

201208002B

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22～24年度 総合研究報告書

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	1
秋山治彦	
II. 分担研究報告	
1. TDP-43異常病変を示すモデルマウスの作製	10
長谷川成人	
2. 前頭側頭葉変性症モデル培養細胞・マウスの作製	21
秋山治彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

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

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(FTLD-TDP). TDP-43 遺伝子の変異で発病するのは筋萎縮性側索硬化症(ALS)・認知症を伴う ALS(ALS-D)であり, 家族性 FTLD-TDP はプログロニューリン遺伝子 GRN 変異で発病する. ALS-D や 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)マウスの作出・解析, GRN ノックアウト(KO)マウスの解析, TDP-43 培養細胞モデルの作製, TDP-43-Tg マウスと GRN-KO 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. しかしながら, 現在までの所, FTLD-TDP 患者に見られる脳病変を十分再現できていない. 一方, TDP-43 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, (上述のように現時点では TDP-43-Tg マウスの 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ところ, やはり有効であることが確認された. また, 線維化 α シヌクレインや DLB 患者脳不溶画分をマウス脳に接種することにより野生型マウスでその病理を再現することに成功した. そこで同様のモデルを TDP-43 にも適用するため, TDP-43 の凝集に必須の 40 アミノ酸からなる配列を特定し, その合成ペプチドがアミロイド様線維を形成することを確認, リコンビナント TDP-43 の線維形成体を in vitro で作成する準備を進めた. さらに TDP-43 モデル開発につながる可能性を考慮し, TDP-43 と同じ RNA 結合蛋白で, その遺伝子変異が ALS の原因となり, 大脳への異常蓄積が FTLD を引き起こすなど多くの点で TDP-43 と共通する FUS について, ALS/FTLD 圏の疾患脳脊髄における病理学的解析を行った.

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

前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) は, 脳に異常蓄積する主要蛋白質により 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 (hnRNP) 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, その遺伝子異常は家族性 ALS の原因となる. TDP-43 は主として神経細胞の細胞質に異常蓄積するが, オリゴデンドロサイトへの蓄積も認められる. TDP-43 遺伝子変異による ALS でも多数例で大脳に病変が拡がり認知症を呈す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, 第 17 番染色

体上にある tau 遺伝子の変異により生じる FTLD-tau と, 同じく第 17 番染色体上のプログロニューリン遺伝子 (GRN) の変異により生じる FTLD-TDP の 2 疾患があり, 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, 病理機序としてプログロニューリンの産生低下が示唆されている. 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 3 分の 1~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. また TDP-43 と同じ hnRNP のひとつである FUS (fused in sarcoma) は, タウ・TDP-43 陰性 FTLD における異常蓄積蛋白質であるとともに, やはり家族性 ALS の原因遺伝子のひとつである. 以上のような背景にもとづき, FTLD-TDP の病態を再現するモデルを作製し, 創薬の基盤となる薬剤候補化合物のスクリーニング系を確立するのが本研究の目的である.

B.研究方法

部位特異的突然変異法を用いてヒト TDP-43 に G298S,あるいは M337V 変異を導入,これら野生型および変異型 TDP-43 の cDNA をマウス thy1.2 genomic expression vector (Dr. Goedert との共同研究)にサブクローニングした.トランスジェニック(Tg)マウスは常法により C57BL/6J マウスの胚の前核にマイクロインジェクションすることによって作製した.また培養細胞に発現させると異常リン酸化やユビキチン化凝集体を形成する部分欠損体 (TDP- Δ NLS&187-192), GFP タグを付加した C 末端断片 GFP-TDP43(218-414)や GFP-TDP-43 (162-414),あるいは凝集体は形成しないが細胞質に局在が変化する核移行シグナルを除いた変異体(TDP- Δ NLS)を発現するマウスの作出も同様に行った.これと並行して,東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室西原真杉教授が開発した GRN ノックアウト(KO)マウスの導入と系統維持,解析を行った.さらに TDP-43-Tg マウスに GRN-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た TDP-43-Tg マウスを作り,その脳脊髄標本の解析を行った.また(神経系細胞による TDP-43 異常蓄積培養細胞モデルは既に創薬に用いることができる水準のものを作製済みなので) TDP-43 蓄積オリゴデンドロサイトの培養細胞モデルも作製した.そしてこれらのマウス脳脊髄試料,培養細胞について,免疫組織化学染色による観察と,界面活性剤による段階的分画~immunoblot による解析を行った.抗体として,ヒトおよびマウスの TDP-43 と反応する抗 TDP-43 ポリクローナル抗体(Protein Tech),ヒト TDP-43 を特異的に認識する抗 TDP-43 モノクローナル抗体(Protein Tech),および異常リン酸化 TDP-43 を認識する pS409/410, pS403/404 を用いた.

