

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 坪口 晋太郎
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 982 号
学位授与の日付 令和3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 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

論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀
副査 教授 柿田 明美
副査 教授 池内 健

博士論文の要旨

背景と目的

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。症状は局所から拡大して進行し、運動神経細胞やグリア細胞に、TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43) 陽性の封入体が認められる。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。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、順行性か逆行性が解明されていない。本研究では、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: 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。

方法

申請者は、TDP-43 凝集体を形成するマウス実験モデルの確立に先立ち、変異 TDP-43 を発現する AAV ベクターを作製した。特定の細胞種への変異 TDP-43 の発現と可視化を可能にするため、広汎細胞、あるいは神経細胞特異的なプロモーターと標識タグである Myc を挿入し、さらに、AAV に感染した細胞と伝播先の細胞を区別する系を確立するため、感染細胞で蛍光タンパク (mCherry あるいは EGFP) と変異 TDP43 を同時に発現する AAV プラスミドを作製した。TDP-43 の発現と凝集体の形成を確認するため、マウスの神経および骨格筋由来の培養細胞に遺伝子導入し、免疫染色で評価を行った。上記プラスミドを用いて AAV を作製し、培養細胞に感染させ、Western Blotting で蛋白の発現を評価した。また、初代培養細胞に AAV を感染させ、免疫染色で、TDP-43 の発現と凝集体の形成を評価した。作製した AAV をマウス大脳皮質、脊髄、骨格筋に注入し、免疫染色で TDP-43 凝集体の評価を行った。大脳皮質では、TDP-43 凝集体によって引き起こされるグリア細胞の活性化を、免疫染色を用いて評価した。大脳皮質における TDP-43 凝集体形成モデルにおいては、頸髄における TDP-43 の伝播を、免疫染色を用いて経時的に評価した。

結果

はじめに、変異 TDP43 を発現する AAV プラスミドを培養細胞へトランスフェクションしたところ、細胞質に明瞭な Myc および TDP-43 陽性の凝集体が効率よく形成された。次に、このプラスミドから作製した AAV を培養細胞に感染させ、Western Blotting を行ったところ、Myc および TDP-43 のバンドを同じ分子量

に認め、TDP-43 の発現が確認された。この AAV を、マウス生体の大脳皮質、脊髄、骨格筋それぞれに注入したところ、AAV に感染した特定の細胞種や領域に、TDP-43 凝集体を誘導することができた。凝集体の形態は、大脳皮質では点状や円形、顆粒状といった様々な形態を呈する一方で、脊髄では主に円形の、筋肉では細胞質辺縁に楕円形の凝集体を形成し、細胞種によって違いが見られた。大脳皮質において、TDP-43 の凝集体形成によるグリア細胞の活性化を評価したところ、TDP-43 の発現に伴い、ミクログリアおよびアストロサイトの活性化を認めた。神経特異的に TDP-43 凝集体を形成した場合にも、グリア細胞の活性化を認め、神経細胞における TDP-43 の発現により二次的にグリア細胞の活性化が引き起こされる可能性が示唆された。TDP-43 の伝播について検証したところ、大脳皮質に TDP-43 凝集体を発現後 6 ヶ月以上経過すると、頸髄の皮質脊髄路および灰白質にて Myc 陽性の凝集体が現れはじめた。Myc は主にオリゴデンドロサイトに局在しており、オリゴデンドロサイトへの伝播の可能性が示唆された。

考察と結論

本研究で確立した AAV を用いたマウス ALS モデルによって、TDP-43 凝集体を任意の時期、任意の細胞に形成させることが可能となった。ALS で凝集体を認めるとされる大脳皮質、脊髄、骨格筋の全てにおいて、マウス生体内で TDP-43 凝集体を再現することに成功した。TDP-43 凝集体の形態は、細胞種によって異なっており、各細胞種で凝集体形成の機序が異なる可能性が示唆された。各脳領域や脊髄、筋に形成した TDP-43 凝集体が、他領域にも現れるか経時的に観察することで、TDP-43 凝集体が運動回路内を伝播しうるのかを、網羅的に解析することが可能になると考えられる。大脳皮質を原発とした場合、脊髄へ TDP-43 凝集体が伝播する可能性が示唆されたが、今後さらなる検証が必要である。本研究で確立したマウス ALS モデルは、TDP-43 凝集体の伝播による ALS の病態進展機序の解明と治療法の開発へ貢献すると期待される。

審査結果の要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位および下位運動ニューロンが侵される神経疾患であるが、病理学的には TDP-43 タンパクの凝集体が認められる。その病態として、異常 TDP-43 が局所から伝播して広がっていくという仮説が提唱されている。この仮説検証のために、特定の脳領域あるいは細胞種に外来性の TDP-43 を発現させ凝集体を形成するマウスモデル作成を行った。

高い凝集能を示す変異型 TDP-43 と、緑色蛍光タンパク (GFP) 等のマーカーを同時発現する組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) を作成した。AAV が最初に感染した細胞と外来性 TDP-43 が伝播した細胞の区別は、GFP 等の非伝播性マーカーの発現の有無にて判断することができる。成体マウスの大脳皮質、脊髄、あるいは骨格筋に TDP-43 発現 AAV とコントロール AAV を注入し、それぞれの部位にて高い効率で TDP-43 の凝集体を作成することに成功した。また、凝集体の観察された大脳皮質では、アストロサイトやミクログリアの活性化も観察された。細胞種特異的な外来性 TDP-43 の発現を達成するため、神経細胞特異的プロモーターを使用したり、アセチルコリン作動性ニューロンで Cre を発現するマウスに Cre 存在下で遺伝子発現する FLEX switch タイプの AAV を使用するなどの工夫を行った。

本研究では、TDP-43 凝集体の伝播様式を *in vivo* で解析するために有用なマウス実験系を確立した。この点に学位論文としての価値を認める。