

に FUS が共蓄積しているかどうかについても、現時点では確かなことは言えない。Proteintech 社の抗 FUS 抗体[52-400]のみが再現性を持って TDP-43 陽性封入体を染色し、Sigma-Aldrich 社の抗体はごく一部の封入体を染色したのみであった。さらに C 末および N 末抗体では封入体の陽性染色は得られなかった（同じ標本で核の陽性染色を得られた症例は相当数存在した）。TDP-43 と FUS は RNA 結合蛋白質として類似した構造を有し、病変形成過程において、いずれか片方の異常な蓄積に際してもう片方が巻き込まれて共蓄積する可能性がある。FTLD-FUS や ALS-6 の FUS 陽性封入体は TDP-43 陰性であるが、TDP-43 と異なり FUS は正常でも細胞質に存在する蛋白質である点に留意する必要がある。現時点で得られている結果からは、一部の抗 FUS 抗体が TDP-43 異常蓄積部位に局在している何らかの抗原と交叉反応をしている可能性も残されており、両者の共存についても今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

剖検脳脊髄標本の解析だけからは、現時点では、TDP-43 の異常蓄積に FUS が関与しているかどうか判断することは難しい。今後、培養細胞等の実験室内モデルを用いて TDP-43 異常蓄積の病態を解明するにあたり、同時に FUS の挙動を解析する、あるいは両者の機能や異常の共通部分について解析する、といったことを考慮する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

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. 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.
4. 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.
5. Coomaraswamy J, Kilger E, Wöfling 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.
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 FTLD-TDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss. *J Neurol Sci* 298:70-77, 2010.
9. 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
10. 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.
11. 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
12. 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

13. 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* 49:331-334, 2010
14. Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM (2010) Effect of topographical distribution of α -synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120:789-801.
15. Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM (2010) Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120:55-66.
16. 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
17. 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
18. 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. 小林禪, 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) プログラニユ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]
7. 辻浩史, 宅間浩, 中馬越清隆, 富所康志, 石井重紀子, 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, 石井重紀子, 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)

なし.

FUS proteinopathy 例の組織化学的検討

報告者氏名 新井哲明^{1,2)}

小林禪^{2,3)}, 土谷邦秋⁴⁾, 青木正志⁵⁾, 長谷川成人⁶⁾, 石津秀樹⁷⁾, 秋山治彦²⁾, 水澤英洋³⁾,
水上勝義¹⁾, 朝田隆¹⁾

1)筑波大学大学院・精神病態医学分野, 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)東京医科歯科大学大学院・脳神経病態学, 4)都立松沢病院・検査科, 5)東北大学医学部神経内科, 6)東京都精神医学総合研究所・分子神経生物学研究チーム, 7) 慈圭病院・慈圭精神医学研究所

研究要旨（10 ポイント程度）

好塩基性封入体を伴う家族性 ALS (ALS6)、好塩基性封入体病 (basophilic inclusion body disease: BIBD)、神経細胞生中間径フィラメント封入体病 (neruonal intermediate filament inclusosn disease: NIFID)の剖検脳における fused in sarcoma (FUS)陽性構造について、病理生化学的に検討した。ALS6 例では、基底核、脳幹、脊髄を中心に、FUS 陽性の神経細胞質内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs)およびグリア細胞質内封入体 (glial cytoplasmic inclusions: GCIs) が、BIBD および NIFID 例では大脳皮質および基底核を中心に NCIs が、いずれも他の異常構造よりも多数観察された。これらの疾患は共通の病理基盤を有する FUS proteinopathy の一群を形成しており、各表現型の違いの背景となる異常 FUS の生化学的特徴を明らかにすることが今後の課題である。

A. 研究目的

2006 年、前頭側頭葉変性症(FTLD)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)に出現する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、両疾患が共通の病理基盤を有することが明らかになった。さらに、2009 年家族性 ALS(familial ALS: FALS)の一型である ALS6 の原因遺伝子として同定された fused in sarcoma (FUS)が、特殊な FTLD である atypical FTLD-U、好塩基性封入体病 (basophilic inclusion body disease: BIBD)、神経細胞生中間径フィラメント封入体病 (neruonal intermediate filament inclusosn disease: NIFID)の封入体にも含まれることが最近判明した。本研究では、FUS の脳内蓄積が確認できた ALS および FTLD 例について FUS 抗体を用いた組織化学的解析を行い、TDP-43 に関するこれまでの知見と比較するとともに、その病的意義を検討する。

B. 研究方法

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じることとし、剖検時に遺族の承諾を得た場合に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、連結不可能匿名化による個人情報保護を図った上で使用した。研究計画全体について当該施設における倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

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 (neuronal cytoplasmic inclusions: NCI) が認められた (図 1-3)。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、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 (glial cytoplasmic inclusions: GCIs) 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 (図 4)。NIFID 例では、 α -インターネキシン陽性 NCI よりも FUS 陽性 NCI の数が多く、BIBD および FALS 例では好塩基性封入体 (basophilic inclusions: BIs) よりも FUS 陽性 NCI の数が多かった。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。

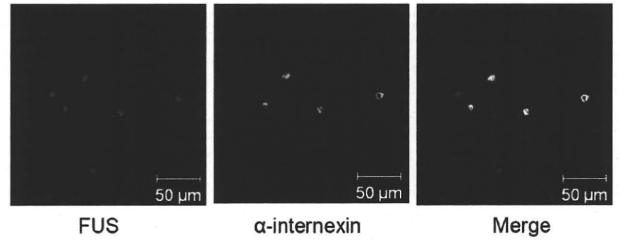


図 2. NIFID 例の橋核神経細胞の NCI における FUS と α -インターネキシンの関係 NCI s

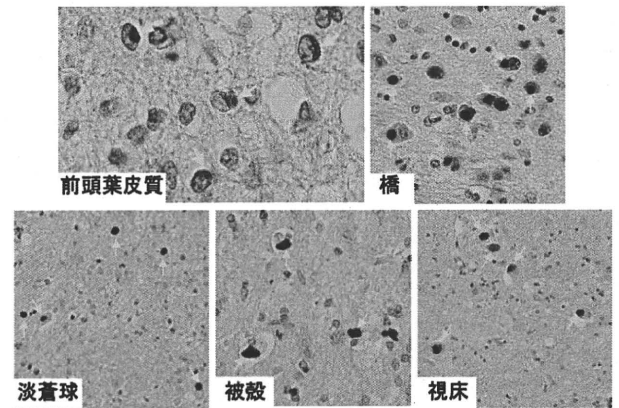


図 3. BIBD 例の FUS 陽性 NCI s (→)

