

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

牟婁病からの iPS 細胞の作製に関する研究

研究協力者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、皮膚由来の線維芽細胞に 4 つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ作製する。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで解析に必要な細胞を作り出し研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。皮膚生検サンプルから作製できるので、多くの疾患から作製可能である。iPS 細胞樹立には、国内で開発されたセンダイウイルスベクターを用いる。この方法では、iPS 細胞作製に用いる初期化因子が染色体に組み込まれないために、疾患研究により有用な iPS 細胞を作製できる。本研究班の協力のもと、牟婁病 4 症例の皮膚生検サンプルを現在までに提供していただき、そのうちの 3 例から皮膚由来線維芽細胞を樹立した。このうちの 1 症例から iPS 細胞を樹立中である。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、皮膚由来の線維芽細胞に 4 つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ作製する。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで解析に必要な細胞を作り出し研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。そこで、難治性疾患の 1 つ牟婁病から iPS 細胞の樹立を行った。

B. 研究方法

1. iPS 細胞樹立のための皮膚線維芽細胞の樹立

牟婁病の患者の皮膚生検から、皮膚由

来初代線維芽細胞培養方法を確立する。

2. SeV ベクターを使った iPS 細胞の確立

SeV ベクターによって患者由来細胞へ初期因子（Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc）を一過性に発現させ、もっとも簡便で、確実な iPS 細胞作製方法の確立を行う。

樹立した iPS 細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。

さらに、未分化マーカーの発現を PCR にて確認する。

（倫理面への配慮）

1) 倫理審査

疾患由来の iPS 細胞作製とその解析については倫理委員会ですでに承認済みで

ある。また患者サンプルの提供については、提供機関の倫理審査委員会の承認があることを確認した後、研究を行う。

2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけではない。作製した iPS 細胞等を用いた病因解析・治療薬開発研究は本研究では行わない。また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製した iPS 細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。痛みは、局所麻酔注射の時のみである。瘢痕は普通のけ

がの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

C. 研究結果

1. 皮膚由来線維芽細胞の樹立

患者からの同意が得られた 4 例の症例において皮膚生検を行い、うち 3 例から iPS 細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。残り 1 例は培養中に真菌の汚染があり破棄した。

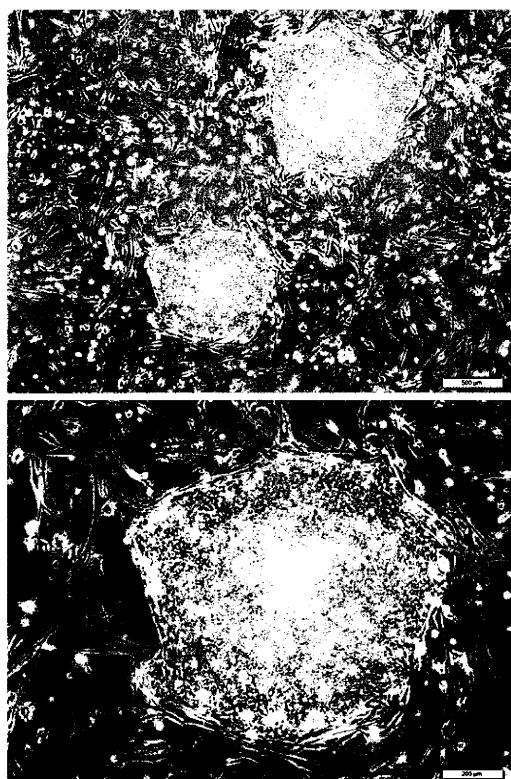
2. iPS 細胞の樹立

症例から樹立した線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を行った。線維芽細胞に初期化因子(Oct3/4, Sox2, KLF4,c-Myc)を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後 1 週間目にマイトマイシンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞(MEF)上へまきなおした。感染から 14 日後ぐらいからコロニーが出現した。現在クローニングしてコロニーを増幅中である(図)。

D. 考察

現在、皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、その細胞を使って iPS 細胞作製を行っている。線維芽細胞樹立のためには生検が必要であり、樹立まで 1 ヶ月かかる。そこで、血液細胞あるいは血液細胞由来の細胞を iPS 細胞作製のソースとすることを検討中である。これが可能であれば、生検を行わずに末梢血の採血で iPS 細胞

図 増幅中の iPS 細胞のコロニー



作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

iPS 細胞のコロニー形成についてはセンダイウイルスベクターで作製したほうが他のウイルスベクターよりも効率がよかった。したがって、iPS 細胞作製をよりスムーズに進めることができる。

E. 結論

iPS 細胞の樹立ではセンダイウイルスベクターによる方法は効率が高い。また、皮膚由来線維芽細胞で iPS 作製は可能であるが、よりよい生体試料を検討すべきである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

Era, T. Mesoderm cell development from ES cells. Methods Mol Biol. 636: 87-103, 2010.

2.学会発表

国際会議

Era, T. Origin of mesenchymal stem cell. First European Conference on Mesenchymal Stem Cells. Toulouse, FRANCE, 2010.

