

types of TDP-43 molecules constitute the distinct types of pathologies of TDP-43 and determine the clinicopathological phenotypes of TDP-43 proteinopathies. In TDP-43 histopathology, ALS is considered to represent a distinct pathological subtype because the distribution of TDP-43 inclusions is different from that of FTLD-TDP (Mackenzie *et al.*, 2006a). However, as shown in this study, the TDP-43 accumulations in ALS and FTLD-TDP type B are biochemically indistinguishable. In fact, clinical and histopathological motor neuron disease is often present in cases with FTLD-TDP type B histology. In the three types of phosphorylated C-terminal TDP-43 banding pattern, the pattern seen in FTLD-TDP type C is the most distinctive, lacking the 26 kDa band detected in ALS, FTLD-TDP type A and type B cases (Fig. 1). The clinical diagnosis of the FTLD-TDP type C cases was semantic dementia in every instance, consistent with other studies showing this type of histology to be associated with semantic dementia (Mackenzie *et al.*, 2006a). FTLD is clinically classified into frontotemporal dementia, demantic dementia and progressive non-fluent aphasia, based on topographical distributions of degeneration (Neary *et al.*, 1998). In frontotemporal dementia, the bilateral frontal and temporal lobes are affected, whereas the bilateral temporal lobes are affected in semantic dementia and the left hemisphere in progressive non-fluent aphasia. Present data showing the most distinctive pattern of abnormal TDP-43 in type C indicate that semantic dementia may be biochemically different from frontotemporal dementia. Similar differences in tau fragment banding patterns have been shown between progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration (Arai *et al.*, 2004). Progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration are neurodegenerative diseases that are characterized by intracytoplasmic aggregates of hyperphosphorylated tau with four microtubule-binding repeats, with distinctive pathological features. Immunoblot analysis of Sarkosyl-insoluble tau demonstrated that a 33 kDa C-terminal fragment of tau band predominated in progressive supranuclear palsy, whereas two closely related bands of ~37 kDa predominated in corticobasal degeneration. The clinicopathological subtypes of these diseases may be explained by different conformations of protein aggregates or species of abnormal proteins.

Unfortunately, we were unable to obtain brain tissue samples from patients with FTLD-TDP type D (associated with *VCP* mutation; Cairns *et al.*, 2007b; Neumann *et al.*, 2007). However, because the deposition of abnormal TDP-43 in this disorder is mostly within neuronal nuclei, it is possible that the conformation of abnormal TDP-43 in FTLD-TDP type D may also differ from that in FTLD-TDP types A–C. Familial ALS and FTLD-TDP cases in which known mutations [*GRN* (Baker *et al.*, 2006) or *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011)] were examined in this study. In FTLD-TDP due to *GRN* mutations, type A pathology is exclusively seen (Mackenzie *et al.*, 2006b; Cairns *et al.*, 2007b; Josephs *et al.*, 2007). All our cases with FTLD with *GRN* mutation showed the same C-terminal banding patterns of phosphorylated TDP-43 corresponding to type A histology. Some recent studies describing the clinical and pathological features of cases of FTLD-TDP with hexanucleotide repeat expansions in *C9ORF72* reported that many of the 'pure' frontotemporal dementia cases had type A pathology, whereas many of the combined frontotemporal dementia and motor neuron disease

cases had type B pathology (Murray *et al.*, 2011; Boeve *et al.*, 2012; Hsiung *et al.*, 2012; Mahoney *et al.*, 2012; Simon-Sanchez *et al.*, 2012; Snowden *et al.*, 2012). Present cases with *C9ORF72* expansions included one case of ALS, one case of pure frontotemporal dementia with type A pathology, and two cases of frontotemporal dementia with motor neuron disease and type B pathology. The C-terminal banding pattern of these cases with familial ALS and frontotemporal dementia with motor neuron disease was not different from that in the sporadic ALS and FTLD-TDP type B cases, and that of the frontotemporal dementia case was not different from that in the cases with *GRN* mutation. Therefore, expansions in *C9ORF72* do not seem to influence the various types of TDP-43 C-terminal banding pattern or histological type of TDP-43 pathology.