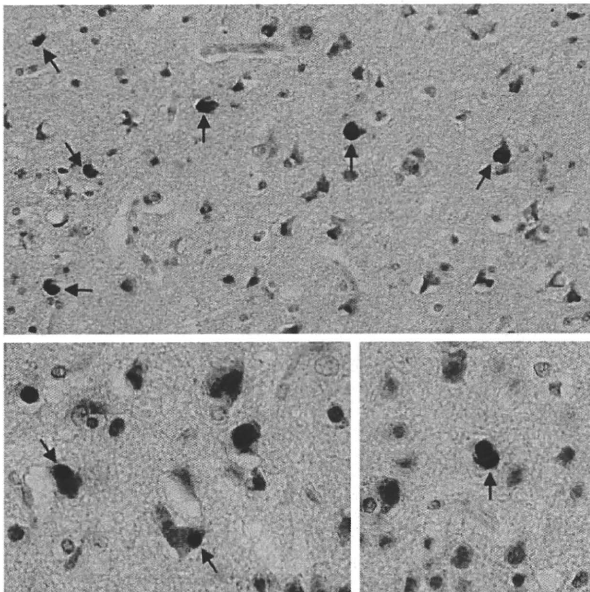


図 1. NIFID 例の大脳皮質の FUS 陽性 NCI s (→)

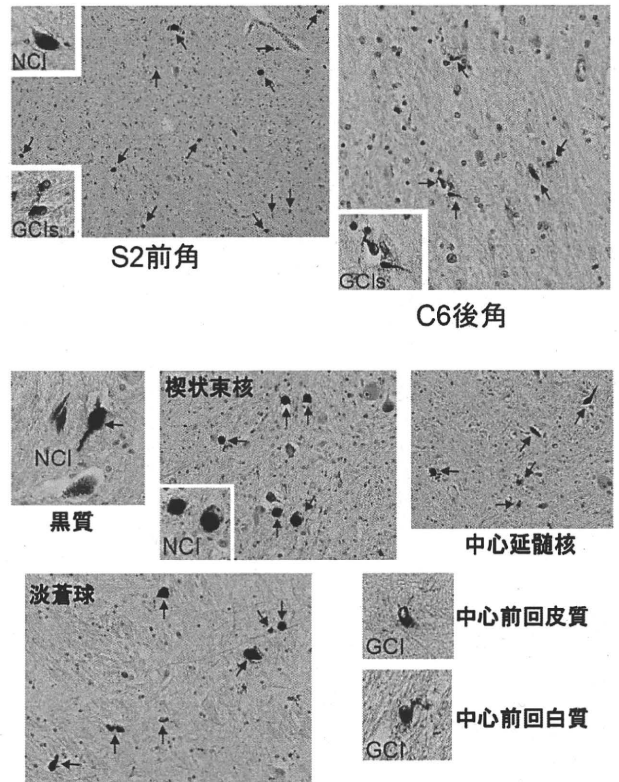


図 4. FALS 例の FUS 陽性 NCI s および

GCIIs

D. 考察

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。さらに、1)その遺伝子変異により ALS を発症する、2)FTLD 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、FTLD、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、3)不溶性画分に回収される TDP-43 に認められるリン酸化や断片化等の異常修飾を示唆する所見が、現時点では FUS には認められない、などが考えられる。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

NIFID、BIBD、BIs を伴う ALS においては、FUS の細胞内蓄積が主要な病理変化であり、これらの疾患は共通の病理基盤を有する FUS proteinopathy の一群を形成する。各表現型の違いを生じる要因となる異常 FUS の生化学的特徴を明らかにすることは今後重要である。TDP-43 と FUS という類似の機能を有する蛋白質が、ALS および FTLD に関与していることから、両蛋白の機能や相互作用の異常と疾患の病態に関する研究も重要と思われる。

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

1. 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: 331-334, 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. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, 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
4. 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. *Neuropathology* 30: 372-380, 2010
5. 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
6. 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 α -synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010
7. 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
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 FTLD-TDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss. *J Neurol Sci* 298: 70-77, 2010
9. 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
10. 新井哲明: FTLD-U. 専門医のための精神科臨床レビュー 12: 97-104, 2010
11. 亀谷富由樹, 新井哲明, 長谷川成人: TDP-43 リン酸化の意義. *Clinical Neuroscience* 28: 128-129, 2010
12. Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Niizato K, Tsuchiya K, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Kobayashi Z, 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
13. 小林禪, 新井哲明: FTLD と ALS を再び結びつけた FUS : 第 4 の proteinopathy の可能性. *Dementia Japan* 24: 74-83, 2010
14. 小林禪, 新井哲明: TDP-43 封入体のスペクトラム. *Clinical Neuroscience* 28: 594-595, 2010
15. 羽淵知加子, 新井哲明, 入谷修司: 脳の老化の神経化学. *分子精神医学* 10: 105-112, 2010
16. 藤城弘樹, 長谷川成人, 新井哲明: 前頭側頭葉変性症の分子病理. *精神神経誌* 112: 313-324, 2010
17. 細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦: TDP-43. 老年精神医学雑誌 21: 561-571, 2010
18. 細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦, 朝田隆: 前頭側頭葉変性症と遺伝要因. 老年精神医学雑誌, 21: 1387-98, 2010
19. 長谷川成人, 新井哲明: TDP-43 蓄積症の発見. *最新医学* 65: 1558-1565, 2010
20. 秋山治彦, 新井哲明, 長谷川成人: アルツハイマー病およびレビー小体型認知症におけるリン酸化 TDP-43. *最新医学* 65: 1625-1631
21. 小林禪, 新井哲明, 秋山治彦, 水澤英洋: FUS/TLS 遺伝子変異による家族性 ALS. *Clinical Neuroscience, in press*
22. 小林禪, 新井哲明, 朝田隆: 認知症の新たな異常物質 TDP-43. *最新精神医学, in press*
23. 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆: 前頭側頭葉変性症の分子病理. *生物学的精神医学会誌 in press*
24. 新井哲明, 細川雅人, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆: TDP-43 分子による新たな認知症群. *精神神経誌 in press*

