

201208002A

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 秋山 治彦

平成25年（2013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

秋山治彦

1

II. 分担研究報告

1. TDP-43蓄積病変をマウス脳内で再現する試み

長谷川成人

7

2. 前頭側頭葉変性症モデルマウス作出に向けた研究

秋山治彦

13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

17

IV. 研究成果の刊行物・別刷

18

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)、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、TDP-43 トランスジェニック(Tg)マウスと GRN ノックアウトマウスの交配による TDP-43-Tg/GRN(+/-)マウスの作製と解析を行った。また、TDP-43 過剰発現培養細胞モデルにおいて TDP-43 凝集体形成の抑制作用を示した methylene blue (MB)の in vivo における効果について、(現時点では TDP-43-Tg の TDP-43 異常蓄積は薬剤の効果判定に用いられるほど大量には生じないため)すでにモデルとして確立されている tau-Tg マウスを用いて調べた。MB は tau の in vitro 線維形成モデル、TDP-43 凝集体形成培養細胞モデルに加え、tau-Tg マウスモデルでも有効なことが明らかになり、tau や TDP-43 が凝集蓄積する疾患の創薬において、抗凝集体形成作用の“交叉”を利用しうることがわかった。本研究では、さらに、 α synuclein で成功したシード注入モデルを TDP-43 に応用するための予備的検討を行った。現時点ではヒト筋萎縮性側索硬化症 ALS や FTLD の脳脊髄由来のシードのみの注入で、観察期間も不十分なため結果は得られていないが、並行して、シードとしての作用がヒト脳脊髄由来の不溶画分より強い合成 TDP-43 凝集・線維形成体の作製をめざして、TDP-43 分子の中で凝集線維化に必須の配列部分を同定した。

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こととされ、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。本研究の最終的な目的は、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。

本年度は，これまでに開発した TDP-43-Tg マウスに GRN ノックアウト(KO)マウスを交配させることによりプログラニユリン産生を抑制し，TDP-43 病変の増加が生じるかどうか検討した (①). また，現時点では薬効判定に十分な TDP-43 蓄積を生じる TDP-43-Tg マウスモデルの作製が遅れているため，さらにヒト疾患では高頻度にタウと TDP-43 が同一症例に蓄積すること，両者の病態に多くの共通性が見られることから，*in vitro* の TDP-43 蓄積モデルでスクリーニングされた治療薬候補化合物の効果を，まず tau-Tg マウスを用いて調べた (②). さらに TDP-43 の *in vitro* 凝集系モデル確立をめざして，TDP-43 の部分配列欠損分子を培養細胞に発現させ，TDP-43 配列において凝集体形成に必須の部位を同定した (③).

B.研究方法

①TDP-43-Tg マウス (G298S 変異，および M337V 変異の 2 系統) と GRN-KO マウスとを交配させ，TDP-43(G298S)-Tg/GRN(+/-)マウスと TDP-43 (M337V)-Tg/GRN(+/-)マウスを得た．これらの系統を約 10 ヶ月齢になるまで加齢させ，脳を取り出して免疫組織化学染色と immunoblot による解析を行った．

②TDP-43 培養細胞モデルで凝集体形成抑制効果が認められた methylene blue(MB)の *in vivo* における効果を調べた．マウスモデルとしてヒト P301L 変異 tau を導入した JNPN3 系 tau-Tg を Taconic より (他系統マウスとの交配許諾を含めて) 購入，ヘテロ雌を 44 匹用意して 3 群 (MB 1mg/kg/day, 0.3mg/kg/day, 脱イオン水のみ) に分けて 5 ヶ月間の長期経口投与実験を行った．

③TDP-43 の線維化，蓄積に必須の領域を同定するため，TDP-43 の C 末端領域を 20 残基ごと

に欠損させた変異体構築して細胞に発現させ，蛍光顕微鏡観察と immunoblot により凝集体形成の有無を観察した．培養細胞に発現させると異常リン酸化，ユビキチン化された TDP-43 凝集体を形成する C 末端断片 162-414 (GFP 融合蛋白質)をもとに，20 残基欠損蛋白質の発現系を構築した．

④TDP-43 異常蓄積マウスモデルの作製をめざして，個体発生段階における導入遺伝子 (ヒト TDP-43) 過剰発現による悪影響を回避できるテトラサイクリンによる発現制御 Tg マウスの作製，ヒト剖検脳由来の凝集 TDP-43 をシードとしてマウス脳に注入するシード注入モデルマウスの作製を開始した．

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えは遺伝子組換え実験計画書を東京都医学総合研究所の当該委員会に提出して承認を得た．トランスジェニックマウスの作製および動物実験は，開始時点では東京都精神医学総合研究所の実験動物倫理委員会における審査承認を受け，その後の研究所移転・改組に伴って，東京都医学総合研究所の実験動物倫理委員会における審査承認を受け，その指針に従って実施した．

C.研究結果

①G298S 変異系統は生後すぐから後肢の不全麻痺を呈するが非進行性で，発生段階における過剰な TDP-43 発現 (ヒトとマウスの TDP-43 は機能的に交叉する) の影響が推測される．一方 M337V 変異系統は，理由は明らかではないが，目立った症状は呈さずに経過する．いずれの系統でもこれまでの検討の結果，老齢になると脊髄～脳にごく少数のリン酸化 TDP-43 蓄積を免疫組織化学染色により検出できるようになる．しかし TDP-43 の異常蓄積は量的にはごく僅かで，生化学的に検出できるほどではない．今回作製した TDP-43(G298S)-Tg/GRN(+/-)マウスと TDP-43(M337V)-Tg/GRN(+/-)マウスの脳・脊髄を免疫組織化学，生化学によ

り解析したが、異常 TDP-43 蓄積の著しい増加は認められなかった。

②JNPN3 系 tau-Tg マウスは加齢とともに脊髄・脳幹から、間脳、大脳皮質へと tau の異常蓄積が広がる。ただマウス個体間の差が大きいため、本研究では各群 10 匹以上を用い、immunoblot の結果を定量評価した。その結果、MB 1mg/kg/day 投与群では対照群に比較して異常リン酸化 tau の蓄積が有意に減少していた。

