

TDP-43 病態伝播仮説の立証を目的としたウイルスベクターの作成

坪口 晋太郎

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻 脳神経内科学分野
(主任:小野寺理教授)

Development of mouse ALS model to detect TDP-43 inclusions and spreading

Shintaro Tsuboguchi

Department of Neurology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University
(Director: Prof. Osamu ONODERA)

Reprint requests to:

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University 1-757 Asahimachi-dori,
Chuo-ku, Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先: 〒951-85185 新潟市中央区旭町通 1-757 新潟大学・大学院医歯学総合研究
科 脳神経内科学分野

要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位運動ニューロン (upper motor neuron: UMN) および下位運動ニューロン (lower motor neuron: LMN) が侵される神経変性疾患である。病理学的には、運動神経細胞やグリア細胞に、TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43) 陽性の凝集体が認められる。このことから、病態として、異常TDP-43が、局所から伝播し広がっていくとする仮説が提唱されている。本研究では、この仮説を検証するため、特定の脳領域あるいは細胞種にTDP-43陽性凝集体を形成するマウスモデルの開発を目的とした。まず凝集体を作りやすい変異TDP-43を発現するアデノ随伴ウイルスを作製した。これを脳皮質、脊髄、あるいは骨格筋に発現させ、特定の細胞種や領域に、TDP-43陽性凝集体を高効率に作成し得た。本研究で確立したマウスモデルは、TDP-43陽性凝集体の伝播を明らかとするのに貢献すると期待される。

キーワード:筋萎縮性側索硬化症, TDP-43陽性凝集体, 伝播, アデノ随伴ウイルス, マウスモデル

緒言

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は、上位運動ニューロン (upper motor neuron: UMN) および下位運動ニューロン (lower motor neuron: LMN) を選択的に侵す神経変性疾患である¹⁾。多くは孤発性であり、局所から始まり、全身に広がり、呼吸筋麻痺にて死に至る。病理学的にはUMN, LMN, 病変部のグリア細胞、骨格筋細胞の細胞質に、糸くず様、顆粒状など、多様な形態のTAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43) 陽性の凝集体を認める²⁾⁻⁶⁾。TDP-43遺伝子の変異をもつ家族性ALSが見出されたことから、TDP-43の異常が、本症の病態の中心と考えられている⁷⁾⁻⁹⁾。

病態の伸展機序として、異常TDP-43が、エクソソームやナノチューブを介し細胞間を伝播し、伝播先の細胞内の正常TDP-43を異常化するという説が唱えられている。これは、プリオンの伸展様式に類似しており、プリオン仮説と言われる¹⁰⁾⁻¹²⁾。実際、TDP-43は、プリオン様のドメインを持ち¹⁰⁾、異常化したTDP-43は、野生型TDP-43の凝集を促す¹³⁾。さらに、培養細胞間で異常TDP-43形成が広がること¹¹⁾¹²⁾、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) にて、サル脊髄に野生型TDP-43を強制発現させた系にて、TDP-43が脊髄内や大脳皮質へ広がること¹⁴⁾、TDP-43病理を示したヒト脳サルコシル抽出物を、TDP-43過剰発現マウスに注入し、注入部位を超えてTDP-43陽性凝集体を認めることが報告された¹⁴⁾¹⁵⁾。

しかし、生体でのTDP-43の伝播は、実証されておらず、その伝播方式も、順行性か逆行性か解明されていない¹⁶⁾¹⁷⁾。アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) を用いた系での凝集体の形成は限定的で、ALS病理とは異なる¹⁴⁾。さらに、AAVによる発現ベクターそのものが、逆行性にあるいはシナプスを超えて感染した可能性がある¹⁸⁾。またTDP-43病理を示したヒト脳サルコシル抽出物を注入した系では、複数の部位に注入しているため、その伸展形式は不明である¹⁵⁾。さらに、脊髄への伝播は示されていない¹⁵⁾。