Immunohistochemical studies using TDP-43 antibodies have shown that pathological TDP-43 is present throughout many CNS areas in ALS, suggesting that ALS does not selectively affect only the motor system, but is rather a multisystem neurodegenerative TDP-43 proteinopathy (Geser *et al.*, 2008). We also confirmed this viewpoint, immunohistochemically and biochemically, finding the same disease characteristic C-terminal fragment (banding) patterns of phosphorylated TDP-43 within the cerebral cortex, spinal cord and the other different brain regions in ALS. Although the types of pathological structures or their morphologies detected on immunohistochemistry analysis appeared different, the banding patterns for the C-terminal fragments were the same in all regions examined in three patients with ALS. This was also true for the one case with FTLD-TDP type C, where the same banding pattern of the C-terminal fragments was detected in several different brain regions beyond the frontal cortex (Fig. 3). These results strongly suggest that the same abnormal TDP-43 molecule is deposited in different brain regions in ALS (and probably also in FTLD-TDP type B) and FTLD-TDP type C, although we need to examine whether this is also true for cases with FTLD-TDP type A. Importantly, the extent of the abnormal protein pathology is closely correlated with the disease progression, such as Alzheimer's disease in tauopathies (Braak and Braak, 1991), and Parkinson's disease in α -synucleinopathies (Braak *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2003). However, the molecular mechanisms governing different clinicopathological phenotypes of these neurodegenerative diseases and their progression are poorly understood. Recent studies using cellular or animal models have suggested that aggregation-prone proteins, such as tau and α -synuclein, can spread to other cells and brain regions like prion disorders (Clavaguera *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2009; Nonaka *et al.*, 2010). The spreading of α -synuclein lesions to the grafts is also observed in Parkinson's disease brains after transplantation (Li *et al.*, 2008). However, it remains to be clarified whether the 'propagating' abnormal protein species represents a distinct 'strain type' that can be differentiated by molecular criteria in human patients or whether the species are the same in different brain regions.

We have also shown that the banding patterns of protease-resistant fragments of phosphorylated TDP-43 are similarly different in accordance with the banding patterns seen in untreated C-terminal fragments, confirming the direct link between neuropathological subtypes and biochemical banding patterns. The mass spectrometric analysis indicated that the protease resistant regions

of abnormal TDP-43 are different between the diseases. As abnormally phosphorylated TDP-43 has been shown to accumulate in a filamentous form in ALS spinal cords (Hasegawa *et al.*, 2008), the filament core regions may be different between the diseases. Protease-resistant bands, and differences in banding patterns, have been reported in the prion diseases, Creutzfeldt–Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy (Collinge *et al.*, 1996). Protease-resistant prion protein extracted from cases with new-variant Creutzfeldt–Jakob disease showed a different and characteristic pattern from that in cases with sporadic Creutzfeldt–Jakob disease, with the banding pattern being indistinguishable from that of mice infected with bovine spongiform encephalopathy prion. Protease-treated prion protein species are thought to have different mobilities because of different conformations. These observations in prion disease suggest that the different banding patterns to the abnormal TDP-43 fragments in ALS and FTLD might represent different TDP-43 strains with different conformations.

Recently, TDP-43 pathology has been detected in some cases with Alzheimer's disease (Arai *et al.*, 2009). We have shown here that the banding patterns of TDP-43 in cases of Alzheimer's disease with TDP-43 pathology are the same as those in FTLD-TDP type A. These novel observations suggest a biochemical commonality between FTLD and Alzheimer's disease with respect to TDP-43 pathology.

The results shown in this study also suggest a molecular basis for the clinicopathological classification of TDP-43 proteinopathies, which complements the histological classifications (Mackenzie *et al.*, 2011).

Funding

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.).