2. 学会発表

- 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: プログラニューリンノックアウトマウスの組織化学的解析. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 24 日
- 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: 内嗅領皮質野に出現するユビキチン陽性顆粒(UPG)の再検討. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 24 日
- 後藤潤, 後藤昇, 柴田昌和, 土谷邦秋, 新井哲

- 明, 秋山治彦, 塩田清二: ヒト神経細胞体の分類: 機能・形態計測の相関. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 23 日
4. 眞鍋雄太, 土谷邦秋, 新井哲明, 秋山治彦: 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 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 24 日
5. 小林禪, 土谷邦秋, 三木一徳, 横田修, 新井哲明, 秋山治彦, 水澤英洋: 致死的脳炎を呈した特発性好酸球増多症の 34 歳男性剖検例. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 24 日
6. 新井哲明, 小林禪, 長谷川成人, 土谷邦秋, 青木正志, 横田修, 新里和弘, 大島健一, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆: FUS proteinopathy 例の組織化学的検討. 第 25 回日本老年精神医学会, 熊本, 2010 年 6 月 25 日
7. 新井哲明, 水上勝義, 里見介史, 野口雅之, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆: 海馬傍回皮質に限局性高密度タウ病変を認めた妄想性うつ病の 1 例. 第 29 回日本認知症学会, 名古屋, 2010 年 11 月 5 日

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

髄液中の TDP-43 の検出と TDP-43 proteinopathy 動物モデル構築への試み

細川 雅人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 老年期精神疾患研究チーム

研究要旨

剖検時及び腰椎穿刺時に採取した脳脊髄液中の TDP-43 を ELISA 法などを用いて定量的に検出することにより、ALS や FILD-TDP の臨床診断法を確立する。異常 TDP-43 の蓄積を検出する簡便な臨床検査法を開発することができれば、疾患の治療につながると思われる。また、神経変性疾患関連タンパク質の異常が相互にどのような影響を与えるかを明らかにするため、TDP-43 proteinopathy モデルマウスを作製した。

A.研究目的

前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FILD)は、前頭・側頭葉の神経細胞脱落により、人格変化や失語症状を呈する神経変性疾患群の総称である。初老期に発症する認知症の中では、アルツハイマー病に次いで頻度が高い。FILD は、病理学的には、Pick 病を中心とするタウ陽性封入体が出現する群（タウオパチー）と、タウ陰性ユビキチン陽性封入体が出現する群に大別されることが明らかとなった。後者の封入体の主要構成タンパクは長い間不明であったが、2006 年、それが TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)であることが判明した。この封入体を有する FILD の一部には筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) と同様の運動ニューロン疾患が合併することが知られていたが、ALS の病理マーカーの一つである脊髄のユビキチン陽性封入体の構成タンパクも TDP-43 であることが同時に判明し、FILD と ALS が同一の病理基盤を有することが明らかになった。

FILD-TDP 患者の死後脳から調整した不溶性画分の生化学的解析の結果、蓄積した TDP-43 はリン酸化および断片化を受けていることが判明している。また、作製したリン酸化特異抗体を用いた免疫ブロットにより検出される断片のパターンが、TDP-43 陽性病理像と相関することを見出した。これらの結果は、TDP-43 のリン酸化および断片化が疾患の病理過程

に深く関わる変化であることを示唆しており、このような異常 TDP-43 を定量的に検出することにより、疾患の早期診断や他の神経変性疾患との鑑別診断が可能になると考えられる。そこで、FILD および ALS の原因分子として同定された TDP-43 を定量するシステムを確立し、疾患の早期診断・早期治療に寄与することを目的とする。具体的には、ヒト体液中の異常 TDP-43 を検出する ELISA システムを構築する。患者脳に蓄積した TDP-43 には、リン酸化および断片化が生じていることから、これらの異常を特異的に測定することが有効と考えられる。アルツハイマー病では、すでに脳脊髄液 (CSF) 中のアミロイド β およびタウの異常を ELISA で検出することが可能であるが、TDP-43 の検出を組み合わせることにより、神経変性疾患の診断精度が向上するとともに、将来の異常タンパク特異的な根本治療の開発につながる事が期待できる

TDP-43 の異常蓄積はアルツハイマー病 (AD) やレビー小体病 (LBD) においても認められる。また、LBD において観察される異常なタウの蓄積はタウと α -シヌクレイン (α -syn) との間に相互促進があることを示唆する。Guam/紀伊半島の ALS・Parkinson 病・認知症複合ではタウと TDP-43 の高度な共蓄積が観察される。TDP-43 異常蓄積を伴う家族性 FILD の原因遺伝子の一つとしてプログランユリン (progranulin: PGRN) が同定された。PGRN 遺伝子の変異により

PGRN の機能低下が TDP-43 異常を促進し、FILD が発症すると考えられている。これらの事より異常蓄積タンパク質の overlap は異常蓄積過程における相互作用によるものと考えられる。さらに FILD-TDP では PGRN 機能低下が、AD や LBD ではアミロイド β (A β) が病態を促進していると推察できる。これらの神経変性疾患関連タンパク質の異常が相互にどのような影響を与えるかを明らかにするため、PGRN の発現量が低下した神経変性疾患モデルマウスを作製する。現時点で確立したトランスジェニックマウス(Tg)が存在しない α -syn を除き A β 、タウ、TDP-43、A β /タウの各 Tg と PGRN ノックアウトマウス (KO) のすべての組合せの交配マウスを作成し、各タンパク質の異常蓄積を同月齢の単独 Tg と比較して病変加速の有無を検討する。

