

201128016A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と
新規治療法創出に関する研究

(H22-難治-一般-007)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 成人
(東京都医学総合研究所)

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法創出に関する研究	1
長谷川成人	
II. 分担研究報告	
1. 患者脳、脊髄に蓄積する TDP-43 の生化学解析	7
長谷川成人	
2. 凝集核依存的な細胞内 TDP-43 蓄積による細胞死の誘導	11
野中 隆	
3. APP 細胞内領域の代謝と TDP-43 の関連性について	13
亀谷富由樹	
4. 好塩基性封入体を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS-6)の 病因蛋白質 FUS の神経細胞内局在に関する研究	17
秋山治彦	
5. グラニューリンノックアウトマウス脳の組織化学的解析	20
新井哲明	
6. TDP-43 proteinopathy 動物モデル構築への試み	23
細川雅人	
III. 研究成果の刊行物・別刷	27

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法創出に関する研究班

研究代表者：長谷川成人

東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室 参事研究員

研究要旨

本研究は ALS 患者に蓄積する TDP-43 の異常を詳細に解析し、試験管内、細胞、動物モデルを解析することにより、ALS における分子病態形成機構と運動ニューロン変性機構を明らかにすると共に、異常 TDP-43 を標的とした新しい ALS の予防、診断、治療法を創出することを目標とする研究班である。今年度は、昨年度に引き続き、ALS 及び臨床病理型が異なる FTLD-U の患者脳脊髄内の TDP-43 の解析を多数例について行い、蓄積する TDP-43 の生化学的違いを明らかにした。細胞モデルを用いた解析では、新しい「凝集核依存的な細胞内 TDP-43 蓄積モデル」を構築した。このモデルにおいて、細胞内に導入した不溶化 TDP-43 を凝集核として、野生型の全長 TDP-43 が細胞内で蓄積した。また、TDP-43 の異常がアルツハイマー病の約 30~50% に認められることから APP の細胞内領域代謝と TDP-43 との関連性について、培養細胞およびプロテオミクス的手法を用いて解析した。動物モデルでは、GRN ノックアウトマウス脳を解析した。TDP-43 の蓄積は認められなかったが、視床および脊髄の一部に p62 陽性構造が多数観察された。また GRN ノックアウトマウスと TDP-43 Tg マウスの交配マウスを作出し、TDP-43 の異常蓄積がおこるかどうか比較検討した。

研究分担者：

野中 隆	東京都医学総合研究所 病態細胞生物学研究室 副参事研究員
亀谷富由樹	東京都医学総合研究所 病態細胞生物学研究室 次席研究員
秋山 治彦	東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト 参事研究員
新井 哲明	筑波大学大学院 人間総合科学研究科 精神病態医学教室 講師
細川 雅人	東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト 主席研究員

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 及び前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTLD)患者脳に認められるタウ陰性ユビキチン陽性封入体の主要構成成分として TDP-43 が同定された。2008 年、家族性および孤発性 ALS 患者に発症と連鎖する TDP-43 の遺伝子変異が多数発見され、TDP-43 の異常が ALS 発症の原因となることが遺伝学的に証明された。TDP-43 は ALS の 90%以上を占める孤発性 ALS の変性ニューロンに認められる特徴的病理構造物の主要成分

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

あるが、他の疾患においてもかなりの割合で TDP-43 の異常が神経変性に関わっていることを示唆する。すなわち異常 TDP-43 の広がりを抑えることができれば、ALSをはじめ、TDP-43 の蓄積を伴う各種神経変性疾患の治療法開発につながると思われる。

本研究班では、ALS 患者剖検脳脊髄に蓄積する TDP-43 の詳細な解析から、TDP-43 異常蓄積の分子機構に関する情報を得ると共に、得られた情報をもとに患者脳脊髄の病態を再現する試験管内、細胞、動物モデルを構築し、ALS における分子病態形成機構と運動ニューロン変性機構を明らかにすること、さらにはそのモデルを用いて、異常 TDP-43 を標的とした新しい ALS の予防、診断、治療法を創出することを目標とする。

B. 研究方法

1. FTLD, ALS 患者剖検脳脊髄の生化学解析。

FTLD-TDP 19 例 (神経病理学的分類の type A が 6 例, type B が 8 例, type C が 5 例)の剖検脳、あるいは脊髄より、サルコシル不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体を用いたイムノブロットを行い、TDP-43 の C 末断片を比較、観察した。また、それらの脳の不溶性画分をトリプシンまたはキモトリプシンで処理した後にイムノブロットを行い、プロテアーゼ耐性 TDP-43 について各疾患におけるバンドパターンの違いを検討した。

2. 培養細胞内における異常 TDP-43 凝集体形成

予め HA タグを付加した全長 TDP-43 のプラスミドを一過性に発現した SH-SY5Y 細胞に、ALS 患者脳より調製した不溶性画分 (TDP-43 の細胞内凝集体が含まれる画分)を導入した。数日間培養したのち細胞を回収し、抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学的解析や、可溶性画分と不溶性画分に分画して抗リン酸化 TDP-43 抗体などによるイムノブロットを行った。

3. APP と TDP-43 との関係

APP の 2 種類の細胞内領域断片に相当する APPC50 および APPC59 をヒト由来の HEK 細胞発現させ、それらの細胞中のタンパク質を、トリプシン消化後、iTRAQ 試薬を用いて標識した。これらのトリプシンペプチドを混合し、イオン交換クロマトグラフィーによって分画し、各分画を逆相クロマトグラフィー質量分析器 (LC-MS/MS) を用いて解析した。

4. GRN ノックアウトマウス脳の解析

野生型(WT)、ヘテロ接合体 (HZ)、KO の 12、24 ヶ月齢の脳を固定後凍結浮遊あるいはパラフィン包埋切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。5 種類の抗 TDP-43 抗体 (リン酸化非依存性および依存性)、抗ユビキチン抗体、抗 p62 抗体を用いた。