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Arai T, Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, et al. Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2009; 117: 125–36.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 602–11.
- Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Nonaka T, Hasegawa M, Ishiguro K, et al. Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration. *Ann Neurol* 2004; 55: 72–9.
- Armstrong RA, Ellis W, Hamilton RL, Mackenzie IR, Hedreen J, Gearing M, et al. Neuropathological heterogeneity in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy: a quantitative study of 94 cases using principal components analysis. *J Neural Transm* 2010; 117: 227–39.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006; 442: 916–19.
- Boeve BF, Boylan KB, Graff-Radford NR, DeJesus-Hernandez M, Knopman DS, Pedraza O, et al. Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. *Brain* 2012; 135: 765–83.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239–59.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197–211.
- Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* 1994; 124 (Suppl): 96–107.
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ, et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 2007a; 114: 5–22.
- Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, et al. TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am J Pathol* 2007b; 171: 227–40.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 909–13.
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996; 383: 685–90.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245–56.
- Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 2009; 284: 12845–52.
- Geser F, Brandmeir NJ, Kwong LK, Martinez-Lage M, Elman L, McCluskey L, et al. Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65: 636–41.
- Geser F, Martinez-Lage M, Robinson J, Uryu K, Neumann M, Brandmeir NJ, et al. Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch Neurol* 2009; 66: 180–9.
- Gitcho MA, Bigio EH, Mishra M, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, et al. TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 633–45.
- Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008; 64: 60–70.
- Hsiung GY, DeJesus-Hernandez M, Feldman HH, Sengdy P, Bouchard-Kerr P, Dwosh E, et al. Clinical and pathological features of familial frontotemporal dementia caused by C9ORF72 mutation on chromosome 9p. *Brain* 2012; 135: 709–22.
- Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, et al. Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTLD-U and ALS. *FEBS Lett* 2008; 582: 2899–904.
- Josephs KA, Ahmed Z, Katsuse O, Parisi JF, Boeve BF, Knopman DS, et al. Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with progranulin gene (GRN) mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 142–51.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008; 40: 572–4.

- Kovacs GG, Murrell JR, Horvath S, Haraszti L, Majtenyi K, Molnar MJ, et al. TARDBP variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea. *Mov Disord* 2009; 24: 1843–7.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008; 14: 501–3.
- Mackenzie IR, Baborie A, Pickering-Brown S, Du Plessis D, Jaros E, Perry RH, et al. Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: classification and relation to clinical phenotype. *Acta Neuropathol* 2006a; 112: 539–49.
- Mackenzie IR, Baker M, Pickering-Brown S, Hsiung GY, Lindholm C, Dwosh E, et al. The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. *Brain* 2006b; 129: 3081–90.
- Mackenzie IR, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, et al. A harmonized classification system for FTL-DTP pathology. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 111–13.
- Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, et al. Frontotemporal dementia with the *C9ORF72* hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 2012; 135: 736–50.
- Murray ME, DeJesus-Hernandez M, Rutherford NJ, Baker M, Duara R, Graff-Radford NR, et al. Clinical and neuropathologic heterogeneity of c9FTD/ALS associated with hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72*. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 673–90.
- Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998; 51: 1546–54.
- Neumann M, Mackenzie IR, Cairns NJ, Boyer PJ, Markesbery WR, Smith CD, et al. TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with *VCP* gene mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 152–7.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130–3.
- Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of α -synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 2010; 285: 34885–98.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257–68.
- Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, Fujiwara H, Koyama S, Sawabe M, et al. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 644–54.
- Simon-Sanchez J, Dopper EG, Cohn-Hokke PE, Hukema RK, Nicolaou N, Seelaar H, et al. The clinical and pathological phenotype of *C9ORF72* hexanucleotide repeat expansions. *Brain* 2012; 135: 723–35.
- Snowden JS, Rollinson S, Thompson JC, Harris JM, Stopford CL, Richardson AM, et al. Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with *C9ORF72* mutations. *Brain* 2012; 135: 693–708.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668–72.
- Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A, et al. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without *SOD1* gene mutation. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 535–42.

Annual Review 神経 2013

2013年1月25日 発行

中外医学社

□ II. 本年の動向

3) 認知症疾患モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発

東京都医学総合研究所認知症プロジェクトプロジェクトリーダー 秋山治彦

key words TAR-DNA binding protein 43 (TDP-43), transgenic mouse model, frontotemporal lobar degeneration (FTLD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

