

201024063A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と
新規治療法創出に関する研究

(H22-難治-一般-007)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 成人
(東京都精神医学総合研究所)

平成23(2011)年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法創出に関する研究	-----	1
長谷川成人		
II. 分担研究報告		
1. 筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭様変性症に蓄積する異常TDP-43の解析 に関する研究	-----	7
長谷川成人		
2. 細胞内TDP-43凝集体形成を抑制する化合物の探索に関する研究	-----	11
野中 隆		
3. 患者脳に蓄積する異常TDP-43のプロテアーゼ耐性バンドの解析 に関する研究	-----	14
亀谷富由樹		
4. 好塩基性封入体を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS-6)の病因蛋白質FUSの コンフォメーション変化に関する組織化学的研究に関する研究	-----	17
秋山治彦		
5. FUS proteinopathy例の組織化学的検討に関する研究	-----	21
新井哲明		
6. 髄液中のTDP-43の検出とTDP-43 proteinopathy動物モデル構築への試み に関する研究	-----	26
細川雅人		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	30
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	36

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法創出に関する研究班

研究代表者：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 副参事研究員

研究要旨

本研究は ALS 患者に蓄積する TDP-43 の異常を詳細に解析し、試験管内、細胞、動物モデルを解析することにより、ALS における分子病態形成機構と運動ニューロン変性機構を明らかにすると共に、異常 TDP-43 を標的とした新しい ALS の予防、診断、治療法を創出することを目標とする研究班である。今年度は、患者組織内の TDP-43 の解析から、臨床病理型が異なる ALS と FILD-U に蓄積する TDP-43 のコンフォメーションが異なることをプロテアーゼ耐性バンドの解析から明らかにした。また、ALS6 として同定された FUS が非典型 FILD-U の多くで蓄積していることを明らかにした。細胞モデルを用いた解析では、BrdU の取り込み実験により、TDP-43 凝集体形成細胞において細胞増殖が著しく阻害されていることが示された。また凝集体形成を抑制する薬剤の探索においては、大手製薬会社との共同研究において、臨床試験中の薬剤に TDP-43 の凝集抑制効果があることを見いだした。動物モデルの構築は、野生型、及び G298S, M337V 変異型ヒト TDP-43 タンパク質を発現するマウスの系統が樹立され、その解析を行った。診断法の開発では、TDP-43 抗体を用いた ELISA による検査法を構築し、ALS と、ALS との鑑別が困難なギランバレー症候群の髄液中の TDP-43 の比較をおこなった。

研究分担者：

野中 隆	東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム 主席研究員
亀谷富由樹	東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム 次席研究員
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 参事研究員
新井 哲明	筑波大学大学院 人間総合科学研究科 精神病態医学教室 講師
細川 雅人	東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム 主席研究員

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 及び前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FILD)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 2006 年に同定された。2008 年、家族性および孤発性 ALS 患者に発症と連鎖する TDP-43 の遺伝子変異が多数発見され、TDP-43 の異常が ALS 発症の原因となることが遺伝学的に証明された。TDP-43 は ALS の 90%以上を占める孤発性 ALS の変性ニューロンに認められる特徴的病理構造物の

主要成分であることから、TDP-43 の異常が多くの ALS 患者の病態発症と進行に関わっている。したがって、TDP-43 は ALS の分子病態形成機序に基づいた根本治療の中心的ターゲットと言える。ALS 患者において、TDP-43 の異常病変は、脊髄だけでなく、中枢神経系の広い領域に広がって見られ、その異常蓄積が広範な変性を引き起こすことを示唆する。一方、アルツハイマー病やレビー小体型認知症など、ALS や FILD 以外の疾患においても、30~50%において TDP-43 の異常病変が認められることも明らかとなってきた。その蓄積は二次的なもので

ある可能性もあるが、他の疾患においてもかなりの割合で TDP-43 の異常が神経変性に関わっていることを示唆する。すなわち TDP-43 の制御法を探ることは、ALS はもちろんのこと、TDP-43 の蓄積を伴う各種神経変性疾患の治療法開発においても重要であるといえる。患者脳脊髄に蓄積する TDP-43 は異常にリン酸化され、また多くは核から細胞質に局在を変え、一部断片化を受け、また一部ユビキチン化されて蓄積している。疾患によりその蓄積部位や蓄積細胞種、蓄積形態などが異なることが示されている。本研究班では、ALS 患者剖検脳脊髄に蓄積する TDP-43 の詳細な解析から、TDP-43 異常蓄積の分子機構に関する情報を得ると共に、得られた情報をもとに患者脳脊髄の病態を再現する試験管内、細胞、動物モデルを構築し、ALS における分子病態形成機構と運動ニューロン変性機構を明らかにすること、さらにはそのモデルを用いて、異常 TDP-43 を標的とした新しい ALS の予防、診断、治療法を創出することを目標とする。

B. 研究方法

1. ALS 患者剖検脳脊髄の病理、生化学解析。

患者の頭頂葉(中心前回)、および脊髄からサルコシル不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体にてイムノブロット解析を行った。また、FTLD-U (type 1)患者の大脳皮質(前頭葉)からも同様の不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体によるイムノブロットを比較した。また、蓄積 TDP-43 のプロテアーゼ耐性バンドを比較するため、ALS、FTLD-U のサルコシル不溶性画分をトリプシン、あるいはキモトリプシンにて 37°C、30 分の処理を行った後に、pS409/410 抗体によるイムノブロット解析をおこなった。

2. TDP-43 凝集体形成と細胞毒性

ヒト神経細胞株 SH-SY5Y に、全長 TDP-43、あるいは様々な部分欠損 TDP-43 を発現した。導

入から 3 日後、細胞内における TDP-43 の局在や凝集体形成を観察すると共に、BrdU 取り込み能を測定することにより細胞増殖能を評価した。また、subG1 解析により、細胞周期についても検討した。さらに、共焦点レーザー生物顕微鏡にて凝集体と共局在する因子の検索を行った。