5. TDP-43 proteinopathy モデル動物の作製

GRN-KO マウスと TDP-43 (G298S) Tg, TDP-43 (M337V)との交配を行った。脳を Tris-HCl buffer 可溶性画分、1% Triton X-100 可溶性画分、1% サルコシル可溶性画分および不溶性画分に分画し、イムノブロットを実施した。また、脳と脊髄を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後 10 μ m の厚さで切片を作製し、抗リン酸化 TDP-43 抗体により免疫組織化学染色を行った

(倫理面への配慮)

剖検脳の生化学解析は、当研究所の倫理委員会に研究の申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C. 研究結果

1. FTLD, ALS 患者剖検脳脊髄の生化学解析

解析した患者剖検脳の全例において、異常リン酸化された TDP-43 が 45 k Da に検出され、さ

らに 18~26 kDa の C 末断片のバンドが認められた。その C 末端断片のバンドパターンは、予想通り、神経病理学的な分類に一致して、それぞれ異なるバンドパターンを示した。

また、プロテアーゼ処理後の試料を電気泳動後、pS409/410 抗体を用いてイムノブロット解析を行ったところ、FTLD-TDP では、type A, B, C がそれぞれ少しずつ異なるパターンを示し、また ALS 患者の TDP-43 は FTLD の type B と同じバンドパターンを示した。

さらに、患者脳の各部位から TDP-43 を抽出し、その生化学解析を行った結果、どの部位をとっても、量の違いはあるが、その C 末端断片のバンドパターンに違いは認められなかった。

2. 培養細胞内における異常 TDP-43 凝集体形成

患者脳不溶性画分を細胞に導入することにより、本来ならば細胞内で不溶化しないプラスミド由来の HA タグの付いた全長 TDP-43 がリン酸化を受けて細胞内で凝集体を形成することが判明した。またイムノブロットにおいては、不溶性画分にタグ付きの全長 TDP-43 の蓄積および C 末端断片が顕著に検出された。特に C 末端断片のバンドパターンは、シードとして加えた ALS 患者由来の不溶性画分のバンドパターンとほぼ同じであった。この結果は、細胞内において、外から加えた凝集核依存的に可溶性 TDP-43 が蓄積することを示唆している。さらに、乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出アッセイにより、このような TDP-43 の凝集体を形成する細胞において細胞死が認められた。この結果より、細胞内において全長 TDP-43 が蓄積することにより細胞死が引き起こされる可能性が考えられる。

3. APP と TDP-43 の関係

APPC50 発現細胞ではストレス反応タンパク質、プロテアソーム関連タンパク質、リボヌク

レオタンパク質の顕著な増加と TDP-43 および ras 関連核タンパク質の減少が観察された。

APPC59 発現タンパク質では脂質代謝に関連するタンパク質およびアポトーシスに関連するタンパク質の変動が観察されたが、TDP-43 に関しては変動が見られなかった。

4. GRN ノックアウトマウス脳の解析

WT、HZ、KO の 12、24 ヶ月齢において、大脳、脳幹、脊髄に、TDP-43 陽性構造は認められなかった。一方、p62 陽性の顆粒状構造が HZ と KO の視床において認められた。陽性構造の密度は、HZ より KO に有意に多く、また 12 ヶ月齢より 24 ヶ月齢に有意に多かった。これらの p62 陽性構造の一部はユビキチンにも陽性であった。脊髄においても、24 ヶ月齢の KO にのみ、神経細胞内に p62 陽性の skein 様構造が認められた。

5. TDP-43 x GRN-KO マウスの作製

TDP-43 (G298S)/PGRN+/- マウスにおいて 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、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かった。さらに 23 ヶ月齢まで加齢させたマウスを用いてイムノブロットによる検討を行った。サルコシル不溶性画分中の TDP-43 量が TDP-43 (G298S)/PGRN+/-、TDP-43 (G298S) Tg マウスともに 9-10 ヶ月齢の時点より増えていたが、両者間での差は観察されなかった。抗リン酸化 TDP-43 による脊髄組織の免疫組織化学染色では、TDP-43 (G298S)/PGRN+/- マウスにおいて神経細胞の細胞質内に封入体が観察され、その数は TDP-43 (G298S) Tg マウスより多い傾向があった。

D. 考察

ALS 及び FTLD-TDP に蓄積する TDP-43 は、C 末断片のバンドパターンだけでなく、プロテアーゼ耐性 TDP-43 のバンドパターンが異なることが示され、病型により異なった TDP-43 の蓄積が示唆された。また ALS と FTLD-TDP type B で同一のパターンを示したことは、運動ニューロン障害の発症に共通する TDP-43 凝集体の関与が考えられた。

細胞モデルの検討では、TDP-43 の凝集体が形成され、かつ細胞死が認められるという、これまでよりも患者脳の異常を良く再現した細胞内 TDP-43 蓄積モデルの構築に成功した。このモデルでは、全長の TDP-43 の蓄積に依存した細胞死が生じており、これまでに報告のない新しいモデルであると考えられる。今後は、このアッセイ系を用いて、TDP-43 の変異と細胞死の関係について検討し、ALS 発症のメカニズムの解明を試みる。さらに、この「凝集核を細胞内に導入する」方法は、培養細胞だけでなく、マウスやラットなどの動物にも応用することが可能であると考えられるため、ALS や FTLD-U の新たな動物モデルの作製も試みる予定である。

APPC 末断片は、培養細胞およびヒト正常脳においては通常ほとんど検出されない。したがって、APPC50 断片発現 HEK 細胞においてストレス反応が生じていて、APPC50 断片が分解されている様子は、HEK 細胞のプロテオスタシスが保たれた正常な動態と考えられた。また、この正常なストレス反応時においては TDP-43 にも顕著な変動が見られたことから、TDP-43 はストレス関連タンパク質として機能していると考えられた。AD 脳では APPC 末断片が増加（蓄積）することが報告されている。本研究においても、APPC59 が細胞膜内に蓄積した際にはアポトーシス関連タンパク質の変動等が起こっており、APPC 末領域の代謝が AD 発症に

