

201008018A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発に
関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋山 治彦

平成23年(2011年) 3月

目 次

I. 総括研究報告

認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発に関する研究	1
秋山治彦	

II. 分担研究報告

1. ヒトTDP-43を発現するトランスジェニックマウスの作出と解析に関する研究	7
長谷川成人	

2. 前頭側頭葉変性症モデル培養細胞・マウスの作製に関する研究	11
秋山治彦	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	19
-----------------	----

認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発

主任研究者：秋山治彦 東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム

研究要旨

タウ陰性前頭側頭葉変性症(FTLD)の多くは TDP-43 異常蓄積にもとづき発病するが(FTLD-TDP), TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症(ALS)にも蓄積する. 家族性 ALS の原因となる TDP-43 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスを作出して解析を行うとともに, マウスモデル改良の基盤となるヒト FTLD 例剖検脳の病理学的解析と培養細胞モデルの作製・解析を進めた.

分担研究者

長谷川成人 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

A.研究目的

TDP-43 は細胞の核に局在する不均一核リボ蛋白質 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNP) の一種で, タウ陰性前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の脳脊髄に特異的に異常蓄積するほか, アルツハイマー病やレヴィー小体型認知症をはじめ様々な認知症疾患の約3分の1から半数において大脳への蓄積が認められる. 異常蓄積した TDP-43 は正常では認められないリン酸化を生じており, さらにユビキチンや p62 により標識されている. また TDP-43 遺伝子 (*TARDBP*) 変異は家族性 ALS の原因となる. FTLD には ALS を合併する病型が存在し, 両疾患は病因・病態に関してきわめて近い関係にある.

以上のような背景から, ヒト中枢神経系における TDP-43 異常蓄積を再現する病態モデルを培養細胞や実験動物を用いて作製することにより, 認知症疾患の根本治療薬開発が大きく加速されると期待される. 本研究の目的は, 中枢神経系にヒト疾患において蓄積する TDP-43 と

同様の異常 (リン酸化など) を有する TDP-43 の蓄積を生じるモデルマウスを作出することである. この目的のために, TDP-43 異常蓄積の培養細胞モデルを作製し, その解析から動物モデル作出の基盤となる情報を得る. また FTLD 例の剖検脳の病理学的解析を進め, 作出した実験室内モデルがヒトの病態をどれだけ再現しているかを検証し, その結果をモデル改良に反映させる. こうして培養細胞モデルによる治療薬候補化合物のスクリーニングと, 有望な化合物をモデルマウスで検証する一連の系を整備し, 認知症の根本治療薬の創薬に結びつける.

B.研究方法

① *TARDBP* トランスジェニックマウス

部位特異的突然変異法を用いてヒト *TARDBP* に家族性 ALS の変異である G298S あるいは M337V 変異を導入, 野生型および変異型 *TARDBP* の cDNA をマウス thy1.2 genomic expression vector にサブクローニングして C57BL/6J マウスの胚に注入し, *TARDBP* トランスジェニック (Tg) マウスを作出した. 次いで, 導入遺伝子の発現が確認されたマウスの脳をイムノブロットおよび免疫組織化学を用いて解析し, ヒト TDP-43 特異抗体により, 脳におけるヒト TDP-43 産生の有無を調べた. こうし

て得られた3系統の *TARDBP*-Tg マウス3系統 (野生型, G298S, M337V 各1系統) を一定期間飼育し, 表現型を観察するとともに, 脳脊髄を採取してイムノブロットおよび免疫組織化学により, ヒト疾患の病態との比較を行った.

②プログラニューリン遺伝子欠損マウス

家族性FTLDのうちTDP-43蓄積を伴うものはプログラニューリン遺伝子(*GRN*)変異により発病する. 既知の*GRN*変異はいずれもプログラニューリンの機能喪失を引き起こすことが知られている. そこで, 東京大学農学部, 西原真杉教授が開発した*GRN*-KOマウスを共同研究の一環として理化学研究所より導入し, 系統維持と繁殖を開始した.

③培養細胞モデル

TDP-43異常蓄積を再現する神経系培養細胞モデルは既に得ているので, さらにオリゴデンドログリア系培養細胞としてKG-1-C細胞を用いた, 神経系培養細胞のモデル作製において良い結果を得ているGFPタグ付*TARDBP*ΔNLSおよび*TARDBP*(219-414)遺伝子を導入した, KG-1-Cはマイトマイシン-C (MMC) 処理による分裂増殖停止が可能であるため, 遺伝子導入後にMMC処理をして1週間まで培養, 蛍光免疫組織化学染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った.

④ヒト剖検脳の解析

FTLD-FUSの病理学的解析には, まず当研究室に蓄積されたFTLD患者, 計66例の剖検脳組織標本を, タウ, TDP-43, ユビキチン, FUSによる免疫組織化学染色により解析した.

(倫理面への配慮)

トランスジェニックマウスの作製および動物実験は, 東京都臨床医学総合研究所および東京都精神医学研究所の実験動物倫理委員会に研究計画を提出して審査承認をうけ, その指針に従って実験を行った. また, ヒト剖検脳の解析

にあたっては, ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理基準に準じることとし, 剖検時に遺族の承諾を得た場合のみ剖検材料を研究に使用した. 同倫理指針策定以前に剖検になった症例については, 連結可能匿名化による個人情報の保護をはかった上で使用した. すべての研究計画は東京都精神医学総合研究所の倫理委員会の審査承認を受けた.

C. 研究結果

①*TARDBP* トランスジェニックマウス

遺伝子導入したヒトTDP-43を脳で発現する*TARDBP*-Tgマウス3系統(野生型, G298S, M337V各1系統)を樹立した. 野生型, G298Sの2系統は生後早い時期から後肢の機能異常が観察された. 生後2ヶ月齢のマウスから脳・脊髄を取り出し, Tris-HCl, Triton-X, Sarkosylにて段階的に蛋白質を抽出しイムノブロット解析を行った. その結果, ヒトTDP-43の産生は確認されたが, 患者脳に蓄積する異常リン酸化TDP-43は生化学的には検出することはできなかった.

野生型, G298Sでは2ヶ月齢, M337Vでは12ヶ月齢において灌流固定により脳脊髄のパラフィン標本を作製し, リン酸化TDP-43特異抗体の免疫組織化学染色を行ったところ, 稀に異常リン酸化TDP-43陽性神経細胞を認めたが, 出現頻度はヒト疾患脳脊髄に比べて僅かであった.