国内会議

招待講演

江良 択実 iPS 細胞バンク化事業 内分泌難病対策の今後と難病研究資源バンクの活用 第14回日本内分泌病理学会学術集会 公開サテライトシンポジウム 京都 2010年

江良 択実 人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の委託作製とバンク化 今後の難病対策のあり方に関するシンポジウム 東京 2010年

江良 択実 多能性幹細胞から組織幹細胞への分化 第12回 Circulation Forum in Hiroshima. 広島 2010年

江良 択実 難治性疾患の診断と治療開発のための iPS 技術 シンポジウム iPS 細胞を使った病気の研究 神戸 2010年

H. 知的財産権の出願・登録状況(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

牟婁病患者由来 iPS 細胞樹立と運動ニューロンへの分化誘導

広川佳史¹⁾

¹⁾ 三重大学医学研究科腫瘍病理学講座

研究要旨

牟婁病患者由来 iPS の作製、樹立を熊本大学発生医学研究所、江良拓実先生との共同研究により行う。iPS 細胞が樹立された後、神経系の細胞に分化・誘導し、患者と同じ遺伝情報を持った神経系細胞を得る。それらの細胞を用いて、病態の機序解明のため in vitro での実験を行う。

A.研究目的

牟婁病患者由来の iPS 細胞を分化誘導することで、運動神経やグリア細胞、ドパミン産生細胞を得ることができる。これらの分化誘導された細胞を用いれば、疾患モデルとして環境因子への脆弱性の検討や薬物の効果判定などが可能となる。本研究は病態解明の為に有効な材料を得ることが目的である。

B.研究方法

患者皮膚より線維芽細胞を採取、培養し、Yamanaka factor である 4 因子、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc をセンダイウイルスを用いて遺伝子導入して作製する。実際の作製作業は熊本大学発生医学研究所にて行う。

iPS 細胞から sonic hedgehog signal pathway の agonist と retinoic acid を用いて embryoid body を作成し、これが運動神経細胞の特徴を有することを確認する。得られた運動神経細胞を用いて、現在まで提唱されている ALS 発症機序が再現できるか検討する。

1) 疫学的環境因子の影響

グアムの類縁疾患の発症機序に、マグネシウムやカルシウム摂取の不足による異常タンパクの蓄積が指摘されている。患者由来と正常人由来の iPS より誘導された運動神経細胞を低マグネシウム、低カルシウムの条件で長期培養し、タウ蛋白、 α

-synuclein、TDP-43 蛋白の産生に差があるか検討する。

2) 小胞体ストレスのメカニズム

小胞体ストレスは、異常たんぱく質蓄積などにより、小胞体の機能に付加が生じ、神経変性疾患を引き起こすモデルと考えられている。

a) 小胞体ストレスを誘導する

N-glycosylation の阻害剤である、tunicamycin は古典的な小胞体ストレス誘導薬である。患者由来と正常人由来の iPS より誘導された運動神経細胞に、tunicamycin 処理を加えて小胞体ストレス関連因子である、Grp78 や XBP1 などの遺伝子発現に差があるか検討する。

小胞体のカルシウム恒常性の障害が、神経変性の病態として提唱されている。グルタミン酸受容体の過度の興奮が小胞体からのカルシウム放出を過剰にし、神経毒性を引き起こす。細胞をグルタミン酸で処理し、小胞体ストレス関連因子の発現差の有無を検討する。

3) 酸化ストレスのメカニズム

家族性 ALS には酸化ストレスの原因であるスーパーオキシドを消去する酵素、SOD1 遺伝子変異のあるものが報告されている。スーパーオキシドによる神経細胞死が ALS 発症の機序として提唱されている。患者由来と正常人由来の運動神経細胞を過酸化水素で処理し、アポトーシスなどの細胞死に差がある

か検討する。また低濃度の過酸化水素で細胞を長期間培養し、タウ蛋白、 α -synuclein、TDP-43蛋白の産生に差があるか検討する。

4) さらに、運動神経、グリア細胞、ドパミン産生細胞のマーカを用いて、embryoid bodyから、それぞれの分化細胞を得る。

最近では、ALS 発症機序に神経細胞単独ではなく、グリア細胞を含めた微小環境の関与が提唱されている。この仮説の検証のため、グリア細胞と運動神経細胞を共培養し、上記であげた項目について検討を行う。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者からの試料の提供受けるにあたって十分な informed consent を得る。研究計画は、事前に三重大学医学研究科の倫理委員会の承認を得ている。得られた個人情報については、法令等を遵守のうえ厳重に管理し、漏洩等のないように十分注意して研究を遂行する。

C.研究結果

3 例の患者線維芽細胞から 1 例で iPS 細胞作製が完成しつつある。他の患者由来の細胞も順次 iPS 細胞樹立を試みる。iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導は、理化学研究所より譲渡された正常ヒト iPS 細胞を用いて、*Nat Protoc.* 2009 ; 4(9):

1295-1304.にあるプロトコールに沿って行っており、形態的および分化マーカーの発現から運動ニューロンへの分化が確認された。



図 正常ヒト iPS 細胞より誘導された運動ニューロン。

D.考察

iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の過程では、運動ニューロン以外の細胞も誘導される。運動ニューロンのみを分離する方法を検討する必要がある。それが困難な場合は、運動ニューロンのマーカーを用いて実験結果を評価する必要がある。

E.結論

iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導は達成されているので、患者由来の iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導を適宜行う。

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

本年度はなし。

2.学会発表

本年度はなし。

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得 本年度はなし。

2.実用新案登録 本年度はなし。

3.その他 特になし。

全ゲノム配列解析の紀伊 ALS/PDC への応用と展望

報告者氏名 辻 省次¹⁾
報告者氏名 石浦浩之¹⁾
報告者氏名 三井 純¹⁾
報告者氏名 Budrul Ahsan¹⁾
報告者氏名 高橋祐二¹⁾
報告者氏名 後藤 順¹⁾

¹⁾ 東京大学神経内科

研究要旨（10 ポイント程度）

紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン認知症複合（紀伊 ALS/PDC）の多くには家族歴が存在し、遺伝的な原因の存在が考えられてきた。これまで、紀伊 ALS/PDC の多発大家系を中心に連鎖解析を行ってきたが候補領域の絞り込みは必ずしも十分でなく、全ゲノム配列の再解析に基づく解析をあわせて実施することによりその病因遺伝子の同定が可能になると考えられる。全ゲノム配列再解析を行うための準備として、次世代シーケンサーを用いて日本人ゲノムの全ゲノム配列再解析を行い、全ゲノム配列解析を行い、研究方法、解析アルゴリズムなどの整備を進めた。