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.そこで, TDP-43 蓄積培養細胞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,既に確立されたモデルである tau-Tg マウスを用いて調べた. Tau-Tg マウスモデルには,ヒト P301L 変異 tau を導入した JNPN3 系 tau-Tg を Taconic 社より(他系統マウスとの交配許諾を含めて)購入し使用した.この時の候補化合物としては,既にヒトへの投与実績(マラリア,ヘモクロマトーシスなど)がある methylene blue(MB)を用いた.

なお,単純にヒト TDP-43 の野生型や変異型をマウスに発現するだけではマウスの寿命期間内に TDP-43 の異常病変が起こらない可能性があることから,本研究ではマウスの脳に TDP-43 の凝

集の種(シード)となりうる異常 TDP-43 を接種するモデルについても検討を行った.我々は,細胞内の異常蛋白病変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.その検証として,試験管内で線維化させた α シヌクレインを野生型マウスの脳に接種したところ,マウス脳に発現する内在性 α シヌクレインが異常になって細胞内に蓄積し,その病変が時間経過に伴って広がることを確認できた.そこで,同様のモデル作製戦略を TDP-43 に応用する目的で, TDP-43 の凝集,蓄積に必須の C 末端部分の配列の特定を行った.そのため, 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.さらに, ALS および FTLTDP 患者の剖検脳(ALS の場合は中心前回,FTLTDP の場合は側頭葉)からサルコシル不溶性画分を調製,それを GRN-KO マウス, TDP-43-Tg(M337V)マウス,野生型マウスの脳に接種した.

また in vitro, in vivo の実験の基盤となる情報を得るためにヒト疾患の剖検脳における TDP-43 および, TDP-43 と同じ hnRNP である FUS の病態について,生化学的,免疫組織化学的解析を行った.

(倫理面への配慮)

Tg マウスの作製および動物実験は,当初,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,遺伝子組換え生物等安全委員会,動物実験倫理委員会,研究倫理委員会に研究計画を提出して審査承認をうけ,その指針に従って開始した.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.また,ヒト剖検脳の解析にあたっては,ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理基準に準じることとし,剖検時に遺族の承諾を得た場合のみ剖検材料を研究に使用した.同倫理指針策定以前に剖検になった症例については,連結可能匿名化による個人情報の保護をはかった上で使用した.ヒト剖検脳解析研究の計画も,当初,東京都臨床医学総合研究所倫理委員会の審査承認を受け,改組後は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

ヒト TDP-43 タンパク質を発現する複数の系統の Tg マウスを樹立した.これらのマウスには生後早期から後肢の不全麻痺が出現し,以後あまり進行せずに加齢する場合と,そのような症状が出現しない系統とがあった.これらのマウスの脳試料では,抗ヒト TDP-43 特異モノクローナル抗体

によりバンドが検出され発現が確認されたが、異常リン酸化 TDP-43 は (Triton-X 不溶画分, Sarkosyl 不溶性画分いずれにおいても) 生化学的には検出できなかった。TDP-43-Tg(G298S), TDP-43-Tg(M337V)の両系統について加齢後に (約 12 ヶ月齢) 病理組織学的に検索すると、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS403/404 および p409/410), 抗ユビキチン抗体で陽性に染色される細胞質封入体が、間脳、脳幹と脊髄にごく稀に認められたが、創薬の過程でスクリーニングに使用するには数が少ないと判断された。

TDP-43 の部分欠損変異体を発現する Tg マウスについても同様に作製し、複数の系統を樹立した。細胞内で凝集しやすいと思われる TDP-43 の部分欠損体 (TDP- Δ NLS&187-192) を導入したマウスは、生まれてきたものの、改変型 TDP-43 蛋白発現はごく小量であった。GFP-TDP43(218-414) を導入したマウスには改変型 TDP-43 蛋白発現を確認できた系統はなかった。GFP-TDP-43 (162-414) を導入したマウスは、蛋白発現は確認できたものの 18 ヶ月齢まで異常な症状は確認できなかった。TDP43- Δ NLS については、5 ヶ月齢で後肢の異常が認められたものの immunoblot で TDP-43 の異常蓄積を確認できなかった。

オリゴデンドログリア系培養細胞モデルの作製には KG-1-C 細胞株を用い、神経系培養細胞のモデル作製において良い結果を得ている GFP タグ付 TARDBP Δ NLS および TARDBP(219-414) 遺伝子を導入した。その結果、異常リン酸化した TDP-43 の細胞質への蓄積は生じたが、遺伝子導入効率は神経系細胞 SH-SY-5Y に及ばなかった。また遺伝子導入後にマイトマイシン-C (MMC) 処理による分裂増殖停止を行うことにより、1 週間まで培養観察が可能であった。分裂を伴わない培養細胞モデルとして薬剤投与実験に使用できると期待されるが、多数の化合物を対象としたスクリーニングを行うためには、遺伝子導入効率の向上をはかる必要があると考えられた。