要 旨

タウ陰性前頭側頭葉変性症や筋萎縮性側索硬化症ではTDP-43異常蓄積が病理プロセスの上流に位置すると考えられている。マウスにTDP-43遺伝子を導入・過剰発現させてこれら疾患のモデルを作製することが試みられているが、これまでに得られたTDP-43トランスジェニックマウスはヒト疾患の病態を十分再現できているとは言い難い。TDP-43の神経細胞における過剰発現は神経細胞の変性を引き起こし、症状として運動機能障害を呈するが、このような効果はTDP-43遺伝子変異の有無にかかわらず生じる。また、症状発現と中枢神経系におけるTDP-43異常蓄積の多寡との関係も明らかではない。TDP-43異常が疾患を引き起こす機序がloss-of-functionであるのか、あるいはtoxic gain-of-functionであるのかなども含め、今後に残された課題は多い。

動 向

2006年秋に、タウ陰性ユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白質がTAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) であることが明らかになった際、同

時に、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) にもTDP-43異常蓄積が生じていることが報告された。病理組織学的には、ALS脊髄運動ニューロンに認められるユビキチン陽性のスケイン様封入体や円形封入体がTDP-43陽性を示す。これらの封入体に蓄積したTDP-43は、凝集・不溶化、異常リン酸化、C末断片形成など、TDP-43蓄積によるFTLD (FTLD-TDP) と同様の生化学的修飾を受けている。こうしてFTLD-TDPとALSは、TDP-43蓄積症 (proteinopathy) という単一の病態が、認知症と運動障害という、それぞれ異なる現れ方をしたのではないかと考えられるようになった。

もしそうであればTDP-43 proteinopathyを再現するモデル動物の作製は、これら疾患の治療法開発の鍵となる。家族性ALSの一部がTDP-43遺伝子 (*TARDBP*) 変異により生じることが報告されて、TDP-43が病因蛋白質であるという説はさらに確かなものになった。これまでにTDP-43 proteinopathyモデル動物は、ショウジョウバエからサルに至るまで様々な動物種で作製が試みられ、それぞれに成果を挙げているが、A β やタウのような確立されたモデルはまだ得られていないように思われる。本稿では特にマウスモデルに焦

点を絞って現状を概説するが、執筆時点までに報告された10を超える多様なトランスジェニック (Tg) マウス系統での知見には、系統間あるいは研究者間で一致していない部分が多く存在する。遺伝子導入によるTDP-43の過剰発現は、多くの場合、マウスに運動機能障害を起こすが、TDP-43異常蓄積という点ではこれらのマウスの所見は一貫しておらず、かつ厳密な意味でヒト疾患と同様のTDP-43異常蓄積を再現しているとは言い難い。

A. TDP-43の異常

FTLDやALS患者脳脊髄におけるTDP-43異常蓄積にはいくつかの特徴がある。TDP-43は不均一核内リボ蛋白質ファミリーに属する蛋白質で、N末側に核移行シグナル (nuclear localization signal: NLS) を有し (アミノ酸残基78~84番目)、正常細胞では主として核に局在する。しかしTDP-43 proteinopathyの脳脊髄において細胞質に封入体を形成した細胞の核ではTDP-43は著しく減少し、病理組織標本の免疫組織化学染色ではほとんど検出されなくなる。TDP-43の生理機能は十分明らかにされてはいないが (転写やスプライシング、翻訳などのプロセスにおける調節に関わると考えられている)、異常細胞における核からの消失という所見は、TDP-43の機能が失われることで細胞が変性に陥るとするloss-of-function説の根拠となっている。

また異常蓄積したTDP-43はsarkosylなどの界面活性剤に対して不溶性になるとともに、異常リン酸化、ユビキチン化といった修飾を受ける。さらにN末側が切断されて、分子量約18~26kDaの複数のC末側断片が形成され、このC末側断片が、不溶化して蓄積したTDP-43のかかなりの割合を占める。こういった変化は、タウや α シヌクレインの異常蓄積と共通している。このように、局

在も機能も大きく異なるいくつかの蛋白質が同じような変化を受けて過剰に蓄積することと神経細胞変性とは関連していることから、TDP-43の場合も異常蓄積が細胞障害性に作用すると考えるtoxic gain-of-function説もある。

いずれにせよ、こういった疾患脳脊髄で認められる変化は、モデル作製の際のツールとなったり、あるいは作られたモデルがどこまでヒト病変を再現しているかという検証に用いられたりするという点で、疾患を解決するための研究の基盤となる情報である。