B. 研究方法

1. TDP-43 検出 ELISA

全長 TDP-43 酵素結合性免疫吸着検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) の系の構築を行った。より特異性を高めるため、異なる 2 種類の抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を用いて CSF 中 TDP-43 濃度を測定した。また、従来は発色法により検出を行っていたが、検出感度を高めるため、化学発光法を用いた。

2. TDP-43 proteinopathy モデル動物、PGRN 機能低下モデル動物の作製

理化学研究所より PGRN ヘテロマウスを入手し、交配により PGRN-KO マウスを作製した。このマウスと Taconic 社から購入したタウ Tg、APP-Tg、APP-タウ double Tg、本研究所分子神経生物研究チームにより作製された TDP-43 (G298S) Tg との交配を行った。

(倫理面への配慮)

剖検時や腰椎穿刺時に採取された脳脊髄液や血漿の使用は、遺族あるい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。詳細な研究計画に関しては、本報告者の所属研究所における倫理委員会の承認を受けた。実験動物は実験動物の倫理基準に準じて実施した。具体的な実験計画は本報告者の所属研究所における動物実験倫理委員会において承認を受けた。

C. 研究結果

1. 全長 TDP-43 検出 ELISA

すでに人工 CSF にリコンビナント全長 TDP-43 を加えた系において、サンドイッチ ELISA 法および間接 ELISA 法による TDP-43 の測定に成功している。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。今後はさらに多検体の CSF を収集し、特に AD や FILD の CSF 中 TDP-43 濃度の測定を行う予定である。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。

2. TDP-43 proteinopathy モデル動物、PGRN 機能低下モデル動物の作製

理化学研究所より PGRN ヘテロマウスを入手し、交配により PGRN-KO マウスを作製した。このマウスと Taconic 社から購入したタウ Tg、APP-Tg、APP-タウ double Tg、本研究所分子神経生物研究チームにより作製された TDP-43 (G298S) Tg との交配を行い、現時点ですべての Tg マウスと PGRN-KO マウスとの間で子供が生まれているが(タウ/PGRN+/-、

APP/PGRN+/-、APP/タウ/PGRN+/-、TDP-43 (G298S)/PGRN+/-、解析可能な月齢になるまで十分に加齢させることを継続中である。

このうち TDP-43 (G298S)/PGRN+/- において TDP-43 の異常蓄積が加速しているかどうかに関して TDP-43 (G298S) との比較を行った。9-10 ヶ月齢の TDP-43 (G298S)/PGRN+/-、TDP-43 (G298S) マウスから脳と脊髄を回収し、TDP-43 の生化学的解析を行った。TDP-43 (G298S)/PGRN+/- において TDP-43 がサルコシル不溶性画分へ多く移行していることが期待されたが、9-10 ヶ月齢の両マウスを比較したところ、トリス可溶性画分における TDP-43 タンパク量、サルコシル不溶性画分の TDP-43 タンパク量ともに変化がないという結果が得られた。今後はさらに加齢したマウス(12 ヶ月以上)の解析を行う予定である。また、Guam/紀伊半島の ALS・Parkinson 病・認知症複合のマウスモデルと考えられる Tau/TDP-43 マウスを作製するためにタウ Tg と TDP-43 (M337V) Tg の掛け合わせを行ったが、現時点では仔が生まれていない。これに関しては引き続き交配を行い、Tau/TDP-43 マウスが作出されるよう努力する。

D. 考察

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 の検出を行った結果、両者に有意差があることが判明した。今後はさらに多検体の 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と考えられる。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が今後の課題である。

TDP-43 proteinopathy 動物モデルの作製において、今回 TDP-43 (G298S)/PGRN+/- マウスと TDP-43 (G298S) との比較で TDP-43 の蓄積に差が観察されなかった。ヒトではプログリン欠損遺伝子のヘテロ変異で前頭側頭葉変性症が発症するが、このマウス

モデルでは十分に病態を反映していない可能性も考えられるため、プログリン欠損の影響を明確にするために現在飼育中の TDP-43 (G298S)/PGRN+/- マウスに PGRN-/- マウスを掛け合わせて、TDP-43 (G298S)/PGRN-/- のマウスを作製し、月齢を追って脳および脊髄の生化学的、組織化学的解析を行うことが必要であると考えられる。

E. 結論

CSF 中 TDP-43 の検出に関しては、臨床応用に向けてこれまで以上に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の検出法を確立することが急務である。TDP-43 proteinopathy モデルマウスの作製では、1年以上の加齢を経た上でのマウスの比較、及び TDP-43 (G298S)/PGRN+/- 以外のモデルマウスの解析が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし

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

細川雅人、新井哲明、秋山治彦、朝田隆 前頭側頭葉変性症と遺伝要因 老年精神医学雑誌 21 巻(12) 1387-1398 (2010)

細川雅人、新井哲明、秋山治彦 認知症の発症に関わる遺伝子 TDP-43 老年精神医学雑誌 21 巻(5) 561-571 (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, 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)

2.学会発表

なし

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

【研究成果の刊行に関する一覧表】(2010~2011)

長谷川成人

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, <u>Hasegawa M.</u>	Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases.	J Biol Chem.	285	34885-98	2010
Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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
Yokota O, Davidson Y, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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.	583	789-801	2010
Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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
Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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
Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, <u>Hasegawa M.</u>	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
Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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, FILD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy	Neuropathol.	30	170-181	2010
長谷川成人、新井哲明.	TDP-43 蓄積症の発見	最新医学	65	1558-1565	2010
野中隆、 <u>長谷川成人.</u>	細胞内 TDP-43 蓄積のメカニズム	最新医学	65	1572-1578	2010

野中 隆

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Tanaka S, Kodama T, <u>Nonaka T</u> , 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.		in press	
<u>Nonaka T</u> , 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
Arai T, Hasegawa M, <u>Nonaka T</u> , 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, FILD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy	Neuropathol.	30	170-181	2010
Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, <u>Nonaka T</u> , 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
山下万貴子, <u>野中 隆</u> , 長谷川成人	TDP-43 凝集体形成阻害化合物の検索	最新医学	49	331-4	2010
<u>野中 隆</u> , 長谷川成人	細胞内 TDP-43 蓄積のメカニズム	最新医学	395	445-56.	2010