影響を与えていると考えられた。

マウスでは、GRN の欠損のみでは TDP-43 の蓄積は生じないが、p62 とユビキチンの蓄積が生じ、量的には明らかに p62 陽性構造の方が多かった。以上の結果から、少なくともマウスでは、PGRN の発現量低下により初期に誘導される主要な分子は p62 であることが示唆された。p62 は、ユビキチン化蛋白の凝集体形成を促進するが、それ自身でも凝集体を形成する。また、p62 はオートファジーによって分解され、オートファジー機能の減弱により p62 蓄積が生じる。以上から、PGRN の低下によりオートファジー系が異常を来す可能性も考えられ、さらに検討が必要と思われた。

免疫組織化学的検討では TDP-43 (G298S)/PGRN+/-マウスの脊髄神経細胞において、細胞質内にリン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体が観察された。TDP-43 (G298S) Tg マウスではほとんどの場合、TDP-43 陽性の封入体は観察されないが、(G298S)/PGRN+/-マウスでは封入体が観察され、TDP-43 proteinopathy モデル動物として期待ができる結果となった。今後は検体数を増やし、確実に ALS モデルマウスとして使用できるかどうかを検討する必要がある。

E. 結論

FTLD, ALS 患者脳、脊髄に蓄積する異常 TDP-43 の C 末端バンドパターンは、神経病理学的分類(type A~C)に一致して、異なるバンドパターンを示した。また、トリプシン、キモトリプシン耐性バンドの解析から、C 末端バンドパターンの違いは、TDP-43 の重合様式の違いによるものと考えられた。TDP-43 の構造変化(重合様式の違い)によって、その病理や臨床像が決定される可能性が考えられる。

ALS 患者脳を凝集核として、細胞内に TDP-43 の凝集体を効率よく作製することに成功した。これらの凝集体は、患者脳に見られる異常 TDP-43 の封入体と性質などが極めてよく似ており、患者

脳の異常を再現する良い細胞モデルである。

APPC50 発現細胞内でストレス反応が生じている際に TDP-43 の変動が見られた。

マウス脳では、GRN の発現低下により ALS および FTLD 患者脳に出現する細胞内封入体の構成成分である p62 の蓄積が生じる。

ALS の発症機序解明とその治療法・治療薬開発のため、TDP-43 proteinopathy モデルマウスを確立することが急務である。

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.

7. Habuchi C, et al (2011) Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification. With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy. *J Neurol Sci* 301, 77-85.

8. Ando K, et al: N-cadherin regulates p38MAPK signaling via association with JLP: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 286: 7619-28, 2011.

9. Aoki N, et al: Gray matter lesions in Nasu-Hakola disease: A report on three autopsy cases. *Neuropathology* 31: 135-143, 2011.

10. Kobayashi Z, et al: FALS with Gly72Ser mutation in SOD1 gene: report of a family including the first autopsy case. *J Neurol Sci* 300: 9-13, 2011

11. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Komachi H, Miki K, Yokota O, Arai T, Hiroto M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H: Fatal encephalitis in a case of hypereosinophilic syndrome: MRI and autopsy findings. *Intern Med* 50: 1219-1225, 2011

12. Torii Y, et al: Effects of aging on the morphologies of Heschl's gyrus and the superior temporal gyrus in schizophrenia: A postmortem

study. Schizophr Res 134: 137-142, 2012.

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.

6. Arai T, Matsuwaki T, Hasegawa M, Akiyama H, Nonaka T, Hosokawa M, Takahashi S, Mizukami K, Asada T, Nishihara M: Histopathological analysis of progranulin knockout mice. Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris,

France, July 18, 2011

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

患者脳、脊髄に蓄積する TDP-43 の生化学解析

報告者氏名：長谷川成人¹⁾、辻 浩史^{1,2)}、新井哲明²⁾、亀谷富由樹¹⁾、野中隆¹⁾、吉田眞理³⁾、初田裕幸⁴⁾、高尾昌樹⁴⁾、齊藤祐子⁵⁾、村山繁雄⁴⁾、秋山治彦¹⁾、David Mann⁶⁾、玉岡晃²⁾
所属：¹⁾ 東京都医学総合研究所、²⁾ 筑波大学、³⁾ 愛知医科大学、⁴⁾ 東京都健康長寿医療センター研究所、⁵⁾ 国立精神・神経センター、⁶⁾ Manchester University

研究要旨

昨年、患者脳脊髄に蓄積する TDP-43 のイムノブロット解析において、TDP-43 の C 末端断片バンドの違いが臨床病理型と強く相関することが示し、蓄積する TDP-43 のコンフォメーションの違いが TDP-43 の C 末端バンドパターンの違いに反映される可能性を示唆した。本年は、多数例の患者剖検脳の解析を行うことにより、この結果が正しいかどうか検証すると共に、異常リン酸化 TDP-43 の C 末端バンドパターンの違いによって客観的に疾患の分類を行うことができる可能性について検討した。その結果、異常 TDP-43 の重合状態の違いを反映し、その解析は TDP-43 異常症の分類に有用であることが示された。この結果は、一つの異常分子が患者脳内で広がって病変が進行したことを示唆する。

A.研究目的

TDP-43 は前頭側頭葉変性症 (FTLD-TDP)や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構成成分として同定されたが、両疾患に蓄積する TDP-43 は、その蓄積の分布や形態学的特徴などで、いくつかのタイプ (type A~D)に分類される。我々は、リン酸化 TDP-43 を特異的に認識する抗体(pS409/410)を用いたイムノブロット解析において、不溶性画分に検出される異常リン酸化 TDP-43 の C 末断片のバンドパターンが、少なくとも ALS と FTLD-TDP で異なることを報告した。本年度は、多数例の ALS および FTLD-TDP の剖検脳に蓄積する TDP-43 の生化学解析を行い、病理分類との関係を検討し、疾患の生化学的、客観的分類を提案する。