③様々な TDP-43 の部分欠損体を発現させた結果、274-293、294-313 を欠損させた場合に、発現細胞内の凝集体形成が減少した。またそれらの細胞からサルコシル不溶性画分を調製して immunoblot 解析を行ったところ、欠損のない蛋白質を発現させた場合に比べ著しい減少が確認された。さらに、この 40 アミノ酸からなるペプチドを合成し、37°C でインキュベートした結果、時間経過と共に濃度依存的に thioflavin S の蛍光が増加した。また蛍光が強い試料を電子顕微鏡により観察したところ、多数の線維が観察された。

④テトラサイクリンによるヒト TDP-43 遺伝子発現制御マウス (tetOn, tetOff 両系統) の作出に成功したが、本報告書作成段階では蛋白発現の確認までで、加齢後の解析を行いうる月齢に達したマウスはいない。また野生型マウス、ならびに TDP-43 異常蓄積を起こしやすいことが推測される遺伝的背景を持つマウス (GRN-KO および TDP-43(M337V)-Tg) にヒト疾患脳脊髄由来の不溶化&異常リン酸化 TDP-43 を含む分画を注入したが、注入後の観察期間がいずれも数ヶ月未満と短く、tau や α synuclein で有意な凝集体形成が認められるようになる時期に達したマウスは得られていない。

D. 考察

TDP-43-Tg マウスは (野生型、変異型にかかわらず) ヒト TDP-43 遺伝子を常法通り過剰発現させただけでは、ヒト疾患の病変 (TDP-43 異常

蓄積) を、治療薬開発に用いることができる (個体間で量的比較ができる) レベルで再現することはできない。本研究ではヒトで家族性 FTLD-TDP の原因となるプログリンの低下を、遺伝的に (GRN(+/-)として) TDP-43-Tg に負荷したが、そのことによる TDP-43 異常蓄積の明瞭な増加は確認できなかった。

ヒト疾患では tau の異常蓄積と TDP-43 の異常蓄積は多くの疾患において同一個体に共存する。また異常蓄積した tau と TDP-43 に生じる翻訳後修飾には共通点が多い。したがってひとつの薬剤が tau と TDP-43 両者の凝集蓄積を抑制する可能性がある。実際、本研究で用いた MB はもともと試験管内の tau 線維化を抑制する化合物として知られており、それが我々の TDP-43 凝集蓄積培養細胞モデルにおいても有効性を示すことが明らかになったものである。MB でのマウスモデルでの投与研究はこれまで行われておらず、本研究において MB の経口投与が tau の凝集蓄積を (完全にではないが) 抑制することが明らかになった。これは前述の我々の推測を裏付ける結果である。今後の創薬研究において、抗凝集体形成抑制作用の“交叉”については十分考慮する必要がある。

今後の TDP-43-Tg 作製の戦略としては、本研究④で開始した、導入遺伝子発現制御系の利用による発生段階での TDP-43 過剰の影響の回避 (今日までに複数の報告がある誕生直後から認められる TDP-43-Tg の表現型はこれによると考えられる)、tau や α synuclein で成功した[業績 #12]シード注入モデルの TDP-43 への応用などが考えられる。現在、これらの実験は進行中で結果を得られる段階には達していない。ただ、本研究で TDP-43 の C 末端の 274 番目から 313 番目までの 40 アミノ酸が TDP-43 の凝集に必要な配列であること、またそのペプチドはそれ自体でアミロイド様の線維を形成する傾向が強いことが明らかになったことから、シード注入モデルで、ヒト剖検脳由来の試料を使うよりも

はるかに効率が高い合成シードの使用への道が開かれたと考えられる。

E. 結論

創薬に使用しうる高度な TDP-43 異常蓄積を生じる TDP-43-Tg マウスの開発は、常法による変異遺伝子の導入と家族性 FTLD-TDP の原因であるプログレンリン低下の負荷だけでは難しい。導入遺伝子の過剰発現時期の制御やノックイン、シード注入モデルなどの手法を用いたモデルマウス開発研究の継続が必要である。一方、tau と TDP-43 の異常蓄積機序に何らかの共通部分があり、ひとつの薬剤が双方に有効性を示す可能性があることが確認された。これは、TDP-43-Tg マウスモデル開発が進捗していない状況における治療薬開発研究において考慮に値する知見であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akiyama H, Hosokawa M, Kametani F, Kondo H, Chiba M, Fukushima M, Tabira T (2012) Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in A β PP and A β PP/tau transgenic mice. *Neuropathology* 32:390-397.
2. Aoki N, Higashi S, Kawakami I, Kobayashi Z, Hosokawa M, Katsuse O, Togo T, Hirayasu Y, Akiyama H (2012) Localization of fused in sarcoma (FUS) protein to the post-synaptic density in the brain. *Acta Neuropathol* 124:383-394.
3. Aoki N, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Arai T, Togo T, Miyazaki H, Kondo H, Ishizu H, Uchikado H, Katsuse O, Hirayasu Y, Akiyama H (2012) Progressive nonfluent aphasia: a rare clinical subtype of FTLD-TDP in Japan. *Neuropathology* 32:272-279.
4. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Takashi Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MCN, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. A (2012). Drug-Screening Platform for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med* 4(145): 145ra104.
5. Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Gerhard A, Allsop D, Mann DM (2012) Postmortem 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* 45:188-195.
6. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M (2012) Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 2012 7(12), e52389, doi:10.1371/journal.pone.0052389
7. Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa JI, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. (2012) Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis.* 45: 188-195.
8. Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H (2012) Atypical FTLD-FUS associated with ALS-TDP: A case report. *Neuropathology* doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01325.x. [Epub ahead of print]
9. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S (2012). α -Synuclein Pathology in the Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71: 625-30.
10. Lue LF, Walker DG, Adler CH, Shill H, Tran H, Akiyama H, Sue LI, Caviness J, Sabbagh MN, Beach TG (2012) Biochemical increase in phosphorylated α -synuclein precedes histopathology of lewy-type synucleinopathies. *Brain Pathol* 22:745-756.
11. Maesako M, Uemura K, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Ando K, Kubota M, Akiyama H, Takahashi R, Kihara T, Shimohama S, Kinoshita A (2012) Gain of function by phosphorylation in Presenilin 1-mediated regulation of insulin signaling. *J Neurochem* 121:964-973.
12. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M, Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* (in press).
13. Mochizuki Y, Isozaki E, Takao M, Hashimoto T, Shibuya M, Arai M, Hosokawa M, Kawata A, Oyanagi K, Mihara B, Mizutani T (2012) Familial ALS with FUS P525L mutation: two Japanese sisters with multiple systems involvement. *J Neurol Sci* 323:85-92
14. Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa KI, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya, Y

- Kokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. (2013). Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism & Related Disorders* 19:15-20.
15. Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Lim SC, Paterson BM, Donnelly PS, Crouch PJ, White AR. (2012). Inhibition of TDP-43 accumulation by bis(thiosemicarbazonato)-copper complexes. *PLoS One* 7(8): e42277.
 16. Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M, and Hisanaga S (2012). Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32: 2430-2441.
 17. Suzuki N, Kato S, Kato M, Warita H, Mizuno H, Kato M, Shimakura N, Akiyama H, Kobayashi Z, Konno H, Aoki M (2012) FUS/TLS-immunoreactive neuronal and glial cell inclusions increase with disease duration in familial amyotrophic lateral sclerosis with an R521C FUS/TLS mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:779-788.
 18. Takahashi M, China Y, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, Arai T, (2012). Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells, *Neurosci Lett* 510 : 48– 52.
 19. Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A and 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 Commun* 417: 116–121.
 20. Tsujii H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama M, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A (2012). Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135: 3380–3391.
 21. Wang Y, Shi M, Chung KA, Zabetian CP, Leverenz JB, Berg D, Srujijes K, Trojanowski JQ, Lee VMY, Siderowf AD, Hurtig H, Litvan I, Schiess MC, Peskind E, Masuda M, Hasegawa M, Lin X, Pan C, Galasko D, Goldstein DS, Jensen PH, Yang H, Cain KC, Zhang J (2012). Phosphorylated a-Synuclein in Parkinson's Disease. *Sci Transl Med.* 4: 121ra20.
 22. 秋山治彦. 認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発. *Annual Review 神経* 2013, pp75-80
2. 学会発表
1. Arai T, Arai M, Itokawa M, Yoshida M, Tamaoka A, Kobayashi Z, Hosokawa M, Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamada M, Matsui M, Kaji R, Nakajima K, Kuwano R, Takahashi S, Asada T, Akiyama H. Screening of The SOD1, TARDBP and FUS mutations and the pathological studies in Japanese cases with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, BC, Canada 2012年7月15日
 2. Hasegawa M: Prion-like Spreading of Pathological a-synuclein in Brain. The 17th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Osaka [2012. 12. 6]
 3. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H. Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Firenze, Italy 2013年3月8日
 4. Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hasegawa M, Akiyama H. Methylene blue reduced tau phosphorylation and aggregation in P301L transgenic mice. Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, BC, Canada 2012年7月17日
 5. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Firenze, Italy 2013年3月9日
 6. Masuda-Suzukake M, Oikawa T, Hosokawa M, Nonaka T, Hasegawa M. Inoculation of recombinant alpha-synuclein fibrils can induce alpha-synuclein pathology in wild-type mice. 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester, United Kingdom 2012年9月5日
 7. Nonaka T, Suzukake M, Yamashita M, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M. Intracellular seeded aggregation and cytotoxic model of TDP-43. Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, BC, Canada 2012年7月16日
 8. 河上緒, 新井哲明, 池田研二, 大島健一, 新里和弘, 東晋二, 青木直哉, 水上勝義, 平安良雄, 秋山治彦. 老年期発症の幻覚妄想を認め, 辺縁系に高度タウ病変を呈した3剖検例. 第31回日本認知症学会(つくば, 10月26日~28日)
 9. 河上緒, 東晋二, 青木直哉, 新里和弘, 大島健一, 安野みどり, 羽賀千恵, 下村洋子, 鈴木京子, 勝瀬大海, 都甲崇, 小林禅, 辻浩史, 玉岡晃, 長谷川成人, 新井哲明, 土谷邦秋, 平安良雄, 秋山治彦. 進行性失語が前景に立った運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症の二剖検例. 第53回日本神経病理学会(新潟, 6月28日~30日)
 10. 後藤潤, 後藤昇, 秋山治彦, 塩田清二. 被殺出血が被殺の外側部分に位置する理由. 第53回日本神経病理学会(新潟, 6月28日~30日)
 11. 高橋晶, 新井哲明, 水上勝義, 近藤ひろみ, 大島健一, 新里和弘, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆. レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄のαシヌクレイン陽性構造の比較検討. 第53回日本神経病理学会(新潟, 6月28日~30日)
 12. 長谷川成人, 野中隆, 増田(鈴掛雅美, 辻浩史, 玉岡晃, 吉田眞理, 村山繁雄, 新井哲明, 秋山治彦: 「蛋白質」としての神経変性疾患. 第53回神経学会総会シンポジウム S (3) 11: 神経変性疾患の病態解明・その病態とバイオマーカーの開発を目指して, 東京 [2012. 5. 25]
 13. 長谷川成人, 野中隆, 辻浩史, 玉岡晃, 吉田眞理, 村

- 山繁雄, David Mann, 新井哲明, 秋山治彦: ALS と TDP-43 の生化学. 第 53 回神経病理学会総会シンポジウム 2 「筋萎縮性側索硬化症: TDP-43 の発見とその後」, 新潟 [2012. 6. 30]
14. 長谷川成人: 神経疾患における異常タンパク質のプロテオミクス解析. 日本プロテオーム学会 2012 年大会 シンポジウム S5 医学の最前線とプロテオミクス, 東京 [2012. 7. 27]
 15. 長谷川成人: 神経変性疾患の分子病態機序. 日本食品免疫学会 2012 年度大会 (JAFI2012) 「高齢化社会における食品免疫学の役割」シンポジウム 1 「健康寿命の延伸と食品免疫学の可能性」, 東京 [2012. 10. 16]
 16. 長谷川成人: TDP-43 と関連疾患. 第 31 回 日本認知症学会学術集会 教育講演 2 「病因仮説再考」, 筑波 [2012. 10. 26]
 17. 長谷川成人: レビー小体と α シヌクレイン. 第 6 回 レビー小体型認知症研究会 (レビー小体発見 100 周年記念大会), 横浜 [2012.11.10]
 18. 望月葉子, 川田昭広, 新井誠, 本間琢, 渡部和彦, 秋山治彦, 川上秀史, 小森隆司, 水谷俊雄, 松原四郎. 橋核の神経細胞も脱落し, FUS 陽性構造物が広範囲な変性部位に出現したが, FUS/TLS 遺伝子変異が認められなかった家族性 ALS の 1 例. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6 月 28 日~30 日)
 19. 堀映, 秋山治彦. 稀な頭部外傷 その 1: 脳銃創一急死例. 亜急性例, 生存例計 7 例の分析. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6 月 28 日~30 日)