A. 研究目的

紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン認知症複合（紀伊 ALS/PDC）の多くには家族歴が存在し、遺伝的な原因の存在が考えられてきた。これまで、紀伊 ALS/PDC の多発大家系を中心に連鎖解析を行ってきたが候補領域領域の絞り込みは必ずしも十分でなく、全ゲノム配列の再解析をあわせて実施することによりその病因遺伝子の同定が可能になると考えられる。紀伊 ALS/PDC の病因遺伝子の解明に全ゲノム配列再解析を適用するための準備として、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列解析を行い、研究方法、解析アルゴリズムなどの整備を進めた。

B. 研究方法

日本人1名について Illumina GAIIX で全ゲノム配列解析を行った。得られた短鎖長シーケンスについては BWA を用いて参照配列 hg18 に alignment を行い、SAMtools を用いて variant

をコールした。

（倫理面への配慮）

東京大学において倫理申請を行い承認された研究である。

C. 研究結果

合計約 189Gb の短鎖長配列が得られた。約 90% が参照配列へマップされ、平均カバレッジは 58X で、20X 以上の冗長度を持った塩基は 98.4% に達した。一塩基置換はゲノム全体で約 350 万個認め、そのうちエクソン内にあるものは約 1 万 9 千個であった。そのうち dbSNP に存在しない新規の一塩基置換として 867 個が見出された。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列再解析のパイプラインの整備を進めた。紀伊 ALS/PDC について、今後全ゲノム再解析を進め

ていく。そこで数多くの変異が見出されると予測されるが、これまでの連鎖解析（パラメトリック解析および model-free（ノンパラメトリック解析）の結果を含め総合的に解析する事により、発症に関与するゲノム要因の同定が可能であると考ええる。

E. 結論

全ゲノム再解析、連鎖解析を総合的に進めることにより紀伊 ALS/PDC の発症に関与する遺伝的背景の解明を進める。

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

Mitsui J, Fukuda Y, Azuma K, Tozaki H, Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S. Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA with barcode indexing using next-generation sequencer. *J Hum Genet* 2010;55:448-55.

Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. *Neurogenetics* Epub ahead of print.

2. 学会発表

Ishiura H, Tsuji S. Massively parallel sequence analysis for revealing causes of neuromuscular disorders. 第 51 回日本神経学会総会（シンポジウム）、2010 年 5 月、東京。

Ishiura H, Ahsan B, Mitsui J, Takahashi Y,

Fukuda Y, Ichikawa Y, Nakahara Y, Hara K, Kakita A, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Goto J, Tsuji S. Siblings of pathologically proven multiple system atrophy: an application of whole genome analysis toward finding strong genetic factors for sporadic diseases. The 60th Annual meeting of American Society of Human Genetics. November 2010. Washington, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況（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

牟婁病の地域集積性に対するミトコンドリア DNA ハプロタイプを用いた研究

後藤雄一

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

研究要旨

原因が明らかになっていない牟婁病の病因として、ミトコンドリア異常が関わっている可能性を考えて検討する。本疾患は地域集積性があることから、今回は牟婁病発生地域の一般住民 23 人のミトコンドリア DNA を用いたハプログループを調べた。各ハプログループの頻度は、報告されている東アジア人の頻度分布と大きな相違はなかった。今後は一般集団の解析数を増加させるとともに、患者試料での同様な解析が有用と考えられる。

A.研究目的

牟婁病の主要な症状はパーキンソン-痴呆症候群（PDC）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）である。パーキンソン病、認知症、ALS のそれぞれの病態において、ミトコンドリア機能異常の関わっていることが最近明らかになってきている。

原因が明らかになっていない牟婁病の病因として、ミトコンドリア異常が関わっている可能性を考えて、ミトコンドリア DNA 解析を行う。

一方で、牟婁病及び類縁疾患は、日本の紀伊半島、グアム島、パプアニューギニアに発生が限定しており、この地域集積性に関してミトコンドリア DNA のハプロタイプを用いた検討が可能である。

B.研究方法

牟婁病の発生地域の一般人 23 人の血液に由来するミトコンドリア DNA のハプログループを調べ、報告されている地域・人種における特徴と比較する。ミトコンドリア DNA の塩基配列決定は、全体を 2 つの PCR プライマーセットで増幅し核 DNA 上の類似配列を増幅しないようにした上で、90 余りのプライマーを用いたシークエンス反応を行い、ABI3930 を用いて行った。得られた配列結果を、A-Z までのハプログループに分類した（MITOMAP：www.mitomap.org 参照）。

（倫理面への配慮）

三重大学、独立行政法人国立精神・神経医療研究センターの各倫理委員会でミトコンドリア DNA 解析を含む本研究計画の承認を受けた。

C.研究結果

23 人のハプログループの構成は以下の表のとおりである。

種類	A	B	C	D	F	G	H	J	M	N	R	Y	Z
既報告	7	16	5	26	11	4	1	1	15	3	2	1	2
本実験	13	9	0	26	17	0	0	0	9	9	0	0	4

(%)

MITOMAP に掲載されている East Asia におけるハプログループの頻度（表中の既報告）では、D、B、M、A の頻度が高いことが報告されている。今回の 23 人においてもこの分布とほとんど相違のない結果であった。

また、病的とされている変異、新たな SNP は見いだされなかった。

D.考察

本研究では、23 例という少数の解析に止まっているために、牟婁病発生地区の住人と胃パン的な東アジア人との間の人類学的な差異を明確にすることはできていない。さらに母数を増やして見る必要があるが、今回の結果からは大きな差異が見いだされる可能性は低いのではないかと予想できる。

一方で、牟婁病患者群のミトコンドリア DNA ハプログループをみておらず、次にこの患者群の解析が重要である。また、試料が手に入るならば、グアム島、パプアニューギニアの患者群の解析も興味深い。