B.研究方法

入手が困難な inclusion body myopathy

associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia (IBMPFD, type D)の剖検脳を除く FTLD-TDP 19 例 (神経病理学的分類の type A が 6 例, type B が 8 例, type C が 5 例)を対象とした。剖検脳、あるいは脊髄より、サルコシル不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体を用いたイムノブロットを行い、TDP-43 の C 末断片を比較、観察した。また、それらの脳の不溶性画分をトリプシンまたはキモトリプシンで処理した後にイムノブロットを行い、プロテアーゼ耐性 TDP-43 について各疾患におけるバンドパターンの違いを検討した。

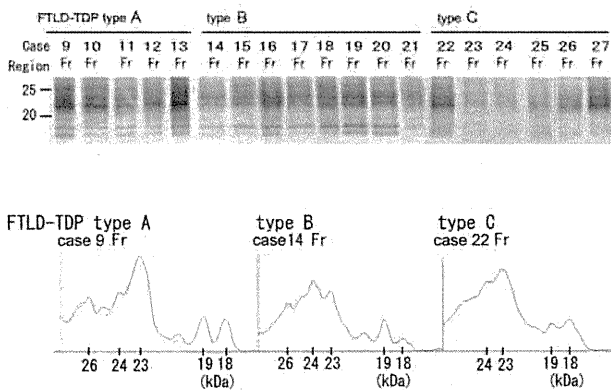
(倫理面への配慮)

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

(1) 患者脳に蓄積する異常 TDP-43 の C 末端バンドパターン

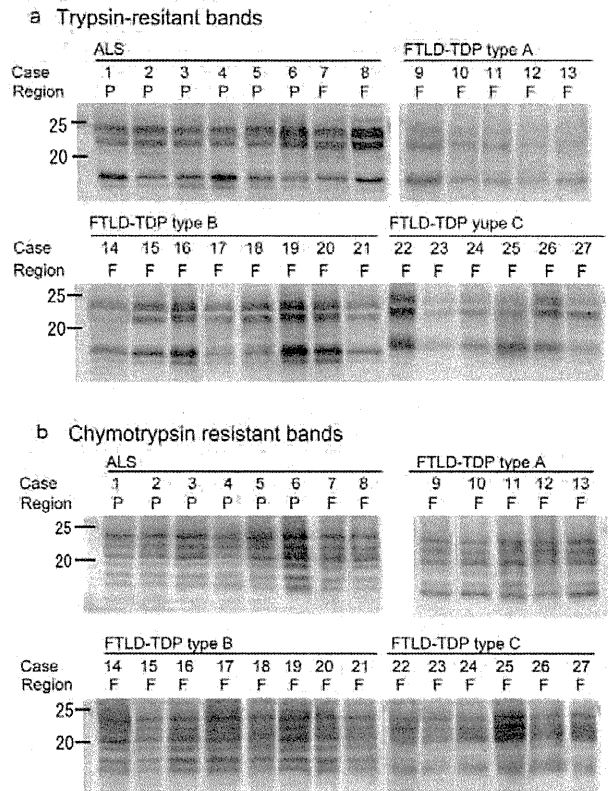
解析した患者剖検脳の全例において、異常リン酸化された TDP-43 が 45 kDa に検出され、さらに 18~26 kDa の C 末断片のバンドが認められた。その C 末断片のバンドパターンは、予想通り、神経病理学的な分類に一致して、それぞれ異なるバンドパターンを示した (下図)。



(デンシトメーター解析による TDP-43C 末端バンドパターンの違い)

(2) プロテアーゼ耐性 TDP-43 バンド

TDP-43 のバンドパターンは、FTLD-TDP の病理分類に一致して、それぞれの疾患で異なっていた。そこでこのバンドパターンの違いをさらに検討するため、不溶性画分を未変性条件で、トリプシン、あるいはキモトリプシンなどのプロテアーゼ処理を行い、プロテアーゼに耐性を示すバンドの比較を行った。この方法は、異常プリオンの検出やプリオン病の病型サブタイピングに使われる方法を参考にした。プロテアーゼ処理後の試料を電気泳動後、PVDF 膜に転写し、pS409/410 抗体を用いて免疫ブロット解析を行ったところ、FTLD-TDP では、type A, B, C がそれぞれ少しずつ異なるパターンを示し、また ALS 患者の TDP-43 は FTLD の type B と同じバンドパターンを示した (右図)。



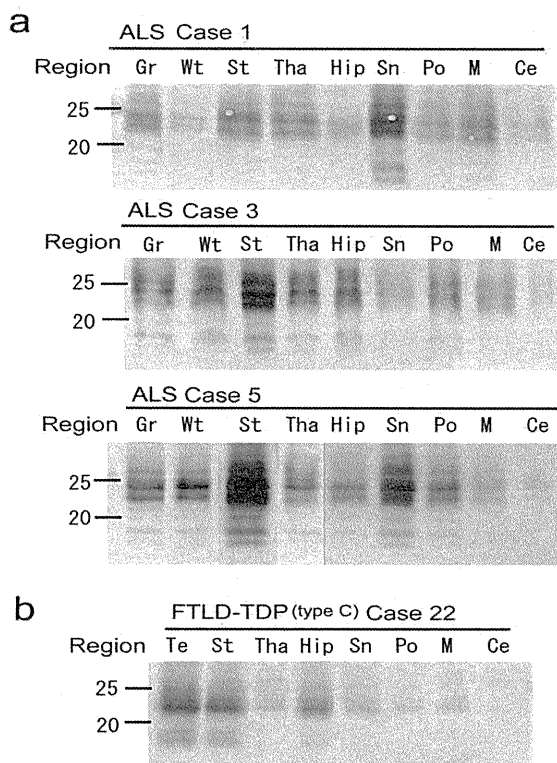
(3) 質量分析によるトリプシン耐性バンドの解析

ALS 患者に蓄積する TDP-43 と FTLD type C 患者に蓄積する TDP-43 について、そのトリプシン耐性バンド (~16kDa) の N 末端切断部位を決定したいと考えて、今度はゲル内(すなわち変性条件下)でトリプシン消化し、この消化ペプチドを LC/MS/MS 解析することにより切断部位の同定を試みた。その結果、ALS の ~16kDa TDP-43 バンドからは 276-414 と 294-414 のペプチドが、FTLD type C の 16kDa TDP-43 バンドからは 273-414 と 276-414 のペプチドが検出され、それぞれ、少し異なる部位で切断がおこっていることが示唆された。

