

## 89. 新たなモデル動物の開発による ALS 発症機構の解明

河原 行郎

大阪大学 大学院医学系研究科 神経遺伝子学講座

Key words : 筋萎縮性側索硬化症, モデル動物, TDP-43, 運動ニューロン

### 緒言

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、中年期以降に上位および下位運動ニューロンの選択的脱落によって全身の筋力が低下する神経難病である。発症すると数年以内に死に至るが、依然として有効な治療法がなく病態解明が急務である。ALS は、90 %以上が孤発性であることから、これまで発症メカニズムに迫る手がかりに乏しかった。しかしながら、2006 年に、変性部位の細胞質封入体中に、RNA 結合蛋白質の 1 種である TDP-43 が、異常リン酸化や断片化を受けて蓄積していることが発見された<sup>1,2)</sup>。更にその後の解析により、現在では、TDP-43 はほぼすべての ALS において封入体中に蓄積していることが判明している。また、2008 年には、頻度は稀ながら ALS 特異的に TDP-43 をコードする *TARDBP* 遺伝子点変異が見つかり (図 1)、TDP-43 が ALS 病態に深く関連していることが明らかとなった<sup>3,4)</sup>。

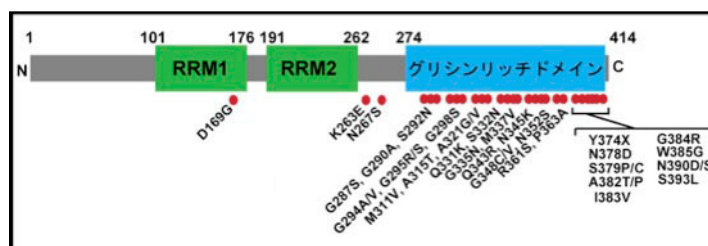


図 1. *TARDBP* 遺伝子に同定されている ALS 関連点変異

RRM: RNA Recognition Motif。赤い点が同定されている点変異。RRM1 にある D169G 点変異を除き、ALS 関連点変異は C 末端に集中している。

TDP-43 は 43 kDa の大きさで、スプライシングなどの RNA プロセッシングに関与している。我々も最近、TDP-43 がマイクロ RNA の生成を促進していることを報告した<sup>5)</sup>。TDP-43 は、主に核に局在しているが、ALS 変性部位では、細胞質封入体中に蓄積し核から消失する。また、完全長 TDP-43 に加え、約 25 kDa の C 末端断片 (CTF25) が不溶化して蓄積している<sup>1)</sup>。このため、局在変化に伴う機能喪失と、CTF25 を中心とした凝集体による毒性獲得の両面から病態解析が進められているが、どちらが主要なメカニズムであるかは結論が出ていない。一方、ALS で見出されている遺伝子点変異は、RNA 認識モチーフ中にある D169G 変異を除くと、ほぼ全変異が C 末端領域に集中している (図 1)。これらの変異は、TDP-43 の機能よりも構造への影響が高いと考えられており、安定性を高め、分解されにくくなることが報告されている<sup>6)</sup>。このため、断片の蓄積よりも、分解されにくい完全長 TDP-43 が機能障害を引き起こすことが発症に重要ではないかという考え方もある<sup>7)</sup>。このように、現状では様々な病態機構が提唱されており、これを解決するためには、適切なモデル動物を作製し、実際の ALS と近い病態を再現することが必要不可欠である。

ALS に限らず多くの神経変性疾患研究においては、これまでトランスジェニック (Tg) マウスやノックアウト (KO) マウスがモデル動物として作製されてきた。TDP-43 の場合、KO マウスは胎生致死である<sup>8)</sup>。また運動ニューロン特異的なコンディショナル KO マウスは、一年以上経過した後、晩発性に運動障害を呈することが報告されている<sup>9)</sup>。しかし、実際の ALS では、TDP-43 が運動ニューロンで欠失しているわけではない。一方、ヒト TDP-43 を過剰発現す

る Tg マウスは、ALS 様の症状を呈する。しかしながら、野生型であっても点変異型でも症状は同じである<sup>10)</sup>。また、ALS において TDP-43 が常に過剰に発現していることを示唆する所見は得られていない。一般に Tg マウスでは、目的とする蛋白の発現量は、利用するプロモーターや挿入部位・コピー数によって変動する。このため、ALS で認められる点変異が発症に必要な十分かどうかを解析するには不向きである。このように、適切なモデル動物が存在しないことが、ALS 病態の解明に向けた障壁となっており、新たなモデル動物の作製が必要である。

ヒトとマウスの TDP-43 は高度に保存されており、アミノ酸数は同一であり 96 %以上に相同性がある。ALS で同定されているほぼすべての点変異部分のアミノ酸は、マウスでも同一である。したがって、マウス *Tardbp* 遺伝子に ALS で同定されている点変異を挿入すれば、ALS 様症状を呈する可能性は非常に高いのではないかと着想した。点変異挿入型のノックイン (KI) マウスは、これまで古典的な相同組み換え法で作製されてきたが、費用が比較的高く、作製にかかる期間も長かった。また、挿入したい点変異の周辺のエクソン、イントロンの構造によっては、技術的に困難な場合も多い。一方、近年のゲノム編集技術の進歩により、比較的容易に点変異の挿入が可能となった。このため、本研究では、ALS で同定されている点変異をマウス *Tardbp* 遺伝子に挿入した KI マウスを作製し、実際の ALS と近い病態を再現する新たなモデル動物を開発することを目的とした。