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

TDP-43 蓄積病変をマウス脳内で再現する試み

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：鈴掛雅美¹⁾、野中隆¹⁾、下中翔太郎¹⁾、新井哲明^{2,3)}、秋山治彦²⁾ David Mann⁴⁾

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

⁵⁾ マンチェスター大学

研究要旨

TDP-43 は ALS や前頭側頭葉変性症(FTLD)の特徴的病理構造物の構成蛋白質として同定され、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が、これまでのところ野生型あるいは変異型 TDP-43 を発現するトランスジェニックマウスで患者脳に見られる病変は再現されていない。一方、 α シヌクレイン線維をマウス脳に接種することで野生型マウス脳においてその病理を再現することに成功した。そこで、患者脳不溶性画分をマウス脳に接種することで TDP-43 の病変を再現できるか検討を進めている。また、TDP-43 の線維化機構解明のため、その凝集に必要な配列を培養細胞系を用いて特定した。

A. 研究目的

TDP-43 の異常病理は孤発性 ALS の 95% 以上に認められ、その病変分布やその広がりや臨床症状との高い相関性が示されている。また TDP-43 の遺伝子 *TARDBP* 上に発症と連鎖する数多くのミスセンス変異が同定されていることから、TDP-43 の異常は、ALS の発症および症状の進行と密接な関連がある中心的分子病態といえる。従って、異常 TDP-43 の病理をマウスや動物で再現するモデルの構築が強く望まれている。我々は、細胞内の異常 TDP-43 病変が、一つの細胞で形成された後、それが細胞間を伝わって広がることにより、異常蛋白質が伝播、拡大し、病気が進行するという仮説を提唱している。最近、この仮説の実験的検証として、レビー小体型認知症やパーキンソン病の原因タンパク質である α シヌクレインの病変を遺伝子改変のない野生型マウスの脳内で再現することに成功した。

すなわち、試験管内で線維化した α シヌクレインを野生型マウスの脳に接種すると、マウス脳に発現する内在性 α シヌクレインが異常になり、細胞内に蓄積し、その病変が時間経過に伴って広がるというものである。またレビー小体型認知症の患者脳不溶性画分を野生型マウスの脳に接種しても、頻度は低いものの同じ結果を得た。この結果を受け、TDP-43 の場合においても、同様の方法により異常 TDP-43 病変を再現できる可能性が考えられる。そこでマウス脳内に異常 TDP-43 を接種する検討を行った。また、TDP-43 蓄積機構の解明、試験管内 TDP-43 凝集系の確立のため、TDP-43 の凝集、蓄積に必要な C 末端部分の配列の特定を行った。

B. 研究方法

1. 剖検脳不溶性画分のマウス脳への接種

ALS、あるいは FTLD-TDP 患者の剖検脳(ALS の場合は中心前回、FTLD の場合は側頭葉)から

サルコシル不溶性画分を調製した。少量の生理食塩水にけん濁して超音波処理により均一にし、*PGRN*-KO マウス、M337V 変異を導入したヒト TDP-43 を発現するトランスジェニックマウスの脳（黒質）、あるいは野生型マウスの脳（線条体や橋）に 5 μ L 接種した。一定期間の後、脳を採取し、ホルマリン固定後、ビブラトームで切片を作製し、免疫組織染色して観察した。接種した試料中に異常 TDP-43 が含まれるかどうかは、試料の一部を電気泳動後、リン酸化 TDP-43 を認識する pS409/410 抗体によりイムノブロットすることによって行った。

2. TDP-43 の凝集に必要な配列の同定

TDP-43 の線維化、蓄積に必須の領域を同定するため、TDP-43 の C 末端領域を 20 残基ごとに欠損させた変異体構築して細胞に発現させ、蛍光顕微鏡観察とイムノブロットによる解析により、その凝集を観察した。発現すると異常リン酸化、ユビキチン化された TDP-43 凝集体を形成する C 末端断片 162-414 (GFP 融合蛋白質) をもとに、20 残基欠損の発現系を構築した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えは遺伝子組換え実験計画書を研究所の委員会に提出して承認を得た。剖検脳の解析は、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。動物実験は、実験計画書を動物実験倫理委員会に提出して承認を得て行った。

C. 研究結果

1. ALS 患者脳不溶性画分の *PGRN*-KO マウス脳への接種

現在、免疫組織染色にて異常 TDP-43 の病変の出現があるかどうか、免疫組織染色によって検討を行っているが、接種後、6 ヶ月経過したマウスの脳には異常リン酸化 TDP-43 の病変は

認められなかった。免疫組織染色の条件やさらに加齢させたマウスでの検討を含め、今後継続的に解析を進める予定である。

2. ALS 患者脳不溶性画分の M337V-TDP-43 発現マウス脳への接種

M337V 変異型ヒト TDP-43 を発現するトランスジェニックマウスの脳の黒質に ALS 患者剖検脳不溶性画分を接種したマウスについても、同様の検討を進めているが、接種後 6 ヶ月の時点においては異常 TDP-43 の蓄積はみられていない。

3. FTLD-TDP 患者脳不溶性画分の野生型マウス脳への接種

野生型マウスの脳に FTLD-TDP 患者脳 (Type A 及び Type B) 不溶性画分を線条体、あるいは橋に接種し、リン酸化 TDP-43 の病変が出現するかどうか検討を行っている。接種後 3 ヶ月の時点では、免疫組織染色で観察した限りにおいて異常病変はみとめられていない。さらに経過観察を行いながらさらに解析を続ける予定である。

4. TDP-43 の線維化に必要な配列の同定

TDP-43 の部分欠損体を発現させ、細胞内の凝集体形成を蛍光顕微鏡で観察した結果、274-293、294-313 を欠損させた場合に、凝集体形成の著しい減少が観察された。またそれらの細胞からサルコシル不溶性画分を調製し、リン酸化 TDP-43 の蓄積量をイムノブロットで解析した結果、欠損のない対照に比べて、著しい減少が確認された。さらにこの 40 アミノ酸からなる配列のペプチドを合成し、様々な濃度に溶解し、37°C でインキュベートした結果、時間経過と共に、濃度依存的にチオフラビン S の蛍光が増加することが観察された。また蛍光が強い試料をネガティブ染色後、電子顕微鏡観察した