4) ALS、FTLD 患者の脳の各部位に蓄積する TDP-43 の C 末端バンドパターン

TDP-43 の病理形態は全体的には type A~D に分類できるものの、脳の様々な部位で詳しく観察すると、その形態は、細胞の種類や部位によ

って異なっている。そこで患者脳の一部から TDP-43 を抽出し、その生化学解析を行った。その結果、どの部位をとっても、量の違いはあるが、その C 末端断片のバンドパターンに違いは認められなかった(下図)。



D. 考察

ALS 及び FTLD-TDP に蓄積する TDP-43 は、C 末断片のバンドパターンだけでなく、プロテアーゼ耐性 TDP-43 のバンドパターンが異なることが示され、病型により異なった TDP-43 の蓄積が示唆された。また ALS と FTLD-TDP type B で同一のパターンを示したことは、運動ニューロン障害の発症に共通する TDP-43 凝集体の関与が考えられた。

E. 結論

FTLD, ALS 患者脳、脊髄に蓄積する異常 TDP-43 の C 末端バンドパターンは、神経病理学的分類(type A~C)に一致して、異なるバンドパターンを示した。また、トリプシン、キモト

リプシン耐性バンドの解析から、C 末端バンドパターンの違いは、TDP-43 の重合様式の違いによるものと考えられた。TDP-43 の構造変化(重合様式の違い)によって、その病理や臨床像が決定される可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

7. Habuchi C, et al (2011) Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification. With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy. J Neurol Sci 301, 77-85.

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

凝集核依存的な細胞内 TDP-43 蓄積による細胞死の誘導

野中 隆, 長谷川成人

東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト・病態細胞生物学研究室

研究要旨

前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者脳などに見られる細胞内異常凝集体の主要な構成タンパク質として TDP-43 が見出された。今回我々は培養細胞を用いて、新しい「凝集核依存的な細胞内 TDP-43 蓄積モデル」を構築した。このモデルにおいて、細胞内に導入した不溶性 TDP-43 を凝集核として、野生型の全長 TDP-43 が細胞内で蓄積した。凝集体が形成される細胞では細胞死や TDP-43 の C 末端断片の蓄積が認められ、患者脳における異常を忠実に再現した新たな細胞モデルであると考えられる。

A. 研究目的

これまでに我々は、TDP-43 の核移行シグナルやその周辺配列を欠損した変異体や患者脳に蓄積する C 末端断片を細胞に発現すると、それらが細胞内において蓄積・凝集体を形成すること、およびそれらの凝集体は、患者脳に見られるものと同様にリン酸化およびユビキチン化を受けていることを明らかにした。しかしながら、これらの凝集体を伴う細胞には顕著な細胞死は認められず、また患者脳における生化学的特徴のひとつである C 末端断片の蓄積を伴わないなど、実際の患者脳の異常所見を忠実に再現した細胞モデルとは言い難かった。そこで、より患者脳の特徴に近い異常を有する細胞モデルの構築に取り組んだ。

B. 研究方法

最近我々は、市販のリポフェクション試薬を用いて、*in vitro* で調製したリコンビナントタンパク質の線維を培養細胞内に導入する方法を開発した。この方法を用いると、リコンビナントタンパク質の線維だけでなく、患者脳由来の界面活性剤不溶性画分（患者脳に出現する細胞内凝集体が含まれる画分）も同様に細胞内に導入できることが判明した。そこでこの方法を用いて、新たな細胞内 TDP-43 蓄積モデルの構築を試みた。予め HA タグを付加した全長 TDP-43 のプラスミドを一過性に発現した SH-SY5Y 細胞に、ALS 患者

脳より調製した不溶性画分 (TDP-43 の細胞内凝集体が含まれる画分) を導入した。数日間培養したのち細胞を回収し、抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学的解析や、可溶性画分と不溶性画分に分画して抗リン酸化 TDP-43 抗体などによるイムノブロットを行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、東京都医学総合研究所の倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

その結果、蛍光顕微鏡による観察において、本来ならば細胞内で不溶化しないプラスミド由来の HA タグの付いた全長 TDP-43 がリン酸化を受けて細胞内で凝集体を形成することが判明した。またイムノブロットにおいては、不溶性画分にタグ付きの全長 TDP-43 の蓄積および C 末端断片が顕著に検出された。特に C 末端断片のバンドパターンは、シードとして加えた ALS 患者由来の不溶性画分のバンドパターンとほぼ同じであった。この結果は、細胞内において、外から加えた凝集核依存的に可溶性 TDP-43 が蓄積することを示唆している。さらに、乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出アッセイにより、このような TDP-43 の凝集体を形成する細胞において細胞死が認められた。この結果より、細胞内において全長 TDP-43 が蓄積することにより細胞死が引き起こされる可能性が考えられる。

D. 考察

以上のように、細胞死が認められ、かつこれまでよりも患者脳の異常を良く再現した細胞内 TDP-43 蓄積モデルの構築に成功した。このモデルでは、全長の TDP-43 の蓄積に依存した細胞死が生じており、これまでに報告のない新しいモデルであると考えられる。今後は、このアッセイ系を用いて、TDP-43 の変異と細胞死の関係について検討し、ALS 発症のメカニズム(例えば、TDP-43 の loss of function あるいは gain of toxic function のどちらが関与しているか)の解明を試みる。さらに、この「凝集核を細胞内に導入する」方法は、培養細胞だけでなく、マウスやラットなどの動物にも応用することが可能であると考えられるため、ALS や FTL-D 11 の新たな動物モデルの作製も試みる予定である。

E. 結論

ALS 患者脳を凝集核として、細胞内に TDP-43 の凝集体を効率よく作製することに成功した。これらの凝集体は、患者脳に見られる異常 TDP-43 の封入体と性質などが極めてよく似ており、患者脳の異常を再現する良い細胞モデルであると言える。

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

Takahashi M, Tin Y, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, and Arai T (2012) Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* in press.

Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A, Hasegawa M (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. Comm.* 417: 116-121

Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng DC, Price KA, Liddell JR, Caragounis A, Li QX, Masters CL, Nonaka T, Hasegawa M, Bogoyevitch MA, Kanninen KM, Crouch PJ, White AR (2011) C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol. Neurodegener.* 6: 57

Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A,

Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci.* 45: 480-485

Nonaka T* and Hasegawa M.* (2011) In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases: New cellular models of neurodegenerative diseases. *Communicative & Integrative Biology.* 4: 501-502 (*: corresponding author)

2. 学会発表

野中隆、長谷川成人 TDP-43 による運動ニューロン変性の分子病態 第 52 回日本神経学会学術大会、シンポジウム 2011. 5. 20 名古屋

長谷川成人、野中隆、辻浩史、山下万喜子、増田雅美、玉岡晃、村山繁雄、新井哲明、秋山治彦；神経変性疾患における蛋白癌仮説；第 52 回日本神経学会学術大会、シンポジウム；2011. 5. 20 名古屋

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

野中隆、渡辺小百合、増田雅美、長谷川成人。(2011. 10. 5) EUROPIAN PATENT SPECIFICATION: 1964918, タンパク質重合体の重合核となりうるタンパク質またはその重合体が導入された細胞及びその製造法

出願

野中隆、鈴掛雅美、山下万貴子、秋山治彦、長谷川成人。神経変性疾患関連タンパク質の不溶性凝集体の増幅方法、出願番号：特願 2011-252522、出願日：2011 年 11 月 18 日

2. 実用新案登録

3. その他

APP 細胞内領域の代謝と TDP-43 の関連性について

報告者氏名 亀谷富由樹¹⁾

1) 財団法人東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野
認知症プロジェクト

研究要旨

TDP-43 異常蓄積が、アルツハイマー病(AD)の約 30~50% にも認められるので、その細胞内異常蓄積を解明する一手段として、AD 原因遺伝子産物アルツハイマーアミロイドタンパク質前駆体 (APP) C 末断片 (C50 および C59) を培養細胞に発現させ、プロテオミクスの手法を用いて解析した。APPC50 発現に伴うストレス反応が生じた際に TDP-43 が変動したが、APPC59 蓄積した際、つまり AD 病で見られる APP 末断片が細胞に蓄積する条件では変動が見られなかった。

A. 研究目的

TDP-43 は、前頭側頭葉変性症(FTLD-U)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)の特徴的病理所見であるユビキチン陽性封入体の主要構成タンパク質であることが知られ、細胞内に蓄積した TDP-43 はリン酸化および断片化されている。この TDP-43 異常蓄積が、アルツハイマー病の約 30~50% にも認められることが判明している。そこで、アルツハイマー病における TDP-43 の細胞内異常蓄積を解明する一手段として、アルツハイマー病原因遺伝子産物アルツハイマーアミロイドタンパク質前駆体(APP)の細胞内領域代謝と TDP-43 との関連性について、培養細胞およびプロテオミクスの手法を用いて解析した。

B. 研究方法

APP の代謝には α 、 β および γ セクレターゼが関与することが知られ、その過程で 2 種類の APP 細胞内領域断片が生成される。これらの断片代謝は、アミロイドとして細胞外に蓄積する $A\beta$ とともに、アルツハイマー病発症と密接に関連してい

ることが判明している。そこで、この 2 種類の断片に相当する APPC50 および APPC59 をヒト由来の HEK 細胞発現させ、3 日間培養後、これらの細胞からそれぞれタンパク質を抽出し、トリプシン消化を行った。その後、iTRAQ 試薬を用い、Mock 細胞由来トリプシン消化ペプチドを 114、APPC50 発現細胞由来トリプシン消化ペプチドを 115、APPC59 発現細胞由来トリプシン消化ペプチドを 116 で標識した。これらのトリプシンペプチドを混合し、イオン交換クロマトグラフィーによって分画した。さらに、各分画を逆相クロマトグラフィー質量分析器 (LC-MS/MS)を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を使用した研究で、倫理面への配慮は特にない。

C. 研究結果

電気泳動およびイムノブロットング解析により、発現させた APPC50 は細胞内ですみやかに分

解され、一方、発現させた APPC59 はすみやかに分解されず、細胞に（特に膜分画）に蓄積したことが判明した（図1）。

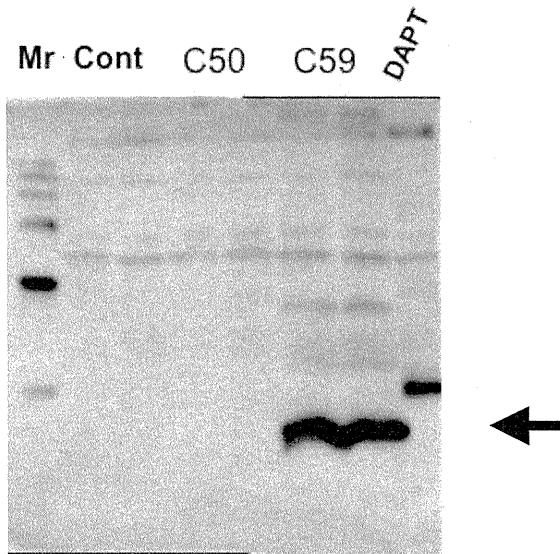


図1 発現した APPC 末断片。電気泳動したあと抗 APPC 末抗体 (R37) で検出。矢印に示したように、C50 断片はすぐに分解されてほとんど検出できない。一方、C59 は細胞、特に膜分画(data not shown)に蓄積している。

