

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

須貝章弘

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻 神経内科学分野

(主任: 西澤正豊教授)

Endogenous TDP-43 Overexpression with Disrupted Autoregulation: Toward an Amyotrophic Lateral Sclerosis Model

Akihiro SUGAI

Department of Neurology, Course for Molecular and Cellular Medicine,

Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) 患者の運動神経細胞およびグリア細胞の細胞質内には, TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43) 陽性の封入体を認める. この TDP-43 発現量が, ALS 患者で亢進しているとの報告がある. 一方, 核内蛋白である TDP-43 は自己蛋白量調節機構を有しており, 通常の状態ではこの過剰は起こり得ない. 著者は, この自己蛋白量調節機構の破綻が TDP-43 過剰発現および神経細胞障害を引き起こすとの仮説を立て, この自己蛋白量調節機構の破綻による内在性 TDP-43 過剰発現モデルを構築し, この仮説を検証することを本研究の目的とした. これまでに著者らは, 外来性 TDP-43 過剰発現細胞の解析に

より、TDP-43 エクソン 6 内の近位選択的イントロンのスプライシングが発現抑制に重要であることを示してきた。本研究では、この選択的スプライシングをモルフォリノアンチセンス核酸により特異的に抑制し、発現抑制機構を破綻させることにより、内在性 TDP-43 過剰発現状態を誘導することに成功した。さらに、成体マウス髄腔内へのアンチセンス核酸の投与により、脊髄組織においても内在性 TDP-43 発現を増加させた。これらの結果は、TDP-43 発現抑制機構におけるこの選択的スプライシングの意義を決定づけるとともに、この破綻による内在性 TDP-43 過剰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、この内在性 TDP-43 過剰発現マウスでは、ALS 罹患組織で見られる TDP-43 C 末断片の増加、さらにアポトーシス促進因子である BIM の発現増加を認めた。これらより、TDP-43 エクソン 6 内の選択的スプライシング効率の減弱は、内在性 TDP-43 の過剰発現を導き、神経細胞障害を引き起こすことが示唆された。この内在性 TDP-43 過剰発現モデルが、ALS 病態のさらなる解明と治療法開発に貢献することが期待される。

キーワード:筋萎縮性側索硬化症, TDP-43, 自己蛋白量調節機構, 選択的スプライシング, アンチセンス核酸

別刷請求先:〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757 新潟大学脳研究所神経内科学教室
須貝章弘

Print requests: Akihiro Sugai, Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University, 1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata-City, Niigata 951-8585, Japan

序文

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¹⁾²⁾³⁾. ALS は上位および下位運動神経が侵される致死的疾患である. 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¹⁾²⁾. また, TDP-43 の点変異は家族性 ALS の原因になる⁴⁾⁵⁾. さらに, 家族性および孤発性 ALS 患者では, TDP-43 発現量の亢進が報告されている⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾. 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 過剰発現による神経細胞毒性が示されてきた⁶⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾. 一方, 外来性 TDP-43 の発現は内在性 TDP-43 の減少を誘導することから, TDP-43 が自己蛋白量を厳密に調節する機構を有していることが明らかになった¹³⁾¹⁴⁾. これは, TDP-43 の過剰が通常の状態では起こり得ないことを意味する. したがって, 外来性 TDP-43 の極端な過剰発現を誘導する既存の遺伝子導入動物モデルでは, なぜ TDP-43 の発現が増加するのかという根本的な問題が解決されず, ALS 病態モデルとしての妥当性が問題になる. 著者は, TDP-43 の自己蛋白量調節機構の破綻が ALS における TDP-43 過剰と神経細胞毒性を引き起こすという仮説を立て, この自己蛋白量調節機構の破綻による内在性 TDP-43 過剰発現モデルを構築することにより, この仮説を検証することを本研究の目的とした.

本仮説の検証のために, 以下の 2 点を確認する必要がある. 第一に, 中枢神経系組織において, 自己蛋白量調節機構の破綻により, 内在性 TDP-43 の過剰発現状態が導かれることである. 第二に, この内在性 TDP-43 過剰状態により, ALS 類似の病態が引き起こされることである. ALS 類似の病態とは, 生化学的には TDP-43 の断片化と不溶性画分への蓄積, 病理学的には TDP-43 陽性の細胞質内封入体と TDP-43 の核からの消失, さらに運動神経細胞死である³⁾. 自己蛋白量調節機構の破綻による内在性 TDP-43 の過剰発現により, これらの現象が確認されれば, ALS の病態理解に大きく近づく.

TDP-43 自己蛋白量調節機構の破綻を誘導するために、まず、この調節機構の詳細を理解しておく必要がある。TDP-43 の発現量の調節は核内 TDP-43 量に依存している。核内蛋白である TDP-43 は、TDP-43 mRNA 前駆体の最終エクソン(エクソン 6)の 3'非翻訳領域に結合する¹³⁾¹⁴⁾。この最終エクソンは、複数の選択的イントロンと複数の選択的 polyA 付加部位をもつ。TDP-43 の過剰は、この polyA 付加部位を変化させ、かつ選択的イントロンのスプライシングを亢進させることにより、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構を介して自己蛋白量の発現抑制を引き起こす(投稿中)¹⁵⁾。特に、複数ある選択的イントロンのうち近位の選択的イントロンのスプライシングが発現抑制に重要であることを、我々はヒト培養細胞を用いて明らかにしている(投稿中)¹⁵⁾。本研究では、まず、この近位の選択的イントロンのスプライシング効率を減弱させることにより、内在性 TDP-43 過剰発現状態が導かれるかをマウス神経系培養細胞およびマウス脊髄組織において検証する。