3. TDP-43 凝集阻害薬の探索

SH-SY5Y 細胞に発現するだけで凝集体形成をおこす TDP-43 の部分欠損

TDP43-deltaNLS&187-192 あるいは C 末端断片 219-414 を一過性に発現し、その後、種々の低分子化合物を添加し、3 日間培養後、蛍光顕微鏡による観察およびイムノブロット解析を行った。

4. 髄液(CSF)中の TDP-43 検出法の構築

ELISA 法による全長 TDP-43 検出の構築を行った。人工 CSF にリコンビナント全長 TDP-43 を加えた系において、各種抗 TDP-43 モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体の組み合わせでサンドイッチ ELISA 法および間接 ELISA 法による TDP-43 の測定を検討した。

5. TDP-43 proteinopathy モデル動物の作製

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した。

6. FUS proteinopathy 例の組織化学的検討

東京都精神医学総合研究所で所蔵する NIFID 1 例、BIBD 1 例、家系内の他のメンバーにすでに FUS 遺伝子変異が同定されている (Suzuki et al., J Hum Genet, 2010) FALS 1 例の計 3 剖検例を対象とし、2 種類の抗 FUS 抗体 (Sigma, HPA008784; Bethyl A300-302A)を用いた免疫組

織化学・生化学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

剖検脳の生化学的解析は、当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。脳脊髄液や血漿の使用は患者の承認を得て実施することを原則とし、連結不可能匿名化による個人情報の保護を図った。

C.研究結果

患者脳、脊髄に蓄積する TDP-43 の解析

典型的な ALS 例と FTLD-U(type 1)例から不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体でイムノプロット解析を行い、18-26kDa の C 末端断片のバンドのパターンが疾患により異なることを確認した。FTLD-U (type 1)では 23kDa バンドが最も強く検出され、続いて 24, 18kDa バンドが検出されるのに対し、ALS では 24kDa バンドが最も強く、続いて 23, 26, 19kDa が検出されるパターンを示した。次に、典型的な ALS の 3 症例の剖検試料より、中心前回付近と脊髄の TDP-43 に違いがあるかどうか検討した結果、3 症例のリン酸化 TDP-43 の C 末端断片のバンドパターンはいずれも type 2 のパターンを示し、脳と脊髄においても、そのバンドパターンに違いは認められなかった。

ALS と FTLD-U に蓄積する TDP-43 の C 末端バンドの違いをさらに検討するため、それぞれ 2 症例について不溶性画分をトリプシン、あるいはキモトリプシン処理を行い、プロテアーゼ耐性 TDP-43 のバンドを比較した。その結果、45kDa の全長 TDP-43、レーン全体がスメア状にそまる分子の反応が消失し、あらたに 15~20kDa の断片バンドが検出され、それぞれの断片バンドのパターンは、FTLD-U と ALS で、明らかに異なるバンドパターンを示した。

TDP-43 凝集体の細胞毒性

TDP-43 の C 末断片を発現させ、凝集体形成

を誘導した細胞においては、BrdU の取り込みがほぼ完全に阻害されていた。すなわち、凝集体形成細胞では細胞増殖が著しく抑制されていることが示された。また、これらの細胞では、遺伝子の転写制御に関与する RNA ポリメラーゼ II やその他いくつかの基本転写因子が凝集体に局在することが観察され、凝集体形成時にそれらが巻き込まれる可能性が示唆された。実際の患者脳においても同様の現象が観察されるか検討した結果、FTLD の TDP-43 陽性構造物に RNA ポリメラーゼ II が共局在することが確認された。以上の結果より、TDP-43 凝集体の形成は細胞の増殖阻害および転写制御の異常を引き起こすことが明らかとなった。

TDP-43 凝集阻害薬の探索

今回試験した化合物は、我々が開発した上記細胞モデルの実施許諾契約を締結した国内製薬企業から提供された 7 化合物 (化合物 A~G) および我々が所有する化合物ライブラリーのディメボンあるいはポリフェノール化合物であるプルプロガリン (2L) およびゴシペチン (1B) である。これらを用いて、TDP-43 の欠損変異体 (deltaNLS&187-192) および C 末端断片 (GFP219-414) の発現による細胞内凝集体形成の抑制効果について試験した。

TDP-deltaNLS&187-192 の発現による細胞内凝集体形成に対する化合物の効果について検討した結果、ポジティブコントロールとして使用したディメボンでは、約 80% の凝集体形成の抑制効果が認められた。一方、化合物 A, B, E, F および 1B においても、ディメボンと同様に、40~50% 程度の阻害効果が認められた。また、化合物 C および 2L には、そのような抑制効果は認められなかった。

髄液(CSF)中の TDP-43 検出法の構築

検出の特異性を高めるために今後はサンドイッチ ELISA を採用することになったが、検出系の見直しにより、従来法よりも 10-50 倍感度

良く TDP-43 を検出することに成功した。この検出系を用いて ALS 患者および、末梢神経障害であるギランバレー症候群(GBS)患者の CSF 中 TDP-43 の検出を行った。ALS 患者の CSF 中 TDP-43 の濃度は 1.62 ± 0.15 ng/ml (N=14), GBS 患者では 1.05 ± 0.13 ng/ml (N=7) [mean \pm S.E.M] であり、Mann-Whitney U-test での統計解析の結果、 $p=0.027$ (two-tail) と有意差があることが判明した。

TDP-43 proteinopathy モデル動物の作製

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。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。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、イムノブロット解析を行った結果、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、発現が確認された。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、それぞれのトランスジェニックマウスの系統が樹立された。異常リン酸化 TDP-43 について pS409/410 抗体で反応するバンドがないか検出を試みたが、どのマウスにおいてもリン酸化 TDP-43 は検出されなかった。