Mock コントロール、APPC50 発現、および APPC59 発現細胞のプロテオミクス解析により、APPC50 発現細胞ではストレス反応タンパク質、プロテアソーム関連タンパク質、リボヌクレオタンパク質の顕著な増加と TDP-43 および ras 関連核タンパク質の減少が観察された。APPC59 発現タンパク質では脂質代謝に関連するタンパク質およびアポトーシスに関連するタンパク質の変動が観察されたが、TDP-43 に関しては変動が見られなかった（表1）。

表1

2倍以上に増加したタンパク質

<C50>

ornithine aminotransferase precursor

H3 histone family, member M

H4 histone family, member B

RuvB-like 1

hnRNP M isoform a

hnRNP F

hnRNP A2/B1 isoform A2

hnRNP C isoform b

conserved nuclear protein NHN1

chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)

peroxiredoxin 6

similar to 60S ribosomal protein L26

proteasome activator subunit 3 isoform 2

proteasome 26S ATPase subunit 4 isoform 1

ubiquitin-conjugating enzyme E2N

coatamer protein complex, subunit alpha

clathrin heavy chain 1

calreticulin precursor

<C59>

hnRNP L isoform a

FK506-binding protein 4

carbonyl reductase 1

acyl-CoA thioesterase 7 isoform hBACHb

transgelin 2

programmed cell death 5

adenylyl cyclase-associated protein

1/2以下に減少したタンパク質

<C50>

pyruvate kinase 3 isoform 1

protein phosphatase 2 subunit Aalpha

TAR DNA binding protein

ras-related nuclear protein

<C59>

ATP citrate lyase isoform 1

p30 DBC protein

methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1

D. 考察

APPC 末断片は、培養細胞（組織）およびヒト正常脳においては通常ほとんど検出されない。したがって、APPC50 断片発現 HEK 細胞においてストレス反応が生じていて、APPC50 断片が分解されている様子は、HEK 細胞のプロテオスタシスが保たれた正常な動態と考えられた。また、この正常なストレス反応時においては TDP-43 にも顕著な変動が見られたことから、TDP-43 はストレス関連タンパク質として機能していると考えられた。AD 脳では APPC 末断片が増加（蓄積）することが報告されている。本研究においても、APPC59 が細胞膜内に蓄積した際にはアポトーシス関連タンパク質の変動等が起こっており、APPC 末領域の代謝が AD 発症に何らかの影響を与えていると考えられたが、TDP-43 との関連性は見いだせなかった。

E. 結論

APPC50 発現細胞内でストレス反応が生じている際に TDP-43 の変動が見られた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Mori M, Naiki H, Higuchi K. Amyloid fibrils formed by selective N- and C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. *Amyloid* 18, 14-16, 2011.
2. Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Kametani F, Sekijima Y, Ikeda S-i. Wild-type transthyretin significantly contributes to the formation of amyloid fibrils in familial amyloid polyneuropathy patients with amyloidogenic

transthyretin Val30Met. *Human Pathology* 42, 236-243, 2011.

3. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, et al. Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *Journal of Molecular Neuroscience*, 45, 480-485, 2011.
4. Obayashi K, Ueda M, Jono H, Yamashita T, Yazaki M, Kametani F, et al. Amyloid turnover after liver transplantation in FAP. *Amyloid*, 18, 182-184, 2011.
5. Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A. 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, 2012.
6. Akiyama H, Hosokawa M, Kametani F, Kondo H, Chiba M, Fukushima M, Tabira T. Long-term oral intake of aluminum or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in A β PP and A β PP/tau transgenic mice, *Neuropathology*, in press.
7. Machida K, Tsuchiya-Suzuki A, Sano K, Arima K, Saito Y, Kametani F, Ikeda SI. Postmortem findings in a patient with cerebral amyloid angiopathy actively treated with corticosteroid, *Amyloid*, in press.

2. 学会発表

1. Kametani F, Haga S. Proteomic analysis of cultured cells expressing APP intracellular domain. 第54回日本神経化学学会大会, 石川, 2011.9.26
2. 亀谷富由樹, 羽賀誠一. 培養細胞でのアルツハイマー病アミロイド前駆体タンパク (APP) 細胞

内ドメイン発現による変動のプロテオミクス解析, 第 30 回日本認知症学会学術集会, 東京,
2011.11.12

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)
特になし。

平成 23 年度 難治性疾患克服研究事業「筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法
創出に関する研究」
(分担) 研究報告書

好塩基性封入体を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS-6)の病因蛋白質 FUS の神経細胞内
局在に関する研究