この選択的イントロンのスプライシング効率を減弱させるために、課すべき制約が 2 つある。第一に、遺伝子に改変を加えないことである。アミノ酸配列の変化に伴い得る TDP-43 機能異常の可能性が排除されていなければならないからである。第二に、TDP-43 mRNA に対し特異的に変化を誘導することである。TDP-43 mRNA を制御する RNA 結合因子などに変更を加えることは、TDP-43 mRNA 以外の広範な RNA 代謝を乱すことになり得るため、病態理解を混乱させる。これらの制約を満たすために、本研究では、モルフォリノアンチセンス核酸を用い、TDP-43 mRNA 前駆体の配列に特異的に介入を加えた。これにより、種々のスプライシング因子の RNA への結合を配列特異的に阻害できる¹⁶⁾。モルフォリノアンチセンス核酸は配列特異性が高く、その作用機序に細胞内蛋白を必要とせず、電氣的に中性であるため細胞内蛋白と相互作用し難い¹⁷⁾。さらに、細胞内で極めて安定性が高く、特に非分裂細胞である神経細胞内に導入されれば、長期間にわたりその効果を発揮し続けることが推定されるため¹⁸⁾、神経変性疾患の病態モデル作製に有用な手段となり得る。

本研究では、モルフォリノアンチセンス核酸を用い、TDP-43 の発現抑制に重要な選択的スプライシングの効率を減弱させることにより、内在性 TDP-43 過剰発現状態が誘導されるかを検証した。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な ALS 類似病態を引き起こすかを検証した。

材料と方法

モルフォリノアンチセンス核酸

オクタグアニジンデンドリマーを結合させたモルフォリノアンチセンス核酸 (Vivo-Morpholinos; Gene tools) を用いた¹⁹⁾。Vivo-Morpholinos の配列は、TDP-43 エクソン 6 内の選択的イントロン 6A の 5'-スプライス部位より近位配列 (#1), 5'-スプライス部位 (#2), 3'-スプライス部位 (#3), 選択的イントロン B の 3'-スプライス部位 (#4) をそれぞれ標的にし、Gene tools 社が設計した (図 1A, 表 1)。コントロールに Standard Control Morpholino Oligo (Gene tools) を用いた。

モルフォリノアンチセンス核の培養細胞への投与

Neuro2a 細胞を 37°C, 5%CO₂ 条件下で 10%FBS を含む Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) で培養した。Vivo-Morpholinos を DMEM 中に図 2 に示す最終濃度となるように添加した。48 時間後に細胞を回収した。

モルフォリノアンチセンス核酸のマウス髄腔内投与

C57BL/6N (CRJ) マウス (雄, 11-12 週齢) に抱水クロラール 0.35 mg/g 体重, キシラジン 0.01 mg/g 体重を腹腔内注射し全身麻酔をかけた。Vivo-Morpholinos を人工脳脊髄液 (Na 150 mM, K 3.0 mM, Ca 1.4 mM, Mg 0.8 mM, P 1.0 mM, Cl 155 mM) を用いて 0.2 ug/ul または 0.4 ug/ul に希釈した。ハミルトンシリンジに接続した約 15cm のカテーテル (PE-10 Intramedic polyethylene tubing, Becton Dickinson) を 32G 針に接続し、Vivo-Morpholinos をカテーテル内に吸引した。腰

背部正中の皮膚を切開し、L5/6 間隙に約 45 度の角度で針を挿入した。ハミルトンシリンジで軽く陰圧をかけ無色透明の脳脊髄液の逆流を確認することにより、針先が髄腔内に到達したものと判断した。血性の液体の逆流を確認したときは、外傷性穿刺と判断し、解析の対象から除外した。シリンジポンプを使用し Vivo-Morpholinos 0.1 ul/分の速度で 7.5 ul (1.5 ug または 3.0 ug) 注入した。7 日後にマウスを解剖し、腰髄を摘出した。片側を RNA 抽出、反対側を蛋白抽出に用いた。新潟大学動物実験倫理委員会による承認を得て行った。

RNA 抽出と逆転写 PCR, 定量 PCR

Total RNA を Nucleospin RNAII (Takara) を用いて抽出した。ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写をかけ相補的 DNA を構築した。

逆転写 PCR は、TaKaRa LA Taq (Takara) を用いて行った。TDP-43 mRNA 選択的スプライシングの解析には、F5 5'-CAGAGCTTTTGCCTTCGTCA-3' , R6-1 5'-CAAAGACGCAGCCTGTGC-3' , F6 5'-TTTCAAATGTTTATGGAAGAAGCA-3' , R6-2 5'-AGTTCCATCTCAAAAGGGTC-3' のプライマー配列をそれぞれ用いた (図 1B)。PCR 条件は、94°C 1 分の初期変性後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 2 分を 35 サイクル、72°C 5 分の追加伸長反応とした。Pdp1 mRNA の選択的スプライシングの解析には、フォワードプライマー 5'-GTGCTGAGTGAGGGAAGGAC-3'、リバースプライマー 5'-TGCAGTGCCATAGATTCTGC-3' を用いた。PCR 条件は、94°C 1 分の初期変性後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分を 40 サイクル、72°C 5 分の追加伸長反応とした。増幅産物を 2% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。

定量 PCR は、SYBR Premix EX TaqTM (Takara) を用いて Thermal Cycler Dice® Real Time System (TP850, Takara) で行った。TDP-43 mRNA の発現解析には、primer 6A のフォワードプライマーに 5'-AGCTGGCTTGGGAAATAACC-3' , リバースプライマーに 5'-

CTGGCTAACATGCCCATCAT-3'を用い， primer 6B のフォワードプライマーに 5'-TGGACTGAGCTTGTGGTGTG-3'，リバープライマーに 5'-CAGAAGTGCAGCAAACAGCA-3'を用いた（図 1B）． BIM mRNA の発現解析には，フォワードプライマー 5'-GGAGACGAGTTCAACGAAACTT ， リバースプライマー 5'-AACAGTTGTAAGATAACCATTTGAGG-3'を用いた． 内在性コントロールは GAPDH (Takara 社より購入)を用いた． PCR 条件は， 95°C30 秒の初期変性後， 95°C5 秒， 60°C30 秒を 40 サイクルとした． $\Delta \Delta CT$ 法により解析した．

