中の凝集体が細胞外へ放出された(t=14:00:00 から t=20:00:00). その後, 凝集体は 3 時間程度浮遊し(t=14:00:00 から 20:00:00), 隣接する EGFP 陽性の細胞へと取り込まれた(t=23:00:00).

次に, 1464RTBS 細胞株を分化させ, EGFP-TDP43.WT と DsR-TDP43.CTF を導入後, 両者を区別して 72 時間タイムラプスイメージングを行なった. ラベルのために使用した Sirius の蛍光は UV 励起のため, イメージング直前に追跡領域に対して 1 回だけ撮影して細胞への傷害を回避した. MG-132 存在下では, 細胞質に EGFP 及び CTF が集積し(t=00:00:00 から 18:00:

00), 凝集体を形成した(t=18:00:00 から 20:30:00). この凝集体には EGFP 及び DsRed 両者が混在したが, EGFP のシグナルはその多くが核に局在した. やがて細胞は膨化し, 細胞膜破綻による細胞死を観察した(t=27:00:00 から 32:00:00). その後, TDP-43 の凝集体は不溶性のまま観察終了時まで残存した. しかしながら, EGFP の蛍光は細胞膜破綻後, 消失し, 残存する凝集体にわずかに含まれるのみであった(t=32:00:00)(文献 30 Figure 5a). 一方, 72 時間観察終了時の生存細胞を観察すると, 凝集体には WT 及び CTF 両者が含まれた(文献 30 Figure 5b). それに対し, MG-132 非存在下の細胞では, 72 時間観察終了時においても, EGFP と DsRed のシグナルは核での共局在も確認された(文献 30 Figure 5c).

さらに, この細胞を用いて, MG-132 の代わりに shRNA を利用し, プロテアソームを阻害した際の TDP-43 の凝集体形成について観察した. 1464RTBS 細胞を分化後, AxCADsRTDP43.WT 及び AxCADsRTDP43.CTF, AxshPSMC1/EGFP を同時に感染させ, 72 時間のタイムラプスイメージングを行った. また, 対照群では AxshPSMC1/EGFP の代わりに AxshNC/EGFP を導入した. コントロール(shNC)を導入した細胞では DsRed シグナルは核に局在することが多く, 追跡期間中, 顕著な局在変化は確認されなかった(文献 30 Figure 6a). 一方, shPSMC1 を導入した細胞では, 核に局在した DsRed のシグナル(t=00:00:00 から 37:30:00)が細胞質へ移動し, 凝集体が形成されることを確認した(t=49:30:00 から 60:00:00)(文献 30 Figure 6b). しかし, MG-132 で処理した時と比較すると, 凝集体形成の頻度は低かった. これは shRNA によるプロテアソーム阻害が MG-132 よりも低いことに起因すると考えられる. 以上のことから, プロテアソームの特異的な抑制により, TDP-43 の凝集体形成が促進されることが示唆された.

分化 1464R 細胞はアストロサイトやオリゴデンドロサイトへも分化する. 実際に, ヒト ALS 症例においてもグリア細胞内でも TDP-43 の凝集体が確認されているため<sup>39)</sup>, 分化 1464R アストロサイト及びオリゴデンドロサイトにおける TDP-43 凝集体形成と細胞死についても検討した. まず, 1464R 細胞から, グリア細胞特異的遺伝子プロモーター制御下で EGFP を発現する株 1464RGFAPpEGFP 及び 1464RCNPpEGFP を樹立した(Table 1). これらの細胞株を FFNB-R により分化後, AxCADsRTDP43.WT 及び AxCADsRTDP43.CTF を感染させた. MG-132 を付加し, EGFP 陽性細胞を対象としてタイムラプスイメージングを行った. 1464RGFAPpEGFP 細胞では, 分化アストロサイト内に TDP-43 の凝集が細胞質に徐々に集積し(t=16:00:00 から 30:00:00), 凝集体が形成された(t=16:00:00 から 36:00:00). やがて細胞は膨化し, 細胞膜破綻による細胞死を確認した(t=36:00:00 から 38:00:00)(文献 30 Figure 7a). 1464RGFAPpEGFP 細胞を用いた際も同様に, 細胞質に凝集体充満することで粗大な凝集体となり, 細胞が膨化した(t=10:45:00 から 24:00:00). その後, 細胞は細胞膜が破綻し, 細胞死を観察した(t=24:00:00 から 29:45:00)(文献 30 Figure 7b). どちらの細胞においても, 細胞死後も凝集体



