

201110009A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発に
関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋山 治彦

平成24年（2012年） 3月

目 次

I. 総括研究報告

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

II. 分担研究報告

1. 改変型TDP-43を発現するトランスジェニックマウスの作出と解析	5
長谷川成人	

2. 前頭側頭葉変性症モデルマウス作出に向けた研究	9
秋山治彦	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	15
-----------------	----

認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発

主任研究者：秋山治彦 東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト

研究要旨

タウ陰性前頭側頭葉変性症(FTLD)の多くは TDP-43 異常蓄積にもとづき発病するが(FTLD-TDP), TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症(ALS)にも蓄積する. 家族性 ALS の原因となる TDP-43 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスを作出して解析を行うとともに, マウスモデル改良の基盤となるヒト FTLD 例剖検脳の病理学的解析を進め, 治療薬開発に用いることができる TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウスの開発を進める.

分担研究者

長谷川成人 東京都医学総合研究所 病態細胞生物学研究室

A.研究目的

TDP-43 は細胞の核に局在する不均一核リボ蛋白質 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNP) の一種で, タウ陰性前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の脳脊髄に特異的に異常蓄積するほか, アルツハイマー病やレヴィー小体型認知症をはじめ様々な認知症疾患の約3分の1から半数において大脳への蓄積が認められる. 異常蓄積した TDP-43 は正常では認められないリン酸化を生じており, さらにユビキチンや p62 により標識されている. また TDP-43 遺伝子 (*TARDBP*) 変異は家族性 ALS の原因となる. 一方 FTLD には ALS を合併する病型が存在し, 両疾患は病因・病態に関してきわめて近い関係にある. FTLD の一部は家族性に発病し, その主要な遺伝子異常としてプログラニュリン遺伝子 (*GRN*) の変異が知られている. この変異の多くはプログラニュリンの発現低下に結びつく

とされ, プログラニュリンの減少が FTLD 発病に関わっていると考えられている.

以上のような背景から, FTLD を中心に TDP-43 異常蓄積をきたす認知症疾患において, それを抑制する治療薬開発はそれら疾患の根本治療に結びつくことが期待される.

本研究の目的は, この TDP-43 異常蓄積を解消するための創薬の基盤となる実験室モデル, 特にヒトへの投与の前段階となる動物実験までを含めた薬剤スクリーニング系の開発を行うことである. そのために, 中枢神経系に, ヒト疾患において蓄積する TDP-43 と同様の異常 (リン酸化など) を有する TDP-43 の蓄積を生じるモデルマウスを作出する必要がある. まず TDP-43 異常蓄積の培養細胞モデルを作製し, その解析から動物モデル作出のヒントを得る. また FTLD 例の剖検脳の病理学的解析を進め, そこで得られた結果を, 培養細胞モデルや動物モデルの改良に反映させる.

B.研究方法

①*TARDBP* トランスジェニックマウス

前年度作出した, ヒト野生型 *TARDBP*, 家族性 ALS の変異である G298S あるいは M337V 変異を導入した変異型 *TARDBP* のトランスジェニック (Tg) マウスのうち, 野生型と G298S では生後

早期から後肢の不全麻痺が出現し、以後あまり進行しない。また M337V 系統は G298S 系統のような著明な症状は出現しない。しかし、これらの系統はいずれも、加齢後に病理組織学的に検索すると、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS403/404 および p409/410)、抗ユビキチン抗体で陽性に染色される細胞質封入体が、脳幹～脊髄にごく少数認められる。

このような知見にもとづき、培養細胞で凝集体形成に成功した、TDP-43 の部分欠損体(TDP- Δ NLS&187-192)や GFP タグを付加した 2 種類の C 末端断片、GFP-TDP43(218-414)および GFP-TDP-43(162-414)を、Thy1 プロモータのもとで発現するマウスを作出した。また凝集体形成までにはいたらないものの TDP-43 局在が細胞質に変化する、核移行シグナルを除いた変異体(TDP- Δ NLS)を発現するマウスも作出した。

②プログラニューリン(*GRN*)遺伝子欠損マウス 家族性 FTLTDP の原因となる *GRN* 遺伝子変異は正常なプログラニューリンの発現を低下させる。そこで前年度、*GRN*-KO マウスを東京大学西原研究室との共同研究の一環として理化学研究所より提供を受け系統維持を開始した。このマウス自体の中樞神経系の変化は軽度で、間脳や脊髄に p62/ユビキチン陽性構造が出現するものの、ヒトのプログラニューリン変異例のように FTLTDP 病変が認められるわけではない。

この *GRN*-KO を、前年度に得た *TARDBP*-Tg (G298S) および *TARDBP*-Tg (M337V) と交配し、二重遺伝子改変マウスを作出した。

③ヒト剖検脳の解析

前年度に引き続いて FTLTDP-FUS 症例の病理学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

トランスジェニックマウスの作製および動物実験は、東京都医学総合研究所および東京都医学研究所の実験動物倫理委員会に研究計画を

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

C.研究結果

①*TARDBP* トランスジェニックマウス

細胞内で凝集しやすいと思われる TDP-43 の部分欠損体(TDP- Δ NLS&187-192)を導入したマウスは、生まれてきたものの、改変型 TDP-43 の蛋白発現はごく小量であった。GFP-TDP43 (218-414)を導入したマウスは、遺伝子導入が 3 系統で確認できたものの、脳脊髄のイムノブロット解析の結果、その蛋白質の発現を確認できた系統はなかった。もう一つの C 末端断片である GFP-TDP-43(162-414)は、蛋白質の発現は確認できたものの、18 ヶ月齢まで、これといった異常な症状は確認できていない。TDP43- Δ NLS については、5 ヶ月齢で後肢の異常が認められたもののイムノブロットにおいて TDP-43 の異常蓄積は確認できていない。

②プログラニューリン(*GRN*)遺伝子欠損マウス

GRN-KO・G298S マウスの症状は G298S と同様であり重症化は観察されなかった。脳・脊髄生化学的解析では不溶画分(PPT)で僅かに *GRN*-KO・G298Sの方が G298S 単独より異常リン酸化 TDP-43 が多いようにも見受けられたが sample application の誤差の範囲を超えるものではなかった。抗リン酸化 TDP-43 の免疫組織染色では G298S 単独より封入体 (TDP-43 異常蓄積) の頻度がやや高い傾向があり、1 視野に 2 個の封入体が観察された部位もあった。これは

G298Sにおいて脊髄横断面標本であれば数枚の切片につき1個の封入体が観察されるのみであることと比較すれば、GRN-KOにより病変が加速されたと考えられるが、ヒト疾患に比べればはるかに少なく、個体差を考慮に入れた場合、このマウス系統をただちに創薬に利用するのは難しいと判断された。現在、GRN(-/-)マウスとTARDBP(M337V)マウスとの交配を進めている。

③ヒト剖検脳の解析

TDP-43と同様、hnRNPであるFUSの異常蓄積を伴うFTLD-FUS、10例の病理組織学的解析において、1例にTDP-43異常蓄積の合併を認めた。本例はFTLDを発症後、10年以上を経過した後、ALS症状が出現した。TDP-43の蓄積は脳幹～脊髄に限られており、その範囲においてALS-TDPに一般的な病理像を示した。一方、FUS蓄積は主として大脳に認められ、通常の封入体の出現ではなく、変性神経突起へのFUS蓄積が病変の中心であった点が特異であった。

D.考察

ヒト家族性ALSの原因となるTDP-43変異を含むコンストラクト、培養細胞モデルにおける封入体形成の状況にもとづく複数の改変コンストラクトを用いたTARDBP-Tgを作出したが、現時点までに、ヒト疾患の病変に匹敵するほど多数のTDP-43異常蓄積～封入体を形成するマウス系統は得られていない。一方、TARDBP-Tgのなかの一系統であるG298Sと、ヒト家族性FTLD-TDPの原因となるGRN変異～プログレンニュリンの減少を再現していると考えられるGRN(-/-)との二重遺伝子改変マウスにおいて、病理組織学的にはG298Sよりもやや多い封入体を認め、病変の加速が想定されたが、やはりヒト疾患の病変に匹敵するレベルではなく、創薬モデルとして使用するには、さらなる病変加速が必要であると考えられた。

具体的には、本年度用いたのとはさらに異なる改変コンストラクトの導入、G298S以外のTARDBP-TgとGRN-KOとの交配、また、十分な蛋白発現が生じる系統が誕生しなかったコンストラクトについてはテトラサイクリンによるon/offを利用した成体での遺伝子発現の導入などの遺伝子操作を試みる。またそれらに加え、神経変性疾患における異常蛋白質凝集の伝播仮説にもとづき、タウで既に成功しているシード注入モデルについても実施する必要があると考えられる。

さらに、今後の改変にもかかわらず、マウスモデルへのTDP-43異常蓄積が高度にならずに、治療薬候補化合物のスクリーニングを行うにあたり、通常よりも多数の個体を必要とする状況となっても創薬研究を進められるように、培養細胞モデルにさらなる改良を加えてヒト病態の再現性を良くし、この段階での候補化合物絞り込みを高度に行って、ごく少数の化合物のみをマウスモデルで検証するスクリーニングモデルの開発も検討するべきであろう。

E.結論

TDP-43異常蓄積マウスモデルの改良の継続と、培養細胞モデルを組み合わせたトータルの治療薬スクリーニングシステムの開発を並行して進める必要がある。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表（国際誌）

1. Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, Thompson JC, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Gerhard A, Allsop D, Mann DM. Post mortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. Neurobiol Dis 2012, 45:188-95.

2. Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann D.M.A., Tamaoka A, Hasegawa M Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 417:116-21.
 3. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H. Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 2011, 45:480-485
 4. Maesako M, Uemura K, Kubota M, Hiyoshi K, Ando K, Kuzuya A, Kihara T, Asada M, Akiyama H, Kinoshita A. Effect of glycogen synthase kinase 3 β -mediated presenilin 1 phosphorylation on amyloid β production is negatively regulated by insulin receptor cleavage. *Neurosci* 2011, 177:298-307.
 5. Aoki N, Tsuchiya K, Togo T, Kobayashi Z, Uchikado H, Katsuse O, Suzuki K, Fujishiro H, Arai T, Iseki E, Anno M, Kosaka K, Akiyama H, Hirayasu Y. Gray matter lesions in Nasu-Hakola disease: A report on three autopsy cases. *Neuropathology* 2011, 31:135-143
 6. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Komachi H, Miki K, Yokota O, Arai T, Miake H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Fatal encephalitis in a case of hypereosinophilic syndrome: MRI and autopsy findings. *Intern Med.* 2011, 50:1219-1225
 7. Foulds PG, et al. Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 2011, 25: 4127-37.
 8. Nonaka T and Hasegawa M. In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases, New cellular models of neurodegenerative diseases. *Commun & Integ Biol* 4, 2011, 501-502.
 9. Meyerowitz J, et al. C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol Neurodegener.* 2011, 6:57.
- TDP-43 in Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. 2011. 2. 22, Tokyo.
4. Yamashita M, Nonaka T, Akiyama H, Hasegawa M. C-terminal TDP-43 inclusion suppress proliferation mediated by transcriptional dysregulation. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11), 2011.07. Paris, France.
 5. Suzukake M, Watanabe S, Suzuki N, Hisanaga S, Hasegawa M. Evaluation of the tau aggregation inhibitors and immunization with phosphorylated tau peptides in tauopathy model mice. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.
 6. Nonaka T, Watanabe S, Iwatsubo T, Hasegawa M. Cellular models of seeded aggregation of alpha-synuclein and tau. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.

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

2.学会発表（国際学会）

1. Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H (2011) Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. *Neuroscience* 2011 Washington D.C. USA [2011/11/14]
2. Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H (2011) Quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's Disease 2011, Paris France [2011/07/17] 1. Hasegawa M: Molecular pathology of TDP-43 proteinopathies. 3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, 2011. 8. 2, Melbourne.
3. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H:

改変型 TDP-43 を発現するトランスジェニックマウスの作出と解析

研究分担者：長谷川成人（東京都医学総合研究所 病態生物生物研究室）

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

¹⁾ 東京都医学総合研究所 病態生物生物研究室

²⁾ 東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト

³⁾ 筑波大学大学院・精神病態医学分野

⁴⁾ 東京都医学総合研究所基盤技術センター動物実験開発室

研究要旨

TDP-43 は ALS や前頭側頭葉変性症(FTLD)のユビキチン陽性構造物の構成タンパク質として同定され、その蓄積と神経変性の関係が示されている。患者脳における TDP-43 の病理を再現するマウスを作出することは、TDP-43 の異常蓄積を伴う疾患の創薬に必須と考えられる。ヒト TDP-43 の野生型、及び家族性 ALS 患者に同定された変異型 TDP-43 を発現するマウスの作出、解析を行っているが、患者脳に見られるような異常蛋白病変が認められるマウスは極めて稀であった。そこで新たに凝集性が高いと思われる TDP-43 の欠損体を発現するマウスの作出を行った。またヒト TDP-43 を特異的に認識する抗体の認識部位を決定した。

A.研究目的

TDP-43 は、核に局在する不均一核リボタンパク質(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNPs)の一種であり、RNA のスプライシングや調節に関わる分子である。2006 年、前頭側頭葉変性症 (FTLD)、および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者脳に認められるユビキチン陽性封入体の主要構成成分として同定され、さらに 2008 年、家族性 ALS 患者に遺伝子変異が多数同定され、その蓄積と神経変性疾患との関連が強く示された。そこで、ヒト TDP-43 を過剰発現するマウスを作製すれば、マウスの脳や脊髄において TDP-43 の異常蓄積を起こる可能性が考えられ、これまでにヒト TDP-43 の野生型 (WT)、家族性 ALS 患者の変異 G298S、M337V 変異を導入した TDP-43 を発現するマウスの作出、およびその解析を行った。しかしながら、どの系統においても、明瞭な異常病理は確認できなかった。そこで新たに凝集性が高い変異型 TDP-43 を発現するマウスの作出を行った。

B.研究方法

培養細胞に発現させた場合、患者脳にみられる異常リン酸化やユビキチン化された凝集体形成が確認された TDP-43 の部分欠損体(TDP- Δ NLS&187-192)、及び GFP タグを付加した 2 種類の C 末端断片 GFP-TDP43 (218-414)、

GFP-TDP-43 (162-414)を、Thy1 プロモータのもとで発現するマウスの作出を行った。また、凝集体形成までにはいたらないものの、局在が細胞質に変化する核移行シグナルを除いた変異体(TDP- Δ NLS)を発現するマウスも作出した。

加えて、ヒト TDP-43 の発現検出に有用なヒト TDP-43 特異抗体の認識部位を同定すると共に、TDP-43 の凝集、線維化に関わる領域の生化学解析を行った。

(倫理面への配慮)

トランスジェニックマウスの作製、および動物実験は、東京都臨床医学総合研究所、および東京都精神医学研究所の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

1) 新規 TDP43-Tg マウスの作出とその解析

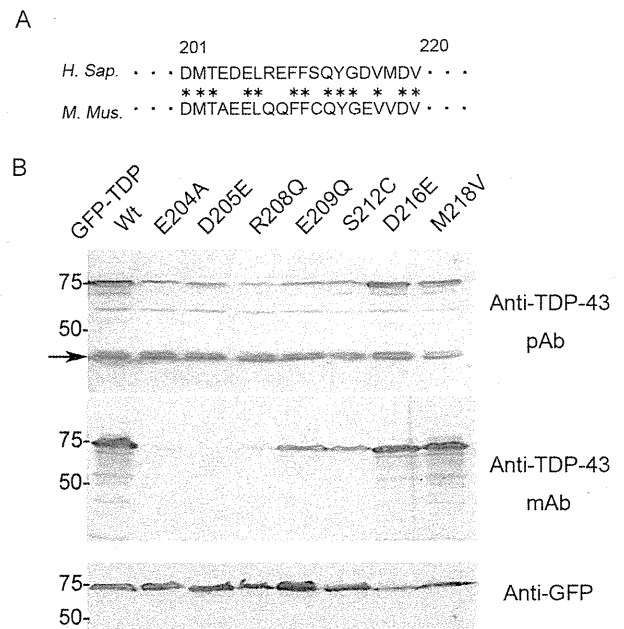
それぞれのマウスの尻尾の PCR 解析により、同定したファウンダーからヒト TDP-43 の遺伝子を発現する複数の系統の Tg マウスを樹立した。樹立したマウスについて、脳を摘出し、それぞれの改変型 TDP-43 の発現をイムノブロットにて観察した。その結果、細胞内で凝集しやすいと思われる TDP-43 の部分欠損体(TDP- Δ NLS&187-192)を導入したマウスは、生まれてきたものの、改変型 TDP-43 の蛋白発現はごく少量であった。一方、GFP-TDP43 (218-414) を導入するマウスは、遺伝子導入が3系統で確認できたものの、イムノブロット解析の結果、その蛋白質の発現を確認できた系統はなかった。もう一つの C 末端断片である GFP-TDP-43 (162-414)は、蛋白質の発現が確認できたものの、18ヶ月齢まで、これといった異常な症状は確認できていない。TDP43- Δ NLS については、5ヶ月齢で後肢の異常が認められたものの、イムノブロットにおいて、TDP-43 の異常蓄積は確認できていない。

