

## マギル大学留学報告

玉木 良高

医仁会武田総合病院脳神経内科  
日本神経学会海外派遣プログラム 2019 年度フェロー

留学先：Montreal Neurological Institute-Hospital, McGill  
University, Canada  
留学期間：2019 年 9 月～2022 年 3 月

## はじめに

筆者が留学した McGill University の附属研究所である Montreal Neurological Institute-Hospital (MNI) はカナダを代表する神経科学の学際的研究機関である。筆者は、神経遺伝学分野において第一線で活躍する研究者の一人であり、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の主な疾患関連蛋白質である TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) をコードする *TARDBP* 遺伝子の変異を ALS 患者で初めて報告したことでも知られる<sup>1)</sup>、Guy A. Rouleau 博士の研究室に在籍した。Rouleau 博士の研究室では ALS をはじめ、様々な神経疾患に対する基礎研究が精力的になされている。本稿では筆者が留学先で行った ALS に対する基礎研究結果の概要と留学生活の思い出について記述する。

## 脳オルガノイドにおける TDP-43 の細胞間伝播現象の研究

孤発性 ALS における中枢神経の病理学的特徴として、核内 RNA 結合蛋白質である TDP-43 の病的構造変化による細胞質への異所性局在化および凝集化が挙げられる。ALS の臨床症状の進展は通常片側一肢から始まり、解剖学的に近接する部位へ順次に障害される傾向があることから、ある細胞で出現した病的構造を有する TDP-43 が隣接する細胞へと伝播していく細胞間伝播現象が病態仮説の一つとして考えられている。この病態仮説はこれまで主に培養細胞やモデルマウスを用いて検証されてきたが<sup>2)~4)</sup>、ヒトの中枢神経組織モデルを用いて立証した研究はまだ報告されていない。筆者はヒト中枢神経組織の培養モデルを用いて、TDP-43 の細胞間伝播現象を明らかにする研究を留学先で行った。

TDP-43 の細胞間伝播現象を検証する場となるヒト中枢神経組織培養モデルとして、ヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cells, 以下 hiPSCs と略記) を中枢神経組織に分化させた脳オルガノイドを使用した。脳オルガノ

イドは幹細胞の自己組織化により形成され、実際のヒト脳組織を模倣した解剖学的構造と生理機能を兼ね備えた三次元的な組織であり、*in vitro* で培養が可能である<sup>5)</sup>。実験方法として、病的構造変化を有する TDP-43 の最大の特徴とも言えるリン酸化 TDP-43 を含んだ孤発性 ALS 剖検例の脊髄組織破砕液を、健常者または ALS 由来の hiPSCs から分化させた脳オルガノイドに注入し、それぞれの脳オルガノイドにおけるリン酸化 TDP-43 の発現量変化を経時的に観察した (Fig. 1)。

非 ALS 剖検例の脊髄組織破砕液の注入では、健常者および ALS 由来の脳オルガノイドのいずれにおいても TDP-43 病理は観察できなかった。一方、ALS 剖検例の脊髄組織破砕液を注入すると、ALS 由来の脳オルガノイドでは神経細胞の細胞質内にリン酸化 TDP-43 凝集体が形成されることを確認した。さらに ALS の脊髄組織破砕液の注入後から 2, 4, 8 週間かけて、リン酸化 TDP-43 凝集体を有する神経細胞の割合が経時的に増加した (Fig. 1)。このことから、病的構造をもつ TDP-43 が脳オルガノイド内の神経細胞間を伝播し、新たに TDP-43 病理を形成したことが示唆された。一方、興味深いことに健常者由来の脳オルガノイドでは、ALS の脊髄組織破砕液を注入しても TDP-43 病理はほとんど認められなかった。また、ALS 由来の脳オルガノイドに ALS の脊髄組織破砕液を注入すると、TDP-43 病理に加えアストロサイトが増生した。さらにその脳オルガノイドにおいて、DNA 二重鎖損傷によるゲノム障害や神経細胞死が誘導されることを確認した。対する健常者由来の脳オルガノイドでは、ALS の脊髄組織破砕液を注入してもこれらの変化は認められなかった。以上より、脳オルガノイドというヒト中枢神経組織を模倣した培養モデルにおいて、病的構造をもつ TDP-43 が神経細胞間を伝播し TDP-43 病理が形成および拡大され、細胞死やゲノム障害が生じることを明らかにした。

これらの研究成果を論文にまとめ、国際学術誌に発表した<sup>6)</sup>。ある神経細胞において TDP-43 に病的構造変化が生じると、隣接する細胞へ容易に伝播することを許してしまうという脆弱性が ALS の病態として背景にある可能性が本研究から示唆される。将来は留学先で行った研究を発展させ、TDP-43 の細胞間伝播現象を来す因子を明らかにしていきたい。