同時にこれら患者試料のミトコンドリア DNA 解析によって、新たな変異やミトコンドリア DNA 量の減少などの所見が得られれば、病因解明の一助になる可能性がある。

E.結論

牟婁病発生地域の一般住民のミトコンドリア DNA ハプログループを調べたところ、東アジア人一般の頻度分布と大きな相違はなかった。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

なし

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

紀伊 ALS/PDC における OPTN 蛋白の神経病理学的及び遺伝学的検討

森本 悟¹⁾

小久保 康昌²⁾、石浦 浩之³⁾、辻 省次³⁾、葛原 茂樹⁴⁾、村山 繁雄¹⁾

- 1) 東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク
- 2) 三重大学医学部 神経内科
- 3) 東京大学医学部 神経内科
- 4) 鈴鹿医療科学大学

研究要旨

紀伊半島南部は、グアム島とともに筋萎縮性側索硬化症(ALS)とパーキンソン認知症複合(PDC)の世界的な多発地域であり、紀伊半島における二つの高集積地では、有病率が世界平均の 50~100 倍にもなる。この数十年間に臨床病型の変化があり、ALS が減少し、PDC や認知症が増加している。この疾患では、前頭葉及び側頭葉を主体とした、大脳皮質、基底核、脳幹諸核に多数の神経原線維変化(NFTs)と神経細胞脱落を認める。また、 α -synuclein 及び TDP-43 陽性構造物についても広範に出現しており、tauopathy を主体とした multiple proteinopathy と考えられる。老人斑は原則として出現しない。本疾患は、高い家族集積率を有するが、現在までのところ、他の運動ニューロン疾患、パーキンソニズム、認知症などで報告されている原因遺伝子に変異は認めていない。2010 年 4 月に Maruyama らのグループにより、ALS の家系から Optineurin (OPTN) 遺伝子の変異が発見され、免疫組織化学的に脊髄前角細胞(AHC)への Optineurin 蛋白の異常蓄積が報告されている。同報告では、当該家系の FALS, SALS, SOD1 FALS (Lewy-body-like hyaline inclusions)でも陽性構造物が認められており、Ubiquitin や TDP-43 positive inclusions にも陽性所見が認められる。したがって今回、紀伊 ALS/PDC 症例においても、疾患関連性を検討するために OPTN の免疫組織化学的及び遺伝学的検索を行った。紀伊 ALS/PDC 症例 10 例（紀伊 ALS 5 例、紀伊 PDC 5 例：年齢 60~77 歳 平均 69.1 歳）におけるホルマリン固定、パラフィン包埋後脊髄を対象とした。抗体は、OPTN-C (Rabbit polyclonal, 1: 100 or 1:50) or OPTN-I (rabbit polyclonal, Cayman Chemical, 1:100 or 1:50)を用いた。また、遺伝子検索については本疾患の大家系に属する 1 症例を抽出し、PCR 法を用いて全 exon 塩基配列解析を行った。前角細胞の大型ニューロンに陽性構造物を認めたのは半数程度（C 末抗体がほとんど）であり、多くは skein like inclusions の形であった。また小~中型ニューロンの胞体には、大型ニューロンより高頻度で陽性構造物を認め、一部には突起にも陽性所見を認めた（int 抗体が主）。また、全 exon 配列における病的な遺伝子変異は認められなかった。したがって、全 exon 配列における病的な遺伝子変異は認められず、細胞脱落の程度を考慮しても、大型ニューロンへの集積が少ないことから、本疾患における OPTN の意義については、causative というよりも、二次的に集積している可能性がある。

A.研究目的

2010 年 Maruyama らのグループにより、ALS の家系から Optineurin (OPTN) 遺伝子の変異が発見され、免疫組織化学的に脊髄前角細胞(AHC)への Optineurin 蛋白の異常蓄積が報告されている。

同報告では、当該家系の FALS, SALS, SOD1 FALS (Lewy-body-like hyaline inclusions)でも陽性構造物が認められており、Ubiquitin や TDP-43 positive inclusions にも陽性所見が認められる。したがって

今回、紀伊 ALS/PDC 症例においても、疾患関連性を検討するために OPTN の免疫組織化学的及び遺伝学的検索を行った。

B.研究方法

紀伊 ALS/PDC 症例 10 例（紀伊 ALS 5 例，紀伊 PDC 5 例：96’ ～09’ の検体；年齢 60～77 歳 平均 69.1 歳）におけるホルマリン固定，パラフィン包埋後脊髄を対象とした。抗体は，OPTN-C (Rabbit polyclonal,1: 100 or 1:50) or OPTN-I (rabbit polyclonal, Cayman Chemical, 1:100 or 1:50)を用いた。また，遺伝子検索については本疾患の大家系に属する 1 症例を抽出し，PCR 法を用いて全 exon 塩基配列解析を行った。

C.研究結果

染色結果を以下に示す (Table1,Figure1)。前角細胞の大型ニューロンに陽性構造物を認めたのは半数程度 (C 末抗体がほとんど) であり，多くは skein like inclusions の形であった。また小～中型ニューロンの胞体には，大型ニューロンより高頻度で陽性構造物を認め，一部には突起にも陽性所見を認めた (int 抗体が主)。また，全 exon 配列における病的な遺伝子変異は認められなかった。