GRN-KO マウスはそれ自体の中樞神経系の変化は軽度で、間脳や脊髄に p62/ユビキチン陽性構造が出現するものの、ヒトのプログラニューリン変異例のように FTLD 病変が認められるわけではない。この GRN-KO マウスと、G298S, M337V の 2 系統の TDP-43-Tg 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が、ヒト疾患を十分再現したと言いうほどの病変増強は得られなかった。

tau-Tg(P301L) マウスへの MB 投与実験では、へ

テロ雌を 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。この系統の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が、マウス個体間の差が大きい。そこで、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。

試験管内で線維化させた 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って細胞内に蓄積し、その病変が時間経過に伴って広がる。そこで、同様のモデルを TDP-43 でも作製するため、TDP-43 の凝集、蓄積に必須の C 末端部分の配列を特定した。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ところ、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。さらにこの部分の 40 アミノ酸からなるペプチドを合成したところ、時間経過と共に濃度依存的にチオフラビン S 陽性産物が増加し、その試料を電子顕微鏡で観察すると多数の線維が認められた。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が示された。この実験と並行して、ALS および 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、それを GRN-KO マウス、TDP-43-Tg(M337V) マウス、野生型マウスの脳に接種した。しかし接種 3~6 ヶ月後の時点では、これらのマウスに異常リン酸化 TDP-43 の病変は認められなかった。

なお、ヒト剖検脳の解析についてであるが、FUS 免疫組織化学染色に際してホルマリン固定による染色性の低下が著しいことが知られている。そこで短時間固定の剖検脳標本を用い高感度免疫組織化学染色を行って、脳における FUS の局在を再検討した。その結果、FUS は細胞核に加えニューロピルにも多数の顆粒状構造として局在していた。二重染色および (マウス脳) immunoblot 解析の結果、ニューロピルの FUS はかなりの部分がシナプスに存在することが明らかになった。ニューロピルの顆粒状 FUS は正常脳に比べ FTLD-TDP で増加しており、(1 例のみの検索であったが) FTLD-FUS では特に増加が著しかった。

D. 考察

TDP-43-Tg マウスは (野生型, 変異型, 部分欠損等の改変遺伝子のいずれでも) 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 (すなわち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ことが明らかになった。全長型 TDP-43 を発現させた Tg マウスにおいてヒト TDP-43 の大半は核に局在し、生化学的には可溶性画分に回収された。免疫組織化学染色でも、老齢のマウスにおいて、ごく少数の異常リン酸化した TDP-43 蓄積が神経細胞の細胞質に認められるのみであった。したがって、TDP-43-Tg マウスが生後すぐから示す後肢麻痺は、発生の段階で過剰発現した TDP-43 の影響の可能性があり (マウスとヒトの TDP-43 は機能的に交叉する)、ALS の病態とは結びつかないと推測される。ただ、後肢麻痺出現の有無は導入遺伝子の変異の有無や発現量と単純に相関するわけではなく、現時点でその発症機序は不明である。

培養細胞で凝集、蓄積のみられた部分欠損変異体 (TDP- Δ NLS&187-192) や GFP タグを付加した TDP-43 の C 末端断片を発現するマウスでは、野生型 TDP-43 に比べて蛋白発現量が少なく、中には蛋白発現自体が確認できない系統もあった。この原因は不明であるが、凝集性の高い欠損変異体や C 末端断片が異常分子として認識され、分解、排除された可能性がある。またこれらの Tg マウスにおいてもヒト病変を再現するような異常リン酸化・不溶性 TDP-43 の蓄積は認められなかった。

そこで、本研究では次に、ヒトで家族性 FTLD-TDP の原因となるプログラニュリンの低下を、遺伝的に (GRN(+/-)として) TDP-43-Tg に負荷した。しかし、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。

次いで、最近我々が α シヌクレインで成功した、線維化した合成 α シヌクレインやヒト疾患脳不溶性画分の脳への注入による凝集体形成を、TDP-43 でも試みた。観察期間の問題もあるが、現時点でこれらのマウスにおいてヒト病変を再現することはできていない。 α シヌクレインの場合、患者脳不溶性画分を接種した場合にも病変は生じるが、試験管内で線維化したものを接種した場合の方が効率良く病変が形成される。そこでコンビナント TDP-43 の線維化を効率よく行うため、凝集に必要な配列を同定した。細胞モデルを用いて解析した結果、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た。さらにその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、*in vitro* で線維化させた TDP-43 のマウス脳接種実験を進める予定である。