蛋白抽出

Protease inhibitor cocktail (Sigma) および phosphatase inhibitor cocktail-2 (Sigma) を含む RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) 400ul に組織を浸し破碎した． 超音波処理をした後， 100,000g で 30 分間 4°C 下で超遠心を行い， 上清を RIPA 可溶性画分とした． Urea 画分抽出のために， 同様な操作を 2 回繰り返すことにより RIPA 可溶性画分の持ち込みを排除した． この RIPA 不溶性のペレットに Protease inhibitor cocktail (Sigma) および phosphatase inhibitor cocktail-2 (Sigma) を含む Urea buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, pH 8.5) 100ul を加えた． 超音波処理した後， 100,000g で 30 分間 22°C 下で超遠心を行い， 上清を Urea 画分とした． RIPA 可溶性画分に対し， BCA Protein Assay kit (Thermo) を用い蛋白濃度を測定した． Urea 画分の蛋白濃度は RIPA 可溶性画分と同じ比率であると仮定し， 解析を行った．

ウエスタンブロッティング

Laemmli Sample Buffer (BioRad) を加え， 96°C で 5 分間処理した． 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 TDP-43 (260-414) 抗体 (Proteintech, 12892-1-AP) または抗 TDP-43 (1-260) 抗体 (Proteintech,

10782-2-AP)を1次抗体として用いた(図 3A). 内在性コントロールとして抗 GAPDH 抗体(MBL)を用いた. HRP を標識した二次抗体を Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)を用いて検出した. ImageQuant™ LAS4000 biomolecular imager(GE Healthcare)を用いてバンドを定量解析した.

図 2

結果

アンチセンス核酸による TDP-43 選択的スプライシングの特異的抑制

ヒト TDP-43 の最終エクソン(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(図 1A:選択的イントロン 6A, 6B). この選択的イントロンの5'-スプライス部位および3'-スプライス部位近傍の配列は, ヒトとマウスにおいて極めて相同性が高い(表 1). マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を用い, 選択的イントロン 6A または 6B を挟むプライマー(図 1B:F5/R6-1, F6/R6-2)による逆転写 PCR を行った結果, ヒトと同じ選択的イントロンのスプライシングを示唆するバンドが検出された(図 2A:lane 1). 直接塩基配列決定法により, 同バンドはヒトと同様の位置でスプライシングを受けた mRNA であることを確認した.

そこで次に, 選択的イントロン 6A, 6B の5'-スプライス部位および3'-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(図 1A)を Neuro2a 細胞に投与し, 選択的イントロン 6A または 6B のスプライシングへの影響を, 同部位を挟むプライマーを用いた逆転写 PCR 法により検討した(図 2A). さらに, 選択的イントロン 6A, 6B 内に各々プライマーを設定し(図 1B:primer 6A, primer 6B), 定量 PCR 法により選択的イントロン 6A または 6B を保持した mRNA の定量的解析を行った(図 2B, 図 2C).

選択的イントロン 6A の5'-スプライス部位の近位部, もしくは5'-スプライス部位を標的としたアンチセンス核酸#1, #2 は, 容量依存性に選択的イントロン 6A の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(図 2A:lane 2-7 上段, 図 2B). 一方, アンチセンス核酸#1, #2 により選択的イントロン 6B を保持した mRNA は減少した(図 2A:lane 2-7 下段, 図 2C). すなわち, アンチセンス核酸#1 または#2 の投与により, 選択的イントロン 6A のスプライシングが抑制され, 選択的イントロン 6B のスプライシングが亢進した TDP-43 mRNA (図 1B : III) が増加した. 選択的イントロン 6A の 3'-スプライス部位を標的としたアンチセンス核酸#3 は, 異常なスプライシングを誘導したが(図 2A:lane 8-10 上段), 非スプライシング産物を増加させなかった(図 2B, 図 2C). 選択的イントロン 6B の 3'-スプライス部位を標的としたアンチセンス核酸#4 は, 選択的イントロン 6B のスプライシングを減弱させたが(図 2A:lane 11-13 下段), 選択的イントロン 6A のスプライシングを亢進させた(図 2A:lane 11-13 上段, 図 2B).

図 3

TDP-43 選択的スプライシングの特異的抑制による TDP-43 蛋白量の増加

次に著者は, TDP-43 選択的スプライシングの抑制が TDP-43 蛋白量を増加させるかをウエスタンブロッティング法により検討した. これまでの解析から, アンチセンス核酸#1 が翻訳領域を含む選択的イントロン 6A を保持する TDP-43 mRNA 量を最も増加させた(図 2A, 図 2B). ゆえに, 以後の解析はアンチセンス核酸#1 を用いた. Neuro2a 細胞にアンチセンス核酸#1 を投与し 48 時間後に TDP-43 の C 末である 260-414 アミノ酸を認識するポリクローナル抗体(図 3A:TDP-43 (260-414))を用いて検討した. その結果, 完全長の 43kDa の TDP-43 蛋白量は約 2 倍に増加した(図 3B). この結果は 1-260 アミノ酸を認識するポリクローナル抗体(図 3A:TDP-43 (1-260))でも同様であったが, 本抗体では 32kDa 付近にもバンドを認め, これはアンチセンス核酸#1 により減少した(図 2C). このバンドは TDP-43 の 260-414 アミノ酸を認識するポリクローナル抗体では検出されず, 選択的スプライシングを受けた mRNA 由来の産物と推定した(図 3A:TDP-43 splicing variant). 以上より, アンチセンス核酸#1 により選択的イントロン 6A のスプライシングが抑