2) TDP-43 特異抗体の認識部位の同定

ヒト TDP-43 を発現する Tg マウスの解析において、外来遺伝子として発現したヒト TDP-43 を内在性のマウス TDP-43 と区別して解析することは重要であり、ヒト TDP-43 を特異的に認識する抗体はその解析に有用である。Proteintech 社のモノクローナル抗体(60019-2-Ig)はヒト TDP-43 とマウス TDP-43 を区別して認識することから、この抗体とよく使われているポリクローナル抗体(10782-2-AP)の認識部位を同定した。

GFP を付加した部分欠損 TDP-43 を細胞に発現させ、抗体でイムノブロット解析した結果、

その認識部位がヒト TDP-43 の 203-209 にあることを同定した。さらにモノクローナル抗体は E204, D205, R208 をアラニンに置換すると反応性が消失することから、これらの残基が抗体の認識に関わっていることが判明した。

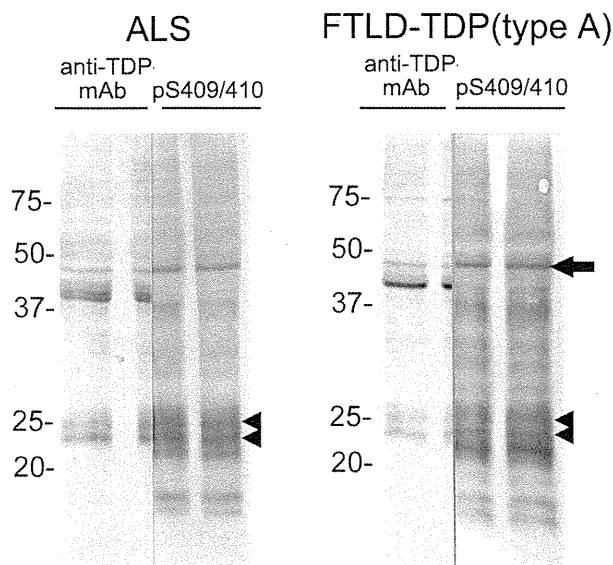


D. 考察

TDP-43 の異常蓄積病変を再現するモデルを構築するため、培養細胞で凝集、蓄積のみられた部分欠損変異体(TDP- Δ NLS&187-192)や GFP タグを付加した TDP-43 の C 末端断片を発現するマウスの作出を行ったが、野生型 TDP-43 に比べ、蛋白発現量が少なかったり、蛋白発現自体が確認できなかつたりした。この理由については不明であるが、凝集性の高い欠損変異体や C 末端断片が異常分子として認識され、分解、排除された可能性が考えられる。GFP-TDP-43 (162-414)を導入したマウスでは、その蛋白質の発現が検出されていることから、今後ひきつづき観察を続けていく予定である。

ALS および FTLD 患者脳の不溶性画分には、TDP-43 の C 末端断片が認められるが、その断片がどこで切断されたのか十分に検討がなされていない。市販 TDP-43 抗体とリン酸化特

異抗体 pS409/410 を用いてイムノブロットすると、リン酸化抗体で認識される C 末端断片の 22~24kDa バンドの内、23~24kDa のバンドは市販抗体で反応したが、22kDa バンドは反応しなかった。市販抗体のエピトープが同定されたことにより、C 末端断片がどこからはじまるのかより明確になった。また、トリプシン、キモトリプシン処理後の反応結果から、この抗体のエピトープは異常 TDP-43 のプロテアーゼ耐性領域の一部を構成していると考えられた。



E. 結論

ヒト TDP-43 の部分欠損体(TDP- Δ NLS&187-192)、及び GFP タグを付加した 2 種類の C 末端断片 GFP-TDP43 (218-414)、GFP-TDP-43 (162-414)、核移行シグナルを除いた変異体 (TDP- Δ NLS)を、Thy1 プロモータのもとで発現するマウスの作出を行った。

部分欠損体(TDP- Δ NLS&187-192)を導入したマウスは、生まれてきたものの、その蛋白発現はごく少量であった。GFP-TDP43 (218-414)は、遺伝子導入が 3 系統で確認できたものの、イムノブロット解析で蛋白質の発現を確認できなかった。GFP-TDP-43 (162-414)は、蛋白質

の発現が確認できたものの、18 ヶ月齢まで、これといった異常な症状は確認できていない。

TDP43- Δ NLS は、5 ヶ月齢で後肢の異常が認められたものの、イムノブロットにおいて、TDP-43 の異常蓄積は確認できていない。

Proteintech 社のモノクローナル抗体 (60019-2-Ig)、ポリクローナル抗体(10782-2-AP)の認識部位がヒト TDP-43 の 203-209 にあることを同定した。モノクローナル抗体は E204, D205, R208 残基が抗体の認識に関わっている。この部位は ALS, FTLD 患者脳に蓄積する異常 TDP-43 のプロテアーゼ耐性中心の一部を構成していると考えられた。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Tsuji H, et al (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 116–121.
2. Foulds PG, et al (2011) Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 25: 4127-37.
3. Foulds PG, et al (2012) Post mortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 45:188-95.
4. Hasegawa M, et al (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 45:480-485

5. Nonaka T and *Hasegawa M (2011) In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases, New cellular models of neurodegenerative diseases. Commun & Integ Biol 4, 501-502.

6. Meyerowitz J, et al (2011) C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. Mol Neurodegener 6:57.

2. 学会発表

1. Hasegawa M: Molecular pathology of TDP-43 proteinopathies. 3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, 2011. 8. 2, Melbourne.

2. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H: TDP-43 in Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. 2011. 2. 22, Tokyo.

3. Yamashita M, Nonaka T, Akiyama H, Hasegawa M. C-terminal TDP-43 inclusion suppress proliferation mediated by transcriptional dysregulation. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11), 2011.07. Paris, France.

4. Suzukake M, Watanabe S, Suzuki N, Hisanaga S, Hasegawa M. Evaluation of the tau aggregation inhibitors and immunization with phosphorylated tau peptides in tauopathy model mice. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.

5. Nonaka T, Watanabe S, Iwatsubo T, Hasegawa M. Cellular models of seeded aggregation of alpha-synuclein and tau. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.

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

前頭側頭葉変性症モデルマウス作出に向けた研究

研究分担者：秋山治彦（東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト）

研究協力者：細川雅人¹⁾，東晋二¹⁾，小林禅¹⁾，青木直哉¹⁾，河上緒¹⁾，長谷川成人^{1,2)}，
野中隆^{1,2)}，多屋長治³⁾

¹⁾ 東京都医学総合研究所認知症プロジェクト

²⁾ 東京都医学総合研究所病態細胞生物学研究室

³⁾ 東京都医学総合研究所基盤技術センター動物実験開発室

研究要旨

タウ陰性前頭側頭葉変性症(FTLD)の多くは TDP-43 異常蓄積にもとづき発病するが(FTLD-TDP)，家族性 FTLD-TDP の原因遺伝子として同定されているのはプログラニューリン遺伝子 *GRN* である。FTLD-TDP の病態を再現するモデルを作製するため、*GRN* ノックアウトマウスの系統導入と維持、様々な改変コンストラクトを用いた *TARDBP* トランスジェニックマウスと *GRN* ノックアウトマウスの交配による二重遺伝子改変マウスの作出と解析を行った。また TDP-43 と同じ RNA 結合蛋白で、その遺伝子変異が家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となり、脳への異常蓄積が FTLD を引き起こすなど多くの点で TDP-43 と共通する FUS について、ALS/FTLD 圏の疾患脳脊髄における病理学的解析を行った。

A.研究目的

TDP-43 は細胞の核に局在する不均一核リボ蛋白質 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNP) の一種で、タウ陰性前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の脳脊髄に異常蓄積するとともに、その (*TARDBP*) 遺伝子異常は家族性 ALS の原因となる。また TDP-43 と同じ hnRNP のひとつである FUS (fused in sarcoma) はタウ・TDP-43 陰性 FTLD における異常蓄積蛋白質であるとともに、やはり家族性 ALS の原因遺伝子のひとつである。一方、家族性 FLTD は tau 遺伝子の変異により発病する群とプログラニューリン遺伝子 (*GRN*) の変異により発病する群とがあり、後者の多くはプログラニューリンの発現減少が病因に関わっていると推測されている。

これらの事実をもとに、FTLD の病態を再現する動物モデルを作出するのが本研究の最終目標である。そのため本年度は、分担研究者である長谷川研究員らが作出した *TARDBP* トランスジェニック (Tg) マウスと、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室西原真杉教授が開発した *GRN* ノックアウト (KO) マウスとの交配による二重遺伝子改変マウスの作出と解析を行った。また前年度に引き続いて、TDP-43 異常蓄積との FUS 異常蓄積を伴う患者脳の病理学的解析を行い、両者の関連の有無を調べた。

B.研究方法

TARDBP-Tg は長谷川研究室において最も早期に作出に成功した *TARDBP*-Tg (G298S) 系統と *TARDBP*-Tg (M337V) 系統を用いた。G298S 系