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、また上述のように 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。

tau や α synuclein では異常蛋白凝集の prion 様伝播が病変形成機序として注目されている。TDP-43 や FUS もそれぞれ C 末側、N 末側に prion 様ドメインを持ち、異常蓄積形成の過程で同様の機序が働いている可能性がある。ただ、TDP-43 や FUS は主として細胞核に局在するため、神経突起やシナプスに豊富に存在する tau や α synuclein と異なり、神経線維連絡～軸索輸送を介した病変の拡がりが生じうるかどうかは疑問であった。しかし、本研究により、少なくとも FUS は神経細胞質～神経突起にも局在し、それが疾患脳において増加することが明らかになったことから、これら RNA 結合蛋白質も異常蓄積においても伝播仮説を適用できる可能性が示された。

E. 結論

創薬に使用しうるレベルの高度な 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や、そのマウスへの家族性 FTLD-TDP の原因であるプログラニュリン低下の負荷だけでは難しいことが明らかになった。これらのマウスで観察された後肢異常はヒト ALS の病態とは異なるものと考えられる。今後は、線維化 TDP-43 のマウス脳への接種、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ろう。一方、培養

細胞モデルは神経系細胞，オリゴデンドログリア系細胞ともほぼ実用レベルのものを利用可能であり，たとえば既存薬のスクリーニング等を行うことで培養細胞モデルから一気にヒトでの治験に移行できれば，現状でも治療薬開発は可能かも知れない．さらに本研究では，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

- 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).
- 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 FTLD, PSP, and CBS. *Parkinsonism & Related Disorders* 19:15-20.
- 秋山治彦. 認知症患者モデル「TDP-43 脳脊髄異常蓄積マウス」の開発. *Annual Review 神経* 2013, pp75-80
- 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]
- 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 AβPP and AβPP/tau transgenic mice. *Neuropathology* 32:390-397.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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 FTLD, PSP, and CBS. *Parkinsonism & Related Disorders* 19:15-20.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Aoki N, Tsuchiya K, Togo T, Kobayashi Z, Uchikado H, Katsuse O, Suzuki K, Fujishiro H, Arai T, Iseki E, Anno M, Kosaka K, Akiyama H, Hirayasu Y. Gray matter lesions in Nasu-Hakola disease: A report on three autopsy cases. *Neuropathology* 2011, 31:135-143
 25. Aoki N, Tsuchiya K, Togo T, Kobayashi Z, Uchikado H, Katsuse O, Suzuki K, Fujishiro H, Arai T, Iseki E, Anno M, Kosaka K, Akiyama H, Hirayasu Y. Gray matter lesions in Nasu-Hakola disease: A report on three autopsy cases. *Neuropathology* 2011, 31:135-143
 26. 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.
 27. Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Akiyama H, Shibayama H, Ozaki N. Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy. *J Neurol Sci* 301:77-85, 2011
 28. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H. Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 2011, 45:480-485
 29. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Komachi H, Miki K, Yokota O, Arai T, Miake H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Fatal encephalitis in a case of hypereosinophilic syndrome: MRI and autopsy findings. *Intern Med.* 2011, 50:1219-1225
 30. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Kubodera T, Shibata N, Arai T, Miura H, Ishikawa C, Kondo H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. FALS with Gly72Ser mutation in SOD1 gene: Report of a family including the first autopsy case. *J Neurol Sci* 300:9-13, 2011
 31. Maesako M, Uemura K, Kubota M, Hiyoshi K, Ando K, Kuzuya A, Kihara T, Asada M, Akiyama H, Kinoshita A. Effect of glycogen synthase kinase 3 β -mediated presenilin 1 phosphorylation on amyloid β production is negatively regulated by insulin receptor cleavage. *Neurosci* 2011, 177:298-307.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaka M, Fujishiro H, Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181
 35. Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argypophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.
 36. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119:689-702, 2010.
 37. Coomaraswamy J, Kilger E, Wölfling H, Schäfer C, Kaeser SA, Wegenast-Braun BM, Hefendehl JK, Wolburg H, Mazzella M, Ghiso J, Goedert P, Akiyama H, Garcia-Sierra F, Wolfer DP, Mathews PM, Jucker M. Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:7969-7974, 2010.
 38. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 293:6-11, 2010.
 39. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity. *Neuropathol* 30:372-380, 2010.
 40. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Clinicopathological characteristics of FTLN-TDP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss. *J Neurol Sci* 298:70-77, 2010.
 41. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Takahashi M, Yokota O, Taki K, Ishizu H, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H. Morel's laminar sclerosis showing apraxia of speech: Distribution of cortical lesions in an autopsy case. *Neuropathol* 30:76-83, 2010
 42. Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumiyama Y, Akiyama H, Arai T, Mizusawa H. Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease showing severe and circumscribed atrophy of anterior temporal lobes. *J Neurol Sci* 297:92-96, 2010.
 43. Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DM. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol* 119:1-4, 2010
 44. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem.* 285: 34885-98, 2010.
 45. Nozaki I, Arai M, Takahashi K, Hamaguchi T, Yoshikawa H, Muroishi T, Noguchi-Shinohara M, Ito H, Itokawa M, Akiyama H, Kawata A, Yamada M. Familial ALS with

