

＜シンポジウム 13—3＞筋萎縮性側索硬化症の病因 TDP-43 および FUS/TLS 研究の最前線

TDP-43 過剰発現による ALS 動物モデルの作製

横田 隆徳

(臨床神経 2010;50:943-944)

Key words : ALS, TDP-43, カニクイザル, 霊長類

背 景

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は、神経細胞内外に疾患特異的な凝集体、封入体を形成することが特徴であり、さらにそれらは疾患の原因に密接に関連する特異的な蛋白から構成されていることがこれまで明らかにされてきた。

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は、脊髄前角細胞や舌下神経核の神経細胞内にスケイン様凝集体、ユビキチン陽性封入体を形成することなどが神経病理学的特徴であるが、その構成蛋白の本体は不明であった。2006年、核蛋白である TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) がその主要な構成成分であることが解明され、また、TDP-43 が細胞質に異常局在している神経細胞では、核における TDP-43 の染色性が低下していることが報告された¹⁾²⁾。さらに近年、孤発性 ALS および家族性 ALS において、TDP-43 遺伝子の点変異によるアミノ酸置換がつぎつぎと報告され、変異 TDP-43 遺伝子が家族性 ALS の原因遺伝子であることが判明した³⁾⁴⁾。しかし、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割は明らかになっていない。

そこで本研究では、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割を明らかにすることを目的とし、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) をもちいてカニクイザルの頸髄前角細胞に野生型 TDP-43 を過剰発現させ、その神経症状および神経病理学的所見を観察した。

方 法

カニクイザル (3~7 歳♂) 4 頭とラット 6 匹に対して椎弓切除術をおこない、N 末端に flag で標識した野生型 TDP-43 発現する AAV 血清型 1 を頸髄の利き手側の前角細胞付近に直接注入した。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握り行動をビデオ映像を元に解析して評価した。さらに手術前後に神経伝導検査、針筋電図をおこなった。サルの実験は、独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センターの動物実験委員会の承認 (番号 DS20-45, DS21-19)、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 (番号 0090105, 100100)、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 (番号 2008-27) をえておこない、動物に苦痛を与えないように最大限の配慮をおこない、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おこなった。

結 果

AAV 注入後約 2 週から注入側の前肢の手内筋に進行性の麻痺が生じ始め、アップルテストでは徐々に対側前肢の使用に偏移して、4 週後には注入側の手指は完全麻痺、上腕筋は中等度の運動麻痺を示した。電気生理学的には正中神経刺激による複合筋活動電位 (CMAP) は約 2 週後から進行性に低下し、ALS 患者類似の軸索機能異常を示し、4 週後では全例で誘発不能となった。針筋電図で fasciculation や positive sharp wave をみとめた。病理所見では、TDP-43 の発現が C2-Th2 広範な脊髄前角細胞に確認され、その内多くの神経細胞で TDP-43 は核から細胞質へとその局在を変化し、核での内因性サル TDP-43 の染色性の低下していた。さらに細胞質の一部には微細な TDP-43 陽性凝集体形成がみられた。また、多く前角細胞体は形態異常を示し、軸索は腫大して TDP-43 の凝集をふくんでいた。第 8 頸髄レベル前根では、AAV 注入側でミエリン球をとともなう軸索変性がみとめられた。

一方、ラットもほぼ同様の進行性の運動麻痺、電気生理学的異常を示したが、TDP-43 の発現は前角神経細胞の核に局限していた。

考 察

ALS 患者の脳脊髄でみとめられる病理所見から、細胞質への TDP-43 の異常局在と凝集による gain-of-toxic function と、同時に神経細胞で観察される核での TDP-43 の染色性低下の所見から、核での TDP-43 の loss-of-toxic function が ALS の TDP-43 病態生理として想定されている。本研究において、霊長類であるカニクイザルの頸髄に野生型 human TDP-43 を AAV1 ベクターで過剰発現させることにより、ALS 類似の進行性の運動麻痺、筋萎縮を生じることに成功した。

TDP-43は脊髄前角細胞の核だけでなく、多く神経細胞の前角細胞においては細胞質に発現し、一部凝集体を形成していた。TDP-43が細胞質に発現した前角細胞では、核内の内因性のサル TDP-43の染色性は低下し、加えてしばしば変性突起をみとめ、孤発性 ALS の脊髄病理像をほぼ再現できた。まったく同様に作製したラットモデルでは TDP-43 の発現は前角細胞の核内に限局しており、霊長類とげっ歯類で TDP-43 病態生理に種差が存在することは驚きであった。

本研究の結果により、霊長類において野生型 TDP-43 の過剰発現で TDP-43 の細胞質への異常局在と核の染色性の低下がおこりえることが明確に示された。核タンパクである TDP-43 の細胞質への異常局在が、野生型 TDP-43 の発現量の増加のみで生じ、さらに核タンパク TDP-43 の過剰発現によって、一見逆説的ともいえる核での TDP-43 の低下を示せたことは意義深い。

以上をまとめて、進行性の運動障害、神経病理学的所見から本サルモデルははじめての孤発性 ALS の霊長類モデルとなる可能性がある。その神経病理学的、電気生理学的検索結果から、核での野生型 TDP-43 の発現量上昇が脊髄前角細胞障害の一次的な実行機構である仮説を考えた。

結 論

TDP-43 病態生理には霊長類とげっ歯類で種差が存在し、本実験系は孤発性 ALS のサルモデル (non-human primate model) となる可能性がある。このモデルは、孤発性 ALS の病態解析・治療法の開発にその有用性が期待される。

文 献

- 1) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-133.
- 2) Arai T, Hasegawa M, Akiyama 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;351:602-611.
- 3) Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, et al. TDP-43 A315 T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol* 2008;63:535-538.
- 4) Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008;319:1668-1672.

Abstract

Animal model of ALS by overexpression of TDP-43

Takanori Yokota, M.D.

Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University

(*Clin Neurol* 2010;50:943-944)

Key words: ALS, TDP-43, cynomolgus monkey, primate