②プログラニューリン遺伝子欠損マウス

GRN-KOマウスはほぼ正常に生育し, 中枢神経系では加齢とともに視床や脊髄にp62あるいはユビキチン陽性構造が出現するが, TDP-43異常蓄積は認められない. このマウスは体重がバックグラウンドの系統に比べてやや小さく, 繁殖させにくいことがわかったが, 今後の交配実験を視野に, 現在, 系統維持と繁殖を進めている.

③培養細胞モデル

TDP-43 異常蓄積を再現する神経系培養細胞モデルはすでに確立しているため、KG-1-C オリゴデンドログリア系培養細胞に TDP-43 改変遺伝子を導入した培養細胞モデルを作製した。神経系細胞と同様、リン酸化、ユビキチン化を伴う TDP-43 異常蓄積を起こすことに成功し、さらにマイトマイシン C 処理による分裂停止後、1 週間の培養も可能であった。今後、遺伝子導入効率の向上をはかって、薬剤候補スクリーニングを可能とする予定である。

④ヒト剖検脳の解析

まず当研究室に蓄積された FTLD 患者 66 例の剖検脳組織標本をタウ、TDP-43、ユビキチンによる免疫組織化学染色を行った。約半数が FTLD-TDP であり、タウ陰性 TDP-43 陰性 FTLD を計 10 例見出した。このうち 9 例が、TDP-43 と同じ hnRNP である FUS 蓄積症 (FTLD-FUS) であった。

D. 考察

ヒト TDP-43 の野生型、G298 変異型、M337V 変異型タンパク質を発現する *TARDBP*-Tg マウス、計 3 系統を樹立した。これらの系統では生後早期から、あるいは高齢になって後肢機能異常という ALS 類似の表現型が出現した。これらの系ではヒト型 TDP-43 蛋白発現は同程度であるにもかかわらず、表現型は野生型が最も強く、G298S、M337V の順に弱くなる傾向が認められた。発現したヒト TDP-43 はそのほとんどが Tris-HCl 可溶性画分に回収され、正常の内在性 TDP-43 と同じく核に局在が観察された。生化学的には不溶画分における異常リン酸化 TDP-43 は認められず、病理組織学的にも、リン酸化 TDP-43 陽性構造は僅かしか検出されなかった。したがって、この運動障害の背景となっている病態はヒト疾患とは異なる可能性がある。これは培養細胞モデルにおいても、全長

TDP-43 の発現では異常リン酸化などの病態再現ができないことと対応した所見であるかも知れない。今後は、培養細胞モデルの知見をもとに導入遺伝子の改変を行う、あるいは *GRN*-KO をはじめとして異常蛋白質蓄積を増幅する背景要因を付加する等の改良が必要であると考えられる。

ヒト疾患脳脊髄では神経細胞に加えオリゴデンドログリアへの TDP-43 蓄積が認められる。これは、神経細胞が分裂増殖をしない細胞であるの対してオリゴデンドログリアが常に増殖して入れ替わっている細胞種であることを考慮に入れると重大な所見である。TDP-43 を標的とした抗認知症薬の創薬には、神経系細胞のみでなく、オリゴデンドログリア系細胞モデルを用いたスクリーニングも必須であると考えられる。

FUS 異常蓄積を伴う FTLD は当初の予想より頻度が高く、また臨床的に (すなわち病変分布が) 行動異常が前景に立つ前頭側頭型認知症を呈する点も FTLD-TDP と FTLD-FUS は共通している。FUS モデルの構築と TDP-43 モデルとの比較は FTLD の病態解析に新たな情報をもたらす、モデル作製・改良への寄与が期待される。

E. 結論

全長 *TARDBP* 導入 Tg マウスでは、ヒト病変に匹敵する TDP-43 異常蓄積を生じる事はなかった。抗認知症薬の創薬モデルとするには、今後、*GRN*-KO 等の異常蓄積を加速させる可能性がある背景要因の付加、改変 TDP-43 遺伝子の導入などの改良を加える必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arai T, Hasegawa M, Nonoka T, Kametani F,

- Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaya M, Fujishiro H, Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181
2. Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tomimaga I. Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.
 3. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119:689-702, 2010.
 4. Coomaraswamy J, Kilger E, Wölfing H, Schäfer C, Kaeser SA, Wegenast-Braun BM, Hefendehl JK, Wolburg H, Mazzella M, Ghiso J, Goedert M, Akiyama H, Garcia-Sierra F, Wolfer DP, Mathews PM, Jucker M. Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:7969-7974, 2010.
 5. Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Akiyama H, Shibayama H, Ozaki N. Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy. *J Neurol Sci* 301:77-85, 2011
 6. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 293:6-11, 2010.
 7. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity. *Neuropathol* 30:372-380, 2010.
 8. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Clinicopathological characteristics of FTLN-TDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss. *J Neurol Sci* 298:70-77, 2010.
 9. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Kubodera T, Shibata N, Arai T, Miura H, Ishikawa C, Kondo H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. FALS with Gly72Ser mutation in SOD1 gene: Report of a family including the first autopsy case. *J Neurol Sci* 300:9-13, 2011
 10. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Takahashi M, Yokota O, Taki K, Ishizu H, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H. Morel's laminar sclerosis showing apraxia of speech: Distribution of cortical lesions in an autopsy case. *Neuropathol* 30:76-83, 2010
 11. Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumiyama Y, Akiyama H, Arai T, Mizusawa H. Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease showing severe and circumscribed atrophy of anterior temporal lobes. *J Neurol Sci* 297:92-96, 2010.
 12. Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DM. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol* 119:1-4, 2010
 13. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem.* 285: 34885-98, 2010.
 14. Nozaki I, Arai M, Takahashi K, Hamaguchi T, Yoshikawa H, Muroishi T, Noguchi-Shinohara M, Ito H, Itokawa M, Akiyama H, Kawata A, Yamada M. Familial ALS with G298S mutation in TARDBP: a comparison of CSF tau protein levels with those in sporadic ALS. *Intern Med* 49:1209-1212, 2010
 15. Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, Takahashi M, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett* 471:20-24, 2010
 16. Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H. TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-4, 2010.
 17. Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role

of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 395: 445-56, 2010.

18. Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010.
19. Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010.
20. 山下万貴子、野中隆、長谷川成人。(2010) TDP-43 凝集体形成阻害化合物の検索 最新医学 65: 1597-1602
21. 長谷川成人、新井哲明。(2010) TDP-43 蓄積症の発見 最新医学 65:1558-1565
22. 藤城弘樹、土谷邦秋、横田修、湯浅和美、新里和弘、新井哲明、秋山治彦 (2010) 統合失調症患者に認められた無症候性アルコール性小脳変性症の1剖検例。精神医学 51:1205-1208
23. 野中隆、長谷川成人。(2010) 細胞内 TDP-43 蓄積のメカニズム 最新医学 65: 1572-157

2.学会発表

1. Akiyama H, Kobayashi Z, Arai T, Hosokawa M, Tsuchiya K, Yokota O, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Hasegawa M (2010) Screening for FUS proteinopathy in the institutional brain collection. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]
2. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H. Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]
3. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]
4. Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]
5. Masuda M, Taniguchi S, Suzuki N, Hasegawa M. Therapeutic approaches of targeting pathological tau protein for

neurodegenerative diseases. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/03]

6. 羽賀千恵, 池田研二, 新井哲明, 石山宮子, 柳下三郎, 下村洋子, 近藤ひろみ, 細川雅人, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2010) 内嗅領皮質野に出現するユビキチン顆粒(UPG)の再検討. 第 51 回日本神経病理学総会学術研究会 [2010/04/24]
7. 横田修, Davidson Yvonne, Bigio Eileen H, 石津秀樹, 寺田整司, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, Sikkink Stephen, Pickering-Brown Stuart, Mann David MA. (2010) 進行性核上性麻痺症例におけるリン酸化 TDP-43 病理、海馬硬化、認知機能低下の関心の検討. *Dementia Japan* 24: 328.
8. 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 細川雅人, 秋山治彦, 長谷川成人. (2010) TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導. *Dementia Japan* 24: 387.
9. 小林禅, 秋山治彦, 新井哲明, 細川雅人, 長谷川成人, 横田修, 寺田整司, 土谷邦秋, 大島健一, 新里和弘, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 池田学, 小柳清光, 石津秀樹, 村山繁雄, 中野今治, 水澤英洋 (2010) 本邦における FTLT-FUS 症例の検討. *Dementia Japan* 24: 391
10. 新井哲明, 松脇貴志, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 細川雅人, 近藤ひろみ, 西原真杉 (2010) プログラニューリンノックアウトマウス脳の組織化学的解析. 第 51 回日本神経病理学総会学術研究会 東京 [2010/04/24]
11. 長谷川成人. ALS の分子病態解明と治療に向けて. 日本神経治療学会, シンポジウム 2, 神経治療学のブレークスルー: 神経疾患の新規治療, 横浜 [2010/07/21]
12. 長谷川成人. TDP-43 の発見から動物モデルまで. 第 51 回日本神経学会総会, シンポジウム 13 「筋萎縮性側索硬化症の病因 TDP-43 および FUS/TLS 研究の最前線」, 東京 [2010/05/22]
13. 長谷川成人. 筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症を特徴づける封入体の構成タンパク質、TDP-43. 第 99 回日本病理学会総会, ワークショップ 12 「神経変性疾患と封入体」, 東京 [2010/04/29]
14. 長谷川成人. 生化学的方法と神経病理. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, シンポジウム 2 [神経病理の更なる発展に向けて②], 東京 [2010/04/24]
15. 辻浩史, 宅間浩, 中馬越清隆, 富所康志, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 玉岡晃. (2010) TDP-43 proteinopathy に認める TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検

討. *Dementia Japan* 24: 386.

16. 辻浩史, 長谷川成人, 野中隆, 新井哲明, 山下万貴子, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 宅間浩, 富所康志, 中馬越清隆, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 玉岡晃 (2010) 筋萎縮性側索硬化症に蓄積する TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. 第 51 回日本神経学会総会, 東京 [2010/05/21]
17. 眞鍋雄太, 土谷邦秋, 新井哲明, 秋山治彦 (2010) パーキンソン病の病理所見を呈する Shy-Drager 症候群と臨床診断されていた 3 例. 第 51 回日本神経病理学総会学術研究会 東京 [2010/04/24]

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

ヒト TDP-43 を発現するトランスジェニックマウスの作出と解析

研究分担者：長谷川成人（東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム）

研究協力者：野中 隆¹⁾，新井哲明^{2,3)}，多屋長治⁴⁾，秋山治彦²⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

²⁾ 東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム

³⁾ 筑波大学大学院・精神病態医学分野

⁴⁾ 東京都臨床医学総合研究所 疾患モデル開発センター

研究要旨

TDP-43 は前頭側頭葉変性症(FTLD)や ALS の異常病理構造物の構成タンパク質として同定され、その蓄積と神経変性の関係が示唆されている。A β 、タウ、SOD1 などの他の神経変性疾患原因タンパク質の動物モデルと同様、ヒト TDP-43 を発現するマウスを作出することにより、患者脳脊髄におこる病変を再現できる可能性が考えられる。そこで、ヒト TDP-43 の野生型、及び家族性 ALS 患者に同定された G298S 変異、あるいは V337M 変異をもつ TDP-43 を発現するマウスの作出、解析を行った。

A. 研究目的

TDP-43 は、414 アミノ酸からなる 1 本鎖ポリペプチドであり、細胞の核に局在する不均一核リボタンパク質 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNPs) の一種である。2006 年、前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTLD)、および筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) の患者脳に認められるタウ陰性ユビキチン陽性封入体の主要構成成分として TDP-43 が同定され、その蓄積と神経変性疾患との関連が示唆されている。これまでアミロイド前駆体タンパク質 APP、変異タウ、変異 SOD1、変異ハンチンチン等、ヒトの変異タンパク質を脳や脊髄に過剰発現するトランスジェニックマウスが作製され、患者脳の病理に近い病変が再現されることが報告されている。そこで、ヒト TDP-43 を発現するマウスを作製すれば、マウスの脳や脊髄において TDP-43 の異常蓄積を起こる可能性が考えられる。そこで、ヒト TDP-43 の野生型(WT)、及び家族性 ALS 患者に見いだされた変異

