

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	須貝 章弘
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 620 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	筋萎縮性側索硬化症の病態モデル：自己蛋白量調節機構の破綻による内在性 TDP-43 の過剰発現
論文審査委員	主査 教授 那波 宏之 副査 教授 西澤 正豊 副査 教授 笹岡 俊邦

博士論文の要旨

【背景と目的】 TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43) は筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の関連蛋白である。ALS は上位および下位運動神経が侵される致死性の疾患であり、この運動神経細胞およびグリア細胞中には TDP-43 陽性の封入体が存在する。生化学的には TDP-43 の断片化と不溶性画分への蓄積を認める。また、ALS 患者では TDP-43 発現量の亢進が報告されている。これらの事実から、多くの TDP-43 遺伝子導入動物が作製され、実際、TDP-43 の過剰発現による神経細胞毒性が示されてきた。しかし、TDP-43 は自己蛋白量調節機構を有しており、通常の状態では、TDP-43 の過剰は起こり得ない。申請者は、TDP-43 の自己蛋白量調節機構の破綻が TDP-43 過剰と神経毒性を引き起こすという仮説を立てた。

本研究ではこの仮説のもと、まず、自己蛋白量調節機構が破綻した内在性 TDP-43 過剰発現モデルの構築を目指した。TDP-43 エクソン 6 内には自己蛋白量調節に関わる 2 つの選択的イントロンが存在するが、申請者らはこれまでに、このうち近位の選択的スプライシングの重要性を示してきた。本研究では、この選択的スプライシングの効率をモルフォリノアンチセンス核酸を用いて減弱させることにより、内在性 TDP-43 の過剰発現が導かれるかを検証した。さらに、この内在性 TDP-43 過剰発現状態が、マウス脊髄組織において生化学的に ALS に類似した病態を引き起こすかを検証した。

【方法】 TDP-43 エクソン 6 内の選択的イントロンのスプライス部位を標的としたモルフォリノアンチセンス核酸 (Vivo-Morpholinos) をマウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞に投与し、48 時間後に細胞を回収した。また、C57BL/6N (CRJ) マウス (雄, 11-12 週齢) の髄腔内に腰椎穿刺によりモルフォリノアンチセンス核酸を極めて緩徐に注入し、7 日後に腰髄を摘出し、片側を RNA 抽出、対側を蛋白抽出に用いた。逆転写 PCR 法、定量 PCR 法、ウェスタンブロッティング法により、TDP-43 mRNA および蛋白量の変化を解析した。

【結果】 TDP-43 エクソン 6 内に存在する 2 つの選択的イントロンの 5'-スプライス部位および 3'-スプライス部位をそれぞれ標的としたアンチセンス核酸を Neuro2a 細胞に投与した。このうち、近位の選択的イントロンの 5'-スプライス部位の近位部を標的としたアンチセンス核酸が、最も効率よく選択的スプライシングを抑制し、非スプライシング産物を増加させた (平均 2.1 倍, $p < 0.001$, $n = 3$)。さらに、このアンチ

センス核酸は TDP-43 蛋白量を約 2 倍に増加させた ($p < 0.001$, $n=4$). 次に, このアンチセンス核酸 1.5 ug をマウス髄腔内に注入すると, TDP-43 mRNA の非スプライシング産物は平均 1.7 倍 ($p < 0.01$, $n=4$), TDP-43 蛋白量は平均 1.9 倍 ($p < 0.05$, $n=4$) に増加した. アンチセンス核酸 3.0 ug 投与では, TDP-43 mRNA の非スプライシング産物は平均 2.3 倍 ($p < 0.001$, $n=4$) に増加したが, 意外なことに, RIPA 可溶性画分の 43kDa TDP-43 の増加はみられなかった. しかし一方で, 35kDa の TDP-43 C 末断片が RIPA 可溶性画分と Urea 画分で増加した. さらに同組織では, アポトーシス促進因子である BIM mRNA の発現が亢進し, この発現量は Urea 画分の 35kDa TDP-43 C 末断片の増加と有意な正の相関を示した ($r=0.92$, $p=0.001$).

【考察】本研究では, まず, TDP-43 の選択的スプライシングをアンチセンス核酸により抑制可能なこと, これにより TDP-43 発現が亢進することをマウス神経系培養細胞で示した. さらに, 成体マウス脊髄組織でも, この選択的スプライシング効率の減弱により TDP-43 量が増加することを明らかにした. これらの結果は, TDP-43 蛋白量調節機構におけるこの選択的スプライシングの重要性を示すとともに, 内在性 TDP-43 過剰発現モデルを細胞およびマウス個体において構築したことを意味する.

さらに, このマウス脊髄組織では, TDP-43 の断片化が促進されることを見出した. 断片化 TDP-43 は ALS 罹患組織においても観察される重要な生化学的指標である. この断片化はカスパーゼ 3 によるものと推定されており, カスパーゼカスケードはアポトーシス誘導刺激により誘導される. 申請者は, 同組織においてアポトーシス促進因子である BIM mRNA の発現が増加していること, この発現量と断片化 TDP-43 量に正の相関があることを見出した. これらの生化学的検討の結果は, 本研究により構築された内在性 TDP-43 過剰発現モデルが ALS 病態を模倣している可能性を示す. 今後, より長期に観察し, 運動神経症状, 核内 TDP-43 の消失と細胞質内の封入体形成, 運動神経細胞死の有無を検証し, モデルとしての適正を検討する必要がある.

本研究では, mRNA 前駆体のプロセッシングを, アンチセンス核酸により特異的に制御することにより, 疾患モデルの作成を試みた. 本手法の利点は, 遺伝子に改変を加えず, 簡便かつ迅速に, 年齢特異的な病態モデルを作製できることにある. しかし, アンチセンス核酸の導入方法については, 毒性がなく, かつ長期の効果発現が示されているものを用いるなどの今後の工夫が必要である. 本研究により構築された内在性 TDP-43 過剰発現モデルが, さらに ALS 病態の解明と治療法開発に貢献することが期待される.

審査結果の要旨

TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43) は筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の関連蛋白である. ALS 患者の運動神経細胞およびグリア細胞中に封入体として存在する TDP-43 は, 神経細胞死との因果関係が指摘されている. ここに申請者は, TDP-43 の選択的スプライシング依存的な自己蛋白量調節機構の破綻が, TDP-43 過剰と神経毒性を引き起こすという仮説を立て, 実験的な検証をおこなった. スプライス部位に対するアンチセンス核酸を Neuro2a 細胞に投与すると, TDP-43RNA の選択的スプライシング効率が減少した. 結果, 全長 TDP-43mRNA レベルが上昇し, 全長 TDP-43 蛋白の発現量も増加した. 同アンチセンス核酸をマウス髄腔内に注入したところ, 選択的スプライシングは上述のように抑制され, TDP-43 蛋白量は増加した. 一方, より大量のアンチセンス核酸投与下では, 選択的スプライシングはより強く抑制されたが, TDP-43 蛋白量は増加せず, 代わりに TDP-43 カルボキシル末断片と思われる分子が RIPA 可溶性画分と Urea 画分で増加した. また, 同時にアポトーシス促進因子である BIM mRNA の発現もそれに伴って上昇をした. このように, 本アンチセンス核酸注入モデルは ALS 患者脊髄の分子病態を反映することが判明した.

以上、本研究において ALS 研究に有用と思われる TDP-43 スプライシング改変モデルを開発した点に、学位論文としての価値を認める。