結果、多数の線維が観察された。以上の結果からこの TDP-43 の C 末端の 274 番目から 313 番目までの 40 アミノ酸が TDP-43 の凝集に必要な配列であること、またそのペプチドはそれ自体でアミロイド様の線維を形成する傾向が強いことが示唆された。

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、発症と連鎖する変異を導入した TDP-43 や部分欠損体を発現するトランスジェニックマウスの作製を行ってきた。系統によっては生まれつき運動異常が認められるマウスも作出されたが、その病理をみると、残念ながら患者脳に認められるような TDP-43 の異常病変は検出できなかった。この結果とこれまでに報告されている結果を総合すると、TDP-43 は野生型でも変異型でも、過剰発現することで何らかの発達異常や障害を与える可能性が高いこと、一方で長期にわたり、脳内に発現させても、マウスの寿命の間には細胞内蓄積を示すような異常は起こさないものと考えられる。

α シヌクレインを発現するトランスジェニックマウスにおいても明瞭な病理は出現しないが、最近、我々及び米国のグループにより、線維化した α シヌクレインを脳内に接種すると、容易に α シヌクレインの異常病変をマウス脳内で再現することができることが判明した。同様のことが TDP-43 やタウなどの細胞内異常蛋白全般にもあてはまる可能性が高いと考えられる。そこで TDP-43 のモデルマウス作製のため、ALS、FTLD-TDP 患者脳不溶性画分をマウス脳に接種する検討を行った。これまでのところ、接種後数ヶ月の時点では、TDP-43 の異常病変は検出されていないが、経過を観察しながら引き続き解析を続ける予定である。

線維化 α シヌクレイン接種の場合、患者脳不溶性画分を接種した場合においても病変が形

成されるが、試験管内で線維化したものを接種した場合の方が頻度高く、効率的に異常病理を形成させることがわかっている。この理由としては、試験管内で線維化した α シヌクレインの量が患者脳に蓄積する異常 α シヌクレインの量よりも圧倒的に多いことが大きな要因として考えられる。ALS、FTLD-TDP 患者脳不溶性画分を接種したマウスの場合において、このような理由により異常病理を形成しにくい可能性が考えられる。試験管内で多量の線維化 TDP-43 を調製することができれば問題の解決につながる可能性が高い。そこで TDP-43 の線維化、凝集に必要な配列を同定し、その部分を合成して線維化することを考えた。その結果、TDP-43 の C 末端 274-313 の 40 アミノ酸が TDP-43 の凝集に必要な領域として同定され、さらに合成ペプチドは濃度依存的にアミロイド様の線維を形成することが観察された。今後、この線維化した合成ペプチドをマウス脳に接種することで病態が形成されるかどうか検討する。

E. 結論

線維化 α シヌクレイン、レビー小体型認知症患者脳不溶性画分を野生型マウス脳に接種することで α シヌクレイン病変を形成させることに成功した。この結果から ALS、FTLD 患者脳不溶性画分をマウス脳に接種することにより TDP-43 の異常病変を形成できると考えられ、剖検脳から異常 TDP-43 を含む不溶性画分を調製し、マウス脳に接種する実験を開始した。

TDP-43 の凝集に必要な配列として、その C 末端 274-313 の 40 アミノ酸を特定した。274-313 の合成ペプチドは試験管内において濃度依存的にアミロイド線維を形成した。今後、そのシード能について培養細胞などで検討し、活性があればマウス脳に接種する実験を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M, Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* in press.

2). Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa KI, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya, Y Kokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. (2013). Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTLN, PSP, and CBS. *Parkinsonism & Related Disorders* 19:15-20.

3). Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M (2012) Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 2012; 7(12): e52389

4). Tsujii H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama M, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A (2012). Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135; 3380-3391.

5). Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Takashi Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D,

Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MCN, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. A (2012). Drug-Screening Platform for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med* 4(145): 145ra104.

6). Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Lim SC, Paterson BM, Donnelly PS, Crouch PJ, White AR. (2012). Inhibition of TDP-43 accumulation by bis(thiosemicarbazone)-copper complexes. *PLoS One* 7(8): e42277.

7). Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S (2012). α -Synuclein Pathology in the Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol*. 71: 625-30.

8). Wang Y, Shi M, Chung KA, Zabetian CP, Leverenz JB, Berg D, Srulijes K, Trojanowski JQ, Lee VMY, Siderowf AD, Hurtig H, Litvan I, Schiess MC, Peskind E, Masuda M, Hasegawa M, Lin X, Pan C, Galasko D, Goldstein DS, Jensen PH, Yang H, Cain KC, Zhang J (2012). Phosphorylated α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Sci Transl Med*. 4: 121ra20.

9). Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M, and Hisanaga S (2012). Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32: 2430-2441.

10). Takahashi M, China Y, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, Arai T, (2012). Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells, *Neurosci Lett* 510 : 48– 52.

11). Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa JI, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. (2012) Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis.* 45: 188-195.

12). Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A and 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 Commun* 417: 116–121.

2.学会発表

1). Hasegawa M: Prion-like Spreading of Pathological a-synuclein in Brain. The 17th Takeda Science Foundation Symposium □on Bioscience, Osaka [2012. 12. 6]

2). 長谷川成人：レビー小体と α シヌクレイン. 第6回 レビー小体型認知症研究会 (レビー小体発見100周年記念大会), 横浜 [2012.11.10]

3). 長谷川成人：非アルツハイマー型認知症研究の最前線 第2回 都医学研シンポジウム 脳神経疾患の臨床・研究の拠点形成による医療イノベーション, 東京 [2012. 11. 28]

4). 長谷川成人：TDP-43 と関連疾患. 第31回 日本認知症学会学術集会 教育講演2「病因仮説再考」, 筑波 [2012. 10. 26]

5). 長谷川成人：蓄積タンパク質の解析から発症機構の解明、治療法の開発へ. 国立精神・神経医療研究センター病院 第7回 精神医療セミナー, 東京 [2012.11.20]

6). 鈴掛雅美, 長谷川成人：異常 α シヌクレインの脳内伝播. 第3回神経科学と構造生物学の融合研究会/大阪大学蛋白質研究所セミナー, 大阪 [2012. 10. 5]

7). 長谷川成人ら：難病 ALS や若年性認知症の TDP-43 の解析、病態を解明, 日経新聞朝刊, マイナビニュースなど [2012. 9. 12]