G298S、あるいは M337V 変異を有する TDP-43 をマウスの脳、脊髄に発現するマウスの作出、およびその解析を行った。

B. 研究方法

部位特異的突然変異法を用いてヒト TDP-43 に G298S、あるいは M337V 変異を導入した。野生型、及び変異型 TDP-43 の cDNA をマウス thy1.2 genomic expression vector (Dr. Goedert との共同研究) にサブクローニングした。トランスジェニックマウスは C57BL/6J マウスの胚の前核にマイクロインジェクションすることによって作製された。ファウンダーは尻尾のバイオプシーの抽出物の PCR 解析によって同定した。ファウンダーマウスは C57BL/6J マウスと交雑させ、系統を樹立した。ホモ接合性は非トランスジェニックマウスと交配し決定した。イムノブロット解析は、マウスの脳、および脊髄を取り出した後、Tris-HCl、Triton-X、Sarkosyl と順次可溶化し、それぞれの分画を電気泳動し、抗体と反応させた。抗体は、ヒトおよびマウスの TDP-43 と反応する抗 TDP-43 ポリクローナ

ル抗体(Protein Tech)と、ヒト TDP-43 を特異的に認識する抗 TDP-43 モノクローナル抗体 (Protein Tech)、および異常リン酸化 TDP-43 を認識する pS409/410 を用いた。

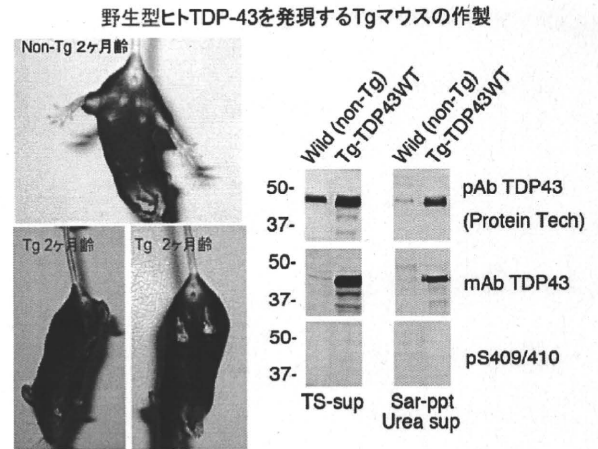
(倫理面への配慮)

トランスジェニックマウスの作製、および動物実験は、東京都臨床医学総合研究所、および東京都精神医学研究所の倫理委員会に研究の申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

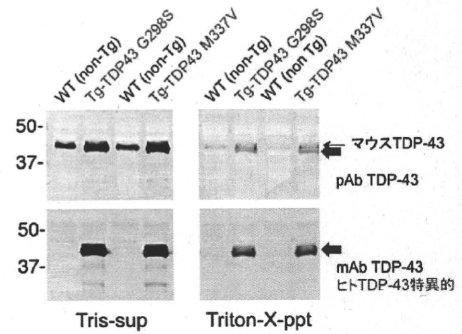
C.研究結果

PCR 解析によって同定したファウンダーからヒト TDP-43 タンパク質を発現する複数の系統の Tg マウスを樹立した。興味深いことに、これらのマウスは生後早い時期から、下肢反射の異常が観察された。マウスは尻尾を持ち上げた状態にすると、正常マウスでは下肢が開いた状態をとるが、これらのマウスでは足組みする異常が観察された。マウス脳、脊髄におけるヒト TDP-43 タンパク質の発現を調べるため、生後 2ヶ月齢のマウスから脳、脊髄を取り出し、Tris-HCl, Triton-X、さらには Sarkosyl を含む緩衝液でタンパク質を抽出し、それぞれの画分を電気泳動し、イムノブロット解析を行った。その結果、抗 TDP-43 ポリクローナル抗体で、非 Tg マウスに比べて Tg マウスにおいて 43kDa の位置に強い反応が検出された。このバンドは抗ヒト TDP-43 特異モノクローナル抗体により、明らかなバンドとして検出された。ヒト TDP-43 野生型(WT)、及び G298S、M337V 変異体タンパク質、それぞれを発現するマウスの系統において同様のバンドが検出され、ヒト TDP-43 の野生型、G298S、M337V 変異体を発現するトランスジェニックマウスの系統が樹立された。これらのマウスにおいて患者脳脊髄に蓄積する異常リン酸化 TDP-43 と同様の蓄積がみられ

るかどうかについて、Triton-X 不溶、さらには Sarkosyl 不溶性画分において pS409/410 抗体で反応するバンドがないか検出を試みたが、残念ながら、どのマウスにおいても生化学的にはリン酸化 TDP-43 は検出されなかった。



変異型TDP-43を発現するTgマウスの作製
東京都臨床医学総合研究所(疾患モデル開発センター)との共同研究

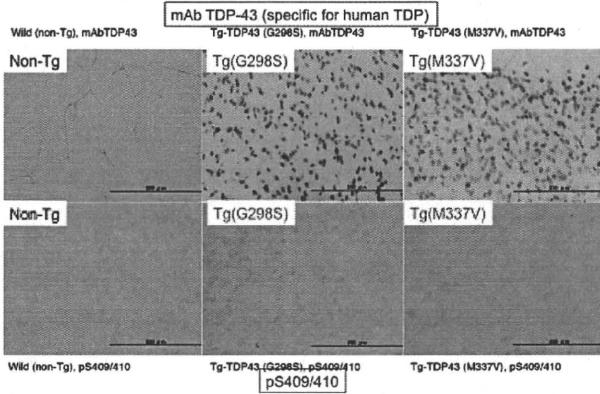


上記の図は脳試料のイムノブロット解析を示すが、脊髄についても同様の検討を行ったが、リン酸化 TDP-43 の反応は検出されなかった。

また、凍結脳を中性緩衝ホルマリンにて固定後、50 ミクロン厚のビブラトーム切片を作製し、免疫組織染色を行って解析した結果、ヒト TDP-43 特異抗体で細胞核が強く染色され、発現するヒト TDP-43 は正常 TDP-43 の局在と同様に核に局在することが確認された。2ヶ月齢のマウスのビブラトーム脳切片では、リン酸化 TDP-43 を認識する pS409/410 での免疫組織染色において、特に異常構造物などの陽性反応は検出されなかった。