FUS proteinopathy 例の組織化学的検討

NIFID および BIBD 例では、前頭・側頭葉皮質、基底核、脳幹部に広汎に、FUS 陽性の神経細胞質内封入体が認められた。封入体を有する細胞の核の染色性は、低下するものから保たれるものまでさまざまで、多様性が認められた。一方、FALS 例では、基底核、脳幹、脊髄を中心に、FUS 陽性の NCI およびグリア細胞質内封入体が多数認められたが、大脳皮質の陽性構造は目立たなかった。唯一凍結脳が保存されて

いた NIFID 例について、サルコシル不溶性画分の Western blot 解析を施行した結果、リン酸化を示唆する明らかなバンドの移動度の変化や断片化を示す低分子量域のバンドは検出されなかった。

D.考察

TDP-43 が蓄積する疾患は ALS、FTLD-U をはじめ、様々であるが、その臨床病理型と TDP-43 の C 末端断片のバンドパターンに強い相関が示されている。今回、3 例の ALS 患者の脳と脊髄に蓄積する TDP-43 の生化学解析を行ったが、いずれの症例においてもこれまでに報告されているバンドと同じパターンを示し、脳と脊髄においてもそのバンドパターンに違いは認められなかった。ALS の脳と脊髄で TDP-43 の蓄積様式が異なるという報告があるが、今回の結果はその逆の結果となる。トリプシン、キモトリプシン処理後のイムノブロット結果は、TDP-43 の異常分子の構造が ALS と FTLD-U で異なること、それが、C 末端断片のバンドパターンに反映されていることを強く示唆する。類似のプロテアーゼ断片パターンの違いと病理型の違いがプリオン病で示されており、ある神経細胞に生じた異常 TDP-43 が異常プリオンと同じように細胞から細胞へと伝播して、広がったことを生化学的に示唆するデータと考えられる。

凝集阻害効果を有する化合物の探索について、今回製薬企業から提供を受けた化合物の名称や構造などの情報は開示されていないが、化合物 C 以外の化合物は TDP-43 と相互作用する活性を有する。試験中はどの化合物に TDP-43 の細胞内凝集体形成に対する抑制効果があるのかは全く予想できなかったが、化合物の活性と欠損変異体の発現による細胞内凝集体形成の抑制効果が見事に一致した。この結果は、我々の細胞内 TDP-43 蓄積モデルが、低分子化

化合物による TDP-43 の細胞内蓄積の抑制を調べる上で、極めて有用なスクリーニングツールとして用いることができることを示している。

髄液中の TDP-43 については、ALS 例とギランバレー症候群で違いが検出される興味深い結果を得たが、今後さらに多検体の CSF を収集し、特に AD や FILD の CSF 中 TDP-43 濃度の測定を行う必要がある。また臨床応用に向けてさらに TDP-43 の検出感度を高めること、および多検体測定と少量の CSF での計測を可能にするため、蛍光ビーズを用いた TDP-43 検出法を確立することを計画している。

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トランスジェニック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。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いこと、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検出されないことなどから、この運動失調は異常 TDP-43 の蓄積とは無関係におこっている可能性が高いと考えられた。

核蛋白である FUS は、転写調節という TDP-43 と類似の機能を有するが、1)その遺伝子変異により ALS を発症する、2)FILD では神経細胞優位に、ALS では神経細胞およびグリア細胞内に蓄積する、3)臨床表現型として、ALS、FILD、両者の合併という 3 型が存在する、などの類似点が指摘できる。一方相違点としては、1)正常の神経細胞では TDP-43 は核にのみ存在するが、FUS は核と細胞質に存在する、2)封入体を形成した細胞において TDP-43 は核から失われるが、FUS は核の染色性が低下するものから保たれるものまでさまざまである。FUS の病的意義を明らかにするために、今後さらに詳細な病理・

生化学的解析が必要である。

E. 結論

ALS 患者脳脊髄に蓄積する異常 TDP-43 の生化学解析から、疾患によって TDP-43 の構造変化が異なり、その異常 TDP-43 が細胞から細胞へと伝播することにより、病変が拡大して、神経変性が広がる可能性が示唆された。

異常 TDP-43 の細胞内凝集は、RNA ポリメラーゼ等の基本転写因子に影響を与え、細胞増殖などの基本的な細胞活動に障害を与え、細胞死、変性を導くことが示唆された。

TDP-43 の細胞内蓄積を抑制する化合物 A, B, E, F およびゴシペチンは、ALS や FILD の新たな治療薬となる可能性がある。

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出した。

髄液中の TDP-43 の検出系を構築し、ALS 例とギランバレー症候群で違いが検出される結果を得た。

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

筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭様変性症に蓄積する異常 TDP-43 の解析

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：新井哲明^{2,3)}，辻浩史⁴⁾，玉岡晃⁴⁾，野中 隆¹⁾，亀谷富由樹¹⁾，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⁾ 筑波大学大学院・神経病態医学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) および 前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) に出現するユビキチン陽性細胞内封入体の主要構成成分としてリン酸化 TDP-43 が同定され、TDP-43 の異常と神経変性の関係が注目されている。患者脳脊髄に蓄積する TDP-43 のイムノブロット解析から、TDP-43 の C 末端断片バンドの違いが臨床病理型と強く相関することが示唆されている。そこで TDP-43 の C 末端断片バンドが疾患、病理型によって異なる理由が、異常蓄積する TDP-43 のコンフォメーションの違いによる可能性について検討した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) や前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTLD)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 が同定された。家族性および孤発性 ALS において TDP-43 の遺伝子変異が多数発見され、TDP-43 の異常が原因で ALS という病気が発症することが遺伝学的に証明された。TDP-43 は孤発性 ALS の特徴的病理構造物の主要構成成分であることから、TDP-43 は ALS の分子病態形成機序に基づいた根本治療の中心的ターゲットと言える。ALS 患者において、TDP-43 の異常病変は、脊髄だけでなく、中枢神経系の広い領域に広がって見られる一方、アルツハイマー病やレビー小体型認知症など、ALS や FTLD 以外の疾患においてもその 30~50%において TDP-43 の異常病変が認められることも報告されている。したがって、TDP-43 異常蓄積の制御法を探ることは、ALS はもちろんのこと、TDP-43 の蓄積を伴う各種