統は生後早期から後肢の不全麻痺が出現し、以後あまり進行せずに加齢する。M337V 系統は G298S 系統のような著明な症状は出現しないが、両系統とも加齢後に病理組織学的に検索すると、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS403/404 および p409/410)、抗ユビキチン抗体で陽性に染色される細胞質封入体が、脳幹～脊髄にごく少数認められる。

GRN-KO マウスは前年度、東京大学西原研究室との共同研究の一環として理化学研究所よりつがいの提供を受け系統維持を開始した。このマウス自体の中樞神経系の変化は軽度で、間脳や脊髄に p62/ユビキチン陽性構造が出現するものの、ヒトのプログラニューリン変異例のように FTLD 病変が認められるわけではない。

マウスモデル作出の基盤となるヒト剖検脳の解析では、FTLD 症例について、リン酸化 TDP-43 と FUS の免疫組織化学染色を行った。

(倫理面への配慮)

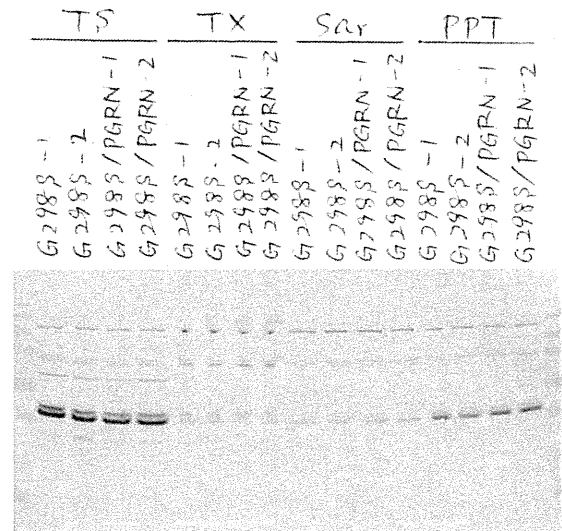
トランスジェニックマウスの作製および動物実験は、東京都医学総合研究所の実験動物倫理委員会に研究計画を提出して審査承認をうけ、その指針に従って実験を行った。また、ヒト剖検脳の解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理基準に準じることとし、剖検時に遺族の承諾を得た場合のみ剖検材料を研究に使用した。同倫理指針策定以前に剖検になった症例については、連結可能匿名化による個人情報の保護をはかった上で使用した。すべての研究計画は東京都医学総合研究所の倫理委員会の審査承認を受けた。

C. 研究結果

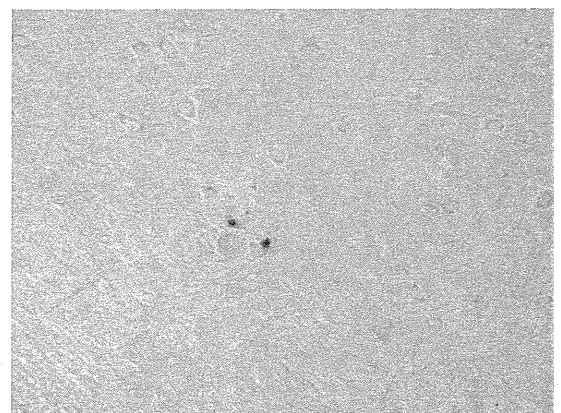
まず GRN(-/-)マウスと TARDBP(G298S)マウスとの交配を行い、GRN(+/-)・G298S マウスを得た。次いで GRN(-/-)と GRN(+/-)・G298S とをかけ合わせることで GRN(-/-)・G298S を得た。

GRN-KO は繁殖力が弱い上に G298S の後肢不全麻痺の影響もあるためか、これらの系統の交配と生育に時間を要した。

GRN-KO・G298S マウスの症状は G298S と同様であり重症化は観察されなかった。脳の Tris 可溶性、Tris 不溶性・Tx-100 可溶性、Tx-100 不溶性・Sarkosyl 可溶性、Sarkosyl 不溶性(PPT)の 4 分画のイムノブロットを下図に示す。



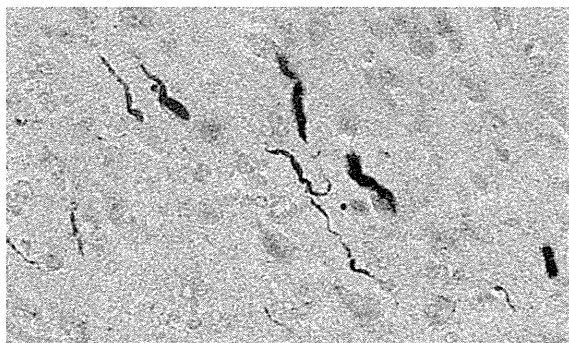
不溶画分(PPT)で僅かに GRN-KO・G298S の方が G298S 単独より異常リン酸化 TDP-43 が多いようにも見受けられるが sample application の誤差の範囲を超えるものではない。抗リン酸化 TDP-43 の免疫組織染色では G298S 単独より封入体 (TDP-43 異常蓄積) の頻度がやや高い傾向があり、1 視野に 2 個の封入体が観察された部位もあった (下図)。これは G298S において



脊髄横断面標本であれば数枚の切片につき 1 個

の封入体が観察されるのみであることと比較すれば、GRN-KOにより病変が加速されたと考えられるが、ヒト疾患に比べればはるかに少なく、個体差を考慮に入れた場合、ただちに創薬に利用するのは難しいと判断された。現在、GRN(-/-)マウスと TARDBP(M337V)マウスとの交配を進めており、GRN(-/-)・M337V が得られたら加齢の後、GRN(-/-)・G298S と同様の解析を行う予定である。

TDP-43 と同様、hnRNP である FUS の異常蓄積を伴う FTLD-FUS、10 例の病理組織学的解析において、1 例に TDP-43 異常蓄積の合併を認めた。本例は FTLD を発症後、10 年以上を経過した後、ALS 症状が出現した。TDP-43 の蓄積は脳幹～脊髄に限られており、その範囲において ALS-TDP に一般的な病理像を示した。一方、FUS 蓄積は主として大脳に認められ、通常の封入体の出現ではなく、変性神経突起への FUS 蓄積が病変の中心であった（下図）。



D. 考察

ヒト TDP-43 の G298 変異型タンパク質を発現する TARDBP-Tg マウスでは後肢機能異常という ALS 類似の表現型は出現するが、脳・脊髄への TDP-43 異常蓄積は軽度である。本研究では、ヒトの家族性 FTLD-TDP の原因と考えられているプログラニュリンの発現低下を再現するマウスモデルである GRN-KO マウスと G298S とを交配させ、GRN(-/-)・G298S 二重遺伝子改変マウスを得た。GRN(-/-)・G298S マウスでは

病理組織学的には異常リン酸化 TDP-43 陽性封入体が G298S 単独マウスよりも増加する傾向が見られたが、生化学的に明瞭な違いを検出できるほど大きな差ではなかった。遺伝子操作によるプログラニュリンの減少は TDP-43 異常蓄積を増加させるようではあるが、今回得られたマウス系統は薬剤候補化合物の効果を判定するためのモデルとしてはまだ不十分であると考えられた。

FUS は生理機能や局在、遺伝子異常による疾患の表現型 (ALS)、非遺伝性 FTLD 脳への異常蓄積と、多くの点で TDP-43 と類似する。今回、10 例の FTLD-FUS の中で 1 例だけ、TDP-43 の異常蓄積による ALS を伴う症例を見出した。この症例における FUS と TDP-43 の異常蓄積部位は各々大脳と脳幹～脊髄と異なっていた。しかし、全くの偶然による 2 疾患の合併と考えるには、両疾患の頻度は低い。さらに、本症例の FUS 病変は通常の FTLD-FUS と大きく異なり、変性神経突起中心の異常 FUS 蓄積を示した。臨床症状の出現時期からは、FUS の異常蓄積が先行し、その 10 年以上後に TDP-43 の異常蓄積が生じたと推測されるが、現時点では、両者の関係は明らかではない。今後、in vitro の病変モデルを用いた FUS と TDP-43 の関係の解析を実施して、よりヒト疾患に近い TDP-43 モデル作出への鍵を探る必要があると思われる。

E. 結論

TARDBP-Tg と GRN-KO との交配により GRN(-/-)・G298S 二重遺伝子改変マウスを得た。異常 TDP-43 蓄積は病理組織学的にはやや増加したが、生化学的に検出できるほど大きな差ではなく、かつ、そのまま創薬モデルとするには十分とは言い難かった。現在作出中の GRN(-/-)・M337V マウスの加齢、解析を待つとともに、さらに異なる病変モデルを検討する必要がある。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

1. Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, Thompson JC, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Gerhard A, Allsop D, Mann DM. Post mortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 2012, 45:188-95.
2. Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann D.M.A., Tamaoka A, Hasegawa M Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 417:116-21.
3. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H. Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 2011, 45:480-485
4. Maesako M, Uemura K, Kubota M, Hiyoshi K, Ando K, Kuzuya A, Kihara T, Asada M, Akiyama H, Kinoshita A. Effect of glycogen synthase kinase 3 β -mediated presenilin 1 phosphorylation on amyloid β production is negatively regulated by insulin receptor cleavage. *Neurosci* 2011, 177:298-307.
5. Aoki N, Tsuchiya K, Togo T, Kobayashi Z, Uchikado H, Katsuse O, Suzuki K, Fujishiro H, Arai T, Iseki E, Anno M, Kosaka K, Akiyama H, Hirayasu Y. Gray matter lesions in Nasu-Hakola disease: A report on three autopsy cases. *Neuropathology* 2011, 31:135-143
6. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Komachi H, Miki K, Yokota O, Arai T, Miake H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Fatal encephalitis in a case of hypereosinophilic syndrome: MRI and autopsy findings. *Intern Med.* 2011, 50:1219-1225

2.学会発表

1. Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H (2011) Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. *Neuroscience* 2011 Washington D.C. USA [2011/11/14]
2. Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H (2011) Quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. *International Conference on Alzheimer's Disease* 2011, Paris France [2011/07/17]

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得 特になし

2.実用新案登録 特になし

3.その他 特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

英文原著・症例報告

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年
Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann D.M.A., Tamaoka A, Hasegawa M	Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration.	Biochem Biophys Res Commun	417	116-121	2011
Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H	Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies	J Mol Neurosci	45	480-485	2011
Maesako M, Uemura K, Kubota M, Hiyoshi K, Ando K, Kuzuya A, Kihara T, Asada M, Akiyama H, Kinoshita A	Effect of glycogen synthase kinase 3 β -mediated presenilin 1 phosphorylation on amyloid β production is negatively regulated by insulin receptor cleavage	Neurosci	177	298-307	2011
Aoki N, Tsuchiya K, Togo T, Kobayashi Z, Uchikado H, Katsuse O, Suzuki K, Fujishiro H, Arai T, Iseki E, Anno M, Kosaka K, Akiyama H, Hirayasu Y	Gray matter lesions in Nasu-Hakola disease: A report on three autopsy cases	Neuropathology	31	135-143	2011
Nonaka T and Hasegawa M	In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases, New cellular models of neurodegenerative diseases.	Commun & Integ Biol	4	501-502	2011
Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng DCh, Price KA, Liddell JR, Caragounis A, Li QX, Masters CL, Nonaka T, Hasegawa M, Bogoyevitch MA, Kanninen KM, Crouch PJ, White AR	C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress.	Mol Neurodegener	6	57	2011
Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, Hasegawa M, Taylor M, Mann DM, and Allsop D	Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease.	FASEB J	25	4127-4137	2012
Kobayashi Z, Tsuchiya K, Komachi H, Miki K, Yokota O, Arai T, Miake H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H	Fatal encephalitis in a case of hypereosinophilic syndrome: MRI and autopsy findings	Intern Med	50	1219-1225	2011



Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration

Hiroshi Tsuji^{a,b}, Takashi Nonaka^a, Makiko Yamashita^a, Masami Masuda-Suzukake^a, Fuyuki Kametani^a, Haruhiko Akiyama^c, David M.A. Mann^d, Akira Tamaoka^b, Masato Hasegawa^{a,*}

^a Department of Neuropathology and Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

^b Department of Neurology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tenodai, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8576, Japan

^c Dementia Research Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-0057, Japan

^d Mental Health and Neurodegeneration Research Group, Greater Manchester Neuroscience Centre, University of Manchester, Hope Hospital, Salford M6 8HD, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2011

Available online 22 November 2011

Keywords:

Aggregation

Tau

Alpha-synuclein

ALS

FTLD

ABSTRACT

TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) is the major component of the intracellular inclusions in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD). Here, we show that both monoclonal (60019-2-Ig) and polyclonal (10782-2-AP) anti-TDP-43 antibodies recognize amino acids 203–209 of human TDP-43. The monoclonal antibody labeled human TDP-43 by recognizing Glu204, Asp205 and Arg208, but failed to react with mouse TDP-43. The antibodies stained the abnormally phosphorylated C-terminal fragments of 24–26 kDa in addition to normal TDP-43 in ALS and FTLD brains. Immunoblot analysis after protease treatment demonstrated that the epitope of the antibodies (residues 203–209) constitutes part of the protease-resistant domain of TDP-43 aggregates which determine a common characteristic of the pathological TDP-43 in both ALS and FTLD-TDP. The antibodies and methods used in this study will be useful for the characterization of abnormal TDP-43 in human materials, as well as in vitro and animal models for TDP-43 proteinopathies.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

TDP-43 is a nuclear ribonucleoprotein implicated in exon splicing, gene transcription, regulation of mRNA stability, mRNA biosynthesis, and formation of nuclear bodies [1–5]. It has been identified as the major component of the ubiquitin-positive tau-negative intracytoplasmic inclusions in frontotemporal lobar degeneration (FTLD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [6,7] and other neurodegenerative disorders [8–12]. Identification of mutations in familial and sporadic ALS and FTLD cases demonstrated a direct link between the genetic lesion and development of TDP-43 pathology [13–16]. Immunohistochemical studies using anti-TDP-43 antibodies revealed that TDP-43 translocates from its normal nuclear localization into the cytoplasm in these disorders. Furthermore, biochemical analysis detected abnormally phosphorylated TDP-43 of 45 kDa, high-molecular-weight smearing and C-terminal fragments of approximately 25 kDa, as well as normal TDP-43 of 43 kDa in the detergent-insoluble, urea-soluble fraction from affected brains. The antibodies generated by immunizing C-terminal phosphopeptides of TDP-43, such as pS409/410 and

pS403/404, strongly stain abnormal neuronal cytoplasmic and dendritic inclusions in FTLD, and skein-like and glial cytoplasmic inclusions in ALS spinal cord, with no nuclear staining, and thus permit easier and more sensitive detection of abnormal TDP-43 accumulations in neuropathological examination [17]. Immunoblotting of the Sarkosyl-insoluble fractions from FTLD and ALS cases using these phosphospecific antibodies clearly demonstrated that hyperphosphorylated full-length TDP-43 of 45 kDa, smearing substances and fragments at 18–26 kDa are the major species of TDP-43 accumulated in FTLD and ALS, and the band patterns of the C-terminal fragments of phosphorylated TDP-43 correspond to the neuropathological subtypes.

Anti-TDP-43 monoclonal antibody (mAb) (60019-2-Ig; Proteintech Group Inc., Chicago, IL) and polyclonal antibody (pAb) (10782-2-AP; Proteintech Group Inc., Chicago, IL) are widely used for the investigation of TDP-43 pathology [6,7,9,18–21]. According to the manufacturer's specifications, anti-TDP-43 mAb and pAb were generated against the N-terminal 260 amino acids (aa) of the protein, but the precise epitope has not yet been identified. Another mouse monoclonal antibody against TDP-43 (2E2-D3; Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) is also commercially available; it recognizes residues 205–222 of human TDP-43, but does not recognize mouse or rat TDP-43 [22].

* Corresponding author. Fax: +81 3 6834 2349.

E-mail address: hasegawa-ms@igakuken.or.jp (M. Hasegawa).

In this study, we mapped the epitope for anti-TDP-43 mAb and pAb (Proteintech Group Inc.). We also showed that anti-TDP-43 mAb recognizes human TDP-43, but not mouse TDP-43. Using these antibodies, we investigated the abnormal forms of TDP-43 from ALS and FTLD brains, and found that the antibodies recognized the amino-terminus of the TDP-43 C-terminal fragments of 24–26 kDa. Immunoblot analysis of Sarkosyl-insoluble fractions after treatment of proteases also demonstrated that the epitope is apparently resistant to trypsin and chymotrypsin in the abnormal TDP-43, suggesting that the epitope region is important for the formation of the pathological structure of TDP-43 in ALS and FTLD.

2. Materials and methods

2.1. Construction of plasmids

GFP-tagged TDP-43 C-terminal or N-terminal fragments were constructed as described [23] by amplifying a cDNA encoding full-length TDP-43 by means of PCR and inserting the fragment into the pEGFP-C1 vector (Clontech). To investigate the specificity of TDP-43 mAb for human TDP-43, site-directed mutagenesis of GFP-tagged full-length TDP-43 was carried out to substitute Glu204 to Ala (E204A), Asp205 to Glu (D205E), Arg208 to Gln (R208Q), Glu209 to Gln (E209Q), Ser212 to Cys (S212C), Asp216 to Glu (D216E), and Met218 to Val (M218V), using a site-directed mutagenesis kit (Stratagene)(Fig. 4). All constructs were verified by DNA sequencing.