変異型TDP-43を発現するトランスジェニック(Tg)マウスの作製

東京都臨床医学総合研究所(疾患モデル開発センター)との共同研究



D. 考察

ヒト TDP-43 の野生型、G298S 変異型、M337V 変異型タンパク質を発現するトランスジェニックマウスが複数系統樹立された。これらのマウスは生後早い時期から下肢の異常や運動機能の異常が観察され、神経系において何らかの異常がおこっていることが示唆された。下肢反射異常、及び運動失調の強さは野生型 TDP-43 発現マウスで最も顕著で、次いで G298S 変異体発現マウス、M337V 変異体発現マウスであった。ヒト TDP-43 の発現量に大きな違いはみられないが、運動失調の症状の違いは単純に発現量の違いによるものではないと考えられる。発現したヒト TDP-43 タンパク質は、そのほとんどが Tris-HCl 可溶性画分に回収され、不溶性画分には検出されなかった。また、正常の内在性 TDP-43 と同じ、核に局在が観察され、リン酸化 TDP-43 抗体陽性構造物などの異常は、凍結保存した脳を固定して作製したビブラトーム切片の解析では検出されなかった。今後のより詳細な検討が必要であるが、下肢の異常が生じている状態においても、患者脳脊髄においてみられるような異常リン酸化 TDP-43 の蓄積がないことから、この運動障害は異常 TDP-43 の蓄積とは無関係におこっている可能性が高いことが示唆された。

E. 結論

ヒト TDP-43 の野生型、G298S 変異型、M337V 変異型を脳脊髄に発現するトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスは下肢の反射異常を中心とする運動機能の異常が生後早い時期から観察された。トランスジェニックによるヒト TDP-43 は内在性 TDP-43 と同じく、細胞核に局在し、患者脳脊髄でみられるようなリン酸化 TDP-43 陽性異常構造物は生後 2 ヶ月では僅かしか認められなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem.* 285: 34885-98, 2010.
- 2). Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.
- 3). Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010.
- 4). Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010.
- 5). Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe

M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H. TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-4, 2010.

6). Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 395: 445-56, 2010.

7). Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaya M, Fujishiro H, Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181

8). 山下万貴子、野中隆、長谷川成人。(2010) TDP-43 凝集体形成阻害化合物の検索 最新医学 65: 1597-1602

9). 野中隆、長谷川成人。(2010) 細胞内 TDP-43 蓄積のメカニズム 最新医学 65: 1572-157

10). 長谷川成人、新井哲明。(2010) TDP-43 蓄積症の発見 最新医学 65:1558-1565

2.学会発表

1). Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]

2). Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA[2010/10/06]

3). Masuda M, Taniguchi S, Suzuki N, Hasegawa M. Therapeutic approaches of targeting pathological tau protein for neurodegenerative diseases. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe,Japan [2010/09/03]

4). Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H. Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe,Japan [2010/09/04]

5). 長谷川成人. ALS の分子病態解明と治療に向けて. 日本神経治療学会, シンポジウム 2, 神経治療学のブレークスルー:神経疾患の新規治療, 横浜 [2010/07/21]

6). 長谷川成人. 生化学的方法と神経病理. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, シンポジウム 2 [神経病理の更なる発展に向けて②], 東京 [2010/04/24]

7). 長谷川成人. 筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症を特徴づける封入体の構成タンパク質、TDP-43. 第 99 回日本病理学会総会, ワークショップ 12「神経変性疾患と封入体」, 東京 [2010/04/29]

8). 長谷川成人. TDP-43 の発見から動物モデルまで. 第 51 回日本神経学会総会, シンポジウム 13 「筋萎縮性側索硬化症の病因 TDP-43 および FUS/TLS 研究の最前線」, 東京 [2010/05/22]

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得 特になし

2.実用新案登録 特になし

3.その他 特になし

前頭側頭葉変性症モデル培養細胞・マウスの作製

研究分担者：秋山治彦（東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム）
研究協力者：細川雅人¹⁾，東晋二¹⁾，小林禅¹⁾，青木直哉¹⁾，新井哲明^{1,2)}，長谷川成人³⁾，
野中隆³⁾，多屋長治⁴⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所老年期精神疾患研究チーム

²⁾ 筑波大学大学院・精神病態医学分野

³⁾ 東京都精神医学総合研究所分子神経生物研究チーム

⁴⁾ 東京都臨床医学総合研究所疾患モデル開発センター

研究要旨

タウ陰性前頭側頭葉変性症(FTLD)の多くは TDP-43 異常蓄積にもとづき発病するが(FTLD-TDP)，家族性 FTLD-TDP の原因遺伝子として同定されているのはプログランニューリン遺伝子 *GRN* である。FTLD-TDP の病態を再現するモデルを作製するため、*TARDBP* トランスジェニックマウスの解析、*GRN* ノックアウトマウスの系統導入と維持、改変 *TARDBP* 過剰発現培養細胞モデルの作製、そして TDP-43 と同じ hnRNP で同様の病態を引き起こす FUS 異常症の病理学的解析を行った。

A.研究目的

TDP-43 は細胞の核に局在する不均一核リボ蛋白質 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNP) の一種で、タウ陰性前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の脳脊髄に異常蓄積するとともに、その (*TARDBP*) 遺伝子異常は家族性 ALS の原因となる。また TDP-43 と同じ hnRNP のひとつである FUS (fused in sarcoma) はタウ・TDP-43 陰性 FTLD における異常蓄積蛋白質であるとともに、やはり家族性 ALS の原因遺伝子のひとつである。また TDP-43 はアルツハイマー病やレヴィー小体型認知症患者の約半数において大脳への蓄積が認められる。TDP-43 や FUS の異常蓄積は神経細胞のみならず、オリゴデンドログリアにおいても生じる。

これらの事実をもとに、FTLD の病態を再現する動物モデルを作出するのが本研究の最終目標である。そのため本年度は、分担研究者で

ある長谷川研究員らが作出した *TARDBP* トランスジェニック (Tg) マウス 3 系統の病理組織学的解析、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室西原真杉教授が開発した *GRN* ノックアウト (KO) マウスの (理化学研究所からの) 導入と系統維持、改変 *TARDBP* 過剰発現培養細胞モデルの作製、そして FUS 異常蓄積を伴う患者脳の病理学的解析を行った。

B.研究方法

作出に成功した *TARDBP*-Tg マウス 3 系統のうち、本邦に家系が見出されている ALS の原因遺伝子変異 M337V を導入した系統では、異常蛋白質の恒常的発現は確認されたが、他の系統のように若齢から後肢の麻痺が生じることはなかった。この *TARDBP*(M337V)マウスを 12 ヶ月齢まで飼育し、灌流固定を行って脳および脊髄のパラフィン標本作製し免疫組織化学染色を用いて解析した。