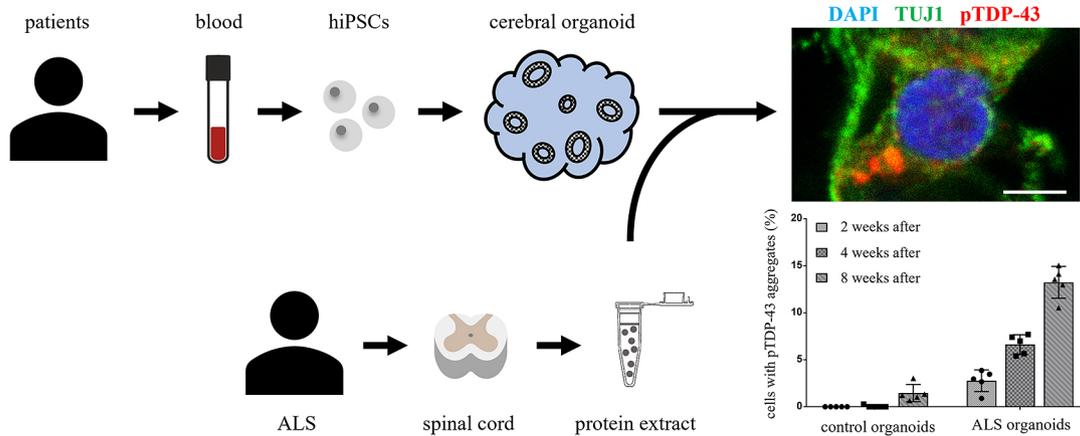


Fig. 1 ALS patient-derived spinal cord extracts induce and spread TDP-43 pathology in cerebral organoids.

To evaluate whether pathogenic TDP-43 propagates in cerebral organoids, ALS-derived detergent-insoluble spinal cord extracts containing phosphorylated TDP-43 (pTDP-43) were administered as pathogenic seeds into mature cerebral organoids through a fine needle injection. Cerebral organoids were differentiated from non-ALS- or ALS-derived human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). The double-labelled immunofluorescence image of pTDP-43 (pS409/410) and TUJ1 staining ALS-derived cerebral organoid at 8 weeks after injection of spinal cord extracts from ALS shows the formation of cytoplasmic pTDP-43 aggregates (red) in TUJ1-positive neuron (green). DAPI (blue) was used for counterstaining of nuclei. Scale bar = 10  $\mu$  m. The bar graph exhibits the percentages of cells with pTDP-43 aggregates in cerebral organoids at 2, 4, and 8 weeks after injection of spinal cord extracts from individual ALS cases. Bar plots show mean  $\pm$  standard deviation with individual points representing a different extract.

## MNI への留学の思い出

およそ2年半にわたる留学期間中、様々なことを経験させていただいた。研究面では実験開始直後から細胞培養が思うようにうまくいかなかったり、実験に使用する試料の選定に苦労したりするなど、留学当初に予定していた実験計画からはずいぶんと遅れが生じるようになった。しかし実験方法や試料の選定については研究結果の根幹に関わるため、焦らずに何度も研究室スタッフとミーティングを重ねることでお互いの意見を述べ合い、議論を深めることができた。このことは振り返ってみれば大変良かったと思う。ミーティングでは自分の考えや伝えたいことを短いスライドにまとめ、プレゼンテーションを繰り返した。研究室スタッフは私の拙い英語の発表にも真剣に耳を傾けてくれた。同僚たちが試料の調達や選定に際し積極的に支援してくれたり、他の研究室のスタッフが実験に協力してくれたり、様々な方からサポートを得られたことは何より嬉しかった。ところがようやく実験手技が安定しはじめ、いよいよ本格的に実験を開始しようと意気込んでいた矢先に、カナダもコロナ渦に突入し、生活が大きく制限されることになった。研究室は医療機関に併設されていることから立ち入り禁止となり、実験の中断を余儀なくされた。数ヶ月間にわたり大切に培養してきた脳オルガノイドを破棄しなければならなくなったときの無念さは今でも忘れられない。自宅待機の指示が出て実験ができなくなり、終わりの見えない海外でのコロナ渦の生活の中、不安感と同時に何のための研究留学なのか思い悩む日々が続いた。それまで当たり前のように研究室に通い、同僚と合間に雑談しながら

実験をする日常がいかに貴重なものだったのか痛感した。ようやく研究室に通って実験が再開できるようになるまでに半年近くの期間がかかった。自宅待機明けからの実験は紆余曲折があったが、研究室のベンチに座って手を動かせる喜びを噛みしめながら研究生活を過ごした。コロナ渦が始まってからは州内の感染状況や病床逼迫の具合に応じて、生活の様々な面において制限・緩和のサイクルが繰り返される中で留学生活であった。その中でも緩和期間を狙って、カナダの雄大な自然の中を家族と旅行したり、同僚や留学生仲間とともに家族ぐるみでキャンプや食事をしたり、かけがえのない思い出を作ることができた。コロナ渦という異常ともいえる状況の中、研究に一区切りをつけて無事に帰国することができたのは、家族・仲間・恩師の先生方の支えがあったからこそだと思う。今後はこの留学経験を活かして、神経難病に関わる診療および研究に全力を尽くしていきたい。最後になりましたが、このような貴重な経験を支援して下さった日本神経学会海外派遣プログラムに深く感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008;40:572-574.
- 2) Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, et al. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 2013;4:124-134.
- 3) Smethurst P, Newcombe J, Troakes C, et al. In vitro prion-like behaviour of TDP-43 in ALS. *Neurobiol Dis* 2016;96:236-247.

- 4) Porta S, Xu Y, Restrepo CR, et al. Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo. *Nat Commun* 2018;9:4220.
- 5) Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013; 501:373-379.
- 6) Tamaki Y, Ross JP, Alipour P, et al. Spinal cord extracts of amyotrophic lateral sclerosis spread TDP-43 pathology in cerebral organoids. *PLoS Genet* 2023;19:e1010606.

日本神経学会では40歳以下の学会員を対象に、神経領域の基礎研究または臨床研究を目的とした海外留学研修を推進するため、毎年11月より「日本神経学会海外派遣プログラム」の募集を行っています。支援の決定者には旅費・滞在費として100万円が給付されます。