8). 長谷川成人：神経変性疾患の分子病態機序. 日本食品免疫学会 2012 年度大会 (JAFI2012) 「高齢化社会における食品免疫学の役割」シンポジウム1「健康寿命の延伸と食品免疫学の可能性」, 東京 [2012. 10. 16]

9). 長谷川成人：神経疾患と異常タンパク質. 第13回北海道神経変性疾患治療研究会, 札幌 [2012. 9. 14]

10). 秋山治彦、長谷川成人、野中隆：「脳の老化を科学する」第10回 サイエンスカフェ in 上北沢 東京 [2012. 8. 3]

11). 長谷川成人：神経疾患における異常タンパク質のプロテオミクス解析. 日本プロテオーム学会2012年大会 シンポジウム S5 医学の最前線とプロテオミクス, 東京 [2012. 7. 27]

12). 長谷川成人：神経疾患研究とプロテオミクス. 「包括脳ネットワーク」リソース・技術開発支援拠点「神経細胞プロテオミクス」チュートリアル「神経科学へのプロテオミクスの応用」仙台 [2012. 7. 25]

13). 長谷川成人：分子間の Propagation の機序と蛋白癌仮説. 神経変性疾患に関する調査研究班 平成24年度ワークショップ Propagation 仮説最前線 - 分子から細胞、細胞から個体へ -, 東京 [2012. 7. 20]

14). 長谷川成人: 神経変性疾患は「蛋白癌」か?. 名古屋大学グローバル COE プログラム 機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点

グローバル COE 第5回国内シンポジウム, 名古屋 [2012. 7. 19]

15). 長谷川成人, 野中隆, 辻浩史, 玉岡晃, 吉田眞理, 村山繁雄, David Mann, 新井哲明, 秋山治彦 : ALS と TDP-43 の生化学. 第53回神経病理学会総会シンポジウム2 「筋萎縮性側索硬化症: TDP-43 の発見とその後」, 新潟 [2012. 6. 30]

16). 長谷川成人, 野中隆, 増田(鈴掛雅美, 辻浩史, 玉岡晃, 吉田眞理, 村山繁雄, 新井哲明, 秋山治彦 : 「蛋白癌」としての神経変性疾患. 第53回神経学会総会シンポジウム S (3) 11 : 神経変性疾患の病態解明・その病態とバイオマーカーの開発を目指して, 東京 [2012. 5. 25]

17). 長谷川成人 : 認知症研究の最前線 -異常たんぱく質を排除しろ-. 第1回 都医学研 都民講座「たんぱく質からみた健康と病気」, 東京 [2012. 4. 18]

18). 長谷川成人 : 「蛋白癌」としてのアルツハイマー病. 北海道大学 IBL 寄附講座シンポジウム, アルツハイマー病研究の進展と治療戦略. 平成23年2月23日, 札幌 [2012. 2. 23]

19). 長谷川成人 : 異常タンパク分子から解明される神経変性疾患の新しい考え方. 首都大学東京 化学コースセミナー, 東京 [2012. 2. 3]

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

前頭側頭葉変性症モデル培養細胞 マウスの作製

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⁾，新井哲明^{1,2)}，
長谷川成人³⁾，野中隆³⁾，多屋長治⁴⁾
¹⁾ 東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト
²⁾ 筑波大学大学院・精神病態医学分野
³⁾ 東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室
⁴⁾ 東京都医学総合研究所 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、TDP-43 トランスジェニック(Tg)マウスと GRN ノックアウトマウスの交配による TDP-43-Tg/GRN(+/-)マウスの作製と解析を行った。また、TDP-43 過剰発現培養細胞モデルにおいて TDP-43 凝集体形成の抑制作用を示した methylene blue の in vivo における効果について、(現時点では TDP-43-Tg の TDP-43 異常蓄積は薬剤の効果判定に用いられるほど大量には生じないため)すでにモデルとして確立されている tau-Tg マウスを用いて調べた。

A.研究目的

前頭側頭葉変性症（frontotemporal lobar degeneration: FTLD）は、脳に異常蓄積する蛋白質により FTLD-tau, FTLD-TDP, FTLD-FUS の 3 疾患に大別される。TDP-43 は細胞の核に局在する不均一核リボ蛋白質の一種で、tau 陰性 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、その遺伝子 (TARDBP) 異常は家族性 ALS の原因となる。TARDBP 変異による ALS の一部では大脳にも病変が拡がることが知られている。一方、家族性に発病する FTLD は従来、FTDP-17 と呼ばれていたが、同じ第 17 番染色体上にある tau 遺伝子 (MAPT) の変異により生じる FTLD-tau と、プログラニューリン遺伝子 (GRN) の変異により生じる FTLD-TDP の 2 病型があり、今日では前者を FTDP-17 と呼ぶことが多い。GRN 変異は結果的に正常な GRN mRNA の減少につながり、プログラ

ニューリンの産生低下が病理機序とされている。

TDP-43 はアルツハイマー病やレヴィー小体型認知症患者の約半数において大脳への蓄積が認められるほか、tau 異常蓄積疾患 (tauopathy) と呼ばれる疾患の多くに（全例ではないにせよ）蓄積することが見出されている。

これらの背景から本年度は、これまでに開発した TDP-43-Tg マウスに GRN ノックアウト(KO)マウスを交配させることによりプログラニューリン産生を抑制し、TDP-43 病変の増加が生じるかどうか検討した (①)。また、現時点では薬効判定に十分な TDP-43 蓄積を生じる TDP-43-Tg マウスモデルの作製が遅れているため、さらにヒト疾患では高頻度にタウと TDP-43 が同一症例に蓄積することから、in vitro の TDP-43 蓄積モデルでスクリーニングされた治療薬候補化合物の効果を、まず tau-Tg マウスを用いて調べた (②)。

B.研究方法

①前年度までに作製していた TDP-43-Tg マウスのうち、G298S 変異、M337V 変異の 2 系統と、GRN-KO マウス（前年度までに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行っていた）とを交配させ、TDP-43(G298S)-Tg/GRN(+/-)マウスと TDP-43(M337V)-Tg/GRN(+/-)マウスを得た。これらの系統を約 10 ヶ月齢になるまで加齢させ、脳を取り出して免疫組織化学染色と immunoblot による解析を行った。