制され、完全長の TDP-43 (図 3A:TDP-43)が増加することが示された。

次に、選択的スプライシングの抑制による TDP-43 の機能的過剰を検証した。TDP-43 はスプライシング関連因子であり、TDP-43 の減少により、Pdp1 mRNA のエクソン1の保持が増加する¹³⁾。逆転写 PCR 法による半定量的な解析では、アンチセンス核酸#1 の投与により Pdp1 のエクソン 1 の保持が有意に減少した(図 3C)。この結果は、TDP-43 の配列に特異的なアンチセンス核酸により、TDP-43 の過剰状態が質的にも引き起こされていることを示す。

図 4

マウス脊髄組織における TDP-43 選択的スプライシングの抑制と TDP-43 過剰発現

次に、マウス中枢神経系組織においてアンチセンス核酸の効果を検証した。11-12 週齢の雄のマウスに対し、アンチセンス核酸を腰椎穿刺により髄腔内に注入し、その 7 日後に脊髄組織を解析した。逆転写 PCR 法による解析では、アンチセンス核酸#1 の投与により、選択的イントロン 6A のスプライシング産物の減少と非スプライシング産物の増加を認めた(図 4A)。定量 PCR 法による解析では、アンチセンス核酸#1 を 1.5 ug 投与することにより TDP-43 mRNA の非スプライシング産物は平均 1.7 倍に、3.0 ug 投与により平均 2.3 倍に有意に増加した(図 4B)。さらに、ウエスタンブロッティング法による解析では、アンチセンス核酸#1 を 1.5 ug 投与することにより、TDP-43 蛋白量は平均 1.9 倍に有意に増加した(図 4C, 図 4D)。また、TDP-43 の標的 RNA である Pdp1 エクソン 1 の保持は有意に減少した(図 4E)。以上の結果により、マウス脊髄組織においても TDP-43 選択的イントロン 6A のスプライシングが TDP-43 の量調節に重要であること、またこの抑制により、個体レベルで中枢神経系における内在性 TDP-43 を増加させることが可能であることが示された。

図 5

TDP-43 選択的スプライシングの抑制による TDP-43 断片化

次に、mRNA レベルでより変化がみられたアンチセンス核酸 3.0 ug 投与時における蛋白レベルの変化を検討した。意外なことに、アンチセンス核酸 3.0 ug 投与では RIPA 可溶性画分において、完全長の TDP-43 の増加はみられなかった(図 5A:RIPA)。しかし一方で、35kDa の TDP-43 が、RIPA 可溶性画分、Urea 画分ともに増加した(図 5A:RIPA long exposure, Urea)。このバンドは 1-260 アミノ酸配列を認識するポリクローナル抗体では検出されず、ALS における神経細胞障害との関連が指摘されている TDP-43 C 末断片であることが示唆された²⁰⁾。そこで、この組織において、細胞障害性を検討するために、プロアポトーシス蛋白である BIM の発現を検討した²¹⁾。アンチセンス核酸#1 の投与により BIM mRNA は有意に増加した(図 5B)。さらに、この BIM mRNA 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(図 5C)。これらの結果は、選択的スプライシングの抑制により、TDP-43 の断片化と神経細胞障害が一連の機序により惹起されていることを示唆する。

考察

本研究では、まず、TDP-43 エクソン 6 内の選択的イントロン 6A のスプライシングをアンチセンス核酸により抑制できること、これにより TDP-43 発現が増加することをマウス神経系培養細胞およびマウス脊髄組織で示した。これまで TDP-43 量調節においては、遠位部イントロンである選択的イントロン 6B のスプライシングの重要性が唱えられてきた¹⁴⁾²²⁾²³⁾。一方、著者らは、近位部イントロンである選択的イントロン 6A のスプライス部位に変異を導入したミニジーンによる実験により、TDP-43 発現抑制におけるこのスプライシングの重要性を示していた(投稿中)¹⁵⁾。本研究では、遺伝子を改変せずに、このスプライシング効率を減弱させた結果として TDP-43 過剰が起こることをマウス中枢神経系において示し、その意義を決定付けた。このことは、このスプライシング効率の減弱が ALS における TDP-43 過剰発現の原因になり得ることを意味しており、今後、ALS 患者

においてこのスプライシングに変化が起きているかを検証する必要がある。興味深いことに、ALS を引き起こす TDP-43 変異は、この選択的イントロン 6A に集中している²⁴⁾。今後、これらの TDP-43 変異が、この選択的スプライシングおよび自己蛋白量調節機構に与える影響を検討する必要がある。

次に著者は、自己蛋白量調節機構の破綻による内在性 TDP-43 過剰状態がマウス脊髄組織において TDP-43 の断片化を促進することを見出した。TDP-43 の断片化は ALS 罹患組織で観察される重要な生化学的指標であり、これを遺伝子に改変を加えないマウスで再現したことは極めて重要である。ALS 患者の剖検脳からは 20-25kDa の C 末断片が主に検出される。³⁾ 一方、孤発性 ALS および TDP-43 変異を有する家族性 ALS 患者のリンパ芽球細胞や iPS 由来運動神経細胞では 35kDa の C 末断片の増加を主に認め²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾、プロテアソーム阻害剤処理により 20-25kDa の C 末断片も検出される²⁵⁾²⁶⁾。これらの断片化はカスパーゼ 3 によるものと推定されている²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾。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²¹⁾。著者は、このマウス脊髄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、さらに、その量が断片化 TDP-43 量と正の相関を示すことを見出した。このことから、TDP-43 過剰状態がアポトーシス促進因子である BIM の発現を誘導し、カスパーゼ 3 の活性化により、TDP-43 の断片化を引き起こしていると推察した³⁰⁾。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し、標的とする遺伝子の発現量を増加させることにより、疾患モデルの作成を試みた。本手法による疾患モデル作製の利点を 3 つあげる。第一に、遺伝子に改変を加えない点である。これは、孤発性疾患