AAVは部位特異的な遺伝子発現誘導を得るには有用であり、本法を用い、生体内での伝播の有無を検証できると考える。しかし、AAVを用いて検証するためには、導入したベクターそのものの感染と、発現したTDP-43を区別できることが必要である。さらに、その伝播方式が、順行性か、逆行性か検証する為には、UMN-LMH-筋肉各々で、特異的にALS病理を模倣できる系を確立する必要がある。本研究では、AAVを用い、この検証に資するマウスモデルを開発することを目的とした(図1)。

材料と方法

1. AAV プラスミドの作成

核移行シグナル (R82L/K83Q) と RNA 認識モチーフ 1 領域 (C173S/C175S) に変異を持ち、高い凝集能を示す TDP-43 (mtTDP43)¹⁹⁾ の DNA プラスミドを GeneArt Site-Directed Mutagenesis System (Thermo Fisher) を用いて作成した。PCR 条件は、プライマー (表 2) を用いて、94°C 2 分の初期変性後、94°C 20 秒、57°C 30 秒、68°C 3 分を 18 サイクルとした。mtTDP43 の 5' 末端に標識タグとして Myc を付与し、制限酵素により CAG プロモーター (広汎細胞用) あるいは human Synapsin 1 プロモーター (hSyn; 神経細胞特異的) を持つ AAV 発現ベクター (pAAV)

に挿入した(表 1). また In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) と標的遺伝子のプライマー(表 2) を用いて, mCherry-P2A-mtTDP43 および EGFP-P2A-mtTDP43 を AAV 発現ベクターに挿入した.

2. 培養細胞

マウス神経芽細胞腫由来である Neuro 2A 細胞および骨格筋細胞として C2C12 細胞を用いた. 10%ウシ胎児血清(FBS, Bio West)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM, Thermo Fisher)中で, 5% CO₂ 存在下, 37°Cで培養した. Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher)を用いてトランスフェクションを行い 2~6 日間培養した. Neuro 2A 細胞では, トランスフェクション 1 時間前に 0.5%FBS 添加 DMEM に変更し, 神経細胞への分化を促した. C2C12 細胞では, トランスフェクション翌日に 10% ウマ血清(HS, Thermo Fisher)を添加した DMEM に変更し 6 日間培養した. 初代培養神経細胞は, 妊娠 18 日のマウスにソムノペンチルを腹腔内投与したのち, 胎仔の頭蓋骨と髄膜を除き, 大脳皮質を取り出した. 0.25% Trypsin と DNase を含んだ PBS で 37°C 15 分インキュベートし分散後, ダルベッコ改変イーグル培地/ハム F-12 混合培地に 5×10^5 cells/ml で培養した. 固定は 4% paraformaldehyde (PFA) で 30 分間行った.

3. AAV の作製

上記の AAV ベクタープラスミド(表 1)とヘルパープラスミド(pAAV2/1 と pHelper)を HEK 細胞(AAVpro 293T Cell Line, Takara)へトランスフェクションし, 3 日後に回収した. $1,000 \times g$ で 10 分間 4°C 下で遠心を行い, 上層を PEG 溶液で攪拌し, 超音波で沈殿を破碎した. Benzonase (25 unit/ μ l) 20 μ l を加え, 37°C で 45 分間インキュベートし, $2,500 \times g$ で 10 分間遠心し, 上層を回収した. Iodixanol 濃度勾配を作成した遠心用チューブ(Beckman)に回収した上層を入れ, 18°C $200,000 \times g$ で 2 時間 15 分遠心した. 21G 針でウイルス層を回収し, Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassette (Thermo Fisher)を用いて透析を行った. アミコンウルトラ(100K 100,000 NMWL)に入れ, $5,000 \times g$ で 10 分間遠心を繰り返し約 500 μ l に濃縮した. AAVpro Titration Kit (Takara)を用いてリアルタイム PCR を行い, ウイルス濃度を測定した. ウイルス濃度は $2.5 \sim 10 \times 10^{12}$ gc/ml に調整した.