神経変性疾患の治療法開発においても重要であるといえる。患者脳脊髄に蓄積する TDP-43 は異常にリン酸化され、また多くは核から細胞質に局在を変え、一部断片化を受け、また一部ユビキチン化されて蓄積している。疾患によりその蓄積部位や蓄積細胞種、蓄積形態などが異なることが示されている。ALS, FTLD-TDP はその病理型の違いによって、現在 4 型に分類されている。変性突起(dystrophic neurites; DN)が特徴的な type 1, 細胞内封入体(neuronal cytoplasmic inclusions; NCI)が主体の type 2, 短い DN と NCI が主体の type 3, さらに核内封入体(intranuclear inclusions: INI)が主体の type 4 であり、それぞれ、semantic dementia (SD)の多くが type 1, ALS や運動ニューロン疾患を伴う FTLD が type 2, プログラニユリン変異を伴う FTLD が type 3, Valosin-containing protein (VCP)の変異による骨パジェット病と前側頭葉型痴呆を伴う遺伝性封入体筋炎 (IBMPFD) が type 4 と報告されている。本研究では ALS の各部位における TDP-43 の C 末端断片の解析を行うと共に、FTLD-U (type 1)とのバンドパターンの違いがコ

ンフォメーションの違いによるものであることを検討した。

B.研究方法

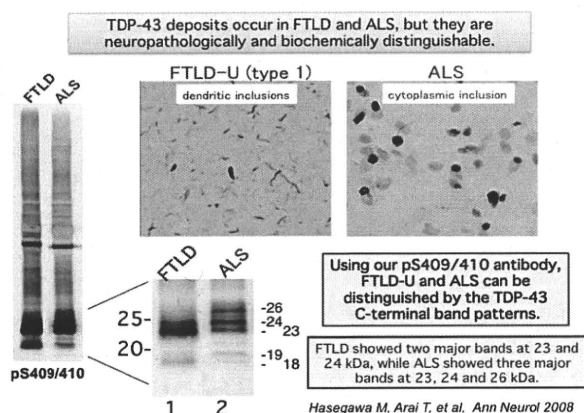
ALS 患者の頭頂葉(中心前回)、および脊髄からサルコシル不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体にてイムノブロット解析を行った。また、FTLD-U (type 1)患者の大脳皮質(前頭葉)からも同様の不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体によるイムノブロットを比較した。また、蓄積 TDP-43 のプロテアーゼ耐性バンドを比較するため、ALS、FTLD-U のサルコシル不溶性画分をトリプシン、あるいはキモトリプシンにて 37°C、30 分の処理を行った後に、pS409/410 抗体によるイムノブロット解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

剖検脳の生化学解析は、当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

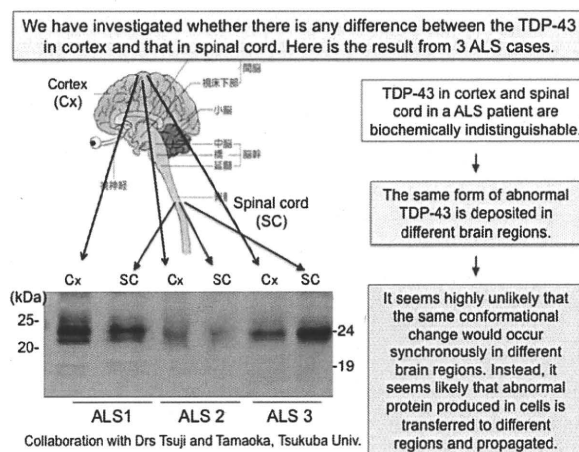
典型的な ALS 症例と FTLD-U(type 1)症例より不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体でイムノブロット解析を行った結果、これまでに報告されている結果と同様、18-26kDa の C 末端断片のバンドが異なることが確認された。



FTLD-U (type 1)では 23kDa バンドが最も強く検出され、続いて 24、18kDa バンドが検出される

のに対し、ALS では 24kDa バンドが最も強く、続いて 23、26、19kDa のバンドが検出されるパターンを示した。

次に、典型的な ALS の 3 症例の剖検試料より、中心前回付近と脊髄からサルコシル不溶性画分を調製し、イムノブロット解析を行って脳と脊髄の TDP-43 に違いがあるかどうか検討した。

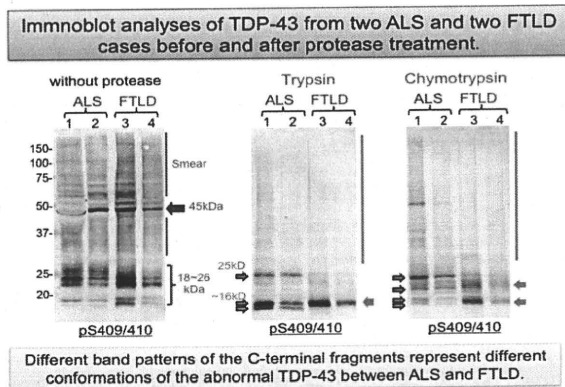


その結果、3 症例のリン酸化 TDP-43 の C 末端断片のバンドパターンはいずれも type 2 のパターンを示し、さらに脳と脊髄の間においても、そのバンドパターンに違いは認められなかった。この結果は、ALS では同じ種類の TDP-43 が脳にも脊髄にも蓄積していることを強く示唆する。