- G298S mutation in TARDBP: a comparison of CSF tau protein levels with those in sporadic ALS. Intern Med 49:1209-1212, 2010
46. Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, Takahashi M, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. Neurosci Lett 471:20-24, 2010
 47. Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. J Mol Biol 395: 445-56, 2010.
 48. 藤城弘樹, 土谷邦秋, 横田修, 湯浅和美, 新里和弘, 新井哲明, 秋山治彦 (2010) 統合失調症患者に認められた無症候性アルコール性小脳変性症の1剖検例. 精神医学 51:1205-1208
 49. 山下万貴子, 野中隆, 長谷川成人. (2010) TDP-43 凝集体形成阻害化合物の検索 最新医学 65: 1597-1602
 50. 野中隆, 長谷川成人. (2010) 細胞内 TDP-43 蓄積のメカニズム 最新医学 65: 1572-157
 51. 長谷川成人, 新井哲明. (2010) TDP-43 蓄積症の発見 最新医学 65:1558-1565

2.学会発表

1. 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. Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 4th Korea-Japan Symposium, Seoul, Korea [2013. 2. 26]
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. グローバル COE 第5回国内シンポジウム, 名古屋 [2012. 7. 19]
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. 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)
14. 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]
15. 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]
16. 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]
17. 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]
18. 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]
19. 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]
20. 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]
21. 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]
22. 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]

23. 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]
24. 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]
25. 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
26. 長谷川成人: 非アルツハイマー型認知症研究の前線 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]
27. 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]
28. 長谷川成人: TDP-43 と関連疾患. 第 3 1 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]
29. 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]
30. 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]
31. 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)
32. 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)
33. 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]
34. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H. Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]
35. 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.
36. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]
37. Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]
38. Hasegawa M: Molecular pathology of TDP-43 proteinopathies. 3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, 2011. 8. 2, Melbourne.
39. Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H (2011) Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. Neuroscience 2011 Washington D.C. USA [2011/11/14]
40. Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H (2011) Quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's Disease 2011, Paris France [2011/07/17]
41. Masuda M, Taniguchi S, Suzuki N, Hasegawa M. Therapeutic approaches of targeting pathological tau protein for neurodegenerative diseases. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/03]
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Akiyama H, Kobayashi Z, Arai T, Hosokawa M, Tsuchiya K, Yokota O, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Hasegawa M (2010) Screening for FUS proteinopathy in the institutional brain collection. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]
46. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H. Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]
47. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]
48. Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]
49. Masuda M, Taniguchi S, Suzuki N, Hasegawa M. Therapeutic approaches of targeting pathological tau protein for neurodegenerative diseases. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/03]
50. 羽賀千恵, 池田研二, 新井哲明, 石山宮子, 柳下三郎, 下村洋子, 近藤ひろみ, 細川雅人, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2010) 内嗅領皮質野に出現するユビキチン顆粒 (UPG) の再検討. 第 51 回日本神経病理学会学術研究会 [2010/04/24]
51. 横田修, Davidson Yvonne, Bigio Eileen H, 石津秀樹, 寺田整司, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, Sikkink Stephen, Pickering-Brown Stuart, Mann David MA.