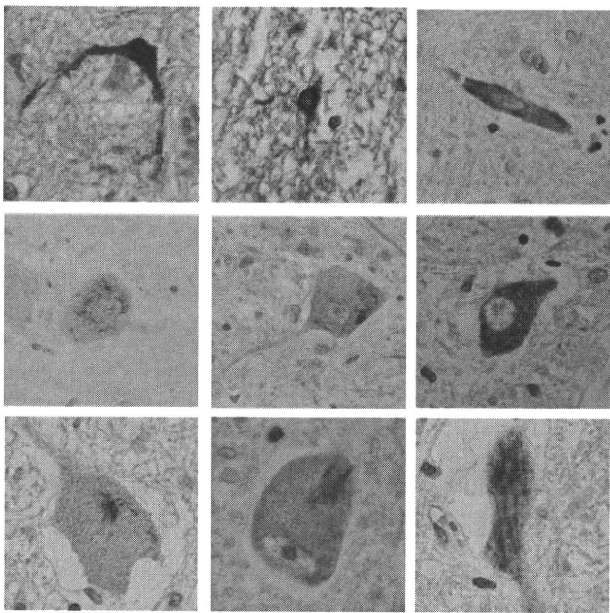
Table1. Optineurin(C-term and int) positive neurons in the spinal anterior horn cells.

		Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5
		ALS	ALS	ALS	ALS	ALS-D
		F	F	F	F	M
C-term	Large	63	66	70	70	77
	Int	-	+	-	+	-
		AHC's	AHC's	AHC's	AHC's	AHC's
		-	+	-	-	-
		Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10
		PDC	PDC	PDC	PDC	PDC
		F	M	F	F	F
C-term	Large	70	75	70	60	70
	Int	+	-	-	±	+
		AHC's	AHC's	AHC's	AHC's	AHC's
		-	-	-	-	+

*AHC's: Anterior Horn Cells

Figure.1 Optineurin positive intracytoplasmic inclusion in AHCs and neuroglia.

The variation OPTN positive structures in neuropathology of the spinal cord stained with the anti-OPTN antibody.



D.考察

PCR 法を用いた全 exon 配列における病的な遺伝子変異は認められず，神経病理学的には細胞脱落の程度を考慮しても，脊髄前角細胞における大型ニューロンへの集積が非常に少ないことから，本疾患の発症及び神経細胞障害のメカニズムにおける OPTN の関与は，あくまで二次的なものである可能性が示唆された。

E.結論

本研究では，家族性の ALS において本邦で新たに発見された OPTN 遺伝子変異及び病理学的特徴について，紀伊 ALS/PDC 症例 10 例（紀伊 ALS 5 例，紀伊 PDC 5 例：96’ ～09’ の検体）を用いて免疫組織化学並びに遺伝学的検討を行った。その結果，全 exon 配列における病的な遺伝子変異は認められず，細胞脱落の程度を考慮しても，大型ニューロンへの集積が非常に少ないことから，本疾患における OPTN の意義については，causative というよりも，二次的に集積している可能性がある。

F.健康危険情報

特記すべき事項なし。

G.研究発表

特記すべき事項なし。

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

特記すべき事項なし。

紀伊 ALS/PDC 患者脳に蓄積するタウの解析

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：村山繁雄²⁾、小久保康昌³⁾、葛原茂樹⁴⁾

¹⁾ 東京都医学研究機構 東京都精神医学総合研究所

²⁾ 東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク

³⁾ 三重大学 医学部 神経内科

⁴⁾ 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部

研究要旨

牟婁病患者脳に蓄積するタウについて、免疫組織化学、生化学解析を行った。その結果、9 例のうち、4 例が 4 リピート(4R)タウと 3 リート(3R)タウがほぼ同量、3 例は 4R タウが 3R タウよりも多く検出され、残り一例は蓄積量が少なく判定が困難であった。4R タウが多く検出された症例は AT8、pS396 抗体を用いた免疫組織染色により顆粒状のタウ病変が観察され、アルツハイマー病とは異なるタウの病理を示した。紀伊 ALS/PDC 患者のタウの病理は症例によって異なると考えられる。

A.研究目的

紀伊 ALS/PDC 患者脳に蓄積するタウのアイソフォームについては、アルツハイマー病患者脳に蓄積するタウと同様、ヒト成人脳に発現する 6 種類すべてのアイソフォームが蓄積することが報告されているが、解析された症例数は少なく、十分な検討がなされていない。そこでこれまでに剖検になった症例で、凍結組織が保存され、生化学解析が可能な症例について、不溶性タウの生化学解析と免疫組織化学解析を行い、紀伊 ALS/PDC 患者脳に蓄積するタウを再検討することを目的とする。

B.研究方法

牟婁病患者剖検脳（9 症例の前頭葉、あるいは側頭葉の凍結組織）を 0.8M NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液、1 % Sarkosyl を含む緩衝液で順次可溶化し、1 % Sarkosyl に不溶性を示す画分を調製した。一部は灰白質と白質に分けて不溶性画分を調製した。8 M 尿素にて不溶性タウを可溶化後、透析により尿素を除

き、遠心により不要物を除去した後、その一部にアルカリホスファターゼを添加し、67℃で 2 時間、脱リン酸化処理を行った。脱リン酸化前後の試料を電気泳動により分離後、PVDF 膜に転写し、抗タウ抗体 (HT7, BR133)、抗リン酸化タウ抗体(pS396)にてイムノブロット解析を行った。また生化学解析に用いた組織の近傍をホルマリン固定後、ビブラトームにて厚さ 50 μ の切片を作製し、抗リン酸化タウ抗体 AT8, pS396 で免疫組織染色を行い、タウの病変の有無、形態の違いなどを観察した。