②また TDP-43 培養細胞モデルで凝集体形成抑制効果が認められた薬剤のうち、既にヒトで使用された実績（マラリア、ヘモクロマトーシスなど）がある methylene blue(MB)を選んで in vivo における効果を調べた。マウスモデルとしてヒト P301L 変異 tau を導入した JNPN3 系 tau-Tg を Taconic より（他系統マウスとの交配許諾を含めて）購入、ヘテロ雌を 44 匹用意して 3 群（MB 1mg/kg/day, 0.3mg/kg/day, 脱イオン水のみ）に分けて 5 ヶ月間の長期経口投与実験を行った。

（倫理面への配慮）

Tg 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。これらの倫理委員会の審査結果はその後の改組に伴い、東京都医学総合研究所に引き継がれ承認された。

C.研究結果

①G298S 変異系統は生後すぐから後肢の不全麻痺を呈するが非進行性で、発生段階における過剰な TDP-43 発現（ヒトとマウスの TDP-43 は機能的に交叉する）の影響が推測される。一方 M337V 変異系統は、理由は明らかではないが、目立った症状は呈さずに経過する。いずれの系統でもこれまでの検討の結果、老齢になると脊髄～脳にごく少数のリン酸化 TDP-43 蓄積を免疫組織化学染色に

より検出できるようになる。しかし TDP-43 の異常蓄積は量的にはごく僅かで、生化学的に検出できるほどではない。今回作製した TDP-43(G298S)-Tg/GRN(+/-)マウスと TDP-43(M337V)-Tg/GRN(+/-)マウスの脳・脊髄を免疫組織化学、生化学により解析したが、異常 TDP-43 蓄積の著しい増加は認められなかった。

②JNPN3 系 tau-Tg マウスは加齢とともに脊髄・脳幹から、間脳、大脳皮質へと tau の異常蓄積が広がる。ただマウス個体間の差が大きいため、本研究では各群 10 匹以上を用い、immunoblot の結果を定量評価した。その結果、MB 1mg/kg/day 投与群では対照群に比較して異常リン酸化 tau の蓄積が有意に減少していた。

D.考察

TDP-43-Tg マウスは（野生型、変異型にかかわらず）ヒト TDP-43 遺伝子を常法通り過剰発現させただけでは、ヒト疾患の病変（TDP-43 異常蓄積）を、治療薬開発に用いることができる（個体間で量的比較ができる）レベルで再現することはできない。本研究ではヒトで家族性 FTLTDP の原因となるプログロニュリンの低下を、遺伝的に（GRN(+/-)として）TDP-43-Tg に負荷したが、そのことによる TDP-43 異常蓄積の明瞭な増加は確認できなかった。TDP-43 異常蓄積マウスモデルの作製には、より異なる手法（発現コントロールによる生育後の過剰発現やノックインなど）を試みる必要があると考えられる。

ヒト疾患では tau の異常蓄積と TDP-43 の異常蓄積は多くの疾患において同一個体に共存する。また異常蓄積した tau と TDP-43 に生じる翻訳後修飾には共通点が多い。したがってひとつの薬剤が tau と TDP-43 両者の凝集蓄積を抑制する可能性がある。実際、本研究で用いた MB はもともと試験管内の tau 線維化を抑制する化合物として知られており、それが我々の TDP-43 凝集蓄積培養細胞モデルにおいても有効性を示すことが明らかになったものである。MB でのマウスモデルで

の投与研究はこれまで行われておらず、TDP-43-Tg マウスモデルの開発が不十分な状況から、本研究では既にモデル性が確立された tau-Tg マウスを用いて in vivo における有効性の検証を行った。

MB の経口投与は tau の凝集蓄積を完全に抑制することはできなかったが、統計学的に有意な凝集形成抑制作用を示し、我々の仮説を支持する結果となった。今後の創薬研究において、このような有効性の“交叉”は治療薬開発の効率を上げるために十分考慮する必要がある。

E. 結論

創薬に使用しうる高度な TDP-43 異常蓄積を生じる TDP-43-Tg マウスの開発は、常法による変異遺伝子の導入と家族性 FTLT-DTP の原因であるプログラニューリン低下の負荷だけでは難しい。導入遺伝子の過剰発現時期の制御やノックインなどの手法を組み合わせた開発継続が必要である。一方、tau と TDP-43 の異常蓄積機序に何らかの共通部分があり、ひとつの薬剤が双方に有効性を示す可能性があることが確認された。これは、TDP-43-Tg マウスモデル開発が進捗していない状況に置ける治療薬開発研究において考慮に値する知見であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M (2012) Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 2012 7(12), e52389, doi:10.1371/journal.pone.0052389
2. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A. (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain*

doi:10.1093/brain/aws230 [Epub ahead of print]

3. Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H (2012) Atypical FTLT-FUS associated with ALS-TDP: A case report. *Neuropathology* doi:10.1111/j.1440-1789.2012.01325.x. [Epub ahead of print]
4. Suzuki N, Kato S, Kato M, Warita H, Mizuno H, Kato M, Shimakura N, Akiyama H, Kobayashi Z, Konno H, Aoki M (2012) FUS/TLS-immunoreactive neuronal and glial cell inclusions increase with disease duration in familial amyotrophic lateral sclerosis with an R521C FUS/TLS mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:779-788.
5. Aoki N, Higashi S, Kawakami I, Kobayashi Z, Hosokawa M, Katsuse O, Togo T, Hirayasu Y, Akiyama H (2012) Localization of fused in sarcoma (FUS) protein to the post-synaptic density in the brain. *Acta Neuropathol* 124:383-394.
6. Maesako M, Uemura K, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Ando K, Kubota M, Akiyama H, Takahashi R, Kihara T, Shimohama S, Kinoshita A (2012) Gain of function by phosphorylation in Presenilin 1-mediated regulation of insulin signaling. *J Neurochem* 121:964-973.
7. Lue LF, Walker DG, Adler CH, Shill H, Tran H, Akiyama H, Sue LI, Caviness J, Sabbagh MN, Beach TG (2012) Biochemical increase in phosphorylated alpha-synuclein precedes histopathology of lewy-type synucleinopathies. *Brain Pathol* 22:745-756.
8. Akiyama H, Hosokawa M, Kametani F, Kondo H, Chiba M, Fukushima M, Tabira T (2012) Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in A6PP and A6PP/tau transgenic mice. *Neuropathology* 32:390-397.
9. Aoki N, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Arai T, Togo T, Miyazaki H, Kondo H, Ishizu H, Uchikado H, Katsuse O, Hirayasu Y, Akiyama H (2012) Progressive nonfluent aphasia: a rare clinical subtype of FTLT-TDP in Japan. *Neuropathology* 32:272-279.
10. Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Gerhard A, Allsop D, Mann DM (2012) Postmortem cerebrospinal fluid alpha-synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other alpha-synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 45:188-195.
11. Mochizuki Y, Isozaki E, Takao M, Hashimoto