の病態研究および治療法開発のためのモデルに最適である。第二に、どの年齢のマウスにも標的とする遺伝子の発現量を増加させることが可能なことである。加齢は神経変性疾患の重要な因子であるが、本方法を用いれば、高齢マウスにおける量調節機構を破綻させた病態モデルの作製を可能とさせる。第三に、その簡便性、迅速性にある。これにより、遺伝子改変を加えた系統を含む様々な系統への適用が容易となる。また、ヒト iPS 由来神経細胞を用いた病態研究および治療薬探索への道筋も開かれている。さらに、本方法の応用により、増加した TDP-43 を減少させることも可能と考えられ、これは画期的な治療方法の開発に繋がる。

本方法による疾患モデル作製の問題点は、アンチセンス核酸による毒性と効果発現との兼ね合いである。今回、著者は、オクタグアニジン dendriマーを結合させたモルフォリノアンチセンス核酸 (Vivo-Morpholinos) を用いた¹⁹⁾。これにより、モルフォリノアンチセンス核酸の細胞内への取り込みが促進され、極めて少量の投与でも効果発現が確認された。一方で、これを急速に大量投与すると、投与直後に痙攣、麻痺が観察され、オクタグアニジン dendriマーによる神経細胞機能への影響が懸念された¹⁸⁾。本研究では、緩徐に少量を投与することにより、この影響を排除することに努めた。本マウスの長期観察のためには、投与量の増量が必要と考えられ、今後、アンチセンス核酸の導入方法について、毒性がなく、かつ長期の効果発現が示されているアンチセンス核酸を用いるなどの工夫が必要である³¹⁾³²⁾。

致死的疾患である ALS の治療薬開発にあたっては、適切な病態把握に基づいた疾患モデルの構築が希求される。本研究において著者は、TDP-43 自己調節機構の破綻が ALS 病態の背景にある、という仮説に基づき ALS 疾患モデルの構築を目指した。この仮説は、自己蛋白量調節機構をもつ TDP-43 の量異常は細胞毒性をもたらす一方で、ALS ではこの TDP-43 発現が増加している、という蓄積された知見に基づいている。本研究で示した TDP-43 自己蛋白量調節機構の破綻を介した内在性 TDP-43 過剰発現モデルは、この病態仮説を支持する。今後、本モデル

が 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。

謝辞

本研究のご指導をいただきました新潟大学脳研究所神経内科学分野 西澤正豊教授, 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター分子神経疾患資源解析学分野 小野寺理教授に深謝いたします。また, 実験のご助言をいただきました新潟大学脳研究所神経内科学分野 石原智彦先生, 今野卓哉先生, 加藤泰介先生, 新潟大学脳研究所超域学術院 志賀篤先生, 小山哲秀先生に深謝いたします。

文献

- 1) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y and 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.
- 2) 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 and Lee VM: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130–133, 2006.
- 3) Lee EB, Lee VM-Y and Trojanowski JQ: Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13: 38–50, 2012.
- 4) 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 and Shaw CE: TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319: 1668–1672, 2008.
- 5) 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 and Onodera O: TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 63: 538–542, 2008.
- 6) Swarup V, Phaneuf D, Dupré N, Petri S, Strong M, Kriz J and Julien JP: Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor κ B-mediated pathogenic pathways. *J Exp Med* 208: 2429–2447, 2011.
- 7) Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, Sasayama H, Foulds P, Mitchell DJ, Mann DM, Allsop D and

- Nakagawa M: Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 117: 55–62, 2009.
- 8) Verstraete E, Kuiperij HB, van Blitterswijk MM, Veldink JH, Schelhaas HJ, van den Berg LH and Verbeek MM: TDP-43 plasma levels are higher in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 13: 446–451, 2012.
 - 9) Suzuki M, Mikami H, Watanabe T, Yamano T, Yamazaki T, Nomura M, Yasui K, Ishikawa H and Ono S: Increased expression of TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 122: 367–372, 2010.
 - 10) Wegorzewska I and Baloh RH: TDP-43-based animal models of neurodegeneration: new insights into ALS pathology and pathophysiology. *Neurodegener Dis* 8: 262–274, 2011.
 - 11) Tsao W, Jeong YH, Lin S, Ling J, Price DL, Chiang PM and Wong PC: Rodent models of TDP-43 : Recent advances. *Brain Res* 1462: 26–39, 2012.
 - 12) Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, Van Broeckhoven C and Kumar-Singh S: TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3858–3863, 2010.
 - 13) Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, Ling SC, Sun E, Wancewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Yeo GW and Cleveland DW: Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* 14: 459–468, 2011.
 - 14) Ayala YM, De Conti L, Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, Tollervey J, Ule J, Baralle M, Buratti E and Baralle FE: TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J* 30: 277–288, 2011.
 - 15) Sugai A, Koyama A, Kato T, Konno T, Ishihara T, Nishizawa M and Onodera O: Alternative splicing or polyadenylation, which is the major mechanism for auto-regulation of TDP-43? : Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting 2013.
 - 16) Morcos PA: Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 521–527, 2007.
 - 17) Summerton J: Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1489: 141–158, 1999.
 - 18) Zhou H, Janghra N, Mitrpant C, Dickinson RL, Anthony K, Price L, Eperon IC, Wilton SD, Morgan J and Muntoni F: A novel morpholino oligomer targeting ISS-N1 improves rescue of severe spinal muscular atrophy transgenic mice. *Hum Gene Ther* 24: 331–342, 2013.
 - 19) Morcos PA and Li Y, Jiang S: Vivo-Morpholinos: A non-peptide transporter delivers Morpholinos into a wide array of mouse tissues. *Biotechniques* 45: 613–623, 2008.
 - 20) Che MX, Jiang YJ, Xie YY, Jiang LL and Hu HY: Aggregation of the 35-kDa fragment of TDP-43 causes formation of cytoplasmic inclusions and alteration of RNA processing. *FASEB J* 25: 2344–2353, 2011.
 - 21) Putcha GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A and Johnson EM: Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29: 615–628, 2001.
 - 22) Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Bembich S, Buratti E, Proudfoot N and Baralle FE: Autoregulation of TDP-43 mRNA levels involves interplay between transcription, splicing, and alternative polyA site selection. *Genes Dev* 26: 1679–1684, 2012.
 - 23) Bembich S, Herzog JS, De Conti L, Stuaní C, Avendaño-Vázquez SE, Buratti E, Baralle M and

Baralle FE: Predominance of spliceosomal complex formation over polyadenylation site selection in TDP-43 autoregulation. *Nucleic Acids Res* 1–10, 2013.