は不溶性のまま観察領域内に残存した。これらのことから、グリア細胞内での TDP-43 の凝集体はニューロンにおける凝集体と同様の性質を示し、細胞死を誘導することがわかった。

### 第3-8節. 凝集体の細胞間伝播の検証

タイムラプスイメージングの結果から、細胞破裂に伴い、凝集体が細胞外へ放出され、隣接する細胞へ取り込まれる像が観察された。これは細胞間伝播の仮説を示唆する知見と考え、いくつかの実験により検証を行なった。まず、TDP-43 凝集体を形成した分化 1464R (TDP 群) と、DsRed を導入し、MG-132 で処理した細胞 (DsRed 群, コントロール) を用意した。これらの細胞をソニケータで破碎し、細胞 lysate を作成し、新たな分化 1464R 細胞へ添加し、2 日後、この細胞を観察したところ、TuJ1 陽性細胞内に DsRed 陽性の TDP-43 の凝集体を確認した。DsRed 陽性の凝集体の大きさは直径 1  $\mu\text{m}$  以下であり、複数の凝集体が含まれる細胞も存在したが、コントロール細胞においても稀に同様のシグナルが確認された。共焦点顕微鏡により、多数の細胞を撮影し、各群における TuJ1 陽性細胞内の DsRed 陽性の凝集体数をヒストグラムにより表した。さらに、TuJ1 陽性細胞内の DsRed の輝度値を定量した結果、DsRed 群は  $1.04 \pm 0.05$  s.e.m A.U. であるのに対し、TDP 群は  $3.02 \pm 0.21$  (s.e.m) であり、TDP 群の方が有意に高かった ( $p < 0.0001$ , Welch's test) (文献 30 Figure 8a-d)。

次に、取り込まれた凝集体が他の細胞へ伝播する可能性を検証した。TDP-43(WT+CTF) または DsRed を導入し、MG-132 で 24 時間処理した細胞にライセートを添加した細胞を用意した (TDP 群及び DsRed 群)。その後、1464RTBG1 細胞を播種し、2 日間共培養し、EGFP 陽性細胞内の DsRed のシグナルを観察した。TDP 群において、わずかではあるが EGFP 陽性細胞内に DsRed 陽性の凝集体が確認された。共焦点顕微鏡により、多数の細胞を撮影し、各群における TuJ1 陽性細胞内の DsRed 陽性の凝集体数をヒストグラムにより表した。また、EGFP 陽性細胞内の DsRed の輝度値を定量化した結果、DsRed 群は  $1.00 \pm 0.03$  (s.e.m) A.U. であるのに対し、TDP 群は  $1.21 \pm 0.07$  (s.e.m) であり、TDP 群の方が有意に高かった ( $p = 0.015$ , Welch's test) (文献 30 Figure 8e-h)。

また、native な凝集体伝播の可能性について検証した。分化 1464R 細胞へ TDP-43(WT+CTF) を導入し、凝集体を形成させ、1464RTBG1 細胞を播種し共培養を行い 2 日後、TDP 群の EGFP 陽性細胞内に、直径 2  $\mu\text{m}$  以上の凝集体が確認された。共焦点顕微鏡により、多数の細胞を撮影し、各群における TuJ1 陽性細胞内の DsRed 陽性凝集体数をヒストグラムにより表した。さらに、凝集体陽性細胞数の割合を算出した結果、さらに、また、EGFP 陽性細胞内の DsRed の輝度値を定量化した結果、DsRed 群では  $1.00 \pm 0.12$  (s.e.m) A.U. であるのに対し、TDP 群では  $1.91 \pm 0.44$  s.e.m であり、TDP 群が有意に高かった ( $p = 0.015$ , Welch's test) (文献 30 Figure 8i-l)。最後に、TDP-43 の凝集体の伝播が示唆されたため、最後に取り込まれた凝