4. マウスへの AAV 注入

C57BL/6J マウス(雄, 8 週齢)あるいは ChAT-Cre マウス(Jackson Laboratory)を用い, イソフルラン吸入による全身麻酔下において AAV を注入した. 大脳皮質への注入では, C57BL/6J マウスの頭蓋骨を露出させ, 27G 針で頭蓋骨に穴を開けた. ガラスキャピラリーをマイクロシリッジにつなぎ, 各種 AAV を大脳皮質の運動野(bregma から頭側に 0.5 mm, 左側に 1.5 mm, 深さ 0.5 mm の位置)に 0.6 μ l を注入した²⁰. グリアの反応については, 2.5×10^{12} gc/ml に調整した AAV-CAG-Myc-mtTDP43 および AAV-hSyn-Myc-mtTDP43 を使用し, コントロールは

同濃度の AAV-CAG-DIO-EGFP とした。脊髄への注入では、ChAT-Cre マウスの椎弓を露出させ、第 4, 5 頸椎の椎弓間(正中から左側に 0.5 mm, 深さ 0.7 mm の位置)に AAV を 0.6 μ l 注入した。筋への注入では、C57BL/6J マウスの上腕二頭筋を露出させ、AAV を 2.0 μ l 注入した。任意の日数経過後、ソムノペンチルを腹腔内投与したのち、PBS 12 ml, 4% PFA 15 ml を心室内に投与して灌流固定し、脳と脊髄を取り出した。4% PFA で 0.5~1.5 時間後固定し、30%スクロースで 1 晩置換した。

5. 免疫染色

OCT コンパウンド中で凍結した組織から、20 μ m 切片を作成した。1% BSA で 2 時間常温でブロッキングを行い、抗 Myc 抗体 (Bio Rad, MCA1929), 抗 TDP-43 (260-414) 抗体 (Proteintech, 12892-1-AP), 抗 GFP 抗体 (AbD Serotec, 4745-1051), 抗 Iba1 抗体 (Wako, 019-19741), 抗 GFAP 抗体 (Abcam, ab7260) を 1 次抗体として用いた。2 次抗体として、Alexa 488/568/647 donkey anti-rat/rabbit/sheep IgG (Invitrogen) を用いた。

6. タンパク質抽出とウエスタンブロットニング

培養細胞に各種 AAV を 1.0 μ l 感染させ、6 日間培養した。Protease Inhibitor (Roche 1169748001) を含む RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) 400 μ l で溶解した。13,000 \times g で 20 分間 4 $^{\circ}$ C 下で遠心を行い、上清を RIPA 可溶性画分とした。BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher) を用いタンパク質濃度を測定した。10%ポリアクリルアミドゲル Super SepTM Ace (Wako) を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜 (Millipore) に転写した。抗 Myc 抗体 (Bio Rad, MCA1929), 抗 TDP-43 (260-414) 抗体 (Proteintech, 12892-1-AP) を 1 次抗体として用いた。内在性コントロールとして抗 Tuj1 抗体 (Covance, MMS-435P) を用いた。HRP 標識した 2 次抗体で反応させ、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いてシグナルを検出した。

結果

1. 培養細胞における TDP-43 陽性凝集体の形成

mtTDP-43 を発現する AAV プラスミド (pAAV-CAG-Myc-mtTDP43, pAAV-hSyn-Myc-mtTDP43; 表 1) を作製した。これらのコンストラクトが、TDP-43 陽性凝集体を形成するか、Neuro 2A 細胞を用い検討した。各コンストラクトを遺伝子導入し、免疫染色を行った。その結果、細胞質に明瞭な Myc 陽性の凝集体を認めた (図 2A, C)。Myc 陽性の凝集体には、TDP-43 も共局在していた (図 2B, D)。hSyn-Myc-mtTDP43 よりも、CAG-Myc-mtTDP43 の方が、凝集体を多く認めた。

次に、AAV に感染した細胞と、伝播先の細胞を区別するため、蛍光タンパク質 (mCherry あるいは EGFP) と mtTDP43 を、同時に発現するベクターとして、pAAV-hSyn-mCherry-P2A-Myc-mtTDP43 および pAAV-Syn-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43 を作製した。これらを Neuro 2A 細