- 24) Onodera O, Sugai A, Konno T, Tada M, Koyama A and Nishizawa M: What is the key player in TDP-43 pathology in ALS: Disappearance from the nucleus or inclusion formation in the cytoplasm? *Neurol Clin Neurosci* 1: 11–17, 2013.
- 25) Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR, Hutton M, Shaw CE, Boylan KB, Boeve B, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Caselli RJ, Dickson DW, Mackenzie IR, Petrucelli L and Rademakers R: Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 4: e1000193, 2008.
- 26) Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard J-P, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat P-F, Camu W, Meininger V, Dupre N and Rouleau GA: TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 40: 572–574, 2008.
- 27) Liu-Yesucevitz L, Lin AY, Ebata A, Boon JY, Reid W, Xu YF, Kobrin K, Murphy GJ, Petrucelli L and Wolozin B: ALS-Linked Mutations Enlarge TDP-43-Enriched Neuronal RNA Granules in the Dendritic Arbor. *J Neurosci* 34: 4167–4174, 2014.
- 28) Zhang YJ, Xu YF, Dickey CA, Buratti E, Baralle F, Bailey R, Pickering-Brown S, Dickson D and Petrucelli L: Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci* 27: 10530–10534, 2007.
- 29) Dormann D, Capell A, Carlson AM, Shankaran SS, Rodde R, Neumann M, Kremmer E, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M and Haass C: Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J Neurochem* 110: 1082–1094, 2009.
- 30) Suzuki H, Lee K and Matsuoka M: TDP-43-induced death is associated with altered regulation of BIM and Bcl-xL and attenuated by caspase-mediated TDP-43 cleavage. *J Biol Chem* 286: 13171–13183, 2011.
- 31) Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz EV, Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, Artates JW, Weiss A, Cheng SH, Shihabuddin LS, Hung G, Bennett CF and Cleveland DW: Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron* 74: 1031–1044, 2012.
- 32) Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF and Krainer AR: Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev* 24: 1634–1644, 2010.

図の説明

図 1 TDP-43 mRNA 前駆体および TDP-43 mRNA の模式図と、アンチセンス核酸およびプライマー設定

(A) TDP-43 mRNA 前駆体の模式図とアンチセンス核酸(#1, #2, #3, #4)の配置を示す。白箱

は非翻訳領域、黒箱は翻訳領域のエクソンを表す。折線はイントロンを表す。(B) TDP-43 mRNA の模式図と PCR 用プライマーの配置を示す。TDP-43 mRNA は、選択的スプライシングと選択的 polyA 付加により、おもに I から IV の構造をとる。

図 2 アンチセンス核酸による TDP-43 選択的スプライシングの特異的抑制

(A) Neuro2a 細胞に図 1A に示した各アンチセンス核酸 (#1, #2, #3, #4, コントロール) 2-8 uM を投与し 48 時間後に解析した。図 1B に示すプライマー (F5/R6-1, F6/R6-2) を用いた逆転写 PCR 産物のアガロース電気泳動像を示す。M はサイズマーカーを示す。(B, C) Neuro2a 細胞に各アンチセンス核酸 (#1, #2, #3, #4, コントロール) 8 uM を投与した。図 1B に示すプライマー (primer 6A, primer 6B) を用いた定量 PCR の結果を示す。データは平均±標準誤差を示す (n=3)。対照群との比較に Dunnett 法を用いた。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 を示す。

図 3 TDP-43 選択的スプライシングの特異的抑制による TDP-43 蛋白量の増加

Neuro2a 細胞にアンチセンス核酸を 8uM 投与し 48 時間後に解析した。(A) TDP-43 と選択的スプライシングを受けた TDP-43 (TDP-43 splicing variant) の模式図およびポリクローナル抗体の認識部位を示す。NLS:核移行シグナル, NES:核外搬出シグナル, RRM1:RNA 認識モチーフ 1, RRM2:RNA 認識モチーフ 2。(B) 抗 TDP-43 (260-414) 抗体によるウェスタンブロットと、GAPDH 比で表したバンドの定量データを示す。(C) 抗 TDP-43 (1-260) 抗体によるウェスタンブロットと、32kDa/43kDa 比の定量データを示す。(D) Pdp1 mRNA の逆転写 PCR 産物のアガロース電気泳動像と、Pdp1 mRNA エクソン 1 を含まないバンドに対するエクソン 1 を含むバンドの比の定量データを示す。データは平均±標準誤差を示す。n=4 (B, C) または n=3 (D)。*p<0.05, **p<0.001 (Student の t 検定)。

図 4 マウス脊髄組織における TDP-43 選択的スプライシングの抑制と TDP-43 過剰発現

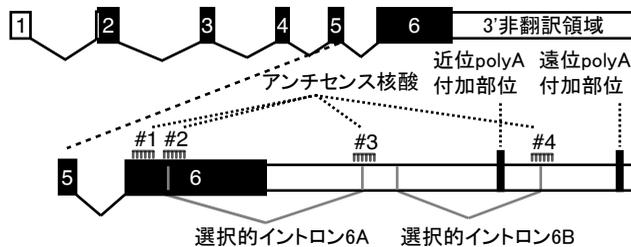
マウス髄腔内にアンチセンス核酸 1.5 ug または 3.0 ug を投与し, 7 日後に解析した. (A) 図 1B に示す F5/R6-1 プライマーによる逆転写 PCR のアガロース電気泳動像. 矢頭は非スプライシング産物, 矢印はスプライシング産物を示す. (B) 図 1B に示す primer 6A による定量 PCR の結果を示す. (C) アンチセンス核酸 1.5 ug 投与時の抗 TDP-43(260-414)抗体を用いたウェスタンブロットを示す. (D) C のバンド定量データを示す. (E) アンチセンス核酸 1.5 ug 投与時の逆転写 PCR 産物のアガロース電気泳動像より得られた Pdp1 mRNA エクソン 1 を含まないバンドに対するエクソン 1 を含むバンドの比を示す. データは平均±標準誤差 (n=4). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