T, Shibuya M, Arai M, Hosokawa M, Kawata A, Oyanagi K, Mihara B, Mizutani T (2012) Familial ALS with FUS P525L mutation: two Japanese sisters with multiple systems involvement. J Neurol Sci 323:85-92

12. 秋山治彦. 認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発. Annual Review 神経 2013, pp75-80

2.学会発表

1. 高橋晶, 新井哲明, 水上勝義, 近藤ひろみ, 大島健一, 新里和弘, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆. レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄の α シヌクレイン陽性構造の比較検討. 第53回日本神経病理学会(新潟, 6月28日~30日)
2. 堀映, 秋山治彦. 稀な頭部外傷 その1: 脳銃創一急死例. 亜急性例, 生存例計7例の分析. 第53回日本神経病理学会(新潟, 6月28日~30日)
3. 河上緒, 東晋二, 青木直哉, 新里和弘, 大島健一, 安野みどり, 羽賀千恵, 下村洋子, 鈴木京子, 勝瀬大海, 都甲崇, 小林禅, 辻浩史, 玉岡晃, 長谷川成人, 新井哲明, 土谷邦秋, 平安良雄, 秋山治彦. 進行性失語が前景に立った運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症の2剖検例. 第53回日本神経病理学会(新潟, 6月28日~30日)
4. 後藤潤, 後藤昇, 秋山治彦, 塩田清二. 被殻出血が被殻の外側部分に位置する理由. 第53回日本神経病理学会(新潟, 6月28日~30日)
5. 望月葉子, 川田昭広, 新井誠, 本間琢, 渡部和彦, 秋山治彦, 川上秀史, 小森隆司, 水谷俊雄, 松原四郎. 橋核の神経細胞も脱落し, FUS陽性構造物が広範囲な変性部位に出現したが, FUS/TLS 遺伝子変異が認められなかった家族性ALSの1例. 第53回日本神経病理学会(新潟, 6月28日~30日)
6. 河上緒, 新井哲明, 池田研二, 大島健一, 新里和弘, 東晋二, 青木直哉, 水上勝義, 平安良雄, 秋山治彦. 老年期発症の幻覚妄想を認め, 辺縁系に高度タウ病変を呈した3剖検例. 第31回日本認知症学会(つくば, 10月26日~28日)

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】

原著

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DMA, Hasegawa M	Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain	Brain	136	1128-1138	2013
Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M	Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice	PLoS One	7(12)	e52389	2012
Aoki N, Higashi S, Kawakami I, Kobayashi Z, Hosokawa M, Katsuse O, Togo T, Hirayasu Y, Akiyama H	Localization of fused in sarcoma (FUS) protein to the post-synaptic density in the brain.	Acta Neuropathol	124	383-394	2012
Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A	Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy	Brain	135	3380-3391	2012

総説

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
秋山治彦	認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発	Annual Review 神経 2013		75-80	2013

Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain

Masami Masuda-Suzukake,¹ Takashi Nonaka,¹ Masato Hosokawa,² Takayuki Oikawa,¹ Tetsuaki Arai,³ Haruhiko Akiyama,² David M.A. Mann⁴ and Masato Hasegawa¹

- 1 Department of Neuropathology and Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan
- 2 Dementia Research Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8506, Japan
- 3 Department of Psychiatry, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan
- 4 Centre for Clinical and Cognitive Neuroscience, Institute of Brain Behaviour and Mental Health, University of Manchester, Salford M6 8HD, Manchester, UK

Correspondence to: Masato Hasegawa, Ph.D.
Department of Neuropathology and Cell Biology,
Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,
2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku,
Tokyo 156-8506,
Japan
E-mail: hasegawa-ms@igakuken.or.jp

α -Synuclein is the major component of filamentous inclusions that constitute the defining characteristic of neurodegenerative α -synucleinopathies. However, the molecular mechanisms underlying α -synuclein accumulation and spread are unclear. Here we show that intracerebral injections of sarkosyl-insoluble α -synuclein from brains of patients with dementia with Lewy bodies induced hyperphosphorylated α -synuclein pathology in wild-type mice. Furthermore, injection of fibrils of recombinant human and mouse α -synuclein efficiently induced similar α -synuclein pathologies in wild-type mice. C57BL/6J mice injected with α -synuclein fibrils developed abundant Lewy body/Lewy neurite-like pathology, whereas mice injected with soluble α -synuclein did not. Immunoblot analysis demonstrated that endogenous mouse α -synuclein started to accumulate 3 months after inoculation, while injected human α -synuclein fibrils disappeared in about a week. These results indicate that α -synuclein fibrils have prion-like properties and inoculation into wild-type brain induces α -synuclein pathology *in vivo*. This is a new mouse model of sporadic α -synucleinopathy and should be useful for elucidating progression mechanisms and evaluating disease-modifying therapy.

Keywords: α -synuclein; Lewy bodies; Parkinson's disease; propagation

Introduction

Filamentous inclusions composed of α -synuclein in nerve cells or glial cells are the defining neuropathological feature of a group of neurodegenerative diseases including Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple-system atrophy (Goedert, 2001). In these so-called α -synucleinopathies, α -synuclein is deposited in a hyperphosphorylated form with β -sheet-rich, fibrillar

structure (Spillantini *et al.*, 1997, 1998; Baba *et al.*, 1998; Wakabayashi *et al.*, 1998; Fujiwara *et al.*, 2002). Missense mutations (A30P, E46K and A53T) in the α -synuclein gene (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kruger *et al.*, 1998; Zarranz *et al.*, 2004) and duplications of the region (Singleton *et al.*, 2003; Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Ibanez *et al.*, 2004,) have been identified in familial forms of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, indicating that abnormalities of α -synuclein cause

Received November 24, 2012. Revised January 11, 2013. Accepted January 14, 2013. Advance Access publication March 6, 2013

© The Author (2013). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.