集合のシード能について検討した。この可能性を確かめるため、凝集体を形成した分化 1464R 細胞と 1464REGFP-TDP43.WT との共培養を 3-5 日間行なった。共培養から 3 日後、固定した細胞を観察すると、EGFP-TDP43.WT 発現ニューロンに、DsRed 陽性の凝集体が細胞質に存在し、EGFP のシグナルの共局在が見られ、取り込まれた凝集体は EGFP-TDP43.WT を引き込む可能性が示唆された。そこで、これらの構造を有する細胞数をカウントしたところ、共培養 3 日目(DIV 3)では  $3.4 \pm 0.5\%$  であるのに対し、5 日目(DIV 5)では  $12.6 \pm 2.5\%$  と有意な上昇がみられた( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test)。このことから、時間による EGFP の凝集体の引き込みは、伝播した TDP-43 凝集体の seed 能を有する仮説を強く支持すると言える(文献 30 Figure 8m-n)。

## 第4章. 考察

### 第4-1節. 培養神経細胞モデルとしての妥当性

現在, SH-SY5Y や IMR32, Neuro2a, NSC34, PC12 などが神経細胞株として使用されているが近年の研究では, これらの細胞株と生体内の神経細胞の間では, 遺伝子発現パターンが大きく異なることが明らかとなった<sup>23)</sup>. 一方, 神経幹細胞 1464R<sup>29)</sup>は, nestin や GFAP などの幹細胞マーカー遺伝子を発現しており, EGF, bFGF を加え, 非接着培養条件培養することでスフィアを形成しながら増殖する. 一方で, スフィアを物理的に分散させ, レチノイン酸を含む神経分化培地で培養することで, TuJ1 陽性ニューロン, GFAP 陽性アストロサイト, O1 及び O4 陽性オリゴデンドロサイトへ分化することがわかった<sup>29)</sup>. さらに, 継代を重ねてもニューロンへの分化効率が低下しなかった. 1464R 細胞は, ニューロンへの分化誘導を再現性高く実現できる細胞株として, 神経細胞モデルの有用性が示された.

### 第4-2節. 分化 1464R 細胞内での TDP-43 凝集体形成

先行研究では, 293 細胞へ CTF を導入するだけで凝集体が形成されることが報告されている<sup>40)</sup>. しかしアデノウイルスベクターによる分化 1464R 細胞への遺伝子導入では, CTF を高発現させても明らかな凝集体は確認されなかったことは, 神経変性疾患の大部分が壮年から高齢期に発症することを裏付ける一つの証拠であるかもしれない. 特に, 蛋白分解系は細胞の恒常性を維持する上で重要な機能であるため, プロテアソームの阻害効果を検討した. その結果, TDP43.CTF 単独よりも TDP43.WT と TDP43.CTF を 1:1 で導入し, プロテアソームを阻害した際に細胞質へ効率よく, 粗大な凝集体が形成された. このような粗大な凝集体が培養細胞で形成された報告は未だなく, 時には核と同程度の凝集体が形成されたことは本研究の注目すべき点である. 現在までもプロテアソームを阻害することでニューロン内に TDP-43 の凝集体が形成された報告があるが<sup>41)</sup>, その大きさや構造物はヒト病理所見と大きく異なっている. また, EGFP-TDP43.WT と DsR-TDP43.CTF を発現させ, MG-132 を付加した際, 細胞質に形成された凝集体は DsRed のシグナルが優位であり, CTF が主として凝集体に含まれることがわかった.