図 5 TDP-43 選択的スプライシングの抑制による TDP-43 断片化

マウス髄腔内にアンチセンス核酸 3.0 ug を投与し, 7 日後に解析した. (A) RIPA 可溶性画分および Urea 画分における抗 TDP-43(260-414)抗体または抗 TDP-43(1-260)抗体によるウェスタンブロットを示す. (B) BIM mRNA の定量 PCR 結果を示す (n=4). *p<0.05 (Student の t 検定). (C) BIM mRNA 発現と Urea 画分 TDP-43 35kDa の相関を示す. r:ピアソンの積率相関係数.

図1

A TDP-43 mRNA 前駆体



B TDP-43 mRNA

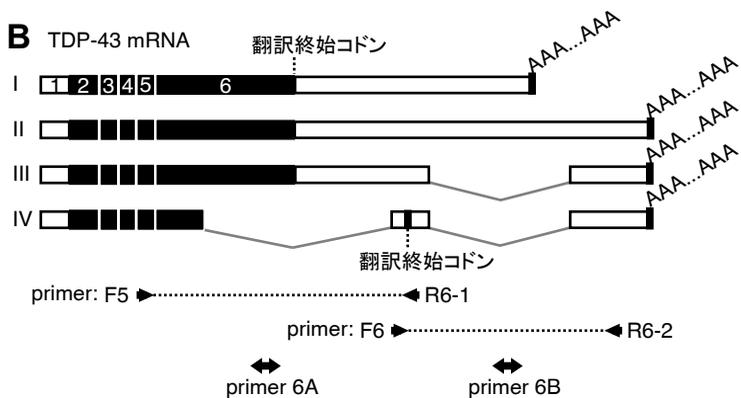
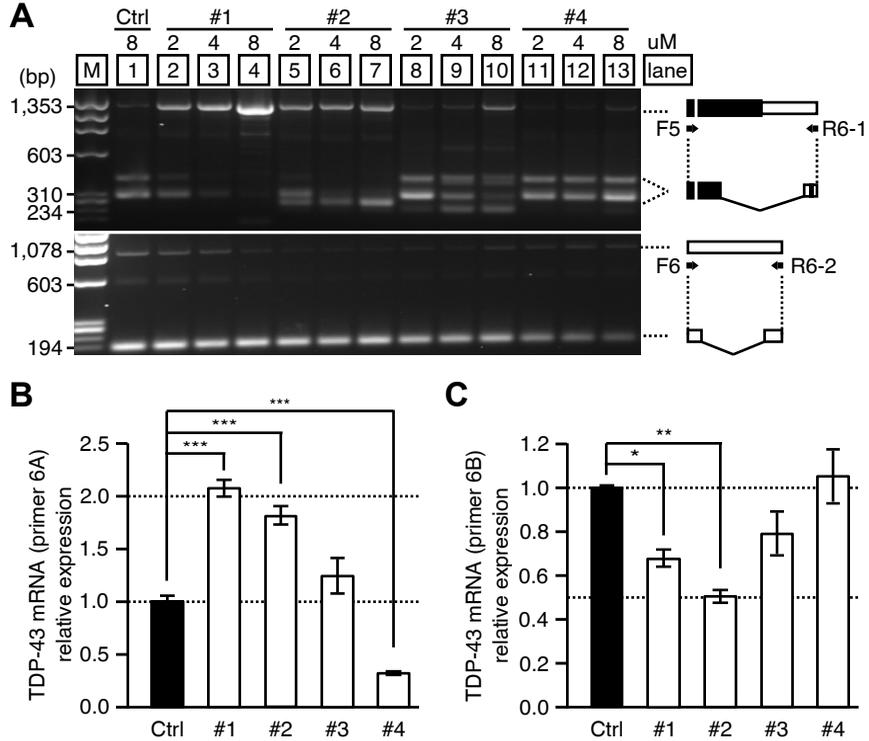
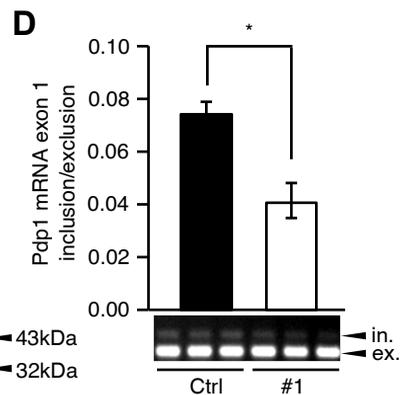
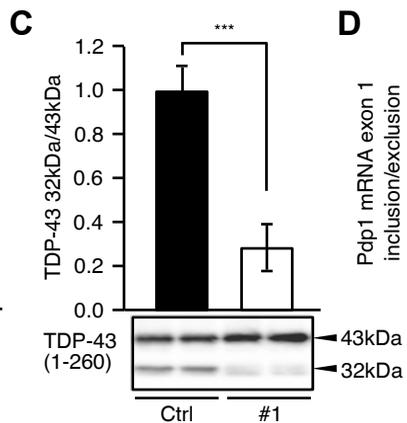
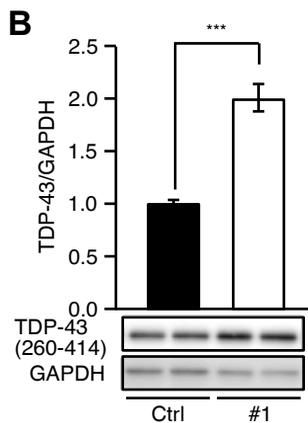
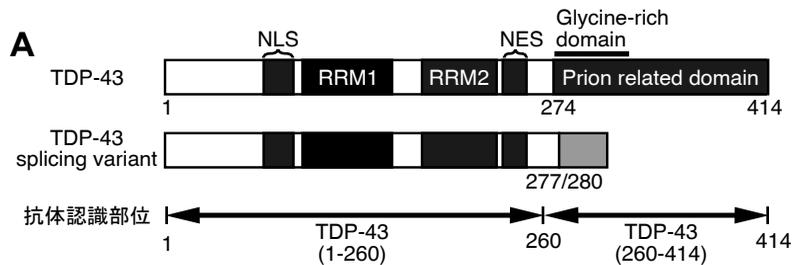