GRN-KO マウスは東京大学西原研究室との共

同研究の一環として理化学研究所よりつがいの提供を受け系統維持を行った。

オリゴデンドログリア系培養細胞として KG-1-C 細胞を用い、神経系培養細胞のモデル作製において良い結果を得ている GFP タグ付 *TARDBP* ΔNLS および *TARDBP*(219-414) 遺伝子を導入した、KG-1-C はマイトマイシン-C (MMC) 処理による分裂増殖停止が可能であるため、遺伝子導入後に MMC 処理をして1週間まで培養、蛍光免疫組織化学染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。

FTLD-FUS の病理学的解析には、まず当研究室に蓄積された FTLD 患者 66 例の剖検脳組織標本をタウ、TDP-43、ユビキチンによる免疫組織化学染色を行ってタウ陰性 TDP-43 陰性 FTLD 計 10 例を抽出し、これらのうち FUS 陽性の 9 例を対象に各種 FUS 抗体で免疫組織化学染色を行った。

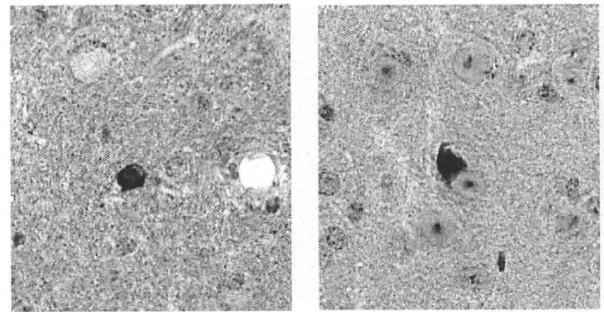
(倫理面への配慮)

トランスジェニックマウスの作製および動物実験は、東京都臨床医学総合研究所および東京都精神医学研究所の実験動物倫理委員会に研究計画を提出して審査承認をうけ、その指針に従って実験を行った。また、ヒト剖検脳の解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理基準に準じることとし、剖検時に遺族の承諾を得た場合のみ剖検材料を研究に使用した。同倫理指針策定以前に剖検になった症例については、連結可能匿名化による個人情報の保護をはかった上で使用した。すべての研究計画は東京都精神医学総合研究所の倫理委員会の審査承認を受けた。

C. 研究結果

TARDBP(M337V) マウスは 10 ヶ月を越して老齢になってくると僅かに後肢に異常がみられるようになる。12 ヶ月齢における脳脊髄組織標本

を抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS403/404 および p409/410)、ユビキチン抗体で染色すると、脊髄から脳幹にかけて稀に陽性細胞を認めた (図)。



(TDP-43 pS403/404) (TDP-43 pS409/410)

しかし、ヒト ALS, FTLD の病理所見に比べて封入体はきわめて稀であり、この Tg マウスは現状ではヒト疾患の病態を十分再現しているとは考えられなかった。他の 2 系統 (ヒト wild type *TARDBP*-Tg および *TARDBP*(G298S)-Tg) も病理所見は同様であった。

GRN-KO マウス (homozygote) はプログレニューリン発現が完全に欠損しているが、ほぼ正常に生育し、中枢神経系では加齢とともに視床や脊髄に p62 あるいはユビキチン陽性構造が出現するが、TDP-43 異常蓄積はないことが、これまでの共同研究でわかっている。実際にマウスを導入して維持を開始したところ、体重がバックグラウンドの系統に比べてやや小さく、また繁殖させにくいことが明らかになった。ヒトの病態においてはプログレニューリンの産生低下は TDP-43 蓄積に結びつくことから、今後の交配実験を視野に、現在、系統維持と繁殖を進めている。

KG-1-C オリゴデンドログリア系培養細胞に TDP-43 改変遺伝子を導入した培養細胞モデルは TDP-43 の細胞質への異常蓄積と異常蓄積した TDP-43 の (ヒト病変と同じ) リン酸化を生じ、MMC 処理により 1 週間の (分裂を伴わない) 培養観察が可能であった。培養細胞モデルによる薬剤候補化合物のスクリーニング系として、既存の神経系細胞 (SH-SY-5Y) と組み合

わせて使用できると期待されるが、現時点では遺伝子導入効率が不十分であり、様々な導入方法を試みて効率向上をはかっている。

TDP-43 と同様、hnRNP である FUS の異常蓄積を伴う FTLD-FUS の病理学的解析では、タウ陰性 FTLD のうち約 8 割が FTLD-TDP-43、残り 2 割のほとんどが FTLD-FUS であることがわかった。

D. 考察

ヒト TDP-43 の野生型、G298 変異型、M337V 変異型タンパク質を発現する *TARDBP*-Tg マウスでは後肢機能異常という ALS 類似の表現型は出現するが、TDP-43 異常蓄積は軽度であり、背景となっている病態はヒト疾患とは異なると推測される。これは培養細胞モデルにおいて全長 TDP-43 を発現させても (ALS 変異の有無にかかわらず) 異常リン酸化などの病態再現ができないことと対応した所見である可能性がある。今後は、培養細胞モデルの知見をもとに導入遺伝子の改変を行う、*GRN*-KO をはじめとして異常蛋白質蓄積を増幅する背景要因を付加する等の改良が必要であると考えられる。

ヒト疾患脳脊髄では神経細胞に加えオリゴデンドログリアへの TDP-43 蓄積が認められる。これは、神経細胞が分裂増殖をしない細胞であるの対してオリゴデンドログリアが常に増殖して入れ替わっている細胞種であることを考慮に入れると、病理組織標本で観察される頻度から得られる印象よりも重大な所見である。

TDP-43 を標的とした抗認知症薬の創薬には、神経系細胞のみでなく、オリゴデンドログリア系細胞モデルを用いたスクリーニングも必須であると考えられる。作製と維持の簡便さが、創薬において実用レベルと考えられる、TDP-43 異常蓄積オリゴデンドログリア系培養細胞の確立が求められる。

FUS 異常蓄積を伴う FTLD は当初の予想より

頻度が高く、また臨床的に (すなわち病変分布が) 行動異常が前景に立つ前頭側頭型認知症を呈する点も FTLD-TDP と FTLD-FUS は共通している。FUS モデルの構築と TDP-43 モデルとの比較は FTLD の病態解析に新たな情報をもたらし、モデル作製・改良への寄与が期待される。現在、FUS のコンストラクト作製を開始している。