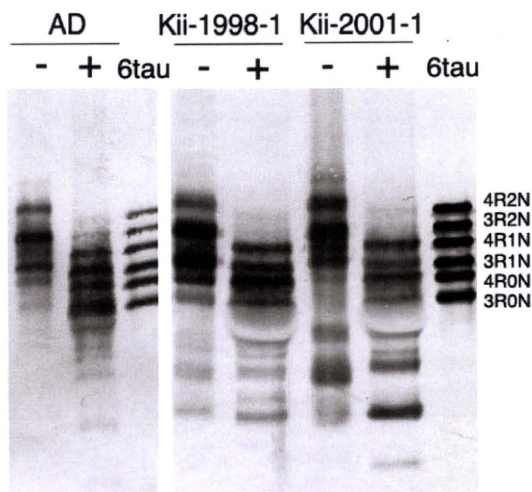
（倫理面への配慮）

剖検脳の生化学解析については当研究所の倫理委員会に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

1998 年から 2010 年までに剖検となった症例のうち、凍結組織が保存されている 9 症例について、不溶性タウを調製し、そのイムノブロット解析を行った。初期の 2 症例(1998-1, 2001-1)は、脱リ

ン酸化前にはADの異常リン酸化タウに特徴的な60, 64, 68kDaのトリプレットバンドを示したが、脱リン酸化後は、ADと異なり、3Rタウより4Rタウのバンドがより強く検出された(図1)。



Anit-Tau-N (BR133)

図1

次に別の3症例について、皮質と白質を分離して不溶性タウを調製し、蓄積タウのアイソフォームを解析した。その結果、皮質と白質で蓄積タウのアイソフォームに違いは見られなかったが、症例によって異なるタウの蓄積が観察された。すなわち、2004-3(臨床診断 ALS)と2000-1(臨床診断 PDC)はADと似た蓄積パターンを示したのに対し、2004-1(臨床診断 PDC)は4Rタウアイソフォームが主に蓄積していた(図2)。

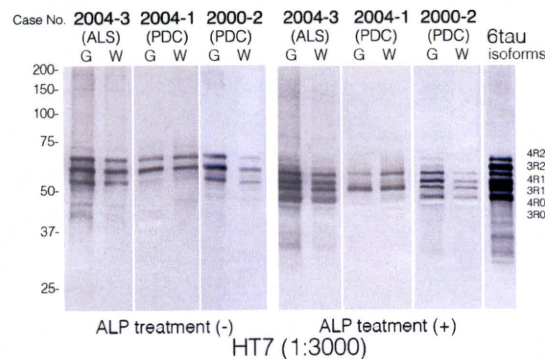
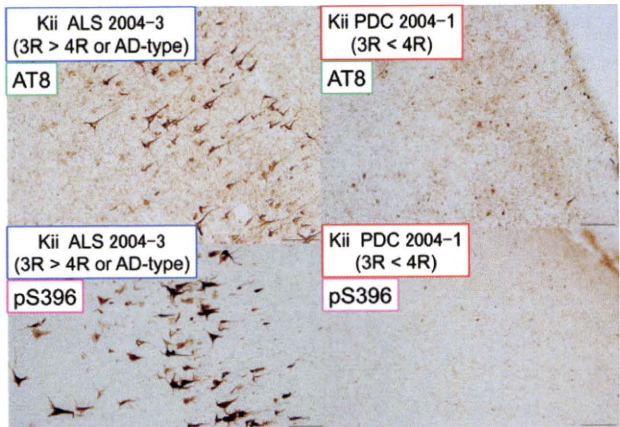


図2

近傍の凍結組織をホルマリン固定し、ビブラトーム切片を作製して、抗タウ抗体による免疫組織染色を行ったところ、両者の病理の違いが明確に検出された。すなわち、ADに似たタウの蓄積パターンを示した2004-3では大型の錐体細胞のNFTや細かな変性突起がAT8で、多数のNFTが

pS396抗体で染色されたのに対し、4Rタウの蓄積が認められた2004-1ではAT8で顆粒状の細かな突起を主体とする病変が認められ、pS396抗体では少量の顆粒状突起の染色が見られた(図3)。



(図3)

さらに残り4症例について同様のタウの生化学解析を行った。蓄積量が少なく、その特定に至らない症例もあったが、2007-1, 2009-1はADに似たバンドパターン、2005-3は4Rタウが多い傾向が観察された。2009-4は不明であった。(図4)

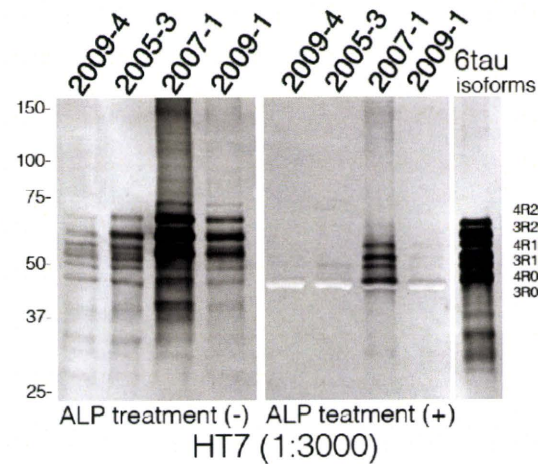


図4

以上の解析を表にまとめた。

症例番号	年齢	性別	臨床診断	タウの生化学	タウの蓄積量
1 1998-1	77歳	男性	ALS with D	3R<4R	Level 1~4
2 2001-1	60歳	女性	PDC with A	3R<4R	Level 2~4
3 2004-3	63歳	女性	ALS	3R>=4R	Level 4
4 2004-1	70歳	女性	PDC with ALS	3R<4R	Level 3~4
5 2000-2	76歳	女性	PDC	3R>=4R	Level 3
6 2009-4	70歳	女性	ALS	?	Level 1
7 2005-3	70歳	女性	ALS	3R<4R ?	Level 2
8 2007-1	70歳	女性	PDC	3R>=4R	Level 4
9 2009-1	75歳	男性	PDC	3R>=4R	Level 3