ALS と FTLD-U に蓄積する TDP-43 の C 末端バンドの違いがどのようにして生じるのか、さらに検討を加えるため、それぞれ 2 症例について不溶性画分を調製し、未変性のまま、トリプシン、あるいはキモトリプシン処理を行い、プロテアーゼ耐性 TDP-43 のバンドを比較した。不溶化の仕方や線維化の仕方が異なれば、それぞれのプロテアーゼ耐性バンドに違いが検出できると考えられたからである。

トリプシン、あるいはキモトリプシン処理の結果、45kDa の全長 TDP-43、レーン全体がスメア状にそまる分子の反応が消失し、あらたに 15~20kDa の断片バンドが検出された。そして、それぞれの断片バンドのパターンは、FTLD-U

と ALS で、明らかに異なるパターンを示した。



D. 考察

TDP-43 が蓄積する疾患は ALS、FTLD-U をはじめ、様々であるが、その臨床病理型と TDP-43 の C 末端断片のバンドパターンに強い相関が示されている。今回、3 例の ALS 患者の脳と脊髄に蓄積する TDP-43 の生化学解析を行ったが、いずれの症例においてもこれまでに報告されているバンドと同じパターンを示した。さらに、脳と脊髄においてもそのバンドパターンに違いは認められなかった。ALS の脳と脊髄で TDP-43 の蓄積様式が異なるという報告があるが、今回の結果はその逆の結果となる。TDP-43 の C 末端断片の違いが病理型によって生じる理由について、蓄積する TDP-43 のコンフォメーションの違いによる可能性を検討するため、プロテアーゼ処理後にその耐性バンドを比較検討した。その結果、トリプシン、キモトリプシン処理のいずれの場合においても、ALS と FTLD-U (type 1) の間に明らかな違いが観察された。この結果は、TDP-43 の異常分子の構造が ALS と FTLD-U で異なること、それが、C 末端断片のバンドパターンに反映されていることを強く示唆する。類似のプロテアーゼ断片パターンの違いと病理型の違いがプリオン病で示されている。すなわち、BSE のウシから感染が疑われたヒトの変異型 CJD の異常プリオンが BSE の異常プリオンと同じプロテアーゼ断片パターンを示すことなど、その生化学的な違い

が病気の発症因子や感染因子自体の違いであることが示されている。今回の ALS の脳脊髄の異常 TDP-43 の解析結果は、脳や脊髄のある神経細胞に生じた異常 TDP-43 が異常プリオンと同じように細胞から細胞へと伝播して、広がったことを生化学的に示唆するデータと考えられる。なぜなら、異なる場所、細胞において、同じ異常をもつ TDP-43 の構造変化がシンクロして起こる可能性は非常に低いと考えられるからである。この異常 TDP-43 の伝播による病変拡大のメカニズムの制御が今後、病気の進行を抑える上で極めて重要と考えられる。

E. 結論

ALS 患者脳脊髄に蓄積する異常 TDP-43 の生化学解析を行うとともに、FTLD-U に蓄積する異常 TDP-43 とのプロテアーゼ耐性バンドの比較を行うことによって、TDP-43 の異常構造の違いが検出された。疾患によって TDP-43 の構造変化が異なり、その異常 TDP-43 が細胞から細胞へと伝播することにより、病変が拡大して、神経変性が広がる可能性が示唆される。

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

細胞内 TDP-43 凝集体形成を抑制する化合物の探索

野中 隆，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

研究要旨

我々が開発した細胞内 TDP-43 蓄積細胞モデルを利用して、これらの凝集体形成を抑制する低分子化合物の探索を行った。その結果、植物由来のポリフェノールであるゴシペチンなどに細胞内 TDP-43 蓄積を抑制する効果があることを見いだした。また、国内製薬企業との共同研究（実施許諾契約）により、数種の同様な作用のある化合物を見いだした。これらは、筋萎縮性側索硬化症（ALS）や前頭側頭葉変性症（FTLD）の新たな治療薬となる可能性がある。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭葉変性症（FTLD）患者に認められるユビキチン陽性の細胞内封入体の主要な構成タンパク質として、TAR DNA-binding protein of 43 kDa（TDP-43）が同定された。また家族性および孤発性 ALS 患者の遺伝子解析により TDP-43 遺伝子において多数のミスセンス変異が同定され、TDP-43 の異常と発症との関連が遺伝学的に明らかとなった。したがって、TDP-43 の異常な細胞内凝集体形成を抑制することは、これらの疾患の治療のターゲットとなることが考えられるため、ALS や FTLD の新たな治療薬の開発を目指して、TDP-43 の細胞内凝集体形成を抑制する低分子化合物の探索を行った。

B. 研究方法

我々は以前に、TDP-43 の核移行シグナルおよびその類似配列（187-192 残基）を欠損した変異体や、患者脳に蓄積する TDP-43 の C 末端断片（219-414 残基）と Green fluorescent protein（GFP）の融合体を培養細胞（SH-SY5Y）に発現すると、リン酸化 TDP-43 抗体およびユビキチン抗体に陽性な細胞質凝集体が出現することを報告した（Yamashita M et al, FEBS Lett. 2009）。この細胞内 TDP-43 蓄積

モデルを用いて、TDP-43 の細胞内凝集を抑制する低分子化合物の探索を行った。具体的には、SH-SY5Y 細胞に pcDNA3-TDP43-deltaNLS&187-192 あるいは pEGFP-TDP43-219-414 を一過性に発現し、その後、種々の低分子化合物を添加した。3日間培養を行った後に、蛍光顕微鏡による観察およびイムノブロット解析を行った。

C. 研究結果

今回試験した化合物は、我々が開発した上記細胞モデルの実施許諾契約を締結した国内製薬企業から提供された 7 化合物（化合物 A~G）および我々が所有する化合物ライブラリーのディメボンあるいはポリフェノール化合物であるプルプロガリン（2L）およびゴシペチン（1B）である。これらを用いて、TDP-43 の欠損変異体（deltaNLS&187-192）および C 末端断片（GFP219-414）の発現による細胞内凝集体形成の抑制効果について試験した。