胞に遺伝子導入した。その結果、mCherryもしくはEGFP陽性細胞にて、MycおよびTDP-43陽性の凝集体を認めた(図2E-J)。

次に、上記コンストラクトからAAVを作製した。AAV-CAG-Myc-mtTDP43およびAAV-Syn-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43を感染させた細胞にて、タンパク質の発現をウエスタンブロットで検討した。MycおよびTDP-43は、同じ分子量(約44kDa)の位置に認めた(図3)。またAAV-Syn-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43にて、EGFPの発現を確認した(図3)。さらにAAV1-CAG-Myc-mtTDP43を、初代培養細胞に感染させ、Myc、TDP-43共陽性の凝集体を確認した(図2K, L)。骨格筋細胞由来C2C12細胞にて、pAAV-CAG-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43の遺伝子導入にて、細胞質にMyc、TDP-43共陽性の凝集体を認めた(図2 M, N)。

2. マウス生体におけるTDP-43陽性凝集体形成モデルの確立

A. 大脳皮質UMNでのTDP-43陽性凝集体形成モデル

上記で作製したAAVを、マウス大脳皮質一次運動野に注入し、TDP-43陽性凝集体が形成されるか検証した(図1A)。AAV1-CAG-Myc-mtTDP43を注入後、2週間で、注入部位の細胞内にMyc陽性の凝集体の形成を認めた(図4A)。大脳皮質の神経細胞では、第II/III層およびUMNを有するV層の神経細胞に陽性細胞認め、その約50%に、点状や円形、顆粒状といった様々な形態の凝集体を、細胞質や軸索の起始部に認めた。ミクログリア、アストロサイトでも凝集体を認めたが、その形成は限定的であった(図4C, D)。神経細胞特異的プロモーターを持つAAV1-hSyn-Myc-mtTDP43によっても、同様の結果を得た(図4B)。しかし、CAG-Myc-mtTDP43より凝集体の数は少ない傾向にあった。次に、蛍光タンパク質とmtTDP43を同時に発現するAAV1-hSyn-mCherry/EGFP-P2A-Myc-mtTDP43の注入を行った。その結果、同様に第II/III層およびUMNを有するV層の神経細胞にmCherryあるいはEGFP陽性細胞を認め、それらの一部にMyc陽性の凝集体を認めた(図4E, F)。

次にTDP-43発現部位のグリアの反応について評価した(図5)。AAV1-CAG-Myc-mtTDP43もしくはAAV1-hSyn-Myc-mtTDP43の注入後2週間の第V層にて、ミクログリアおよびアストロサイトの細胞体の面積と密度を免疫染色で評価した。AAV自体でのグリア細胞の活性化が報告されているためAAV1-CAG-DIO-EGFPを対照とした²¹⁾。AAV1-CAG-Myc-mtTDP43ではGFAP陽性のアストロサイトの細胞体の面積の有意な増加を認めた(図5D-F)。一方、神経細胞特異的なAAV1-hSyn-Myc-mtTDP43では、ミクログリア、アストロサイト共に細胞体面積の有意な増加を認めた(図5G-I, J-L)。

B. 脊髄LMNでのTDP-43陽性凝集体形成モデル

mtTDP43をLMN特異的に発現させるため、Cre依存的にmtTDP43発現するAAV1-CAG-DIO-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43を作製し、LMNにCreを発現するChAT-Creマウスの脊髄へ注入した(図1B)。その結果、注入から2週間で脊髄にMycおよびTDP-43陽性の明瞭な凝集体

を認めた(図4G). 凝集体は, 細胞質では主に円形を示しており, 神経突起内にも認めた. 大脳皮質と比べると形態が異なり, また凝集体の割合は5%程度であった.

C. 骨格筋でのTDP-43陽性凝集体形成モデル

mtTDP43を骨格筋に発現させるため, AAV1-CAG-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43をマウスの上腕二頭筋に注入した(図1C). その結果, 注入から2週間で骨格筋にMycおよびTDP-43陽性の明瞭な凝集体を認めた(図4H). 骨格筋細胞の細胞膜周囲に接する形で, 複数の楕円形の凝集体を認めた. 凝集体が作られる割合は50%程度であった.