亀谷富由樹

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Araki W, <u>Kametani F</u> , Oda A, Tamaoka A	MEK inhibitors suppress beta-amyloid production by altering the level of a beta-C-terminal fragment of amyloid precursor protein in neuronal cells.	FEBS Lett	584	3410-3414	2010
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, FILD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy	Neuropathol.	30	170-181	2010

矢崎正英, 鈴木彩子, 池田修一, 亀谷富由樹	アミロイド沈着の生化学的分析: 微小生検組織を用いたアミロイド蛋白の解析.	生物物理化学	54	19-22	2010
-------------------------	---------------------------------------	--------	----	-------	------

秋山治彦

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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, <u>Akiyama H</u>	TDP-43 M337V Mutation in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis in Japan.	Intern Med	49	331-334	2010
Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, <u>Akiyama H</u> , 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, <u>Akiyama H</u> , 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
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, <u>Akiyama H</u> , 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
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, <u>Akiyama H</u> , 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, <u>Akiyama H</u> , Mizusawa H	Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity.	Neuropathology	30	372-380	2010
Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, <u>Akiyama H</u> , Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM	Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy.	Acta Neuropathol	120	55-66	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 α -synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease.	Acta Neuropathol	120	789-801	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
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 FILD-TDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss.	J Neurol Sci	298	70-77	2010
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	2010
Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Niizato K, Tsuchiya K, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Kobayashi Z, 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
細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦	TDP-43	老年精神医学雑誌	21	561-571	2010
細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦, 朝田隆	前頭側頭葉変性症と遺伝要因	老年精神医学雑誌	21	1387-1398	2010
秋山治彦, 新井哲明, 長谷川成人	アルツハイマー病およびレビー小体型認知症におけるリン酸化 TDP-43	最新医学	65	1625-1631	2010
小林禪, 新井哲明, 秋山治彦, 水澤英洋	FUS/TLS 遺伝子変異による家族性 ALS	Clinical Neuroscience	印刷中	印刷中	2011

新井哲明

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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	331-334	2010

Kobayashi Z, Tsuchiya K, <u>Arai T</u> , Aoki M, Hasegawa M, 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, <u>Arai T</u> , Yokota O, Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H	Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity.	Neuropathology	30	372-380	2010
Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, <u>Arai T</u> , 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
Yokota O, Davidson Y, <u>Arai T</u> , Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM	Effect of topographical distribution of α -synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease.	Acta Neuropathol	120	789-801	2010
Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumiyama Y, Akiyama H, <u>Arai T</u> , 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
Kobayashi Z, Tsuchiya K, <u>Arai T</u> , Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H	Clinicopathological characteristics of FILD-TDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss.	J Neurol Sci	298	70-77	2010
Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, <u>Arai T</u> , 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	2010
<u>Arai T</u> , Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Niizato K, Tsuchiya K, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Kobayashi Z, Akiyama H	Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FILD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy.	Neuropathology	30	170-181	2010
小林禪, 新井哲明	TDP-43 封入体のスペクトラム	Clinical Neuroscience	28	594-595	2010
羽淵知加子, 新井哲明, 入谷修司	脳の老化の神経化学	分子精神医学	10	105-112	2010

藤城弘樹, 長谷川成人, 新井哲明	前頭側頭葉変性症の分子病理	精神経誌	112	313-324	2010
細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦	TDP-43	老年精神医学雑誌	21	561-571	2010
細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦, 朝田隆	前頭側頭葉変性症と遺伝要因	老年精神医学雑誌	21	1387-1398	2010
長谷川成人, 新井哲明	TDP-43 蓄積症の発見	最新医学	65	1558-1565	2010
秋山治彦, 新井哲明, 長谷川成人	アルツハイマー病およびレビー小体型認知症におけるリン酸化 TDP-43	最新医学	65	1625-1631	2010
小林禪, 新井哲明, 秋山治彦, 水澤英洋	FUS/TLS 遺伝子変異による家族性 ALS	Clinical Neuroscience	印刷中	印刷中	2011
小林禪, 新井哲明, 朝田隆	認知症の新たな異常物質 TDP-43	最新精神医学	印刷中	印刷中	2011

細川雅人

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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	Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FILD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy	Neuropathol.	30	170-181	2010
細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦	認知症の発症に関わる遺伝子 TDP-43	老年精神医学雑誌	21	561-571	2010
細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦, 朝田隆	前頭側頭葉変性症と遺伝要因	老年精神医学雑誌	21	1387-1398	2010

Seeded Aggregation and Toxicity of α -Synuclein and Tau CELLULAR MODELS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES^{*[3]}

Received for publication, May 26, 2010, and in revised form, August 17, 2010. Published, JBC Papers in Press, August 30, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.148460

Takashi Nonaka^{*1}, Sayuri T. Watanabe^{*5}, Takeshi Iwatsubo^{5¶}, and Masato Hasegawa^{*2}

From the ^{*}Department of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo 156-8585 and the ⁵Department of Neuropathology and Neuroscience, Graduate School of Pharmaceutical Science, and [¶]Department of Neuropathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

The deposition of amyloid-like filaments in the brain is the central event in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Here we report cellular models of intracytoplasmic inclusions of α -synuclein, generated by introducing nucleation seeds into SH-SY5Y cells with a transfection reagent. Upon introduction of preformed seeds into cells overexpressing α -synuclein, abundant, highly filamentous α -synuclein-positive inclusions, which are extensively phosphorylated and ubiquitinated and partially thioflavin-positive, were formed within the cells. SH-SY5Y cells that formed such inclusions underwent cell death, which was blocked by small molecular compounds that inhibit β -sheet formation. Similar seed-dependent aggregation was observed in cells expressing four-repeat Tau by introducing four-repeat Tau fibrils but not three-repeat Tau fibrils or α -synuclein fibrils. No aggregate formation was observed in cells overexpressing three-repeat Tau upon treatment with four-repeat Tau fibrils. Our cellular models thus provide evidence of nucleation-dependent and protein-specific polymerization of intracellular amyloid-like proteins in cultured cells.