まず、プラスミド発現に対する化合物の影響について検討した。GFP の空ベクター（pEGFP-c1）を化合物存在下において細胞に発現させ、3日間培養を行い、GFP の発現量をイムノブロットにて調べた。その結果、今回用いたいずれの化合物においても、GFP の発現量を低下させる効果はなく、プラスミド

発現に対する抑制作用は全く認められなかった。

次に、GFP219-414の凝集体形成に関して化合物の効果を調べたところ、ポジティブコントロールとして使用したディメボンは、GFP219-414発現による凝集体形成を効率よく阻害したが、化合物A, B, C, 2Lおよび1Bには、いずれもC末端断片の凝集体形成を抑制しなかった。その他の化合物に関しては、化合物Dには顕著な細胞死誘導効果あるいは細胞増殖抑制効果が見られたため、その後の試験には用いず、また化合物EおよびFについては、試験していない。

また、核移行シグナルおよびその周辺配列の欠損変異体(deltaNLS&187-192)の発現による細胞内凝集体形成に対する化合物の効果について検討した。その結果、ポジティブコントロールとして使用したディメボンでは、約80%の凝集体形成の抑制効果が認められた。一方、化合物A, B, E, Fおよび1Bにおいても、ディメボンと同様に、40~50%程度の阻害効果が認められた。また、化合物Cおよび2Lには、そのような抑制効果は認められなかった。

D. 考察

今回、製薬企業から提供を受けた化合物については名称や構造などの情報は開示されていないが、化合物C以外の化合物はTDP-43と相互作用する活性を有する。本試験の終了後にその情報を提供されたため、試験中はどの化合物にTDP-43の細胞内凝集体形成に対する抑制効果があるのかは全く予想できなかった。しかしながら、化合物の活性と欠損変異体の発現による細胞内凝集体形成の抑制効果が見事に一致した。この結果は、我々の細胞内TDP-43蓄積モデルが、低分子化合物によるTDP-43の細胞内蓄積の抑制を調べる上で、極めて有用なスクリーニングツールとして用いることができることを示している。また今回、細胞内TDP-43の蓄積を抑制した化合物はいずれも、TDP-43のC末端断片の発現による凝集体形成は抑制せず、全長TDP-43に近いNLS欠損変異体の発現による細胞内凝集体の形成を抑制した。これらの結果により、化合物の作用点

がTDP-43のN末端側にある、あるいはC末端断片による凝集体と欠損変異体による凝集体では構造が異なるため、化合物の効果に相違が生じたのではないかと考えられる。いずれにしても、今回見いだされた化合物は、ALSやFTLDの新たな治療薬として、今後さらに動物レベルでの基礎的な試験などを積み重ね、さらに開発されていくことが大いに期待される。

E. 結論

本試験において新たに見いだされた、TDP-43の細胞内蓄積を抑制する化合物A, B, E, Fおよびゴシペチンは、ALSやFTLDの新たな治療薬となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Tanaka S, Kodama T, Nonaka T, Toyoda H, Arai M, Fukazawa M, Honda Y, Honda M, Mignot E. Transcriptional regulation of the hypocretin/orexin gene by NR6A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403: 178-183, 2010

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: 34885-34898, 2010

Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Fujishiro H and Akiyama H. Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30: 372-380, 2010

Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga S, 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: 445-456, 2010

2.学会発表

Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M (2010) Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting, San Diego, USA [2010/11/13]

野中隆 (2010) 細胞内異常タンパク質の蓄積機構とその制御. 第29回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

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. 第29回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

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. 第29回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

鈴掛雅美, 野中隆, 久永真市, 長谷川成人 (2010) モデルマウスを用いたタウ凝集阻害薬、ペプチドワクチンの評価. 第29回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

團彩帆, 野中隆, 村山繁雄, 初田裕幸, 新井孝夫, 長谷川成人 (2010) RD4 エピトープ内に起こっている翻訳後修飾によるタウの生理機能変化. 第29回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

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

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

野中隆 (2010) 細胞内に TDP-43 が蓄積する神経変性疾患モデルの構築とその応用. 第9回国際バイオ EXPO・バイオアカデミックフォーラム, 東京 [2010/07/02]

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]

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得

TDP-43 蓄積細胞モデル (特許出願 PCT/JP2009/054826), 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人, 山下万喜子

2.実用新案登録

3.その他

患者脳に蓄積する異常 TDP-43 のプロテアーゼ耐性バンドの解析

亀谷富由樹¹⁾
長谷川成人¹⁾

1) 財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・分子神経生物学研究チーム

研究要旨

ALS および FTLD 患者の脳中に蓄積する異常 TDP-43 をトリプシンを用いて限定消化し、得られたトリプシン耐性断片を含む分画 (ALS25kDa、ALS16kDa および FTLD16kDa) をキモトリプシンで酵素消化し、質量分析器で解析を行った。トリプシン耐性 TDP-43 断片の検出パターンおよび C 末 380 番残基以降で非リン酸化ペプチド断片が検出されたことから、FTLD では TDP-43 のリン酸化等の修飾が比較的均一であるのに対して、ALS ではリン酸化等の修飾が不均一であることが推定された。

A. 研究目的

これまでの研究から、神経変性疾患において、異常蓄積タンパク質断片と病理像および臨床病型との密接な関係が明らかにされ、疾患の発症との関連性も示唆されてきている。本研究においては、ALS および FTLD 患者脳中に蓄積した TDP-43 断片の相違を明らかにするためにトリプシンによる限定消化を行い、その耐性断片を解析した。

B. 研究方法

ゲル内酵素消化およびその消化物の質量解析

ALS および FTLD 患者脳 Sarkosyl 不溶画分をトリプシンで 30 分間限定酵素消化した。この消化物を SDS 電気泳動し、異常蓄積した TDP-43 のトリプシン耐性断片 (ALS:25kDa および 16kDa、FTLD:16kDa) を切り抜き、ゲル内でキモトリプシン (75-150ng) を用いて 20 時間消化した。