### 第4-3節. 凝集体の詳細な性質

ALS 及び FTLD 剖検脳での TDP-43 凝集体は細胞質及び核にみられ, その形態は一様でなく, 患者によっても異なる. 細胞体に形成される粗大な凝集体は round inclusion と呼ばれる. そのほかに, 顆粒状構造物が集積した granular pattern や軸索や樹状突起に形成される dystrophic neurites や neuropil thread, さらには凝集体がアミロイド繊維状の構造をとる skein like inclusion がある. 本研究の細胞質 TDP-43 凝集体の電子顕微鏡による観察では, 境界明瞭な

粗大な細胞質凝集体が確認され、その境界部は膜構造を有していなかった。また粗大な凝集体が核を押しやる像も観察され、凝集体の強固さも示された。この凝集体の大部分が直径およそ 20-30 nm の電子密度の高い顆粒状構造物であり、control には確認できない構造であることから、凝集した TDP-43 であることがわかる。これは、形態学的には ALS 症例における granular pattern の形態に近い。

凝集体のリン酸化修飾及びユビキチン化修飾もまた重要な病理所見であり、ALS ではリン酸化 TDP-43 陽性領域により病態のステージングもなされている<sup>42)</sup>。凝集体形成細胞のウェスタンブローディングの結果から、WT よりも CTF が優位にリン酸化修飾を受けた。これは ALS の症例とも類似する点ではある<sup>37)</sup>。おそらくリン酸化反応は凝集体が形成されると生じるとされているため、凝集体に多く含まれる CTF が選択的に修飾を受けることを反映した結果である可能性がある。しかしながら、MG-132 添加時間を変えた継時サンプルを比較すると、24 時間以上を界に継時的な WT のリン酸化バンドの増加が確認された。分解した CTF のリン酸化は検出されなかったものの、リン酸化様式や不溶性としての生化学的性質はヒト ALS 及び FTLD-TDP 症例と類似していた。

#### 第4-4節. 凝集体形成におけるプロテアソームの関与

神経変性疾患の主たる原因は解明されていない。しかしながら、選択的に神経が変性する原因の一つに神経細胞の脆弱性が挙げられる。細胞の恒常性が破綻した際、神経細胞は障害を受けやすく、細胞死を起こしやすい。ALS のみならず、神経変性には小胞体ストレスや酸化ストレス、ミトコンドリア機能不全、グルタミン酸毒性、蛋白分解系の破綻などの関与が指摘されてきた<sup>43)44)</sup>。さらに、グリア細胞の non-cell autonomous な活性化も脳内で炎症を引き起こし、病態を悪化させると言われている<sup>45)46)</sup>。神経細胞内凝集体形成と蛋白質代謝の関連性に着目した。プロテアソームはユビキチン化修飾を受けた蛋白を選択的に分解する機構であり、特定の分子による凝集体形成に関与することが考えられる。また、プロテアソームの重要なサブユニットの一つである RPT2 を欠損したマウスでは Lewy body 様の封入体を形成し神経細胞死が誘導されたことが報告され、その機能の重要性が示唆された<sup>47)</sup>。本研究での MG-132 処理による凝集体形成は、プロテアソームを阻害したことで TDP-43 の凝集体形成が促進されたものと考えている。そして、TDP-43 の C 末端に存在する prion-like domain が凝集体の原因である。

MG-132 は可逆的プロテアソーム阻害剤として広く利用されている反面、その副作用についても様々な指摘がある。そのため、MG-132 の代わりに他のプロテアソーム阻害剤についても検討した結果、MG-132 を用いた際と同様の凝集体が確認された。また、PSMC1 に対する

shRNA を導入した際に、阻害剤よりも効果は弱いものの一部の細胞内に凝集体が観察されたことから、プロテアソーム阻害による TDP-43 の凝集体形成促進作用が強く示された。