The conversion of certain soluble peptides and proteins into insoluble filaments or misfolded amyloid proteins is believed to be the central event in the etiology of a majority of neurodegenerative diseases (1–4). Alzheimer disease (AD)³ is characterized by the deposition of two kinds of filamentous aggregates, extracellular deposits of β -amyloid plaques composed of amyloid β ($A\beta$) peptides, and intracellular neurofibrillary lesions consisting of hyperphosphorylated Tau. In Parkinson disease

(PD) and dementia with Lewy bodies (DLB), filamentous inclusions consisting of hyperphosphorylated α -synuclein (α -syn) are accumulated in degenerating neurons (5). The deposition of prion proteins in synapses and extracellular spaces is the defining characteristic of Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases (3). The identification of genetic defects associated with early onset AD, familial PD, frontotemporal dementia, parkinsonism linked to chromosome 17 (caused by Tau mutation and deposition), and familial Creutzfeldt-Jakob disease has led to the hypothesis that the production and aggregation of these proteins are central to the development of neurodegeneration. Fibrils formed of $A\beta$ display a prototypical cross- β -structure characteristic of amyloid (6), as do many other types of filaments deposited in the extracellular space in systemic or organ-specific amyloidoses (7), including prion protein deposits (8). Filaments assembled from α -syn (9) and from Tau filaments (10) were also shown to possess cross- β -structure, as were synthetic filaments derived from exon 1 of huntingtin with 51 glutamines (11). It therefore seems appropriate to consider neurodegenerative disorders developing intracellular deposits of amyloid-like proteins as brain amyloidosis. The accumulation and propagation of extracellular amyloid proteins are believed to occur through nucleation-dependent polymerization (12, 13). However, it has been difficult to establish the relevance of this process in the *in vivo* situation because of the lack of a suitable cell culture model or method to effectively introduce seeds into cells. For example, it has not yet been possible to generate *bona fide* fibrous inclusions reminiscent of Lewy bodies as a model of PD by overexpressing α -syn in neurons of transgenic animals. Here, we describe a novel method for introducing amyloid seeds into cultured cells using lipofection, and we present experimental evidence of seed-dependent polymerization of α -syn, leading to the formation of filamentous protein deposits and cell death. This was also clearly demonstrated in cells expressing different Tau isoforms by introducing the corresponding Tau fibril seeds.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and Antibodies—A phosphorylation-independent antibody Syn102 and monoclonal and polyclonal antibodies against a synthetic phosphopeptide of α -syn (Ser(P)¹²⁹) were used as described previously (5). Polyclonal anti-ubiquitin antibody was obtained from Dako. Polyclonal anti-Tau Ser(P)³⁹⁶ was obtained from Calbiochem. Monoclonal anti- α -tubulin and anti-HA clone HA-7 were obtained from Sigma. Lipofectamine was purchased from Invitrogen. Monoclonal

* This work was supported by grants-in-aid for scientific research on Priority Areas, Research on Pathomechanisms of Brain Disorders (to T. I. and M. H.) and Grant-in-aid for Scientific Research (C) 19590297 and 22500345 (to T. N.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

[3] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S5.

¹ To whom correspondence may be addressed: Dept. of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan. Tel.: 81-3-3304-5701; Fax: 81-3-3329-8035; E-mail: nonaka-tk@igakuken.or.jp.

² To whom correspondence may be addressed: Dept. of Molecular Neurobiology, Tokyo Institute of Psychiatry 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan. Tel.: 81-3-3304-5701; Fax: 81-3-3329-8035; E-mail: hasegawa-ms@igakuken.or.jp.

³ The abbreviations used are: AD, Alzheimer disease; $A\beta$, amyloid β ; PD, Parkinson disease; DLB, dementia with Lewy bodies; α -syn, α -synuclein; 3R1N, three-repeat Tau isoform with one amino-terminal insert; 4R1N, four-repeat Tau isoform with one amino-terminal insert; LA, Lipofectamine; LDH, lactate dehydrogenase.

Seeded Aggregation of α -Synuclein and Tau in Cells

anti-Tau T46 was from Zymed Laboratories Inc.. AT100 and HT7 antibodies were obtained from Innogenetics.

Preparation of α -Syn Seed, Oligomers, and Tau Fibrils—Human α -syn cDNA in bacterial expression plasmid pRK172 was used to produce recombinant protein (14). Wild-type (WT) or carboxyl-terminally HA-tagged α -syn was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and purified as described (15). To obtain α -syn fibrils, α -syn (5–10 mg/ml) was incubated at 37 °C for 4 days with continuous shaking. The samples were diluted with 5 volumes of 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) and ultracentrifuged at $110,000 \times g$ for 20 min at 25 °C. The pellets were resuspended in 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) and sonicated twice for 5 s each. The protein concentration was determined as described, and this preparation was used as Seed α S. In the case of α -syn oligomers, α -syn (10 mg/ml) was incubated at 37 °C for 3 days in the presence of 10 mM exifone. After incubation, the mixture was ultracentrifuged at $110,000 \times g$ for 20 min at 25 °C. The supernatant was desalted by Sephadex G-25 (Amersham Biosciences) column chromatography, and eluted fractions (α -syn oligomers) were analyzed by reversed-phase HPLC, SDS-PAGE, and immunoblot analysis. Recombinant human three-repeat Tau isoform with one amino-terminal insert (3R1N) and four-repeat Tau isoform with one amino-terminal insert (4R1N) monomer and corresponding fibrils were prepared as described previously (16, 17).

Introduction of Proteins into Cells—Human neuroblastoma SH-SY5Y cells obtained from ATCC were cultured in DMEM/F-12 medium with 10% FCS. Cells at ~30–50% confluence in 6-well plates were treated with 200 μ l of Opti-MEM containing 2 μ g of the seed α -syn WT (Seed α S); HA-tagged α -syn (Seed-HA); α -syn monomers, oligomers; or Tau 3R1N or 4R1N fibrils; and 5 μ l of Lipofectamine (LA) for 3 h at 37 °C. The medium was changed to DMEM/F-12, and culture was continued for 14 h. The cells were collected by treatment with 0.5 ml of 0.25% trypsin for 10 min at 37 °C, followed by centrifugation ($1,800 \times g$, 5 min) and washing with PBS. The cellular proteins were extracted with 100 μ l of homogenization buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, and a mixture of protease inhibitors by sonication. After ultracentrifugation at $290,000 \times g$ for 20 min at 4 °C, the supernatant was collected as a Tris-soluble fraction, and the protein concentration was determined by BCA assay. The pellet was solubilized in 100 μ l of SDS-sample buffer. Both Tris-soluble and insoluble fractions were analyzed by immunoblotting with appropriate antibodies as indicated (15, 18).