B. TDP-43遺伝子 (*TARDBP*) 変異

家族性に発症するALSの中にALS-10と呼ばれていた群があり、2008年に*TARDBP*変異が原因であることが明らかになった。*TARDBP*変異によるALSは家族性ALSの数%、孤発性ALSの1%前後を占めるに過ぎないが、孤発性ALSや*C9orf72*のリピート伸長によるALSとは、TDP-43の異常蓄積という点で共通の病理変化を持つ。言い換えると、ALSの大半は*TARDBP*変異による家族性ALSと同じ病態にもとづき発病している可能性が高い。ALSの原因となる*TARDBP*変異は多数見出されているが、そのほとんどがTDP-43のC末側部分に存在する。ただ、*TARDBP*変異がどのような機序で発病に結びつくかは不明である。この点はTgマウスの作製、解析によっても明確な答は得られていない。また*TARDBP*変異がFTDのみという病型をとることは稀で、ほとんどの家系はALSの病型をとるが、この理由もわかっていない。ただ、*TARDBP*変異の発見はTDP-43異常が病因であるという考え方の重要な根拠となり、さらに、タウやA β 前駆体蛋白質の病因遺伝子変異の導入が疾患モデルマウス開発に結びついたこれまでの経験から、TDP-43 proteinopathyのモデルとしてALSの原因となる変

異 TARDBP を過剰発現させた Tg マウスが次々と作製されることになった。

C. 通常の TDP-43-Tg マウス

本稿執筆時点までに、主要なジャーナルだけで 10 を超す Tg マウス作製の論文が報告されている (表 1)¹⁻¹¹⁾。多くはヒト TDP-43 cDNA を、中枢神経疾患の Tg マウス作製に頻用されるプロモーター (プリオン, Thy1.2, CaMKII などのプロモーター) を用いて過剰発現させたもので、野生型

TDP-43 に加え、A315T, M337V といった ALS の変異を持つ導入遺伝子が用いられている。得られた系統の表現型は、胎生致死から、ほぼ正常に発育へ加齢するものまで様々で、そういった系統差の少なくとも一部は導入遺伝子の発現量と関係していると推測されている。これらの研究では、生後一定期間以上生存し、さらに交配による維持が可能な系統を中心に解析が行われているが、そのような系統の多くで生後早期からの運動機能障害と寿命短縮が報告されている。運動機能障害とともに学習障害が確認された系統もある。導入遺