- (2010) 進行性核上性麻痺症例におけるリン酸化 TDP-43 病理、海馬硬化、認知機能低下の関心の検討. *Dementia Japan* 24: 328.
52. 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 細川雅人, 秋山治彦, 長谷川成人. (2010) TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導. *Dementia Japan* 24: 387.
 53. 小林禅, 秋山治彦, 新井哲明, 細川雅人, 長谷川成人, 横田修, 寺田整司, 土谷邦秋, 大島健一, 新里和弘, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 池田学, 小柳清光, 石津秀樹, 村山繁雄, 中野今治, 水澤英洋 (2010) 本邦における FTL-D-FUS 症例の検討. *Dementia Japan* 24: 391
 54. 新井哲明, 松脇貴志, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 細川雅人, 近藤ひろみ, 西原真杉 (2010) プロ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. 第 51 回日本神経病理学会学術研究会 東京 [2010/04/24]
 55. 長谷川成人. ALS の分子病態解明と治療に向けて. 日本神経治療学会, シンポジウム 2, 神経治療学のブレークスルー: 神経疾患の新規治療, 横浜 [2010/07/21]
 56. 長谷川成人. TDP-43 の発見から動物モデルまで. 第 51 回日本神経学会総会, シンポジウム 13 「筋萎縮性側索硬化症の病因 TDP-43 および FUS/TLS 研究の最前線」, 東京 [2010/05/22]
 57. 長谷川成人. 筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭葉変性症を特徴づける封入体の構成タンパク質、TDP-43. 第 99 回日本病理学会総会, ワークショップ 12 「神経変性疾患と封入体」, 東京 [2010/04/29]
 58. 長谷川成人. 生化学的方法と神経病理. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, シンポジウム 2 [神経病理の更なる発展に向けて②], 東京 [2010/04/24]
 59. 辻浩史, 宅間浩, 中馬越清隆, 富所康志, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 玉岡晃. (2010) TDP-43 proteinopathy に認める TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. *Dementia Japan* 24: 386.
 60. 辻浩史, 長谷川成人, 野中隆, 新井哲明, 山下万貴子, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 宅間浩, 富所康志, 中馬越清隆, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 玉岡晃 (2010) 筋萎縮性側索硬化症に蓄積する TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. 第 51 回日本神経学会総会, 東京 [2010/05/21]
 61. 眞鍋雄太, 土谷邦秋, 新井哲明, 秋山治彦 (2010) パーキンソン病の病理所見を呈する Shy-Drager 症候群と臨床診断されていた 3 例. 第 51 回日本神経病理学会学術研究会 東京 [2010/04/24]

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 異常病変を示すモデルマウスの作製

研究分担者：長谷川成人（東京都医学総合研究所 病態生物生物研究室）
研究協力者：野中隆¹⁾，鈴掛雅美¹⁾，山下万貴子¹⁾，下中翔太郎¹⁾，新井哲明^{2,3)}，
秋山治彦²⁾，設楽浩志⁴⁾，多屋長治⁴⁾，David Mann⁵⁾
¹⁾ 東京都医学総合研究所 病態生物生物研究室
²⁾ 東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト
³⁾ 筑波大学大学院・精神病態医学分野
⁴⁾ 東京都医学総合研究所 基盤技術研究センター
⁵⁾ マンチェスター大学

研究要旨

TDP-43 の異常は ALS や前頭側頭葉変性症(FTLD)の発症、進行と密接な関係が示されている。従って、患者脳における TDP-43 の病理をマウスで再現することは、TDP-43 の異常による疾患の創薬に必須と考えられる。そこで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を複数系統作出した。しかしながら現在までのところ、患者脳に見られる病変は再現できていない。一方、線維化 α シヌクレインやDLB患者脳不溶画分をマウス脳に接種することにより野生型マウスでその病理を再現することに成功した。そこで TDP-43 蓄積を伴う患者脳不溶性画分をマウス脳に接種する実験を開始し、経過観察している。TDP-43 の線維化機序の解明と新たなモデルマウス作出のため、TDP-43 の凝集に必須の 40 アミノ酸からなる配列を特定し、その合成ペプチドがアミロイド様線維を形成することを確認した。

A. 研究目的

TDP-43 は、細胞の核に局在する不均一核リボタンパク質 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: hnRNPs) の一種である。2006 年、前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTL D)、および筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) の患者脳に認められるユビキチン陽性封入体の主要構成成分として TDP-43 が同定され、その蓄積と神経変性疾患との関連が示唆された。ヒト TDP-43 を発現するマウスを作製すれば、マウスの脳や脊髄において TDP-43 の異常蓄積を起こる可能性が考えられるため、TDP-43 の野生型 (WT)、及び家族性 ALS 患者に見いだされた G298S 変異、あるいは M337V 変異を有する TDP-43 を脳、脊髄に発現するマウスの作出、およびその解析を行った。

また、単純にヒト TDP-43 の野生型や変異型をマウスに発現するだけでは、マウスの寿命期間内に TDP-43 の異常病変が起こらない可能性が考えられることから、マウスの脳に TDP-43 の凝集の種(シード)となりうる異常 TDP-43 を接種する検討を行った。細胞内の異常蛋白病変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我々は提唱しているが、その仮説が動物モデルで検証されつつある。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って細胞内に蓄積し、その病変が時間経過に伴って広がる。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

じ結果が得られた。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、また新たなモデルマウス作出のため、TDP-43の凝集、蓄積に必須のC末端部分の配列の特定を行った。