考察

ALSのプリオン仮説を検証するためには, AAVによる強制発現系は有用である, しかし, AAVはシナプスを超え感染する場合があるため¹⁸⁾, 導入したベクターそのものの感染と, 伝播したTDP-43を区別する必要がある. 私は, P2Aを用い²²⁾, 翻訳後にMyc-mtTDP43のN末端側を切断し, 蛍光タンパク質とmtTDP-43を, 別々に発現させた. 本手法により, AAVそのものが, シナプスを超えて感染した細胞は蛍光タンパク質も陽性となるが, TDP-43のみが伝播した細胞は, 蛍光タンパク質は陰性となるため, ウイルスベクターそのものの感染を明確に区別し, TDP-43の伝播の有無を検証することが可能である.

さらに, 順行性, 逆行性の可能性について検証するため, その原発部位として考えられる, UMN-LMH-筋肉各々にて, ALS病理に類似したTDP-43陽性凝集体を形成させる必要があった. 私は, 高い凝集能を持つ変異ヒトTDP-43と, CAG, SynapsinプロモーターやCre依存性に発現するDIOを含んだコンストラクトを用い, マウス, 大脳皮質運動野第II/III層, V層の錐体神経細胞, 脊髄の運動神経細胞, 骨格筋細胞に, 糸くず, 顆粒状など多様な形態をもち, 既報のALS病理に類似したTDP-43陽性凝集体を, 効率よく形成する系を開発した²⁾⁶⁾. これらにより, UMN-LMH-筋肉間での伝播を検証することが可能となった.

今回の系では, 神経細胞特異的なAAV1-hSyn-Myc-mtTDP43の発現にて, ミクログリア, アストロサイト共に細胞面積の有意な増加を認め, 神経細胞におけるTDP-43の発現によりグリア細胞の活性化が, 引き起こされた可能性が示唆された. グリア細胞の活性化は, ALSやそのモデルマウスでも報告されている²³⁾²⁴⁾. このことから, 本モデルは, この面でもALS病態を模倣していると考えた. グリア細胞の活性化が, 神経細胞死によるものか否かは議論がある. 私の結果では, 凝集体を形成した細胞の神経細胞死が目立たなかった. よって, グリア細胞の活性化は, 神経細胞死によらない可能性がある. このことは, 神経細胞死が, この活性化したグリア細胞によりもたらされる可能性を示唆する.

本モデルの課題について考察する. 本研究では第II/III層および第V層を中心とした大脳皮質感染性を持つAAV1を採用した²⁵⁾. そのため, TDP-43の発現は第II/III層および第V層に限局していた. 一方, ALSでは大脳皮質のすべての層にTDP-43陽性凝集体を認めうる. よって, 本モデルではALS病態を正確に反映できていない可能性がある. また, 人工的に核移行

シグナルに変異を導入し、核タンパク質であるヒトTDP-43を、細胞質に強制的に局在させている。さらに、UMN-LMH-筋肉で異なるプロモーターを用いているためTDP-43の発現量は統一されておらず、部位毎の比較が困難である。また、解剖学的に、ヒトではUMNとLMNが直接結合するcortico-motoneuronが多いが、マウスではUMNとLMNの間に介在ニューロンが存在する相違がある²⁶⁾。つまり、ヒトと齧歯類ではUMN-LMUの運動神経回路が異なり、随意運動時の機能も異なると推定される。これらの課題を踏まえた上で、TDP-43の伝播について注意深く検証する必要がある。

本モデルの開発により、TDP-43 が特定の神経回路内を伝播しうるか、またするとすればどのような様式なのか検証が可能となり、伝播機序の解明および治療への応用へ貢献することが期待される。

表 1

AAV ベクタープラスミド
pAAV-CAG-Myc-mtTDP43
pAAV-hSyn-Myc-mtTDP43
pAAV-CAG-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43
pAAV-hSyn-mCherry-P2A-Myc-mtTDP43
pAAV-hSyn-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43
pAAV-CAG-DIO-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43