2.2. Antibodies

TDP-43 polyclonal antibody, 10782-2-AP, and TDP-43 monoclonal antibody, 60019-2-Ig, were purchased from Proteintech Group Inc. Anti-GFP monoclonal antibody was purchased from MBL (Nagoya, Japan). A polyclonal antibody specific for phosphorylated TDP-43 (pS409/410) was prepared as described [17].

2.3. Cell culture and expression of plasmids

Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y and mouse neuroblastoma cell line Neuro 2a were maintained in appropriate medium as described previously [24,25]. Cells were then transfected with expression plasmids using FuGENE6 (Roche) according to the manufacturer's instructions.

2.4. Immunoblotting

Expressed proteins in cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA). After blocking with 3% gelatin, membranes were incubated overnight with primary antibodies (1:1000) at room temperature. After incubation with an appropriate biotinylated secondary antibody, labeling was detected using the ABC system (Vector Lab., Burlingame, CA) coupled with a diaminobenzidine (DAB) reaction intensified with nickel chloride.

2.5. Analysis of abnormal TDP-43 in ALS and FTLD-TDP brain

Brains from two cases with Alzheimer's disease (AD), two with ALS, two with FTLD-TDP (type A), two with FTLD-TDP (type B) and two with FTLD-TDP (type C) were employed in this study. The two AD cases had no TDP-43 pathology. The age, sex, brain weight, and diagnosis are given in Table 1. Sarkosyl-insoluble, urea-soluble fractions were extracted from these brains as previously described [6,9]. The samples were loaded onto 15% polyacrylamide gel and

Table 1
Description of subjects.

Case No.	Diagnosis	Age (years)	Sex	BW (g)
1	AD	65	F	1165
2	AD	70	F	1126
3	ALS	62	M	1230
4	ALS	42	F	1140
5	FTLD-TDP (type A)	71	F	863
6	FTLD-TDP (type A)	66	F	1100
7	FTLD-TDP (type B)	45	M	1260
8	FTLD-TDP (type B)	67	M	1280
9	FTLD-TDP (type C)	67	M	na
10	FTLD-TDP (type C)	59	M	na

BW, brain weight; AD, Alzheimer's disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; FTLD-TDP, frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 pathology; na, not available.

transferred onto a membrane. The membrane was cut in the center of the loaded lane, and the same samples were reacted separately with anti-TDP-43 Abs and pS409/410 as described above.

2.6. Protease treatment of TDP-43

Sarkosyl-insoluble fractions extracted from neocortical regions of the brains were treated with trypsin (at a final concentration of 100 µg/ml, Promega, Madison, USA) or chymotrypsin (at a concentration of 10 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by boiling for 5 min. After centrifuging at 15,000 rpm for 1 min, the samples were analyzed by immunoblotting with anti-TDP-43 pAb and mAb as described above.

3. Results

3.1. Epitope mapping of anti-TDP-43 antibody

Our previous study showed that both TDP-43 mAb and pAb reacted with GFP-tagged TDP-43 C-terminal fragment (GFP-TDP 162–414), but failed to detect GFP-TDP 218–414 [23]. To map the epitope of these antibodies, we expressed a series of GFP-tagged human TDP-43 C-terminal fragments (Fig. 1A) in SH-SY5Y cells and immunoblotted them with the antibodies. Both anti-TDP-43 pAb and mAb detected endogenous human TDP-43 of 43 kDa and exogenous GFP-tagged full-length, 171–414, 181–414, 191–414 and 201–414 TDP-43. However, both antibodies failed to detect 211–414 (Fig. 1A). These results suggest that the epitopes of these antibodies are located within residues 201–210.

To narrow down the epitope structure further, another series of GFP-tagged C-terminal fragments of TDP-43 was expressed in SH-SY5Y cells (Fig. 1B) and tested. Both antibodies reacted with GFP-TDP 203–414, but failed to recognize GFP-TDP 204–414, 205–414 and 207–414 (Fig. 1B), demonstrating that Thr203 forms the N-terminal border of the epitope for both antibodies.

To determine the C-terminus of the epitope, a series of GFP-tagged N-terminal fragments of TDP-43 was expressed and immunoblotted with these antibodies (Fig 1C). Anti-TDP-43 pAb reacted with all of the N-terminal fragments tested, although it stained the 1-212 fragment most strongly. This suggests that one of the pAb epitopes is located at the N-terminal region of TDP-43, in addition to the central epitope. Anti-TDP-43 mAb strongly stained GFP-TDP 1-212, moderately stained GFP-TDP 1-210, and barely stained GFP-TDP 1-209, while it failed to react with GFP 1-208 and 1-207 (Fig. 1C), indicating that Glu209 forms the C-terminus of the epitope for anti-TDP-43 mAb. Thus, anti-TDP-43 mAb recognizes residues 203–209 of human TDP-43.

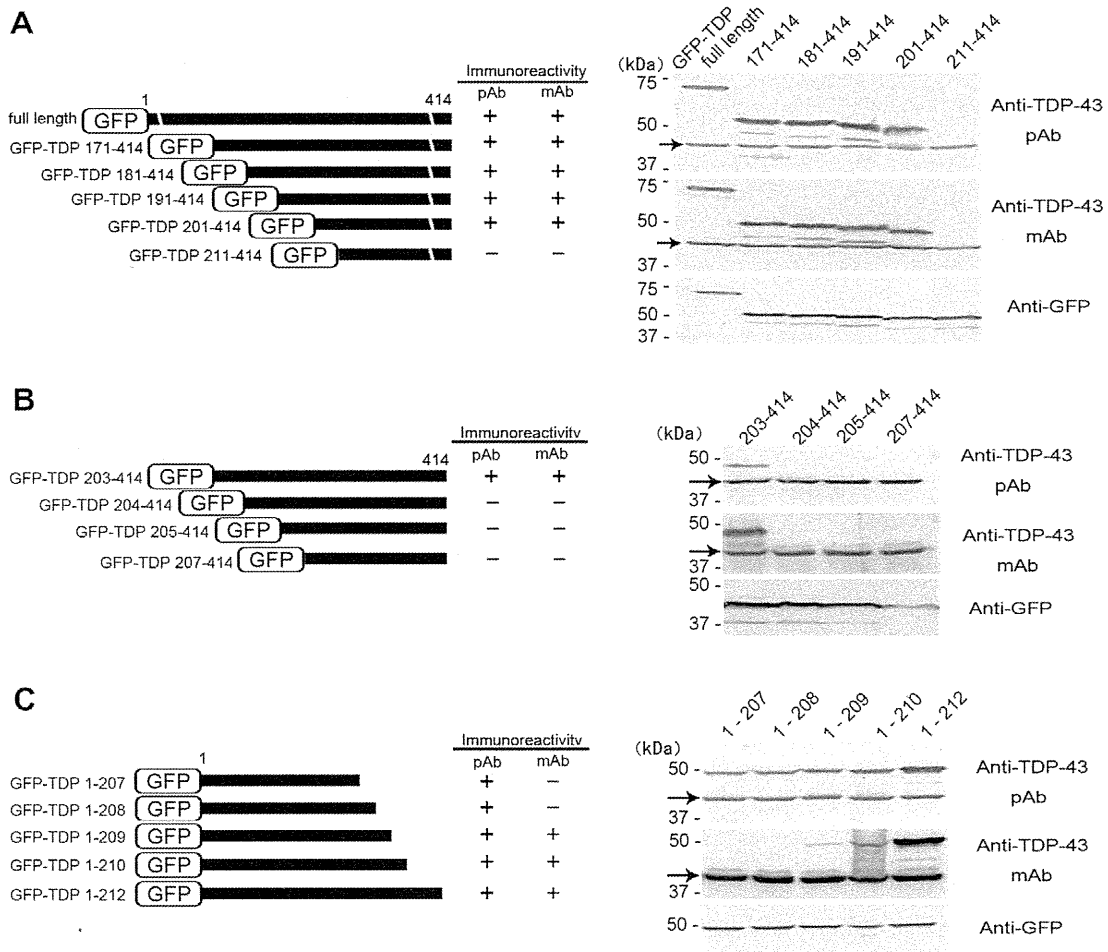


Fig. 1. Epitope mapping of anti-TDP-43 polyclonal and monoclonal antibodies. (A) Schematic diagram of GFP-tagged full-length TDP-43 (GFP-TDP) and the C-terminal fragments. Immunoblot analyses of GFP-TDP and the C-terminal fragments in SH-SY5Y cells. Both mAb and pAb reacted with GFP-TDP and the C-terminal fragments, except for 211–414. The anti-GFP antibody recognizes all the proteins expressed. (B) Further epitope mapping of anti-TDP-43 antibodies. Immunoblot analyses of the GFP tagged C-terminal fragments of TDP-43. Both mAb and pAb reacted with 203–414, but failed to recognize 204–414, 205–414, and 207–414. The anti-GFP antibody recognizes all of the fragments. (C) Epitope mapping of the C-terminus recognized by anti-TDP-43 polyclonal and monoclonal antibodies. Immunoblot analyses of GFP-TDP and N-terminal fragments in SH-SY5Y cells. Anti-TDP-43 pAb reacted with all of the N-terminal fragments, although it stained 1-212 fragment most strongly. In contrast, anti-TDP-43 mAb strongly stained GFP-TDP 1-212, moderately stained GFP-TDP 1-210, and barely stained GFP-TDP 1-209, while it failed to react with GFP 1-208 and 1-207. The anti-GFP antibody recognized all of the fragments equally. The arrows indicate endogenous TDP-43 in SH-SY5Y cells.