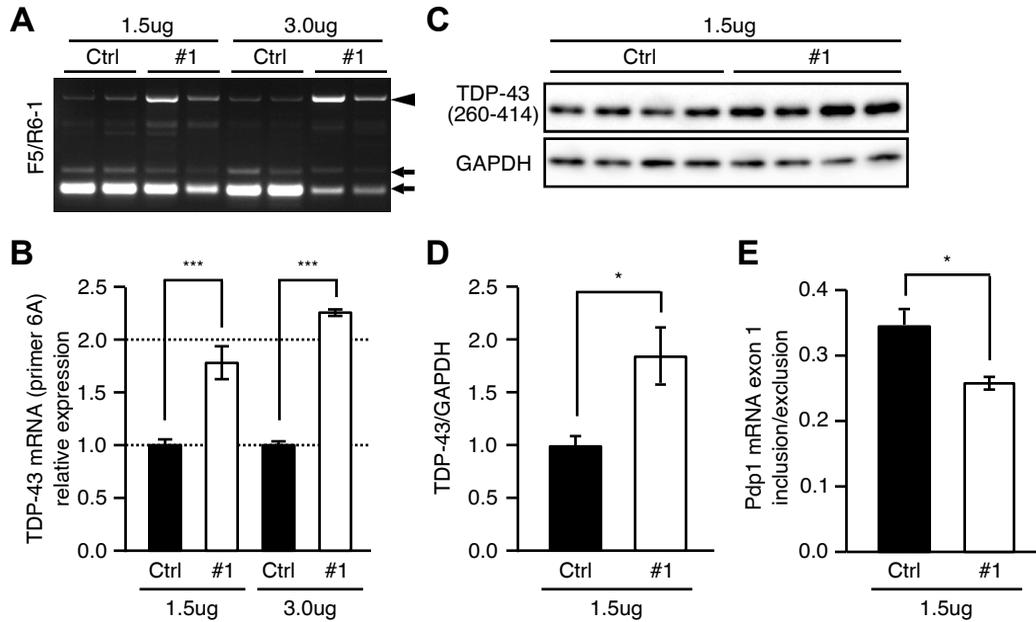
图2



3



4



5

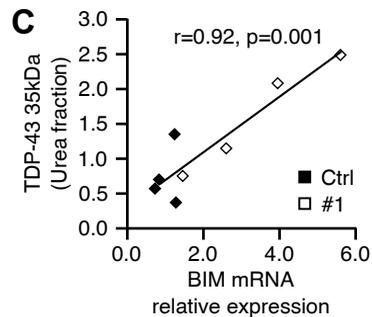
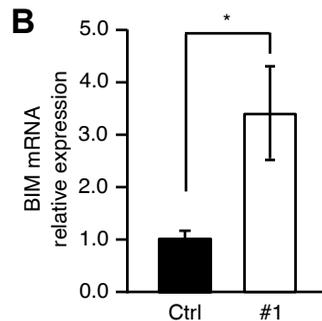
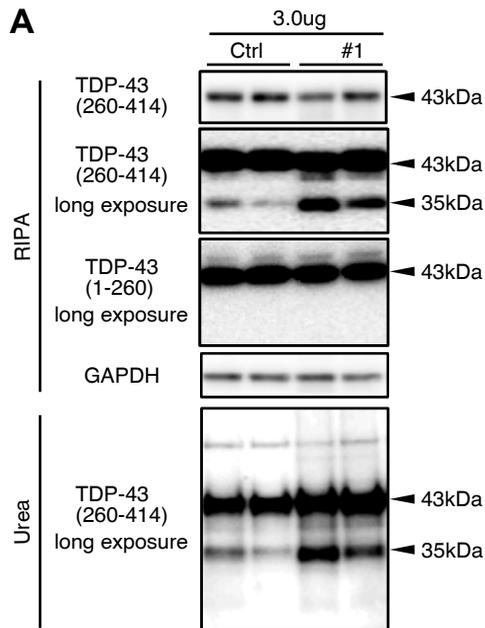


表 1

選択的 イントロン	種	5'-スプライス部位近傍配列	3'-スプライス部位近傍配列
6A	Homo sapiens	agtggaagattgggtgGTaatccagGTggctttggaatc	gccttcattaatctctgcAGttcatctcatttcaaagt
	Mus musculus	agtggaagattgggtgGTaatccagGTggctttggaatc	gccttcattaatctctgcAGttcatctcatttcaaagt
6B	Homo sapiens	acagggcggcgtcttgacgGTgggtgtccattttatcc	atatgtgtctttgtttgcAGccctgaatgcaaagaatt
	Mus musculus	acagggcggcgtcttgacgGTgggtgtccattttatcc	atatgtgtctttgtttgcAGccctgaatgcaaagaatt

大文字はスプライス部位を示す。網掛けはヒトとマウスの相違配列を示す。