表 2

	forward primers	reverse primer
Mutant TDP-43	5'-ATATGATAGATGGACGATG GAGTGACAGCAAACCTTCCTAA TTCTAAG-	3'-GAAGCATCTGTCTCATCCATTG TAGTTTGTTATCTTTTGGATAGT-
mCherry- P2A	5'-GAAGGTACCGGATCCGCCA CCATGGTGAGCAAG	3'-AGTAGCTCCGGATCCGGACTTGT ACAGCTCGTC
EGFP- P2A	5'-GAAGGTACCGGATCCGCCA CCATGGTGAGCAAG	3'-AGTAGCTCCGGATCCCTTGATACA GCTCGTCCATG

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において御指導を賜りました新潟大学医歯学総合研究科・脳神経内科学分野の小野寺理教授、脳研究所システム脳病態学の上野将紀教授に深謝申し上げます。

図 1. AAV を用いた TDP-43 陽性凝集体の伝播マウスモデル

本研究の概略. マウスの大脳皮質(A), 脊髄(B), 骨格筋(C)にそれぞれ AAV を注入することにより, TDP-43 陽性凝集体を形成する. 凝集体の生化学的, 病理学的特徴, さらには伝播を評価できるマウスモデルを開発した.

図 2. 培養細胞における TDP-43 陽性凝集体の形成

(A, B) pAAV-CAG-Myc-mtTDP43 のトランスフェクションによる Myc および TDP-43 陽性凝集体 (Neuro 2A 細胞). (C, D) pAAV-hSyn-Myc-mtTDP43 による Myc, TDP-43 陽性凝集体 (Neuro 2A 細胞). (E-G) pAAV-hSyn-mCherry-P2A-Myc-mtTDP43 による mCherry 陽性細胞での Myc, TDP-43 陽性凝集体. (H-J) pAAV-hSyn-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43 による EGFP 陽性細胞での Myc, TDP-43 陽性凝集体. (K, L) AAV-CAG-Myc-mtTDP43 を感染させた初代培養神経細胞の Myc, TDP-43 陽性凝集体. (M, N) pAAV-CAG-Myc-mtTDP43 による Myc, TDP-43 陽性凝集体 (C2C12 細胞). スケールバー, 50 μ m.

図 3. Western blotting による TDP-43 タンパク質の発現の評価

AAV-CAG-Myc-mtTDP43 および AAV-hSyn-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43 を感染させた Neuro 2A 細胞における, Myc, TDP-43, GFP の発現を Western blotting で評価した. Myc-mtTDP-43(変異), 白矢頭; TDP-43(内因性), 黒矢頭.

図 4. 変異 TDP-43 発現 AAV を投与したマウス大脳皮質における TDP-43 陽性凝集体の形成

(A) AAV-CAG-Myc-mtTDP43 を投与したマウス大脳皮質における Myc 陽性の凝集体. (B) AAV-hSyn-Myc-mtTDP43 を投与したマウス大脳皮質における Myc 陽性凝集体. (C, D) AAV-CAG-Myc-mtTDP43 投与により, Myc を発現した GFAP 陽性アストロサイト. (E) AAV-hSyn-mCherry-P2A-Myc-mtTDP43 投与による mCherry 陽性神経細胞内での Myc 陽性凝集体. (F) AAV-hSyn-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43 投与による EGFP 陽性神経細胞内での Myc 陽性凝集体. (G) AAV-DIO-CAG-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43 を投与した ChAT-Cre マウス脊髄における EGFP 陽性神経細胞内での Myc 陽性凝集体. (H) AAV-CAG-EGFP-P2A-Myc-mtTDP43 を投与したマウス骨格筋における EGFP 陽性細胞内での Myc 陽性凝集体. スケールバー, 50 μ m.