#### 第4-5節. タイムラプスイメージングによる TDP-43 凝集体形成と細胞死

神経細胞内の凝集体は、神経変性疾患を特定するための確固たる所見である。しかしながら、凝集体と細胞死に関する議論は未だに解決していない。さらに、凝集体形成が細胞の保護作用であると見解も存在する<sup>38)</sup>。相反する見解が存在するのは、凝集体を形成した細胞の運命が不明瞭であるためだと考え、タイムラプスイメージングによる解析を検討した結果、いくつか重要な点が挙げられた。MG-132 存在下において、凝集体形成は小さな顆粒状構造物が集積した結果、粗大な凝集となる様子を観察した。凝集体の始まりは stress granule として出現し、それが徐々に凝集し、やがて粗大な凝集体を形成するモデルが提唱されている。今回の結果もこれに一致する点がある。DsR-TDP43.CTF を発現させただけでも、細胞内に小胞の大きさの顆粒状構造物がしばしば観察された。今後凝集体の性質をより詳細に調べるため、stress granule マーカーなどと共染色を試みる必要がある。

最近になり、ALS モデルマウスであるヒト SOD1<sup>G93A</sup>トランスジェニックマウスでは運動ニューロン死の多くが RIPK1 阻害剤である necrostatin-1<sup>48)</sup>により抑制されることから、ALS 病態における運動ニューロン死はプログラムされた細胞死ネクローシスによるものであることが報告され、注目を集めている<sup>49)</sup>。本研究のタイムラプスイメージングから見えたの細胞死形態は、アポトーシスというよりネクローシスの形態であった。今後、細胞死の経路探索についても検討する必要がある。

#### 第4-6節. TDP-43 の凝集体の伝播

神経変性の過程は不明な点が多く残されているが、神経変性メカニズムとしてプリオン様仮説が現在最も有力である。これは prion 蛋白で発見された現象で、CJD では異常なコンフォメーションを持ったプリオン蛋白が細胞外へ放出され、正常な細胞へと取り込まれる。取り込まれた凝集体が鋳型となり、細胞内の正常な蛋白を異常なコンフォメーションへ変えてしまう。この異常型凝集蛋白の細胞間伝播は A $\beta$  や  $\alpha$ -synuclein, tau, huntingtin, SOD1 で証明されている<sup>25),26)</sup>。凝集蛋白ごとに伝播のメカニズムに差異はあるものの、細胞間伝播として最も注目されているのが exosome と呼ばれる小胞を介する経路である。Exosome の神経変性疾患への関与も多数の報告がある<sup>50),51)</sup>。凝集した tau 及び  $\alpha$ -synuclein, SOD1 は exosome による細胞間の伝播が報告された。これらの凝集蛋白に比べ、TDP-43 凝集体の細胞間伝播に関する報告は未だほとんど存在しない。2013 年、野中らはヒト患者剖検脳ライセートを SH-SY5Y 細胞へ添加することで鋳型依存的に凝集体を形成することを立証した<sup>52)</sup>。また、2015 年には野生

