

令和 5年 2月

兎谷翔太 学位論文審査要旨

主査 大槻 明 広
副主査 香月 康 宏
同 渡辺 保 裕

主論文

Pathological comparison of TDP-43 between motor neurons and interneurons expressed by a tetracycline repressor system on the mouse artificial chromosome

(マウス人工染色体を用いたテトラサイクリンリプレッサーシステムによる運動ニューロンと介在ニューロンにおけるTDP-43の病理比較)

(著者：兎谷翔太、濱道修生、香月康宏、平塚正治)

令和5年 Yonago Acta Medica doi:10.33160/yam.2023.02.004

参考論文

1. Simultaneous loading of PCR-based multiple fragments on mouse artificial chromosome vectors in DT40 cell for gene delivery

(DT40細胞が保持するマウス人工染色体上へ遺伝子搭載を行うための複数PCR断片同時搭載法)

(著者：山崎匡太郎、松尾京亮、岡田茜、宇野愛海、鈴木輝彦、阿部智志、濱道修生、岸間菜々美、兎谷翔太、冨塚一磨、香月康宏)

令和4年 Scientific Reports 12巻 21790

学位論文要旨

Pathological comparison of TDP-43 between motor neurons and interneurons expressed by a tetracycline repressor system on the mouse artificial chromosome

(マウス人工染色体を用いたテトラサイクリンリプレッサーシステムによる運動ニューロンと介在ニューロンにおけるTDP-43の病理比較)

方法

Cre-loxp組換え法を用いてマウス人工染色体(MAC)保持CHO細胞内のマウス人工染色体上に薬剤誘導型変異TDP-43過剰発現システムを持ったCHO細胞(CHO/MAC6/Tet-hTDP-43 A315T)を樹立した。樹立したCHO細胞が目的領域を保持することをゲノムPCR解析とFISH解析にて検証し、ドキシサイクリン(Dox)投与によるhTDP-43の発現量をウエスタンブロット法と定量RT-PCR法を用いて評価した。また細胞免疫染色によりCHO細胞内におけるhTDP-43の局在を確認した。その後微小核細胞融合法によって人工染色体ベクターをCHO細胞からマウスES細胞に移入した。このマウスES細胞でも同様の解析を行い目的領域の保持や発現量の評価を行った。次にマウスES細胞を用いて運動ニューロンと介在ニューロンへ分化誘導を行い、RT-PCR法と細胞免疫染色法にて分化誘導が正しく行われているか、また分化誘導効率を確認した。最後にDox投与後の運動ニューロンと介在ニューロンにおいて、hTDP-43の局在の変化と活性型カスパーゼ3による細胞死の評価を行った。

結果

ゲノムPCR及びFISH解析の結果からCHO細胞内において人工染色体ベクター上に目的領域が搭載されたこと、また約70%の確率で独立に保持されていることを確認した。またこの細胞へDox投与することでTDP-43が過剰発現することを確認した。CHO細胞内で発現させたTDP-43は細胞質及び核両方に局在していた。このベクターをマウスES細胞に移入してもDox投与によりTDP-43が過剰発現することを確認した。このマウスES細胞を運動ニューロンと介在ニューロンに分化誘導しRT-PCRを行い、神経幹細胞マーカー、運動ニューロンマーカー及び介在ニューロンマーカーの発現を確認した。また細胞免疫染色にて分化誘導効率を測定した結果、分化誘導効率の低下は確認されなかった。次に分化誘導した運動ニューロンと介在ニューロンに対してDox投与し、投与後6日目においてhTDP-43の細胞内局在を調べたところ、運動ニューロン及び介在ニューロン共に細胞質のみで変異型TDP-43が観

察された。一方で活性型カスパーゼ3の発現にて細胞死を評価したところ、運動ニューロンでは高頻度に細胞死が検出されたのに対して介在ニューロンでは細胞死がほとんど検出されなかった。

考 察

今回の実験から外因的に発現させた変異TDP-43は、運動ニューロン及び介在ニューロンのいずれにおいても、細胞質にのみ異所性に局在したが、変異TDP-43の細胞毒性に対しては運動ニューロンよりも介在ニューロンの方が抵抗性を示した。このことから、TDP-43の神経毒性は神経細胞種によって異なる可能性が示唆された。

TDP-43は、主に核タンパク質であり核と細胞質間を移動することで、遺伝子の転写抑制と調節に関与している。また自身の発現をフィードバック調節する機構を持つため外因性のTDP-43が発現すると、負のフィードバックループにより、内因性のTDP-43タンパク質の発現が減少することが知られている。その結果、核内TDP-43の消失を伴いTDP-43は細胞質内へと蓄積してゆくことになる。今回の実験系において、ヒト由来TDP-43が、マウス由来TDP-43の発現や細胞内局在に影響を及ぼすことが細胞障害作用に繋がっている可能性が考えられる。

細胞質に過剰に蓄積したTDP-43は、ストレス顆粒の形成、軸索輸送、ミトコンドリア機能、小胞体ストレス、オートファジーなどの細胞応答を乱している可能性が強く考えられることから、TDP-43過剰発現後のこれら細胞応答反応がどのように連動しているのか解析することにより、運動ニューロンと介在ニューロン間の異なる脆弱性を規定している因子を明らかにすることができると考えられる。

結 論

TDP-43の細胞質の異所性の局在は運動ニューロン及び介在ニューロンの両方で観察される一方で、TDP-43の細胞毒性は運動ニューロンでより強く発揮されたことから、細胞種によって脆弱性が異なることが示唆された。MACベクター上に作製した薬剤誘導性のTDP-43発現システムは、ALSにおいて運動ニューロンのTDP-43に対する脆弱性を制御しているメカニズム解析を行う上で有用な実験モデルとなると考えられる。