E. 結論

ALS 変異の有無に関わりなく、全長 *TARDBP* 導入 Tg マウスでは、ヒトの FTLD-TDP や ALS の病変に匹敵する TDP-43 異常蓄積を生じる事はなかった。*GRN*-KO マウスや、やはり TDP-43 異常蓄積を生じるアルツハイマー病やレヴィー小体型認知症の病態を再現しているモデルマウス等との交配、改変 TDP-43 遺伝子の導入など、多様な病変加速要因の負荷を加えたモデルの開発が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Akiyama H, Shibayama H, Ozaki N. Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy. *J Neurol Sci* 301:77-85, 2011
2. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Kubodera T, Shibata N, Arai T, Miura H, Ishikawa C, Kondo H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. FALS with Gly72Ser mutation in SOD1 gene: Report of a family including the first autopsy case. *J Neurol Sci* 300:9-13, 2011
3. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H,

- Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119:689-702, 2010.
4. Coomaraswamy J, Kilger E, Wölfling H, Schäfer C, Kaeser SA, Wegenast-Braun BM, Hefendehl JK, Wolburg H, Mazzella M, Ghiso J, Goedert M, Akiyama H, Garcia-Sierra F, Wolfer DP, Mathews PM, Jucker M. Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7969-7974, 2010.
 5. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 293:6-11, 2010.
 6. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity. *Neuropathol* 30:372-380, 2010.
 7. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Clinicopathological characteristics of FTLD-TDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss. *J Neurol Sci* 298:70-77, 2010.
 8. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Takahashi M, Yokota O, Taki K, Ishizu H, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H. Morel's laminar sclerosis showing apraxia of speech: Distribution of cortical lesions in an autopsy case. *Neuropathol* 30:76-83, 2010.
 9. Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumiyama Y, Akiyama H, Arai T, Mizusawa H. Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease showing severe and circumscribed atrophy of anterior temporal lobes. *J Neurol Sci* 297:92-96, 2010.
 10. Nozaki I, Arai M, Takahashi K, Hamaguchi T, Yoshikawa H, Muroishi T, Noguchi-Shinohara M, Ito H, Itokawa M, Akiyama H, Kawata A, Yamada M. Familial ALS with G298S mutation in TARDBP: a comparison of CSF tau protein levels with those in sporadic ALS. *Intern Med* 49:1209-1212, 2010.
 11. Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, Takahashi M, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett* 471:20-24, 2010.
 12. 藤城弘樹, 土谷邦秋, 横田修, 湯浅和美, 新里和弘, 新井哲明, 秋山治彦 (2010) 統合失調症患者に認められた無症候性アルコール性小脳変性症の 1 剖検例. *精神医学* 51:1205-1208
 13. Arai T, Hasegawa M, Nonoka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Fujishiro H, Akiyama H. Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology* 30:170-181, 2010.
 14. Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DM. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol* 119:1-4, 2010
- 2.学会発表
1. Akiyama H, Kobayashi Z, Arai T, Hosokawa M, Tsuchiya K, Yokota O, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Hasegawa M (2010) Screening for FUS proteinopathy in the institutional brain collection. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]
 2. 羽賀千恵, 池田研二, 新井哲明, 石山宮子, 柳下三郎, 下村洋子, 近藤ひろみ, 細川雅

人, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2010) 内嗅領皮質野に出現するユビキチン顆粒(UPG)の再検討. 第 51 回日本神経病理学総会学術研究会 [2010/04/24]

3. 横田修, Davidson Yvonne, Bigio Eileen H, 石津秀樹, 寺田整司, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, Sikkink Stephen, Pickering-Brown Stuart, Mann David MA. (2010) 進行性核上性麻痺症例におけるリン酸化 TDP-43 病理、海馬硬化、認知機能低下の関係の検討. *Dementia Japan* 24: 328.
4. 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 細川雅人, 秋山治彦, 長谷川成人. (2010) TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導. *Dementia Japan* 24: 387.
5. 小林禅, 秋山治彦, 新井哲明, 細川雅人, 長谷川成人, 横田修, 寺田整司, 土谷邦秋, 大島健一, 新里和弘, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 池田学, 小柳清光, 石津秀樹, 村山繁雄, 中野今治, 水澤英洋 (2010) 本邦における FTLD-FUS 症例の検討. *Dementia Japan* 24: 391
6. 新井哲明, 松脇貴志, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 細川雅人, 近藤ひろみ, 西原真杉 (2010) プログラニューリンノックアウトマウス脳組織の組織化学的解析. 第 51 回日本神経病理学総会学術研究会 東京 [2010/04/24]
7. 辻浩史, 宅間浩, 中馬越清隆, 富所康志, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 玉岡晃. (2010) TDP-43 proteinopathy に認める TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. *Dementia Japan* 24: 386.
8. 辻浩史, 長谷川成人, 野中隆, 新井哲明, 山下万貴子, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 宅間浩, 富所康志, 中馬越清隆, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 玉岡晃 (2010) 筋萎縮性側索硬化症に蓄積する TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. 第 51 回日本神経学会総会, 東京 [2010/05/21]
9. 眞鍋雄太, 土谷邦秋, 新井哲明, 秋山治彦 (2010) パーキンソン病の病理所見を呈する Shy-Drager 症候群と臨床診断されていた 3 例. 第 51 回日本神経病理学総会学術研究会 東京 [2010/04/24]