ゲルから消化物を抽出した後、微量高速液体クロマトグラフィー (C18 キャピラリーカラム 150 mm x 0.075 mm i.d.、流速 300 nl/min、2-80% Acetonitrile / 0.1 % formic acid) で消化物を分離し、直接質量分析機 (LXQ) で測定した。データは BioWorks および Mascot にて解析した。

(倫理面への配慮) 特に無し。

C. 研究結果

ALS および FTLD 患者脳 Sarkosyl 不溶画分をトリプシンで 30 分間限定酵素消化すると、ALS では、25kDa に 1 本および 16kDa 付近に 2 本の pS409/410 抗体で検出される Trypsin 耐性バンドが検出された。また FTLD では 16kDa に 1 本のトリプシン耐性バンドが検出された (図 1)。

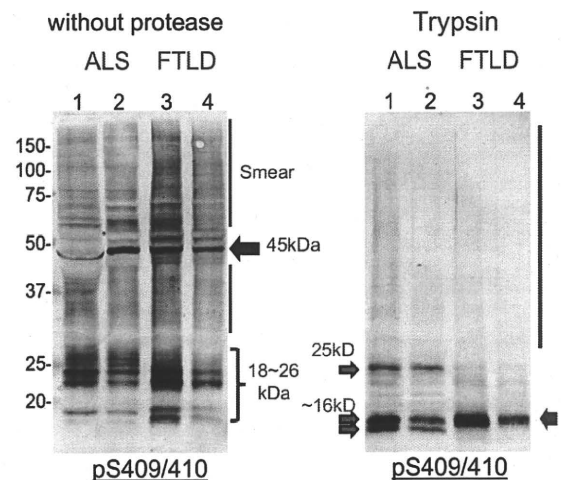


図 1 ALS および FTLD 患者脳中の蓄積した異常 TDP-43 のトリプシン耐性断片。

これらのバンドを切り抜き in gel でキモトリプシン消化を行い、ALS16kDa では 277-289、290-299、294-333、300-316、382-397 および 402-412 のペプチドが検出された。ALS25kDa では 194-207、235-249 および 271-283 のペプチドが検出された。一方、FTLD16kDa からは 273-283、277-289、290-313 および 317-330 のペプチドが検出された (図 2)。

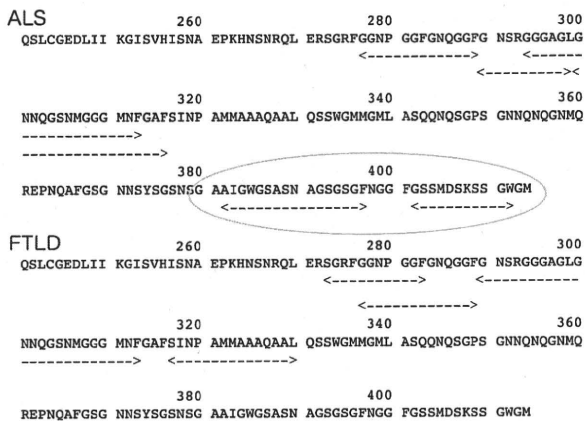


図 2 16kDa のトリプシン耐性断片の解析で得られたペプチドの比較。

ALS においては、C 末 380 番残基以降の非リン酸化ペプチド (382-392 および 402-412) が検出されたが、FTLD では検出されなかった (図 2)。

D. 考察

pS409/410 で検出される Trypsin 耐性バンド検出パターン (ALS では 16-25kDa に 3 バンド、FTLD では 16kDa 付近に 1 バンド) および ALS において、C 末 380 番残基以降の非リン酸化ペプチド (382-392 および 402-412) が検出されたことから、FTLD では TDP-43 のリン酸化等の修飾が比較的均一であるのに対して、ALS ではリン酸化等の修飾が不均一であることが推定された。

E. 結論

ALS および FTLD 患者脳中の異常 TDP-43 蓄積構造物の構造は異なっている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

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, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181

2. 学会発表

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

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

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

Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F,

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

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]

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

すべて無し

平成 22 年度 難治性疾患克服研究事業「筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法
創出に関する研究」
(分担) 研究報告書

好塩基性封入体を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS-6)の病因蛋白質 FUS のコンフォメ
ーション変化に関する組織化学的研究

研究分担者：秋山治彦¹⁾

研究協力者：小林 禅¹⁾、青木直哉¹⁾、東 晋二¹⁾

所 属：¹⁾東京都精神医学総合研究所

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) から前頭側頭葉変性症 (FTLD) にまたがる疾患の病因蛋白質として TDP-43 が同定されたことをきっかけに、やはり RNA 結合蛋白質のひとつである FUS の変異が若年発症で好塩基性封入体を伴う家族性 ALS (ALS-6) で見出され、同時に ALS-6 脳脊髄への FUS 異常蓄積が報告された。その後、タウ陰性・TDP-43 陰性 FTLD の多くに FUS 異常蓄積が見出され、TDP-43, FUS というふたつの RNA 結合蛋白質の異常がともに ALS から FTLD にまたがる神経変性疾患を起こすことが知られるようになった。FUS の病態を明らかにすることは、TDP-43 異常解明のヒントとなる可能性が高く、本研究では患者脳脊髄に異常蓄積した FUS のコンフォメーションについて解析を行った。FTLD-FUS 症例大脳皮質の FUS 陽性封入体を市販の 7 種類の抗 FUS 抗体を用いて検討したところ、FUS のカルボキシル末端側部分を抗原とする抗体では、細胞核の染色性が封入体の染色性より高かった。一方 FUS の中間部分を抗原とする抗体では、封入体の染色性の方が核の染色性より高かった。FTLD-FUS において FUS の異常蓄積～封入体形成過程で FUS 分子のコンフォメーションが変化していることが示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) から前頭側頭葉変性症 (FTLD) にまたがる疾患の病因蛋白質として TDP-43 が同定されたことをきっかけに、原因遺伝子が未知である家族性 ALS 家系において様々な RNA 結合蛋白質の遺伝子が解析され、2009 年に若年発症で好塩基性封入体を伴う家族性 ALS(ALS-6) の原因遺伝子として FUS が同定された。その際、ALS-6 症例の脳脊髄に FUS 陽性封入体が出現することも併せて報告された。その後、FTLD の 10%前後を占めるタウ陰性・TDP-43 陰性 FTLD の大多数において FUS 陽性封入体が見出され、TDP-43 と同様、FUS も ALS から FTLD にまたがる神経変性疾患の病因蛋白質である可能性が指摘された。