型 TDP-43 が *exosome* を介して軸索終末からニューロン間を伝播することが他の研究グループにより報告された<sup>27)</sup>. この様に, TDP-43 の細胞間伝播の可能性が示されてきたものの, 他の凝集蛋白に比べて不明点や疑問点が多く残されている. 一方, 本研究では TDP-43 凝集体の細胞間伝播を示唆する現象をタイムラプスイメージングにより観察した. この構造体が *exosome* であるか定かではないが, 細胞死とともに凝集体が放出された点は正常な状態と明らかに異なる. そこで, 凝集体を取り込んだ細胞と 1464RTBG1 細胞の共培養を行なった. その結果, 非常に少ない割合ではあるが, EGFP 陽性ニューロン内に凝集体が確認され, 凝集体を有する細胞数及び, その蛍光輝度値は有意に高かった. これらの結果から, 凝集体を含むライセートの添加により, 凝集体は細胞内に取り込まれ, 他の細胞へ移ることが示された. そこで, 凝集体が直接細胞間を伝播する可能性を検証するため, 凝集体を形成した細胞と共培養を行なった. EGFP 陽性ニューロン内の DsRed 陽性構造体を有する細胞数及び DsRed 輝度値は, コントロールと比較して有意に高かった. しかしながら, DsRed/MG-132 との共培養した際にも EGFP 陽性細胞内に DsRed のシグナルが確認されたため, これをバックグラウンドととして捉えるならば, 共培養する細胞の比率を検討し, コントロール群における伝播の割合を減少させる必要がある. この点を考慮し, 最後に伝播した凝集体のシード能について検討した. 取り込まれた凝集体が正常型 TDP-43 を取り込む可能性を検証するために, 凝集体形成細胞と EGFP-TDP43.WT を発現する細胞株 1464REGFPTDP43.WT との共培養を行った. この際に, 凝集体形成細胞数を 1464REGFPTDP43.WT の 10 分の 1 とし, DsRed 発現細胞群で見られたバックグラウンドの現象を最小限に抑えた. その結果, 共培養 3 日後, 伝播した DsRed 陽性の凝集体と EGFP-TDP43.WT が細胞質で共局在した. さらに注目すべき点は, この構造をもつ細胞が, 共培養 5 日目で上昇した点であり, 伝播した凝集体が正常型の TDP-43 を引き込むことが明らかとなった. この凝集体を核として, さらに粗大な凝集体を形成する可能性を検討することが今後の課題である. 本研究では, プロテアソームの機能不全が TDP-43 の凝集体形成を促進することを示したため, このモデルを確立するためには, 凝集体を取り込んだ細胞が蛋白分解系の機能不全に陥っている必要性が考えられる. さらに, 凝集体が伝播する経路についても詳細なメカニズムの解明が必要である. この実験系で観察された凝集体の伝播は, 細胞同士の物理的接着が必要条件である可能性も示唆されるため, 今後は *trans-well* などを用いた共培養系を検討する. これらの結果を踏まえ, 凝集した TDP-43 のプリオン様伝播の詳細についてもさらに研究を進めていきたい.

#### 第4-7節. 結論

本研究により, 培養下で効率よく神経細胞を誘導する手法を確立した. TDP-43 の凝集体形成には CTF の発現のみならず, プロテアソームに対する障害が凝集体形成を促進することが

わかった。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新たに明らかとなり、凝集体のシード能が示唆された。本研究の培養細胞における TDP-43 凝集体モデルは、ALS の病態をよく反映しており、既存の報告と比較しても最良のモデルであると言える。この系を利用することで、凝集体形成を抑制する薬剤のスクリーニング系や凝集体伝播のメカニズムの追跡などへの応用が期待できる。

#### **第4-8節. 研究倫理**

本研究は公益財団法人東京都医学総合研究所の遺伝子組換え生物等安全管理・病原体等安全管理委員会の承認および慶應義塾大学薬学部の遺伝子組換え実験委員会の承認のもとに行われた。また、本研究は公益財団法人東京都医学総合研究所の動物倫理委員会の承認および慶應義塾動物実験委員会の承認のもとに行われた。

## 第5章. 謝辞

博士課程の間、多大なるご指導を賜りました慶應義塾大学大学院薬学研究科薬理学講座、三澤日出巳教授に甚大な感謝を申し上げます。

本研究にあたり、常に研究全体のご指導、ご鞭撻をしてくださいました杏林大学保健学部臨床検査学科、渡部和彦教授に心から感謝申し上げます。

学位論文にあたり、電子顕微鏡の撮影に携わり、学位論文に関する原著論文の共著者となっただきました公益財団法人東京都医学総合研究所基盤技術研究センター、河上江美子様、遠藤堅太郎様に心から感謝申し上げます。