タウの蓄積量に関しては部位によって異なるため今回の解析だけで十分ではないが参考のために付け加えた。今回解析した 9 症例のうち AD のタウに似た蓄積を示した症例が 4 例、4R タウアイソフォームの蓄積が認められた 2004-1 を含め、4R タウが 3R タウよりも多く蓄積している症例が 4 例、1 例が不明という結果となった。臨床診断と蓄積タウのアイソフォームに関連はないように思われた。

D. 考察

神経疾患に蓄積する異常タンパク質は、疾患ごとに特徴的な構造をとる場合が多いが、紀伊 ALS/PDC の場合、AD type の病理と 4R タウオパチーの病理の両方が別々、あるいは混在して認められ、症例ごと、あるいは部位によっても異なると考えられる。そのメカニズムは不明であるが、二つの疾患が混在している可能性も考えられるが、シード依存性タンパク質凝集の仮説に立てば、AD type のシードに加え、4R タウのシードの両方がしやすい環境がある可能性が考えられる。通常、凝集核シードができるまでは長時間かかるため、一種類のシードが形成されてそこから同じ病変が広がると考えられるが、紀伊 ALS/PDC の場合、複数のシードが出来やすい遺伝的背景、あるいは環境背景があるのかもしれない。

E. 結論

紀伊 ALS/PDC 患者(9 症例)について、蓄積タウの生化学解析を行った。3R タウと 4R タウがほぼ同程度蓄積する症例と、4R タウの割合が多く蓄積する症例の両方が認められ、症例によって蓄積タウの分子種が異なることが明らかとなった。蓄積タウの分子種の違いは AT8, 抗 pS396 抗体などを用いた免疫組織染色でも検出が可能である。

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

- 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). 秋山治彦、新井哲明、長谷川成人. (2010) 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

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: 1572-1578

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 (2010) 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 (2010) 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 (2010) 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 (2010) 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 (2010) 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 (2010) 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 (2010) 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 (2010) 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]

9). 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]

10). 團彩帆, 野中隆, 村山繁雄, 初田裕幸, 新井孝夫, 長谷川成人, 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. Dementia Japan 24: 380

11). 鈴掛雅美, 野中隆, 久永真市, 長谷川成人, 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. Dementia Japan 24: 381

12). 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]

13). 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]

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

紀伊 ALS/PDC におけるタウ凝集体の解析

報告者氏名 高島 明彦¹⁾

¹⁾ 所属（理化学研究所 脳科学総合研究センター、アルツハイマー病研究チーム

研究要旨

タウ凝集体である神経原線維変化形成の過程ではリン酸化タウ、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体、タウ線維が形成され、リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することが明らかになっている。牟婁病における認知機能障害についてはアルツハイマー病同様、タウが関与すると考え、牟婁病におけるタウ凝集状態を明らかにすることを目的に生化学的に異なる大きさのタウ凝集体、また他の病理学的特徴である TDP43, シヌクレインについても同時に解析を行い、タウ凝集が認知症に関与すること、及びタウリン酸化以外の要因が凝集に関与する可能性が示された。

A.研究目的

紀伊 ALS/PDC ではタウ、TDP-43、シヌクレインの凝集体が形成される。タウ凝集体である神経原線維変化形成の過程ではリン酸化タウ、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体、タウ線維が形成され、リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することを見いだしている。紀伊 ALS/PDC における病態発症の原因としてタウ、TDP-43、シヌクレイン凝集による可能性が考えられる。ここでは紀伊 ALS/PDC もアルツハイマー病と同様タウオパチーとして捉えられるかどうかを、アルツハイマー病脳由来のタウ凝集物と比較することで明らかにすることを目的としている。更に、TDP-43、シヌクレインの凝集とタウ凝集との関係も同時に検討する。

B.研究方法

脳サンプルを 10 mM Tris (pH 7.4), 800 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% sucrose を含む TBS 中でホモゲナイズし 27,000 × g 遠心後、その上清を 50, 40, 30, and 20% の蔗糖密度勾配遠心法で分離する。その各フラクションを SDS-PAGE で分離後タウ、TDP43、シヌクレインの抗体を用いてそれぞれのフラクションにあるタウ、TDP43、

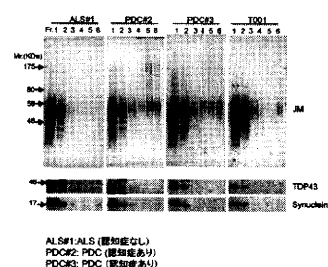
シヌクレインの分布を調べる。顆粒状タウはフラクション3に回収されることは AFM 観察で確認されている。脳サンプルは小久保先生から前頭葉サンプルを提供して頂き、解析を行った。

(倫理面への配慮)

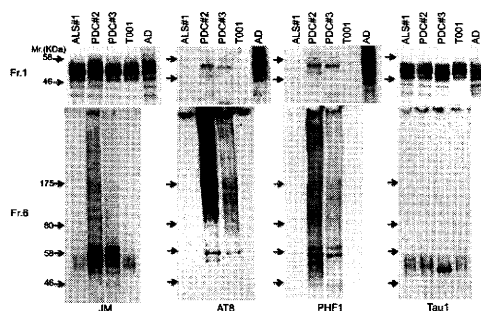
理化学研究所倫理規定だい16条に基づき実施

C.研究結果

今回正常ヒト脳、牟婁病 ALS 発症（認知症なし）1例、PDC2例（高度の認知症）について検討を行った。ALS#1 ではタウ、TDP43, Synuclein はフラクション1、2に回収されており、凝集体は出来ていないと考えられた。PDC#2、3は顆粒状凝集体（フラクション3）、線維（フラクション5、6）のフラクションにタウのシグナルが観察された。牟婁病の認知症発症にはタウが関与すると考えられた（図1）。