表 1 TDP-43 トランスジェニックマウス

筆頭著者	誌名	発現 TDP-43 遺伝子	表現型
Wegorzewska I	PNAS 2009 ¹⁾	A315T	前頭葉第 V 層と脊髄前角の神経細胞にユビキチン (+) 封入体 (核の TDP-43 減少を伴うが、封入体は TDP-43 陰性)。3~4 カ月齢で歩行障害。短命
Wils H	PNAS 2010 ²⁾	wild	hTDP-43 発現量に応じた運動ニューロンの変性 (前頭葉第 V 層と脊髄)・四肢麻痺、稀にリン酸化 TDP43 (+) 封入体 (核内・細胞質、核の TDP-43 減少を伴う)、TDP-43C 末断片形成 (~25kDa, 核 Tx 不溶/Sarkosyl 可溶画分)、homo と hetero との比較では homo に強い変化
Tsai KJ	J Exp Med 2010 ³⁾	wild (mouse)	学習障害、進行性の運動機能障害、海馬萎縮 (神経細胞のアポトーシス)、加齢に伴う TDP-43 (+) ユビキチン (+) 細胞質封入体出現 (核の TDP-43 減少を伴う)
Stallings NR	Neurobiol Dis 2010 ⁴⁾	wild, A315T	変異 TDP-43 の場合は脊髄での TDP-43 発現量に応じて誕生早期からの運動障害。A315T の系統の中に発育後の麻痺、核からの TDP-43 減少、TDP-43 断片形成、ユビキチン陽性細胞質封入体とグリオシス。Wild TDP-43 では (発現量が高くて) 症状が出ず
Xu YF	J Neurosci 2010 ⁵⁾	wild	hTDP-43 の発現量に応じた mTDP-43 の減少。中程度の hTDP-43 発現の場合: C 末断片形成、細胞質・核のユビキチン増加、稀にリン酸化 TDP-43 陽性核内・細胞質封入体、ミトコンドリア異常蓄積、歩行障害、短命
Shan X	PNAS 2010 ⁶⁾	wild	発育不良、短命、リン酸化 TDP-43 (+) 細胞質封入体なし、TDP-43/FUS (+) 核内封入体形成、細胞質へのミトコンドリア蓄積 (封入体形成) と軸索でのミトコンドリア欠損
Igaz LM	J Clin Invest 2011 ⁷⁾	wild, Δ NLS (tetOff)	神経細胞変性・錐体路変性、痙性、mTDP-43 発現低下、ごく少数のリン酸化 TDP-43 (+) ユビキチン (+) 凝集体 (RIPA 不溶画分) に出現
Swarup V	Brain 2011 ⁸⁾	wild, G348C, A315T	cDNA ではなく hTDP-43 遺伝子断片を発現。老齢で TDP-43 が細胞質にも出現・封入体形成、一部ユビキチン化・不溶化・断片形成 (リン酸化は不明)。加齢とともに運動機能障害、学習障害
Xu YF	Mol Neurodegener 2011 ⁹⁾	wild, M337V	核内・細胞質にリン酸化 TDP-43 (+) 凝集体が高頻度出現、~25/35kDa 断片形成、ユビキチン増加を伴う。mTDP-43 は減少。細胞質のミトコンドリア凝集、グリオシス、歩行障害、短命
Caccamo A	Am J Pathol 2012 ¹⁰⁾	CTF (25kDa)	可溶性画分の TDP-43 C 末断片 (25kDa) 増加に伴う学習障害 (神経変性や封入体形成とは無関係に生じた)
Cannon A	Acta Neuropathol 2012 ¹¹⁾	wild (tetOff)	離乳後 On: 細胞質でのリン酸化 TDP-43 の顆粒状凝集 (ユビキチン陽性)、神経細胞変性。発生段階から On の場合は、これらにミトコンドリア異常と短命が加わる

伝子が野生型であるか変異型であるかにより差があったとする研究もあるが、むしろ野生型でも変異型と同様の表現型が得られたとする研究が多い。前述のように導入遺伝子の発現量がある程度以上でないと表現型が現れない、また、発現量が多すぎると短命となる、またホモとヘテロとの比較でホモにのみ症状が認められた、といった報告がある。複数の研究者が、導入遺伝子の発現量が増加するに伴いマウス内在性TDP-43のmRNA量や蛋白量が減少することを指摘している。

これらTgマウスの脳脊髄の病理所見としては、神経細胞、特に皮質錐体細胞や脊髄前角細胞の変性、ミトコンドリアの異常凝集、細胞質へのユビキチン陽性蓄積物の出現、それらがリン酸化TDP-43陽性を示すこと、異常細胞における核TDP-43の減少～消失(FTLD-TDP, ALSの封入体陽性細胞と類似の所見)、核内TDP-43陽性封入体出現などが、それぞれの研究ごとに様々に報告されている(表1)。生化学的にヒト疾患での所見を十分に再現したと考えられるTgマウス系統はないように思われるが、C末側断片の形成、可溶性の変化などを示した研究はある。またヒトALSやFTLDにおける重要な特徴である、正常な発育と加齢後の発病、進行性の神経細胞変性、といった点をきちんと再現していると考えられる系統はないか、あったとしても僅かであるように見受けられる。重要な点は、複数の研究者が、運動機能障害やその背景となる神経細胞変性と、TDP-43異常蓄積とが必ずしも相関しないことを指摘していることである。

なお、全長ではなく25kDaのC末側断片のみを発現させたTgマウスも作られており¹⁰⁾、このマウスでは可溶性画分のC末側断片増加が行動異常や内在性マウスTDP-43のプロセッシング異常を引き起こしたと報告されている。この著者らは、封入体形成や神経細胞変性は必ずしも症状発現に必須ではなく、このC末側断片が神経細胞の機能