学位申請にあたり、本研究に関して多くのご指導、ご助言を賜りました副査の慶應義塾大学大学院薬学研究科化学療法学講座、杉本芳一教授並びに同学薬物治療学講座、斎藤英胤教授に心から感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、いつも助言や激励の言葉をかけてくださりました、公益財団法人東京都医学総合研究所、(旧)神経変性病理解プロジェクトの三五一憲先生、秋山けい子様、柳澤比呂子様、新見直子様に厚く御礼申し上げます。

博士課程の間、研究に関するアドバイスをくださった理学講座の奥田隆先生、森脇康博先生ならびに及び日常生活を共に過ごした慶應義塾大学大学院薬本講座の大学院生、卒論生の皆様にも深く感謝致します。

学位請求論文を執筆する際、microsoft office word を用いた文章の作成方法及び体裁の整え方など数多くのご指導いただきました慶應義塾大学基礎薬学研究センター、石川さと子准教授に心から感謝申し上げます。

博士課程の間、私生活や大学院生のあり方について多くの助言をいただきました、元慶應義塾大学大学院薬学研究科実務薬学講座木津純子教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、博士課程に進学してからいつも変わらず健康面、精神面で私を気遣い、支えてくださった両親へ心から感謝し、深く御礼申し上げます。



## 第6章. 参考文献

- 1 難病情報センター. <http://www.nanbyou.or.jp/entry/214>
- 2 Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362(6415):59-62.
- 3 Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci*. 2014 ;17(1):17-23.
- 4 Bettencourt C, Houlden H. Exome sequencing uncovers hidden pathways in familial and sporadic ALS. *Nat Neurosci*. 2015;18(5):611-3.
- 5 Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130-3.
- 6 Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(3):602-11.
- 7 Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. 2013;79(3):416-38.
- 8 Ou SH, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol*. 1995;69(6):3584-96.
- 9 Lukavsky PJ , Daujotyte D, Tollervey JR, Ule J, Stuani C, Buratti E, et al. Molecular basis of UG-rich RNA recognition by the human splicing factor TDP-43. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(12):1443-9.
- 10 Ayala YM, Pantano S, D'Ambrogio A, Buratti E, Brindisi A, Marchetti C, et al. Human, *Drosophila*, and *C.elegans* TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *J Mol Biol*. 2005;348(3):575-88.
- 11 Buratti E, Dörk T, Zuccato E, Pagani F, Romano M, Baralle FE. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J*. 2001;20(7):1774-84.
- 12 Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011;14(4):459-68.

- 13 Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, et al. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011;14(4):452-8.
- 14 Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, Kato T, Tan CF, Sato T, et al. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2013;22(20):4136-47.
- 15 Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(9):3347-52.
- 16 De Conti L, Akinyi MV, Mendoza-Maldonado R, Romano M, Baralle M, Buratti E. TDP-43 affects splicing profiles and isoform production of genes involved in the apoptotic and mitotic cellular pathways. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(18):8990-9005.
- 17 Ling JP, Pletnikova O, Troncoso JC, Wong PC. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science*. 2015;349(6248):650-5.
- 18 Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(44):18809-14.
- 19 Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H, et al. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci*. 2010;30(32):10851-9.
- 20 Shan X, Chiang PM, Price DL, Wong PC. Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16325-30.
- 21 Igaz LM, Kwong LK, Lee EB, Chen-Plotkin A, Swanson E, Unger T, et al. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(2):726-38.
- 22 Liu YC, Chiang PM, Tsai KJ. Disease animal models of TDP-43 proteinopathy and their pre-clinical applications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20079-111.
- 23 Hornburg D, Drepper C, Butter F, Meissner F, Sendtner M, Mann M. Deep proteomic evaluation of primary and cell line motoneuron disease models delineates major differences in neuronal characteristics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(12):3410-20.
- 24 Madji Hounoum B, Vourc'h P, Felix R, Corcia P, Patin F, Guéguinou M, et al. NSC-34 Motor Neuron-Like Cells Are Unsuitable as Experimental Model for Glutamate-Mediated Excitotoxicity. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:118.