しかしこれまでのところ、蓄積した FUS については不溶画分に回収される割合がやや増加するという報告がひとつあったのみで、リン酸化や断片化といった生化学的異常は見出されていない。ひとつに

は FUS 異常蓄積をきたす疾患は頻度が低く、FUS に関する研究の多くがホルマリン固定標本のアーカイブを対象に行われているという問題がある。そこで、FUS のさまざまな部位を認識する複数の異なる抗体を用い、FTLD-FUS 脳組織標本の免疫組織化学染色を行って FUS 陽性封入体の抗原性プロファイルを検討した。

B. 研究方法

これまでの論文で、病理組織標本における FUS の抗原性はホルマリン固定により強く影響されることが示されている。そこで、まず 4%パラフォルムアルデヒドで短時間固定した凍結標本を用い、市販の抗 FUS 抗体 13 種類をテストして、固定標本でも比較的良好的な反応が得られる 7 種類の抗体を選び出した。次いでこれらの抗体を用いて FTLD-FUS の大脳皮質標本を染色し、細胞核と封入体の染色性を比較した。必要に応じて異なる抗体濃度を使用し、

抗体を希釈していく過程で、核と封入体、どちらの染色が先に減弱～消失するかを確認した。

また本研究を遂行している途中で、非遺伝性 ALS の TDP-43 異常蓄積構造が、組織切片に特殊な前処理を加えることで FUS の一部の抗体により認識されるとの論文が発表されたため【※Ann Neurol, 67:739-748, 2010】、その論文で用いられているものと同じ装置・試薬による前処理を行って、非遺伝性 ALS の脊髄標本および FTLD-TDP の海馬標本を複数の抗 FUS 抗体により染色した。

(倫理面への配慮)

剖検脳の解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理基準に準拠することとし、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図った上で使用した。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

東京都精神医学総合研究所の脳組織標本アーカイブをスクリーニングして見出された 9 例の FTLD-FUS 症例を対象とした。うち 1 例は大脳病変が FTLD-FUS に合致する一方、脊髄に TDP-43 病変を認めた。臨床的には前頭側頭型認知症で発症し十数年の経過を経た後に筋萎縮性側索硬化症の徴候が加わった症例で、これら両病変の合併が何らかの意味があるのか、あるいは偶然によるのかは明らかではない。ただ、この症例の大脳 FUS 病変は他の FTLD-FUS 例と異なり、細胞質封入体が少なく、変性神経突起への FUS 蓄積が主体をなしている点が特異であった。

これら FTLD-FUS 例の大脳皮質について、予備的検討でアルデヒド系固定液処理後も多少ともエピトープの構造が保存されていると判断された、FUS 分子の様々な部位に対する抗体 7 種を用いて免疫組織化学染色を行った。それぞれの抗体は FUS のアミノ酸配列のうちアミノ末端側から順に [1-50] (2 種類), [52-400], [86-213], [250-300], [400-450],

[500-526] の範囲に抗原エピトープがあるとされている。その結果、FUS のカルボキシル末端側部分 ([400-450], [500-526]) を抗原とする抗体では、核の染色性が封入体の染色性より高かった。一方 FUS の中間部分 ([52-400], [86-213], [250-300]) を抗原とする抗体では、封入体の染色性の方が核の染色性より高かった。アミノ末端側 ([1-50]) に対する抗体は症例により異なる染色結果を示した。

Ann Neurol【※】の著者は米国 Biocare Medical 社の antigen retrieval solution と同社の decloaking chamber を前処理に使用することで、Proteintech 社の抗 FUS 抗体 [52-400] と Sigma-Aldrich 社の抗 FUS 抗体 [86-213] で非遺伝性 ALS の TDP-43 蓄積が陽性に染色されたと報告した。そこで、同じ前処理システム (装置と試薬) を導入し、追試を行った。このシステムを使用した場合、通常のオートクレーブを使用した前処理に比べ、Proteintech 社の抗 FUS 抗体の染色性はやや向上した。また同社の抗体により、試験的に染色した 4 例の通常の ALS 全例の脊髄で封入体が陽性に染色された。一方、Sigma-Aldrich 社の抗体では半数の例でごく少数の封入体が染色され、また N 末 [1-50] 抗体と C 末 [400-450] 抗体では全例が陰性であった。

D. 考察

ホルマリン固定パラフィン標本において、正常な細胞の核に局在する FUS は C 末端側を認識する抗体で染色されやすく、封入体を形成した FUS は中間部分を認識する抗体で染色されやすいという、免疫組織化学的プロファイルの違いが認められた。しかし、古い、アーカイブされた組織標本で得られた結果のみでは、FTLD-FUS において異常蓄積～封入体形成過程で FUS 分子のコンフォメーションが変化しているかどうかをただちに確定することはできない。今回得られた免疫組織化学的プロファイルの違いが、実際の FUS 分子の生化学的な違いを反映したものであるかどうかについては、今後、さらに検討を加える必要がある。

通常の (非遺伝性) ALS の TDP-43 異常蓄積構造