を直接障害するのではないかと推測している。剖検脳脊髄では確かに25kDa前後のC末側断片がTDP-43異常蓄積の主要な部分を占めるが、免疫ブロットにおけるC末側断片出現パターンはおそらく疾患のタイプによるTDP-43異常凝集体の立体構造の違いを反映しており¹²⁾、病理プロセスにおけるC末側断片形成は、不溶化、凝集体形成より下流のできごとである可能性が高い。C末側断片TDP-43-Tgマウスがどの程度ヒトの病態に近いかについては、慎重に判断する必要があるように思われる。

D. テトラサイクリン発現制御TDP-43-Tgマウス

遺伝子導入モデルでは、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子を同時に組み込み、テトラサイクリン(ドキシサイクリン)を投与(あるいは投与中止)することで、目的とする導入遺伝子の発現時期をコントロールする技術がしばしば用いられる。TDP-43-Tgマウスでも既に2件報告されており^{7,11)}、多くの遺伝子の転写・翻訳の制御に関わっていると考えられるTDP-43を発生段階で過剰発現させることによる非特異的な変化を回避する目的で使用されている。

この発現制御モデルにおいて、発生時から導入遺伝子発現をONにした場合、リン酸化TDP-43の凝集、ユビキチン染色の増加、ミトコンドリア異常、神経細胞変性と寿命の短縮が起きるが、生き延びたマウスでは運動障害などの症状の加齢に伴う進行は認められなかったという。一方、同じ系統のマウスにおいて、離乳後にONにした場合は、ミトコンドリア異常と寿命短縮は生じなかったと報告されている¹¹⁾。野生型と核移行シグナルを欠く(Δ NLS)TDP-43をそれぞれ離乳後に発現させた研究では⁷⁾、どちらの場合も、前脳の新皮質や海馬の神経細胞消失と皮質脊髄路の変性

が認められ（ここではCaMKIIプロモーターを使用しているため脊髄では導入遺伝子の発現は少ない）、それに伴い運動機能障害が認められたという。しかしどちらの系統でもヒト疾患のような異常TDP-43蓄積はほとんど生じず、唯一、 Δ NLSを導入したTgマウスの中で最も発現量が多い系統において、少数の異常リン酸化&ユビキチン化封入体を認めたとのことである。TDP-43 (Δ NLS) の場合は過剰発現されたヒトTDP-43が核へは移行せず細胞質にとどまるが、マウス内在性TDP-43の減少は、(核に移行する)ヒト野生型TDP-43の過剰発現と同様、認められている。

E. TDP-43生理機能の低下

上述のように、運動機能障害などの症状とTDP-43異常蓄積の有無とが乖離していること、導入遺伝子の過剰発現によりマウスの内在性TDP-43の発現低下が示されていることなどから、Tgマウスに認められる病変形成の機序としてloss-of-functionの可能性を示唆する研究者もいる。すなわち、TDP-43の発現はそれ自身の産生量にもとづき厳密に調節されているため、導入したヒトTDP-43の過剰発現がマウスTDP-43の発現抑制に結びつき、TDP-43の多彩な機能が発生段階から低下して、生後早期から強い障害を示すという考え方である。ただしTDP-43が、種を超えて配列が比較的良好に保存された分子である点は留意する必要がある。ちなみにTDP-43のノックアウト (KO) マウスは、ホモ接合体では胎生致死、ヘテロではTDP-43の蛋白量に野生型との有意差は見られず、表現型としては運動機能障害が認められたという¹³⁾。また、誕生後にTDP-43をKOした場合は、急速に脂質代謝障害が進行し早期に死亡に至ることが報告されている¹⁴⁾。さらにマウスTDP-43を過剰発現させたTgマウスにおいても(ヒトTDP-43過剰発現と)同様の表