B. 研究方法

1. ヒトTDP-43を発現するトランスジェニックマウスの作出

部位特異的突然変異法を用いてヒトTDP-43にG298S、あるいはM337V変異を導入した。野生型、及び変異型TDP-43のcDNAをマウス *thyl1.2 genomic expression vector* (Dr. Goedertとの共同研究) にサブクローニングした。トランスジェニックマウスはC57BL/6Jマウスの胚の前核にマイクロインジェクションすることによって作製した。ファウンダーは尻尾のバイオプシーの抽出物のPCR解析によって同定した。ファウンダーマウスはC57BL/6Jマウスと交雑させ、系統を樹立した。ホモ接合性は非トランスジェニックマウスと交配し決定した。この他、培養細胞に発現させると異常リン酸化やユビキチン化凝集体を形成する部分欠損体(TDP- Δ NLS&187-192)、GFPタグを付加したC末端断片GFP-TDP43(218-414)やGFP-TDP-43(162-414)、あるいは凝集体は形成しないが細胞質に局在が変化する核移行シグナルを除いた変異体(TDP- Δ NLS)を発現するマウスの作出も同様に行った。

イムノブロット解析は、マウスの脳、および脊髄を取り出した後、Tris-HCl、Triton-X、Sarkosylと順次可溶化し、それぞれの分画を電気泳動し、抗体と反応させた。抗体は、ヒトおよびマウスのTDP-43と反応する抗TDP-43ポリクローナル抗体(Protein Tech)と、ヒトTDP-43

を特異的に認識する抗TDP-43モノクローナル抗体(Protein Tech)、および異常リン酸化TDP-43を認識するpS409/410を用いた。

2. 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。それを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。

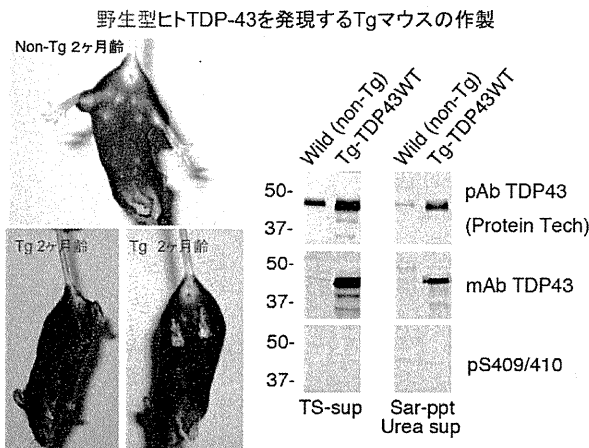
(倫理面への配慮)

トランスジェニックマウスの作製、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、あるいは東京都医学総合研究所の遺伝子組換え生物等安全委員会、動物実験倫理委員会、研究倫理委員会に研究の申請を提出、承認を受け、実験指針に従って行った。

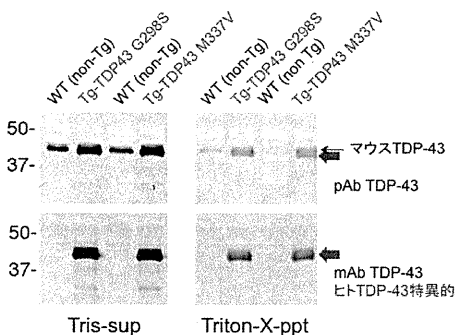
C. 研究結果

1. 野生型、あるいは変異型ヒト TDP-43 を発現するトランスジェニック(Tg)マウスの作製

PCR 解析によって同定したファウンダーからヒト TDP-43 タンパク質を発現する複数の系統の Tg マウスを樹立した。興味深いことに、これらのマウスは生後早い時期から、下肢反射の異常が観察された。生後 2 ヶ月齢のマウスから脳、脊髄を取り出し、Tris-HCl, Triton-X、さらには Sarkosyl を含む緩衝液でタンパク質を抽出し、それぞれの画分を電気泳動し、イムノブロット解析を行った結果、抗ヒト TDP-43 特異モノクローナル抗体によりバンドが検出され、発現が確認された。ヒト TDP-43 野生型(WT)、及び G298S、M337V 変異体タンパク質、それぞれを発現するマウスの系統において同様のバンドが検出され、ヒト TDP-43 の野生型、G298S、M337V 変異体を発現するトランスジェニックマウスの系統が樹立された。



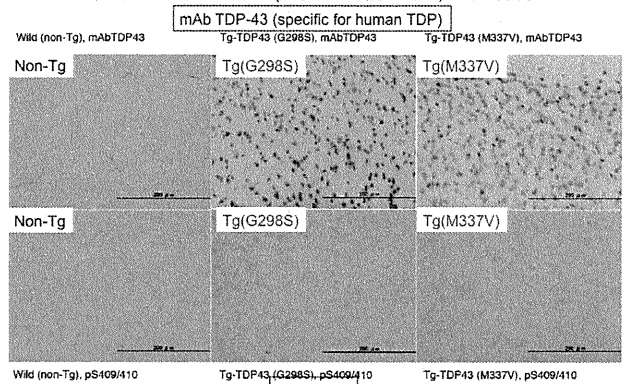
変異型TDP-43を発現するTgマウスの作製
東京都臨床医学総合研究所(疾患モデル開発センター)との共同研究