3.2. Amino acid sequence differences between human and mouse TDP-43

The anti-TDP-43 mAb reacted with endogenous TDP-43 of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, but not with TDP-43 of mouse neuroblastoma Neuro2a cells (Fig. 1B, 1C, 2B). Similarly, the mAb recognized TDP-43 in human brain extract, but failed to detect TDP-43 in mouse brain extract, suggesting that the mAb does not recognize mouse TDP-43 (data not shown). The absence of reactivity with mouse TDP-43 is explained by the sequence differences around the epitope between human and mouse TDP-43 (Fig. 2A). Each different amino acid of human TDP-43 was substituted to that of mouse TDP-43. The mutated proteins were expressed in Neuro2a cells and immunoreactivity with anti-TDP-43 mAb was examined. Substitution of D216 to E and M218 to V did not affect the immunoreactivity (Fig. 2B), whereas substitutions of E204 to A, D205 to E, and R208 to Q abolished the immunoreactivity of anti-TDP-43 mAb, indicating that these residues are necessary for recognition by the mAb. Anti-TDP-43 pAb reacted with these mutants, although a marked

decrease in immunoreactivity was observed in the cases of E204A, D205A, R208Q, and S212C.

3.3. Biochemical analysis of abnormal TDP-43 in ALS and FTLT brains with anti-TDP-43 mAb

On immunoblots of Sarkosyl-insoluble fractions extracted from the brain of patients with ALS and FTLT-TDP (type A), the anti-TDP-43 mAb detected phosphorylated full-length TDP-43 at 45 kDa, two bands around 25 kDa and high-molecular-weight smears, in addition to the normal TDP-43 band at 43 kDa, which can also be detected in control cases. Immunoblot analysis of the split membrane with a phosphorylation-dependent anti-TDP-43 antibody pS409/410 revealed that the two bands around 25 kDa stained with the mAb corresponded to the C-terminal fragments of 24 and 26 kDa recognized by pS409/410 (Fig. 3)[17]. These results demonstrated that these 24 and 26 kDa C-terminal fragments contain the epitope of the mAb, residues 203–209, and that the cleavage sites of these C-terminal fragments are located at the N-terminal side of Thr203.

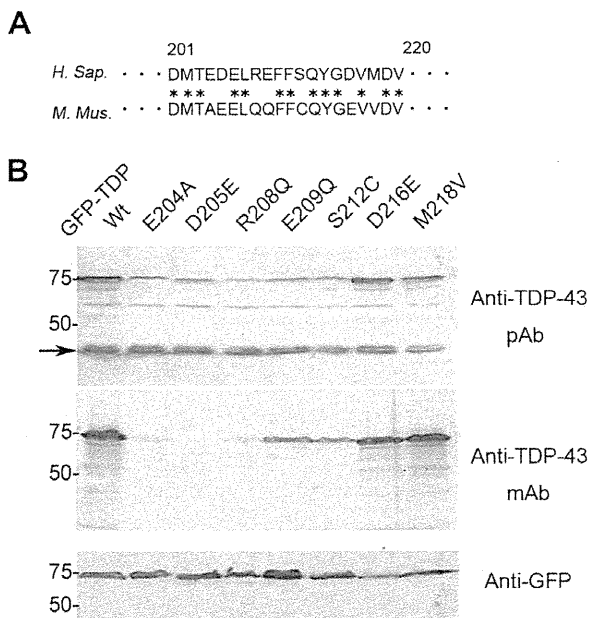


Fig. 2. Alignment of human and mouse TDP-43 (A) and immunoblot analyses of mutated TDP-43 with anti-TDP-43 antibodies. (A) The amino acid sequences of human (upper) and mouse (lower) TDP-43 around the epitope of anti-TDP-43 mAb. The asterisks show identical amino acids. (B) Immunoblot analyses of GFP-TDP wild type (Wt) and GFP-TDP mutants expressed in Neuro2a cells. Substitution of D216 to E and M218 to V did not affect the immunoreactivity, whereas substitutions of E204 to A, D205 to E, and R208 to Q, abolished the immunoreactivity of anti-TDP-43 mAb. Anti-TDP-43 pAb reacted with all these mutants, although markedly decreased immunoreactivities were observed in E204A, D205A, R208Q, and S212C. The arrows indicated endogenous TDP-43 in Neuro2A cells. Note that endogenous mouse TDP-43 in Neuro 2a cells was not recognized by anti-TDP-43 mAb.

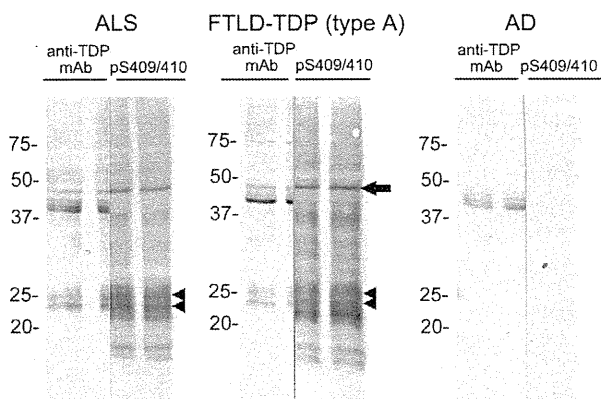


Fig. 3. Immunoblot analyses of Sarkosyl-insoluble fractions from ALS, FTLD-TDP (type A), and AD brains with anti-TDP-43 monoclonal antibody and phosphorylation-dependent anti-TDP-43 antibody, pS409/410. With pS409/410, fragments of approximately 45 kDa and 18–26 kDa, as well as smearing, were detected. The banding pattern of 18–26 kDa fragments showed three major bands at 23, 24, and 26 kDa, and 2 minor bands at 18 and 19 kDa, with the 24 kDa band being the most intense. In addition to the normal full-length TDP-43 at 43 kDa, anti-TDP-43 mAb labeled phosphorylated full-length TDP-43 at 45 kDa, high-molecular-weight smears and two bands at 26 kDa and 24 kDa (arrowheads), which were not seen in the AD case. The two bands corresponded to the major 26 and 24 kDa bands were detected with pS409/410.

3.4. The epitope of these TDP-43 antibodies constitute part of protease-resistant core domain of TDP-43 in ALS and FTLD brains

In order to characterize the epitope further, we treated the Sarkosyl-insoluble fractions extracted from brains of patients with proteases and analyzed them with these antibodies. Without pro-

tease treatment, both antibodies strongly stained normal full-length TDP-43 of 43 kDa in all cases examined including AD cases which were without TDP-43 pathology. In ALS and FTLD-TDP cases, phosphorylated full-length TDP-43 of 45 kDa (Fig 4A, arrows) and the ~25 kDa fragments (Fig 4A, arrow heads) were detected with these antibodies. After trypsin treatment, the full-length band of TDP-43 was disappeared and the protease-resistant fragments around 25 kDa (Fig 4B, white arrows) and smearing substances appeared in the ALS and FTLD-TDP cases. Similarly, after chymotrypsin treatment, protease-resistant triplet bands of 16, 20 and 25 kDa (Fig 4C, white arrow heads) and smearing substances were clearly detected in ALS and FTLD-TDP-cases with the mAb, while no such bands were seen in AD cases. On blot with the pAb, multiple bands were detected in addition to the triplet, and some of these bands were also detected in AD cases, suggesting that the pAb stained some normal fragments in addition to the abnormal TDP-43 bands. In the cases examined, apparent difference was not detected in these trypsin-resistant and chymotrypsin-resistant bands detected among the clinicopathological phenotypes of the diseases. By proteinase K treatment, immunoreactivities with these antibodies were completely abolished (data not shown), suggesting that the epitope is not entirely resistant to any proteases. However, it is obvious that the epitope of the TDP-43 deposited in the patients is fairly protease-resistant compared to the normal protein. These results indicate that the epitope of the mAb (residues 203–209 of TDP-43) constitute part of the protease-resistant domain of TDP-43 which determine a common characteristic of the abnormal TDP-43 in both ALS and FTLD-TDP.

4. Discussion

This is the first analysis of the epitopes of Proteintech's anti-TDP-43 polyclonal and monoclonal antibodies, which have often been used to research TDP-43 proteinopathies since 2006 [6,7]. We demonstrated that anti-TDP-43 mAb specifically recognizes residues 203–209 of human TDP-43, which form a part of the second RNA-recognition motif (RRM2, residues 193–257) of normal TDP-43 [26], but constitute part of the protease-resistant core domain of abnormal TDP-43 in ALS and FTLD-TDP-43.