図 5. 変異 TDP-43 発現 AAV を投与したマウス大脳皮質におけるグリア細胞の活性化

(A-F) AAV-CAG-Myc-mtTDP43 を投与したマウス大脳皮質におけるミクログリアおよびアストロサイトの活性化. コントロールは AAV-CAG-DIO-EGFP. Iba1 陽性のミクログリア(A, 右; Myc, 左)の細胞体の面積(B), 密度(C). GFAP 陽性のアストロサイト(D, 右; Myc, 左)の細胞体の面積(E), 密度(F). (G-L) AAV-hSyn-Myc-mtTDP43 を投与したマウス大脳皮質におけるミクログリアおよびアストロサイトの活性化. コントロールは AAV-CAG-DIO-EGFP. Iba1 陽

性のミクログリア(G, 右; Myc, 左)の細胞体の面積(H), 密度(I). GFAP 陽性のアストロサイト(J, 右; Myc, 左)の細胞体の面積(K), 密度(L). n = 3, * $p < 0.05$ (Student の t 検定). スケールバー, 50 μm .

参考文献

- 1) Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW: Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539:197-206, 2016.
- 2) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:602-611, 2006.
- 3) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130-133, 2006.
- 4) Lee EB, Lee VM, Trojanowski JQ: Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13:38-50, 2011.
- 5) Mori F, Tada M, Kon T, Miki Y, Tanji K, Kurotaki H, Tomiyama M, Ishihara T, Onodera O, Kakita A, Wakabayashi K: Phosphorylated TDP-43 aggregates in skeletal and cardiac muscle are a marker of myogenic degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and various conditions. *Acta Neuropathol Commun* 7:165, 2019.
- 6) Tawara N, Yamashita S, Kawakami K, Kurashige T, Zhang Z, Tasaki M, Yamamoto Y, Nishikami T, Doki T, Zhang X, Matsuo Y, Kimura E, Tawara A, Maeda Y, Hauschka SD, Maruyama H, Ando Y: Muscle-dominant wild-type TDP-43 expression induces myopathological changes featuring tubular aggregates and TDP-43-positive inclusions. *Exp Neurol* 309:169-180, 2018.
- 7) Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, Mayo K, Norton JB, Levitch D, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Bigio EH, Caselli R, Baker M, Al-Lozi MT, Morris JC, Pestronk A, Rademakers R, Goate AM, Cairns NJ: TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol* 63:535-538, 2008.
- 8) Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE: TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319:1668-1672, 2008.

- 9) Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O: TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 63:538-542, 2008.
- 10) Ravits JM, La Spada AR: ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology* 73:805-811, 2009.
- 11) Polymenidou M, Cleveland DW: The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell* 147:498-508, 2011.
- 12) Hock EM, Polymenidou M: Prion-like propagation as a pathogenic principle in frontotemporal dementia. *J Neurochem* 138:163-183, 2016.
- 13) Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M: Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4:124-134, 2013.
- 14) Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yokota S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Kuwabara S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T: Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* 135:833-846, 2012.
- 15) Porta S, Xu Y, Restrepo CR, Kwong LK, Zhang B, Brown HJ, Lee EB, Trojanowski JQ, Lee VM: Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo. *Nat Commun* 9:4220, 2018.
- 16) Gromicho M, Figueiral M, Uysal H, Grosskreutz J, Kuzma-Kozakiewicz M, Pinto S, Petri S, Madeira S, Swash M, de Carvalho M: Spreading in ALS: The relative impact of upper and lower motor neuron involvement. *Ann Clin Transl Neurolo* 7:1181-1192, 2020.
- 17) Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC: Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 377:942-955, 2011.
- 18) Zingg B, Chou XL, Zhang ZG, Mesik L, Liang F, Tao HW, Zhang LI: AAV-Mediated Anterograde transsynaptic Tagging: Mapping corticocollicular input-defined neural pathways for defense behaviors. *Neuron* 93:33-47, 2017.
- 19) Shodai A, Morimura T, Ido A, Uchida T, Ayaki T, Takahashi R, Kitazawa S, Suzuki S, Shirouzu M, Kigawa T, Muto Y, Yokoyama S, Takahashi R, Kitahara R, Ito H, Fujiwara N, Urushitani M: Aberrant assembly of RNA recognition motif 1 links to pathogenic conversion of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem* 288:14886-14905, 2013.
- 20) Ueno M, Nakamura Y, Li J, Gu Z, Niehaus J, Maezawa M, Crone SA, Goulding M, Baccei ML, Yoshida Y: Corticospinal circuits from the sensory and motor cortices

differentially regulate skilled movements through distinct spinal interneurons. *Cell Rep* 23:1286-1300, 2018.