更に、リン酸化タウ抗体を用いて可溶性画分（フラクション1）、不溶性画分（フラクション6）を比較検討した。PDC#2, PDC#3 から分離した線維画分にあるタウはAT8, PHF1 というリン酸化タウ抗体に反応し凝集物特有のスミアを呈した。リン酸化タウが凝集に関与することが考えられた。可溶性画分でも、ALS#1 に比較してAT8, PHF1 サイトのリン酸化亢進が観察された。AD 脳由来の可溶性画分サンプルと比較すると、トータルタウ量には変化がないが、PDC#2, PDC#3 サンプルに於ける、リン酸化程度は遥かに低かった。このことは、PDC に於けるタウ凝集はリン酸化以外の要因が関与することを示唆している。



D.考察

ALS#1, 対照脳と比べて PDC#1, PDC#2 では顆粒状タウ凝集体、線維状凝集体、共に増大しており、神経脱落、神経原線維変化が起きていることが示唆された。これらのサンプルでシヌクレイン、TDP43 は凝集体形成は見出されていない。さらに、この患者では高度の認知症が認められておりタウ凝集が紀伊 ALS/PDC における認知症の原因であると考えられた。可溶性画分のタウリン酸化のAD 脳との比較からタウのリン酸化程度は低いことが示された。FTDP-17 の場合リン酸化程度はAD に比べて低いにも関わらず変異によるタウの凝集性の増大が神経原線維変化を形成している。このことを考え合わせると、紀伊 ALS/PDC においても、凝集を促進する要因が関与することで、AD のような過剰なリン酸化を介することな

くタウ凝集体を形成することが考えられた。

E.結論

タウ凝集が紀伊 ALS/PDC における認知症の原因である。

タウ凝集にはリン酸化以外の要因が関与する可能性が示唆された。

F.健康危険情報

G.研究発表

論文発表

1. Kimura T, Fukuda T, Sahara N, Yamashita S, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Lee B, Sotiropoulos I, Maeda S, **Takashima A**, Aggregation of detergent-insoluble tau is involved in neuronal loss but not in synaptic loss. J. Biol Chem. 2010 Oct 4. [Epub ahead of print]
2. Peethumnongsin E, Yang L, Kallhoff-Muñoz V, Hu L, **Takashima A**, Pautler RG, Zheng H. Convergence of presenilin- and tau-mediated pathways on axonal trafficking and neuronal function. J Neurosci. 30(40):13409-18. 2010
3. Miyasaka T, Sato S, Tatebayashi Y, **Takashima A**, Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation. FEBS Lett.584(14):3227-32. 2010
4. Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, **Takashima A**, et al. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. Circ Res.106(11):1692-702. 2010

2.学会発表

1. Invited speaker of plenary lecture,
International Conference on Alzheimer's
Disease (ICAD2010) (Hawaii,
2010/07/10-15)
2. Invited speaker of MRC center for synaptic
plasticity and association for neuron and
disease symposium (Bristol,
2010/06/29-07/01)
3. Invited speaker of Aging, Tau & Dementia
workshop (French Embassy in Tokyo,
2010/10/19-20)
4. Invited speaker of minisymposium in Society
for Neuroscience (SanDiego,
2010/11/14-11/17)

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

牟婁病の神経病理学的研究

村山繁雄 1)

森本 悟 1)、齊藤祐子 2)

- 1) 東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク、
2) 国立精神・神経医療研究センター臨床検査部

研究要旨

牟婁病例のタウ蛋白の免疫化学検索結果は多彩であり、汎太平洋神経疾患として同一と仮定されている、グアム島筋萎縮性側索硬化症・パーキン病認知症複合体（ALS/PDC）と異なることが明かとなった。牟婁病の神経病理学的検索例は少数で、先行八瀬研究においても ALS 剖検例は僅少で、PDC 剖検例で再検索可能例はない。高齢者ブレインバンク登録例との対比で、免疫組織化学・超微形態・生化学的解析を、検索可能な全症例に施すことが、牟婁病のタウオパチーの本態解明の前提である。

A.研究目的

牟婁病におけるタウオパチーの関与を、筋萎縮性側索硬化症（ALS）群、パーキンソン病・認知症複合（PDC）群に分け、検討し、文献的に ALS/PDC-Guam 群と比較することで、検討した。

B.研究方法

牟婁病で、凍結脳の抗タウ抗体による免疫ブロットによる検討がなされた 9 例について、現存の標本と、一部高齢者ブレインバンク（BBAR）で染色した抗タウ抗体免疫染色標本を検討した。Gallyas-Braak 鍍銀染色標本を基本とし、適宜 AT8 免疫染色を参照した。

（倫理面への配慮）

剖検承諾書の範囲内の、診断行為である。

C.研究結果

結果を表 1 にまとめる。PDC 群で、4R 優位例 2 例のうち、症例 2 は進行性核上性麻痺（PSP）に類似した神経原線維変化（NFT）分布を示したが、病変が軽く、かつ下オリブ核に最も強い点

で、PSP とは異なっていた。症例 3 は、3+4 リピート（R）病変を示す PDC 例に比べ、アルトログリア内原線維変化（AT）の量が明らかに多い傾向を示した。3+4R を示す PDC は症例 7、8 とも、ghost tangle（GT）の量が極めて多い特徴を示した。

			CD	WB	Neuropath
1	77	M	ALS-D	3R<4R	GT, AT, Sub
2	76	F	PDC	3R<4R	PSP-like
3	60	F	PDC	3R<4R	GT, AT, Pj+
4	70	F	PDC /ALS	4R dom	CBD like, Pj+
5	63	F	ALS	3R+4R	GT, (AT)
6	70	F	ALS	3R<4R	GT, AT
7	70	F	PDC	3R+4R	GT, (AT)
8	75	M	PDC	3R+4R	GT, (AT) LB
9	70	F	ALS	-	PT

Table 1: Summary of Neuropathological Findings
CD: clinical diagnosis; WB: western blot, Neuropath: neuropathology; M: male; F: female;