現型が観察されており³⁾、現状ではTDP-43-Tgマウスの表現型をマウス内在性TDP-43の減少で説明することについては慎重にならざるを得ない。

F. プログラニューリン遺伝子KOマウス

FTLD-TDPやALSにおけるTDP-43蓄積発見の数カ月前に、FTDP-17と呼ばれていた家族性FTLDのうちタウ遺伝子変異陰性の家系がプログラニューリン遺伝子 (*GRN*) 変異によることが報告された。*GRN*変異家系は病理学的にはTDP-43異常蓄積を伴う点で非家族性のタウ陰性FTLDと共通する。その後いくつもの*GRN*変異が同定されているが、その多くは変異効果としてプログラニューリン産生低下をきたすと考えられている。これまでに報告された*GRN*-KOマウスでは、TDP-43異常蓄積を含む、ヒトFTLD様の病理所見は十分確認されていない。*GRN*-KOマウスは老齢になるとユビキチン陽性構造が蓄積し、それに伴い神経細胞の減少や反応性グリオシスが生じるが^{15,16)}、リン酸化TDP-43の封入体形成はないとされている。ただ、生化学的には細胞核から得られた界面活性剤不溶分画にリン酸化TDP-43が検出されたという報告がある¹⁶⁾。

むすび

Tgマウスでは、使用するプロモーターや発現量以外にも様々な要因により、同じ遺伝子を持つマウスに発現させた場合であっても表現型が異なる。ヒト疾患に認められるTDP-43の異常(不溶化・凝集、異常リン酸化、ユビキチン化、C末側断片形成、核から細胞質への局在変化など)のうち、いずれが病理機序の上流の変化で、いずれが下流の変化かを十分見極められていない状況では、Tgマウスで得られた結果の解釈はさらに難しくなる。これまでに報告さ

れた10を超える系統で得られた結果は、TDP-43 遺伝子の過剰発現が、導入遺伝子におけるALS 変異の有無、誕生したマウス脳脊髄における TDP-43異常蓄積の有無に関わりなく運動機能障害や神経細胞変性を引き起こすことを示しているように思われる。このヒト病理所見との乖離を、封入体形成が実は病理機序において下流に位置する所見であることを示していると考えるか、あるいは、これらのTgマウスがヒト疾患の病態を十分再現できていないと考えるかは、難しいところである。Tgマウスでは導入TDP-43遺伝子は内在性TDP-43の数倍あるいはそれ以上に過剰発現されているが、ヒト疾患においてTDP-43の過剰発現は見出されていない。これも注意を要する点である。今後、さらなる研究により、よりよいTDP-43 proteinopathyモデルマウスが作られることを期待したい。

文献

- 1) Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, et al. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 18809-14.
- 2) Wils H, Kleinberger G, Janssens J, et al. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 3858-63.
- 3) Tsai KJ, Yang CH, Fang YH, et al. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *J Exp Med.* 2010; 207: 1661-73.
- 4) Stallings NR, Puttaparthi K, Luther CM, et al. Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiol Dis.* 2010; 40: 404-14.
- 5) Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, et al. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci.* 2010; 30: 10851-9.
- 6) Shan X, Chiang PM, Price DL, et al. Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 16325-30.
- 7) Igaz LM, Kwong LK, Lee EB, et al. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121: 726-38.
- 8) Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, et al. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain.* 2011; 134: 2610-26.
- 9) Xu YF, Zhang YJ, Lin WL, et al. Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Mol Neurodegener.* 2011; 6: 73.
- 10) Caccamo A, Majumder S, Oddo S. Cognitive decline typical of frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice expressing the 25-kDa C-terminal fragment of TDP-43. *Am J Pathol.* 2012; 180: 293-302.
- 11) Cannon A, Yang B, Knight J, et al. Neuronal sensitivity to TDP-43 overexpression is dependent on timing of induction. *Acta Neuropathol.* 2012; 123: 807-23.
- 12) Tsuji H, Arai T, Kametani F, et al. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain.* 2012. In press.
- 13) Kraemer BC, Schuck T, Wheeler JM, et al. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol.* 2010; 119: 409-19.
- 14) Chiang PM, Ling J, Jeong YH, et al. Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 16320-4.
- 15) Ahmed Z, Sheng H, Xu YF, et al. Accelerated lipofuscinosis and ubiquitination in granulin knockout mice suggest a role for progranulin in successful aging. *Am J Pathol.* 2010; 177: 311-24.
- 16) Wils H, Kleinberger G, Pereson S, et al. Cellular ageing, increased mortality and FTL-D-TDP-associated neuropathology in progranulin knockout mice. *J Pathol.* 2012; 228: 67-76.