21) He T, Itano MS, Earley LF, Hall NE, Riddick N, Samulski RJ, Li C: The Influence of murine genetic background in adeno-associated virus transduction of the mouse brain. *Hum Gene Ther Clin Dev* 30:169-181, 2019.

22) Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, Lee KY, Kim MK, Shin BA, Choi SY: High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 6:e18556, 2011.

23) Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW: Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11:251-253, 2008.

24) Brettschneider J, Toledo JB, Van Deerlin VM, Elman L, McCluskey L, Lee VM, Trojanowski JQ: Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 7:e39216, 2012.

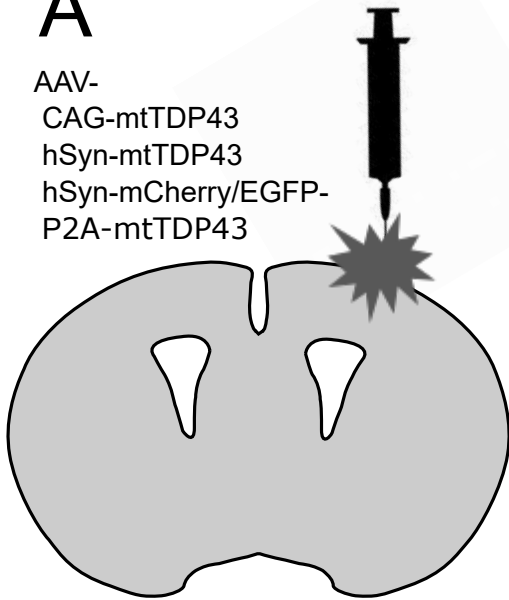
25) Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, Takaji M, Isa K, Mizukami H, Ozawa K, Isa T, Yamamori T: Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci Res* 93:144-157, 2015.

26) Lemon RN: Descending pathways in motor control. *Ann Rev Neurosci* 31:195-218, 2008.

図1

A

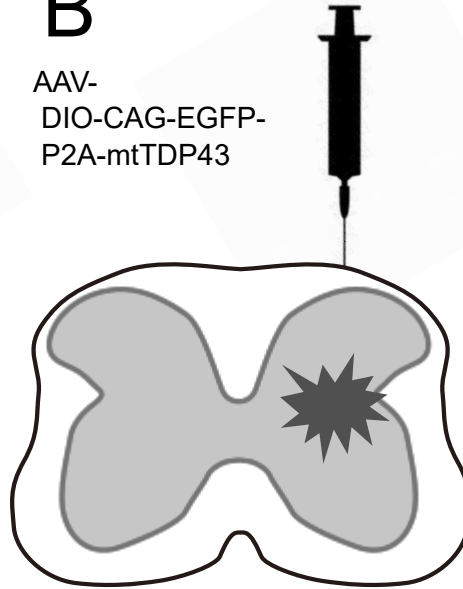
AAV-
CAG-mtTDP43
hSyn-mtTDP43
hSyn-mCherry/EGFP-
P2A-mtTDP43



野生型マウス
大脳皮質

B

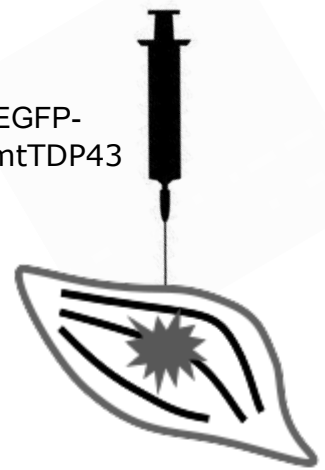
AAV-
DIO-CAG-EGFP-
P2A-mtTDP43



*ChAT-Cre*マウス
脊髄

C

AAV-
CAG-EGFP-
P2A-mtTDP43



野生型マウス
骨格筋