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

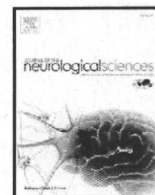
英文原著・症例報告

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年
Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Akiyama H, Shibayama H, Ozaki N	Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy	J Neurol Sci	301	77-85	2011
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Kubodera T, Shibata N, Arai T, Miura H, Ishikawa C, Kondo H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H	FALS with Gly72Ser mutation in SOD1 gene: Report of a family including the first autopsy case	J Neurol Sci	300	9-13	2011
Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M.	Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases.	J Biol Chem.	285	34885-98	2010
Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M.	Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding.	J Mol Biol.	395	445-56	2010
Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I.	Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study.	Psychogeriatrics	10	69-76	2010
Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG, Arizona Parkinson's Disease Consortium	Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders	Acta Neuropathol	119	689-702	2010
Coomaraswamy J, Kilger E, Wölfing H, Schäfer C, Kaeser SA, Wegenast-Braun BM, Hefendehl JK, Wolburg H, Mazzella M, Ghiso J, Goedert M, Akiyama H, Garcia-Sierra F, Wolfer DP, Mathews PM, Jucker M	Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease	Proc Natl Acad Sci USA	107	7969-7974	2010
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H	Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis	J Neurol Sci	293	6-11	2010
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H	Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity	Neuropathol	30	372-380	2010
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H	Clinicopathological characteristics of FTLTDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss	J Neurol Sci	298	70-77	2010
Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumiyama Y, Akiyama H, Arai T, Mizusawa H	Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease showing severe and circumscribed atrophy of anterior temporal lobes	J Neurol Sci	297	92-96	2010
Nozaki I, Arai M, Takahashi K, Hamaguchi T, Yoshikawa H, Muroishi T, Noguchi-Shinohara M, Ito H, Itokawa M, Akiyama H, Kawata A, Yamada M	Familial ALS with G298S mutation in TARDBP: a comparison of CSF tau protein levels with those in sporadic ALS	Intern Med	49	1209-1212	2010
Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H.	TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan.	Intern Med	49	331-4	2010
Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM.	Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease.	Acta Neuropathol.	120	789-801	2010

Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM.	Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy.	Acta Neuropathol.	120	55-66	2010
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------	-----	-------	------

英文総説

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年
Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaya M, Fujishiro H, Akiyama H	Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy.	Neuropathol	30	170-181	2010
Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DM	Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update	Acta Neuropathol	119	1-4	2010



Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy

Chikako Habuchi^{a,b,*}, Shuji Iritani^{a,c}, Hirotaka Sekiguchi^a, Youta Torii^a, Ryoko Ishihara^a, Tetsuaki Arai^c, Masato Hasegawa^d, Kuniaki Tsuchiya^e, Haruhiko Akiyama^c, Hiroto Shibayama^f, Norio Ozaki^a

^a Department of Psychiatry, Nagoya University Graduate School of Medicine, Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi-ken 466-8550, Japan

^b Aichi Shiroiyama Hospital, Nagoya, Japan

^c Department of Psychogeriatrics, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Tokyo, Japan

^d Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Tokyo, Japan

^e Department of Laboratory Medicine and Pathology, Tokyo Metropolitan Matsuzawa Hospital, Tokyo, Japan

^f Asahigaoka Hospital, Aichi, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2010

Received in revised form 24 October 2010

Accepted 25 October 2010

Available online 24 November 2010

Keywords:

Alzheimer's disease

Diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNCT)

Frontotemporal lobar degeneration

Non-Alzheimer degenerative dementia

Presenile dementia

Synucleinopathy

Tauopathy

TDP-43 proteinopathy

ABSTRACT

Diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNCT) is a relatively rare presenile dementia that clinically shows overlapping symptoms of Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration (FTLD). DNCT is pathologically characterized by localized temporal or frontotemporal atrophy with massive neurofibrillary tangles, neuropil threads and Fahr's-type calcification without senile plaques. We tried to clarify the molecular basis of DNCT by immunohistochemically examining the appearance and distribution of accumulated alpha-synuclein (aSyn) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) in the brains of 10 Japanese autopsy cases. We also investigated the clinically characteristic symptoms from the clinical charts and previous reports, and the correlations with neuropathological findings. The characteristic symptoms were evaluated using the Neuropsychiatric Inventory Questionnaire (NPI-Q). As a result, we confirmed the high frequency of neuronal cytoplasmic accumulation of aSyn (80%) and phosphorylated TDP-43 (90%) in DNCT cases. There was a significant correlation between some selected items of NPI-Q scores and the severity of the limbic TDP-43 pathology. The pathology of DNCT included TDP-43 and aSyn pathology with high frequency. These abnormal accumulations of TDP-43 might be involved in the pathological process of DNCT, having a close relationship to the FTLD-like psychiatric symptoms during the clinical course.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNCT) is a rare presenile dementia, thought to belong to tauopathy. Thus far, about

Abbreviations: aSyn, alpha-synuclein; AD, Alzheimer's disease; AGD, argyrophilic grain disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; DLB, Dementia with Lewy bodies; DN, dystrophic neurite; DNCT, diffuse neurofibrillary tangles with calcification; FTLD, frontotemporal lobar degeneration; FTLD-TDP, FTLD with ubiquitin-positive, tau-negative, TDP-43 positive neuronal cytoplasmic inclusions; FTLD-U, FTLD with ubiquitin-positive, tau-negative neuronal cytoplasmic inclusions; GB, Gallyas-Braak staining method; GCI, glial cytoplasmic inclusion; G-PDC, Guamanian ALS/parkinsonism-dementia complex; NFT, neurofibrillary tangles; NCI, neuronal cytoplasmic inclusion; NPI-Q, Neuropsychiatric Inventory Questionnaire; pTDP-43, phosphorylated TAR DNA-binding protein of 43 kDa; TDP-43, TAR DNA-binding protein of 43 kDa; Tx-PBS, PBS containing 0.3% Triton X-100.

* Corresponding author. Department of Psychiatry, Nagoya University Graduate School of Medicine, Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi-ken 466-8550, Japan. Tel.: +81 52 744 2282; fax: +81 52 744 2293.

E-mail address: habuchi@hm9.aitai.ne.jp (C. Habuchi).

30 or more cases of DNCT have been reported, mainly from Japan. Clinically, patients with DNCT show overlapping symptoms with Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD), including progressive memory disturbance, verbal disturbances, and personality changes (Fig. 1). Pathologically, DNCT is characterized by localized temporal or frontotemporal atrophy with massive neurofibrillary tangles (NFT), neuropil threads and Fahr's-type calcification without senile plaques [1,2].

Initially the diagnosis was neuropathologic. However, increasing knowledge about DNCT has made it possible for a clinical diagnosis also to be made [3,4]. At present, DNCT is considered a non-Alzheimer degenerative dementia, with frontotemporal lobar atrophy and frontal lobe syndrome which are characteristic in FTLD.

In 2006, two new discoveries were made in the research field of FTLD. One was the mutations of progranulin gene in familial FTLD with ubiquitin-positive, tau-negative neuronal cytoplasmic inclusions (FTLD-U) linked to chromosome 17 [5–7], and the other was TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) as a major component of ubiquitin-positive inclusions in most sporadic and familial cases of