## 方 法

本研究では、ゲノム編集を幅広い配列に適用可能な Cas9/CRISPR システムを採用した。本システムで点変異を挿入する場合には、切断酵素 Cas9 が NGG 配列を認識するため、NGG 配列から上流 10 塩基以内に挿入塩基が存在しないと、挿入効率が著しく低下する。このため、ALS で同定されている *TARDBP* 遺伝子点変異の中から、マウスでも保存されており、かつゲノム編集で挿入しやすいものをスクリーニングし、最終的に 1 つの点変異に絞り込んだ。この点変異の挿入した 1 本鎖 DNA と一緒に、Cas9/CRISPR RNA の同時発現が可能なベクターを、約 300 個の受精卵にインジェクションした。その後生まれてきた仔をスクリーニングした結果、一匹に点変異の挿入が確認できた。その後、ヘテロ接合体からホモ接合体を作製し、約 1 年間に渡って表現型を解析した。

## 結果および考察

*Tardbp* 遺伝子に点変異を挿入した KI マウスは、ホモ接合体において生後 4 ヶ月程度で痙縮が認められるようになり、生後 8 ヶ月程度で後脚が clasping 姿勢を保持するようになった (図 2)。更に、10 ヶ月程度で後脚が屈曲したままとなり、前脚のみで歩行するようになった。その後、尾を揚げるのが困難となり、垂れる状態が長くなった。現在、最長 10 ヶ月まで観察しているが、死亡するには至っていない。これらの結果から、本 KI マウスは、上位運動ニューロン症状から発症し、その後下位運動ニューロン症状が現れる経過を呈すると考えられた。

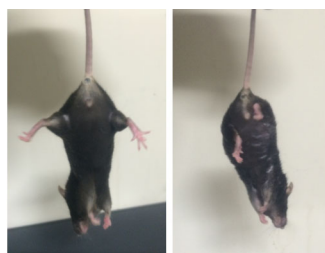


図 2. *Tardbp* 点変異マウスに認められる clasping 姿勢

右の同胞野生型には認められない clasping が、左のホモ接合体 (オス, 生後 8 か月) に認められる。

一方、ヘテロ接合体は、ホモ接合体に比べ経過は緩徐であるが、やはり同様の症状を呈することが分かった。生後 6 ヶ月程度で痙縮が認められるようになり、約 1 年で、後脚の clasping 姿勢が顕著となった。現在 14 ヶ月程度まで観察しているが、尾の垂れが認められるようになってきている。以上の結果から、TDP-43 を介した運動ニューロンの変性においては、dominant negative 作用よりも、変異 TDP-43 の量依存的なメカニズムが発症の主因と考えられた。今後は、ロータロッドや脚力・歩行幅などの運動機能を定量化する。また、発症前と発症後のいくつかのポイントで病理学的解析を行い、臨床症状との相関性を解析する予定である。

今回、ALSに近い病態を反映している可能性の高いモデル動物の作製に成功した。ALSでは、これまで *TARDBP* 遺伝子の点変異はほとんどヘテロ接合型しか見出されていない。このため、ホモ接合型では症状が増悪するのか改善するのか不明であった。今回の解析から、症状が増悪することが分かったので、変異 TDP-43 の量がニューロンの変性に重要であることが明らかとなった。今後、病理学的な評価が固まれば、発症メカニズムや薬剤の治療効果判定などに有効活用することが期待できる。

## 共同研究者

本研究は、大学院生の Charles Jourdan Reyes さんの協力のもと実施しました。また、ゲノム編集による ALS モデルマウスの作製は、大阪大学医学部附属動物実験施設生殖工学ユニットで行いました。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に心より深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 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*. 2006;314(5796):130-3. PubMed PMID: 17023659.
- 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*. 2006;351(3):602-11. PubMed PMID: 17084815.
- 3) 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*. 2008;319(5870):1668-72. doi: 10.1126/science.1154584. PubMed PMID: 18309045.
- 4) Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, Bouchard JP, Lacomblez L, Pochigaeva K, Salachas F, Pradat PF, Camu W, Meininger V, Dupre N, Rouleau GA. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2008;40(5):572-4. doi: 10.1038/ng.132. PubMed PMID: 18372902.
- 5) Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(9):3347-52. doi: 10.1073/pnas.1112427109. PubMed PMID: 22323604.
- 6) Watanabe S, Kaneko K, Yamanaka K. Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked mutant TDP-43 proteins. *J Biol Chem*. 2013;288(5):3641-54. doi: 10.1074/jbc.M112.433615. PubMed PMID: 23235148.
- 7) Li Q, Yokoshi M, Okada H, Kawahara Y. The cleavage pattern of TDP-43 determines its rate of clearance and cytotoxicity. *Nat Commun*. 2015;6:6183. doi: 10.1038/ncomms7183. PubMed PMID: 25630387.
- 8) Wu LS, Cheng WC, Hou SC, Yan YT, Jiang ST, Shen CK. TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis. *Genesis*. 2010;48(1):56-62. doi: 10.1002/dvg.20584. PubMed PMID: 20014337.
- 9) Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*. 2013;136(Pt 5):1371-82. doi: 10.1093/brain/awt029. PubMed PMID: 23449777.
- 10) Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, Kriz J, Julien JP. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain*. 2011;134(Pt 9):2610-26. doi: 10.1093/brain/awr159. PubMed PMID: 21752789.