Cell Culture Model of Seed-dependent Polymerization of α -Syn or Tau— α -Syn or Tau 3R1N or 4R1N was transiently overexpressed in SH-SY5Y cells by transfection of 1 μ g of wild-type human α -syn cDNA in pcDNA3 (pcDNA3- α -syn) or human Tau cDNA in pcDNA3 (pcDNA3-Tau 3R1N or 4R1N) with 3 μ l of FuGENE6 (Roche Applied Science) in 100 μ l of Opti-MEM, followed by culture for 14 h. Under our experimental conditions, the efficiency of transfection with pEGFP-C1 vector was 20–30%. The cells were washed with PBS once, and then Seed α S, Seed-HA, Seed 3R1N, or Seed 4R1N was introduced with Lipofectamine as described above. The medium was changed to DMEM/F-12, and culture was continued for ~2–3 days. Cells were harvested in the presence of trypsin to digest

extracellular cell-associated α -syn fibrils. The cellular proteins were differentially extracted and immunoblotted with the indicated antibodies, as described (18).

Confocal Microscopy—SH-SY5Y cells on coverslips were transfected with pcDNA3- α -syn and cultured for 14 h as described above, and then Seed α S was introduced, and culture was continued for ~1–2 days. After fixation with 4% paraformaldehyde, the cells were stained with appropriate primary and secondary antibodies as described previously (18). For thioflavin S staining, the cells were incubated with 0.05% thioflavin S at room temperature for 5 min. Fluorescence was analyzed with a laser-scanning confocal fluorescence microscope (LSM5Pascal, Carl Zeiss).

Immunoelectron Microscopy—For electron microscopy, cells overexpressing α -syn were transfected with Seed α S, cultured for 2 days, fixed in 0.1 M phosphate buffer containing 4% glutaraldehyde for 12 h, and then processed and embedded in LR White resin (London Resin, Reading, UK). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate for investigation. Immunolabeling of the inclusions was performed by means of an immunogold-based postembedding procedure. Sections were blocked with 10% calf serum, incubated overnight on grids with anti-Ser(P)¹²⁹ antibody at a dilution of 1:100, rinsed, then reacted with secondary antibody conjugated to 10-nm gold particles (E-Y Laboratories, San Mateo, CA) (1:10), rinsed again and stained with uranyl acetate.

Immunoelectron microscopic analysis of α -syn or Tau filaments extracted from cells was performed as follows. Cells overexpressing α -syn or Tau were transfected with Seed α S or Seed Tau, respectively. After incubation for 3 days, they were harvested, suspended in 200 μ l of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EGTA, 10% sucrose, 0.8 M NaCl and sonicated. The lysates were centrifuged at $20,400 \times g$ for 20 min at 4 °C. The supernatant was recovered, and Sarkosyl was added (final 1%, v/v). The mixtures were incubated at room temperature for 30 min and then centrifuged at $113,000 \times g$ for 20 min. The resulting pellets were suspended in 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, placed on collodion-coated 300-mesh copper grids, and stained with the indicated antibodies and 2% (v/v) phosphotungstate. Micrographs were recorded on a JEOL 1200EX electron microscope.

Cell Death Assay—Cell death assay was performed using a CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega). TUNEL staining was performed using an *in situ* cell death detection kit (Roche Applied Science).

Assay of Proteasome Activity—SH-SY5Y cells transfected with pcDNA3- α -syn and Seed α S were cultured for 3 days or treated with 20 μ M MG132 for 4 h. Cells were harvested, and cytosolic fraction was prepared as follows. Cells were resuspended in 100 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) and disrupted by sonication, and then insoluble material was removed by ultracentrifugation at $290,000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The supernatant was assayed for proteasome activity by using a fluorescent peptide substrate, benzoyloxycarbonyl-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-methylcoumarin (Peptide Institute, Inc.). 7-Amino-4-methylcoumarin release was measured fluorometrically (excitation at 365 nm; emission at 460 nm). In a green fluorescent protein (GFP) reporter assay of proteasome activity in living cells by confocal laser microscopy, SH-SY5Y cells trans-

These cells were analyzed using a laser-scanning confocal fluorescence microscope (LSM5Pascal, Carl Zeiss).

Statistical Analysis—The *p* values for the description of the statistical significance of differences were calculated by means of the unpaired, two-tailed Student's *t* test using GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software).

RESULTS

Introduction of Seed α -Syn into Cultured Cells Using Lipofectamine Reagent—Cellular overexpression of α -syn by itself does not lead to fibrillization of α -syn in a form that resembles Lewy bodies. This prompted us to examine whether or not introduction of preformed aggregation seeds of α -syn (Seed α S) would elicit fibril formation. To introduce Seed α S into SH-SY5Y cells in a non-invasive manner, we tried several reagents used for transporting proteins or plasmid DNA into cells and found that LA, a cationic gene introducer, enables the introduction of Seed α S into SH-SY5Y cells. We were not able to detect any introduced α -syn monomer or fibrils following the simple addition of protein preparations to the culture medium, notwithstanding a previous report on this approach (20). The insoluble α -syn formed following LA-mediated Seed α S introduction was detected as buffer-insoluble α -syn in cell lysates (Fig. 1A). The insoluble α -syn was phosphorylated at Ser¹²⁹ upon introduction into cells (Fig. 1A), indicating that Seed α S was incorporated in cells and phosphorylated intracellularly. Cells were harvested in the presence of trypsin to digest extracellular cell-associated α -syn fibrils. The optimal ratio of LA to Seed α S was about 5 μ l to 2 μ g of protein in 6-well plates. This treatment effectively introduced Seed α S not only into SH-SY5Y cells but also into several other types of cells examined, including Chinese

hamster ovary cells and human embryonic kidney 293T cells (data not shown). In sharp contrast, soluble α -syn (either monomeric or oligomeric forms) was not introduced into the