RRM2 is a functional domain with distinct RNA/DNA binding characteristics. The anti-TDP-43 mAb recognized human TDP-43, but not mouse TDP-43. Site-directed mutagenesis and subsequent immunoblot analysis revealed that Glu204, Asp205 and Arg208 residues in human TDP-43 are important for the specific recognition by the mAb (Fig. 2). In fact, human TDP-43 shares 98.5% homology with mouse TDP-43 at the amino acid level, but the RRM2 domain has only 66% homology.

We also showed that one of the major epitopes of the pAb is located in almost the same region at that of the mAb (Fig. 1), although the pAb also recognizes the N-terminal region of TDP-43. Recently, TDP-43 transgenic mice overexpressing human TDP-43 have been produced as animal models of TDP-43 proteinopathy [27]. However, abnormal TDP-43 pathologies in these mice are very rare, so new transgenic or other animal models that develop abundant TDP-43 pathology are still required. Since the TDP-43 mAb recognizes human TDP-43, but not mouse TDP-43, it will be a useful reagent for the characterization of mouse lines transgenic for human TDP-43, together with phosphorylation-dependent antibodies.

Biochemical analyses of TDP-43 proteinopathies have demonstrated that abnormally phosphorylated full-length and C-terminal fragments of TDP-43 are the major species in the inclusions. The band patterns of the C-terminal fragments at 18–26 kDa are closely correlated with the clinicopathological subtypes of TDP-43 proteinopathies [17]. In addition, most of the pathogenic mutations

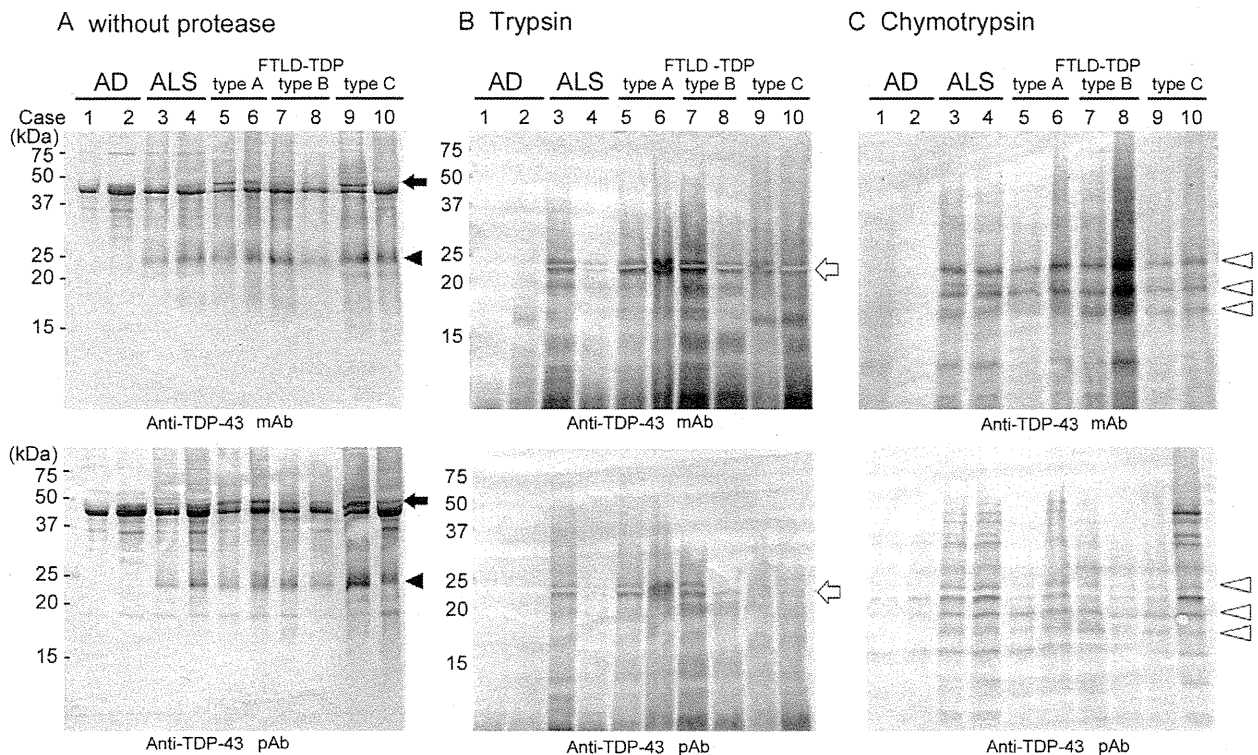


Fig. 4. Immunoblot analysis of Sarkosyl-insoluble fractions from AD and TDP-43 proteinopathies before and after protease treatment. (A) Without protease treatment, normal TDP-43 of 43 kDa was detected with these antibodies in all cases examined. In the ALS and FTLD-TDP cases, phosphorylated full-length TDP-43 of 45 kDa (arrows), high-molecular-weight smears, and the 24–26 kDa fragments (arrow heads) were detected in addition to the normal TDP-43. (B) Upon trypsin treatment, full-length TDP-43 disappeared, and the protease-resistant ~25 kDa fragments (white arrows) and smears appeared in ALS and FTLD-TDP cases, but not in AD cases. (C) After chymotrypsin treatment, triplet bands (white arrowheads) were detected in ALS and FTLD-TDP cases with the mAb and multiple bands were detected with pAb, whereas such immunoreactivities were hardly detected in AD cases.

are found in the C-terminal half of the TDP-43 [13–16]. Therefore, misfolding or structural alteration of the C-terminal half of TDP-43 seems to be the key to the pathogenesis of TDP-43 proteinopathies. By mass spectrometric analysis of the 23 kDa band in Sarkosyl-insoluble fraction from FTLD-TDP (type A), we identified the cleavage site as the N-terminus of Asp219 [23]. Another group reported cleavage at Asp208, based on N-terminal sequencing of urea extracts of FTLD-TDP brain [28]. However, the cleavage sites of the other major C-terminal fragments of 24 and 26 kDa have not been determined yet. In this study, we showed that the pathological TDP-43 C-terminal fragments of 24 and 26 kDa in ALS and FTLD-TDP type A contain the epitope of anti-TDP-43 mAb, residues 203–209, by comparing the immunoblotting results with those using pS409/410 (Fig. 3). This result suggests that the cleavage sites of pathological TDP-43 C-terminal fragments in ALS and FTLD-TDP are located at the N-terminal side of Thr203. Although the mechanisms of generation of the C-terminal fragments are still controversial, the presence of multiple cleavage sites suggests that cleavage may occur after the aggregation or assembly of TDP-43.

Structural or conformational changes in the proteins are thought to be the most important in protein aggregation in these neurodegenerative diseases. To analyze the conformational change in the epitope of TDP-43 from normal to the abnormal states further, we treated the Sarkosyl-insoluble TDP-43 with trypsin or chymotrypsin, and immunoblotted with these antibodies. The protease-resistant TDP-43 bands and smears were detected in ALS and all subtypes of FTLD-TDP with these anti-TDP-43 antibodies (Fig. 4), while no such bands were seen in AD cases. These demonstrate that the epitope is protease-resistant in the abnormal TDP-43 but not in normal TDP-43. Using an antibody pS409/410 that recognizes the C-terminal phosphorylation sites, some

protease-resistant TDP-43 bands are detected, and the band patterns are slightly different between ALS and FTLD-TDP type C [29]. On immunoblots with anti-TDP-43 pAb and mAb, such difference was not observed. This is probably due to that the epitope of the mAb and pAb is located in the amino-terminus of the protease-resistant core of the TDP-43, whereas epitope of the pS409/410 located in the C-terminus. Similar protease-resistant bands have been reported in abnormal prion in prion diseases, tau in Alzheimer's disease and alpha-synuclein in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Biochemical studies in these proteinopathies suggested that the protease-resistant bands represent the core domains of the filamentous aggregates of these proteins with cross- β structures [30–32]. By analogy with these proteins we propose that these protease-resistant C-terminal fragments represent the core of the filamentous aggregates of TDP-43. Since the epitope of the mAb and pAb are determined to locate at residues 203–209, this may be important in the formation of a core region of pathological TDP-43 aggregates which is common in all TDP-43 proteinopathies. Finally, the protease treatment used in this study may be useful for detection of the abnormal TDP-43 in brains of patients, animal models, culture cells and in vitro models with these anti-TDP-43 antibodies more specifically, as used for detection of abnormal prion proteins.

Acknowledgments

Authors thank Dr Tetsuaki Arai (Tsukuba University) for helpful advice and discussions. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (to M.H., 11000624) from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and grants from Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (to M.H.).