研究分担者：秋山治彦¹⁾

研究協力者：小林 禪¹⁾、青木直哉¹⁾、河上緒¹⁾、東 晋二¹⁾

所 属：¹⁾東京都医学総合研究所

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) から前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLN) にまたがる疾患の病因蛋白質として TDP-43 が同定されたことをきっかけに、やはり RNA 結合蛋白質のひとつである FUS の遺伝子変異が若年発症で好塩基性封入体を伴う家族性 ALS (ALS-6) で見出され、同時に ALS-6 脳脊髄への FUS 異常蓄積が報告された。次いで、タウ陰性・TDP-43 陰性 FTLN の多くにも FUS 異常蓄積が見出され、FTLN-FUS と呼ばれるようになった。FUS は機能的に TDP-43 と類似の分子であり、正常では核に局在することも含めて両者には共通点が多い。しかし剖検脳・脊髄組織では、ALS-6 や FTLN-FUS において FUS の蓄積は主として細胞体における封入体の形で認められ、TDP-43 のような神経突起への異常蓄積は稀にしか観察されない。本研究では FUS がホルマリン固定で容易に抗原性を失い免疫組織化学染色が難しくなる点に着目し、短時間固定の剖検脳組織標本を用いて FUS 局在の再検討を行った。その結果、神経突起 (主として樹状突起) にも FUS が存在していること、神経変性に伴い神経突起の FUS が増加することが明らかになった。今日、タウや α シヌクレインの凝集・蓄積の過程において、分子構造の変化 (異常) が脳内で細胞から細胞に伝播すること、神経線維連絡がその経路となることが想定されている。もし同様の機序が ALS-6/FTLN-FUS においても働くのであれば、FUS は核や細胞体封入体だけでなく神経突起にも局在している必要がある。本研究の結果は FUS 蓄積症による ALS や FTLN においても異常蛋白蓄積の伝播が起こりうることを示唆している。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) から前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLN) にまたがる疾患の病因蛋白質として TDP-43 が同定されたことをきっかけに、同じく RNA 結合蛋白質である FUS の遺伝子変異が若年発症で好塩基性封入体を伴う家族性 ALS(ALS-6)の原因遺伝子として見出され、同時に ALS-6 脳脊髄への FUS 異常蓄積が報告された。その後、FTLN の 10%前後を占めるタウ陰性・TDP-43 陰性 FTLN の大多数においても FUS 陽性封入体が見出され、TDP-43 と同様、FUS も ALS から FTLN にまたがる神経変性疾患の病因蛋白質である可能性が指摘された。

従来の剖検脳組織標本の検索では、FUS は正常脳では TDP-43 同様、細胞核に局在し、ALS-6 や FTLN-FUS では病変部の神経細胞の細胞体に封入体として蓄積することが明らかになっていた。また正常の神経細胞において、核に加え、細胞体の細胞質にも少量存在することが知られている。一方、タウや α シヌクレイン、TDP-43 の場合は細胞体内の封入体に加えて神経突起への異常蓄積が認められる。本研究では FUS の抗原性がホルマリン固定により失われやすく、固定が長期にわたるほど免疫染色の染色性が低下することに着目、短時間固定の剖検脳組織標本を用いることで、FUS を高感度で検出してその局在を検討した。

B. 研究方法

本研究では剖検時に小ブロックとして切り出し、4%パラフォルムアルデヒドで短時間固定して作製した凍結切片を浮遊法により免疫染色して観察した。市販の抗 FUS 抗体からこれまでの経験にもとづきアミノ(N)末端側部分[1-50]×2種、中間部分[52-400]、[86-213]、カルボキシル(C)末端側部分[400-450]、最C末の6種類を選んで使用した。二重染色には蛍光法を用いコンフォーカルレーザー顕微鏡による観察を行った。イムノブロット、マウス脳の分画法は常法にそって行った。(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のみ剖検材料を研究に使用した。同倫理指針策定以前に剖検になった症例については、連結可能匿名化による個人情報の保護を図った上で使用した。すべての研究計画は東京都精神医学総合研究所の倫理委員会の審査承認を受けた。

C. 研究結果

ヒト脳、マウス脳の total homogenate を用いたイムノブロットにおいて、今回使用したすべての抗 FUS 抗体で約 72kDa のバンドが検出された。また検索したマウス全身臓器のすべてで FUS のバンドが認められたが、特に脳、肺、脾、精巣、胸腺で発現が多い傾向があった。

ついで、これらの抗体を用いて、対照脳(非神経疾患)の短時間固定、浮遊切片の免疫組織染色を行った。その結果、細胞核に加え、ニューロピルに微細顆粒状の陽性構造を認め、それは脳幹から小脳にかけて特に多数観察された。FUS 陽性顆粒は使用した6抗体の全てで染色されたが抗体により染色性が異なり、中間部分に対する2抗体[52-400]、[86-213]でより強く染色された。一方、N末側、C末側部分に対する抗体では顆粒の染色性は弱く、それに対して核の染色性は中間部分に対する抗体よりも強かった。樹状突起のマーカーとして MAP-2、また軸索のマーカーとしてリン酸化 neurofilaments、シナプス

のマーカーとして synaptophysin との二重染色を行ったところ、FUS 陽性顆粒は synaptophysin と部分的に重なり、時に MAP-2 陽性神経突起(樹状突起)に沿った分布を示したが、リン酸化 neurofilaments とは明らかな空間的關係は認められなかった。

上記により FUS がシナプスと関連して局在していることが示されたため、マウス脳から得たシナプトソーム分画をさらに synaptic vesicle と post-synaptic density に分けイムノブロットを行った。その結果、FUS は主として post-synaptic density 分画で検出された。

次にニューロピルの FUS 陽性顆粒が疾患脳においてどのような変化を示すかを、海馬～海馬傍回の切片において検討した。FUS 陽性顆粒は正常脳のこれらの部位ではあまり多く認められないが、TDP-43 異常蓄積による FTLD (FTLD-TDP) では顕著な増加が観察された。一方 Alzheimer 病においても FTLD-TDP ほどではないが軽度～中等度の増加が認められた。さらに1例のみであるが、FTLD-FUS は FTLD-TDP を上回る増加を示した。

D. 考察

正常脳において脳幹を中心にニューロピルにおける顆粒状の FUS 免疫染色陽性構造を認めた。同様のニューロピル顆粒は大脳にも存在していたが、正常脳では脳幹や小脳に比べて低頻度であった。二重染色、および分画法を用いた生化学解析の結果は、ニューロピルに認められる FUS 陽性顆粒状構造が主として樹状突起、特にシナプスの post synaptic density に局在していることを示した。FUS は核において RNA に結合し転写を調節していると考えられている。神経突起内への局在は、FUS が神経突起～末梢部位における転写制御にも関わっていることを示唆している。

ニューロピルの FUS 陽性顆粒は変性疾患の大脳皮質において正常対照者に比し増加する傾向を示した。その傾向は、(1例のみの検索であるので今後の複数例での検討が必要であるが) FTLD-FUS で最も