- 25 Guo JL, Lee VM. Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med.* 2014;20(2):130-8.
- 26 Brettschneider J, Del Tredici K, Lee VM, Trojanowski JQ. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(2):109-20.
- 27 Feiler MS, Strobel B, Freischmidt A, Helferich AM, Kappel J, Brewer BM, et al. TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals. *J Cell Biol.* 2015;211(4):897-911.
- 28 Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, et al. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep.* 2013;4(1):124-34.
- 29 Watabe K, Akiyama K, Kawakami E, Ishii T, Endo K, Yanagisawa H, et al. Adenoviral expression of TDP-43 and FUS genes and sfhRNAs for protein degradation pathways in rodent motoneurons in vitro and in vivo. *Neuropathology.* 2014;34(1):83-98.
- 30 Ishii T, Kawakami E, Endo K, Misawa H, Watabe K. Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179375.
- 31 Dennis K, Uittenbogaard M, Chiaramello A, Moody SA. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III beta-tubulin gene. *Gene.* 2002;294(1-2):269-77.
- 32 Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, et al. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nat Methods.* 2009;6(5):351-3.
- 33 Krohn K, Rozovsky I, Wals P, Teter B, Anderson CP, Finch CE. Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor-beta1 and interleukin-1beta are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. *J Neurochem.* 1999;72(4):1353-61.
- 34 Gravel M, Gao E, Hervouet-Zeiber C, Parsons V, Braun PE. Transcriptional regulation of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene expression by cyclic AMP in C6 cells. *J Neurochem.* 2000;75(5):1940-50.
- 35 Zhang YJ, Xu YF, Cook C, Gendron TF, Roettges P, Link CD et al. Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(18):7607-12.
- 36 Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet.*

2009;18(18):3353-64.

- 37 Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2008;64(1):60-70.
- 38 Cowan CM, Mudher A. Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol*. 2013;4:114.
- 39 Neumann M, Kwong LK, Truax AC, Vanmassenhove B, Kretschmar HA, Van Deerlin VM, et al. TDP-43-positive white matter pathology in frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007 Mar;66(3):177-83.
- 40 Igaz LM, Kwong LK, Chen-Plotkin A, Winton MJ, Unger TL, Xu Y, et al. Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *J Biol Chem*. 2009;284(13):8516-24.
- 41 van Eersel J, Ke YD, Gladbach A, Bi M, Götz J, Kril JJ, et al. Proteasome inhibition modulates kinase activation in neural cells: relevance to ubiquitination, ribosomes, and survival. *J Neurosci Res*. 2009;87(14):3231-8.
- 42 Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, et al. Stages of pTDP-43 Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 2013;74(1):20-38.
- 43 Ruegsegger C, Saxena S. Proteostasis impairment in ALS. *Brain Res*. 2016;1648(Pt B):571-579.
- 44 Hipp MS, Park SH, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol*. 2014;24(9):506-14.
- 45 Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, et al. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*. 2014;81(5):1001-8.
- 46 Lee J, Hyeon SJ, Im H, Ryu H, Kim Y, Ryu H. Astrocytes and Microglia as Non-cell Autonomous Players in the Pathogenesis of ALS. *Exp Neurobiol*. 2016;25(5):233-240.
- 47 Bedford L, Hay D, Devoy A, Paine S, Powe DG, Seth R, et al. Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J Neurosci*. 2008;28(33):8189-98.
- 48 Degtarev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*.

2005;1(2):112-9.

- 49 Re DB, Le Verche V, Yu C, Amoroso MW, Politi KA, Phani S, et al. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*. 2014;81(5):1001-8.
- 50 Pegtel DM, Peferoen L, Amor S. Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1652).
- 51 Schneider A, Simons M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell Tissue Res*. 2013;352(1):33-47.
- 52 Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, et al. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep*. 2013;4(1):124-34.