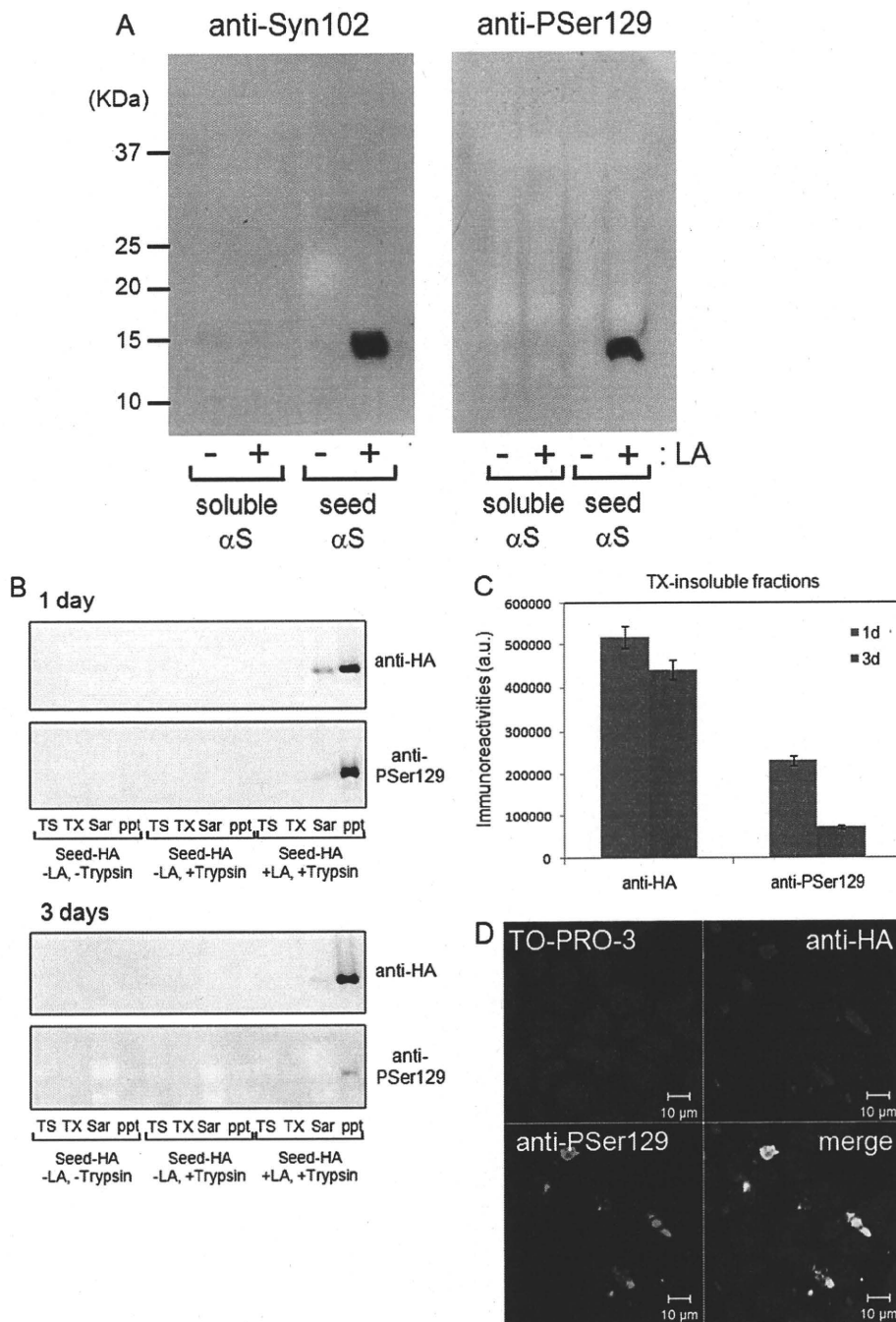


FIGURE 1. Introduction of seed α -syn into cultured cells with Lipofectamine reagent. A, purified recombinant α -syn (soluble form; 2 μ g) and filaments (2 μ g) were sonicated and then incubated with LA. The protein-LA complexes were dispersed in Opti-MEM and added to SH-SY5Y cells. After 14 h of culture, the cells were collected and sonicated in SDS sample buffer. After boiling, the samples were analyzed by immunoblotting with a phosphorylation-dependent anti- α -syn Ser(P)¹²⁹ (PSer129) (right) or a phosphorylation-independent antibody, Syn102 (left). B and C, carboxyl-terminally HA-tagged α -syn fibril seeds (Seed-HA) were transduced into cells by the use of LA. After incubation for 1 day (1d) or 3 days (3d), cells were harvested with or without trypsin, and proteins were differentially extracted from the cells with Tris-HCl (TS), Triton X-100 (TX), and Sarkosyl (Sar), leaving the pellet (ppt). Immunoblot analyses of lysates using anti-HA and anti-Ser(P)¹²⁹ are shown. The immunoreactive band positive for anti-HA or anti-Ser(P)¹²⁹ in the Triton X-100-insoluble fraction was quantified. The results are expressed as means \pm S.E. (*n* = 3). D, confocal laser microscopic analysis of cells treated with Seed-HA in the presence of LA. Cells were transduced with 2 μ g of Seed-HA using 5 μ l of LA. After a 48-h incubation, cells were fixed and immunostained with anti-Ser(P)¹²⁹ (green) and anti-HA (red) and counterstained with TO-PRO-3 (blue).

fectured with pcDNA3- α -syn (1 μ g) and GFP-CL1 (0.3 μ g) using FuGENE6 and then transfected with Seed α S were grown on coverslips for 2 days or treated with 20 μ M MG132 for 6 h (19).

hamster ovary cells and human embryonic kidney 293T cells (data not shown). In sharp contrast, soluble α -syn (either monomeric or oligomeric forms) was not introduced into the