これらのマウスにおいて患者脳脊髄に蓄積する異常リン酸化 TDP-43 と同様の蓄積がみられるかどうかについて、Triton-X 不溶、さらには Sarkosyl 不溶性画分において pS409/410 抗体で反応するバンドがないか検出を試みたが、残念ながら、どのマウスにおいてもリン酸化 TDP-43 は検出されなかった。

また、凍結脳を中性緩衝ホルマリンにて固定後、50 ミクロン厚の切片を作製し、免疫組織染色を行って解析した結果、ヒト TDP-43 の発現が正常 TDP-43 の局在と同様に核に確認された。リン酸化 TDP-43 を認識する pS409/410 での免疫組織染色において、特に異常構造物などの陽性反応は検出されなかった。

変異型TDP-43を発現するトランスジェニック(Tg)マウスの作製
東京都臨床医学総合研究所(疾患モデル開発センター)との共同研究



TDP-43 の部分欠損変異体を発現する Tg マウスについても同様に作製し、複数の系統を樹立した。それぞれの改変型 TDP-43 の発現をイムノブロットにて観察した結果、細胞内で凝集しやすいと思われる TDP-43 の部分欠損体(TDP-ΔNLS&187-192)を導入したマウスは、生まれてきたものの、改変型 TDP-43 の蛋白発現はごく少量であった。一方、GFP-TDP43 (218-414) を導入するマウスは、遺伝子導入が 3 系統で確認できたものの、イムノブロット解析の結果、その蛋白質の発現を確認できた系統はなかった。もう一つの C 末端断片である GFP-TDP-43 (162-414) は、蛋白質の発現が確認できたものの、18 ヶ月齢まで、異常な症状は確認できなかった。

TDP43- Δ NLS については、5ヶ月齢で後肢の異常が認められたものの、イムノブロットにおいて、TDP-43 の異常蓄積は確認できなかった。

2. ALS 患者脳不溶性画分の PGRN-KO マウス脳への接種

ヒト TDP-43 を過剰発現させただけでは、マウスの寿命内で患者脳と同じ TDP-43 の異常が起こらない可能性が考えられる。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することで、異常リン酸化 α シヌクレインの病理を再現することに成功したことから、同様に実験を TDP-43 でも進めた。はじめに、FTD の原因遺伝子である PGRN のノックアウトマウスに患者脳由来の異常 TDP-43 を接種した。接種後、6ヶ月経過したマウスの脳について、免疫組織染色を行い、異常 TDP-43 の病変があるかどうか検討したが、異常リン酸化 TDP-43 の病変は認められなかった。

3. 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 Tg マウスは、ヒト TDP-43 を発現するものの、外見上、運動症状などの明らかな異常は認められない。そこでこのマウスの黒質に ALS 患者剖検脳不溶性画分を接種して、ヒト M337V 変異型 TDP-43 が蓄積するかどうか検討したが、接種後6ヶ月の時点においては異常 TDP-43 の蓄積はみられなかった。

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した。残念ながら、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なかった。さらに経過観察を行いながらさらに解析を続ける。

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。さらにこの部分の40アミノ酸からなるペプチドを合成し、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

ヒト TDP-43 の野生型、G298S 変異型、M337V 変異型タンパク質を発現する Tg マウスが複数系統樹立された。これらのマウスは生後早い時期から下肢の異常や運動機能の異常が観察され、神経系において何らかの異常がおこっていることが示唆された。下肢反射異常、及び運動失調の強さは野生型 TDP-43 発現マウスで最も顕著で、次いで G298S 変異体発現マウスであり、M337V 変異体発現マウスはほとんど症状はみられなかった。ヒト TDP-43 の発現量に大きな違いはみられないことから、症状の違いは単純に発現量の違いによるものではないと考えられる。発現したヒト TDP-43 タンパク質は、そ

のほとんどが Tris-HCl 可溶性画分に回収され、不溶性画分には検出されなかった。また、正常の内在性 TDP-43 と同じ、核に局在が観察され、リン酸化 TDP-43 抗体陽性構造物などの異常は検出されなかった。従って、運動失調は異常 TDP-43 の蓄積とは無関係におこっている可能性が高いと考えられる。

培養細胞で凝集、蓄積のみられた部分欠損変異体(TDP- Δ NLS&187-192)や GFP タグを付加した TDP-43 の C 末端断片を発現するマウスの作出も行ったが、野生型 TDP-43 に比べ、その蛋白発現量は少なく、発現自体が確認できない系統もあった。この原因については不明であるが、凝集性の高い欠損変異体や C 末端断片が異常分子として認識され、分解、排除された可能性が考えられる。

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 Tg 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、残念ながら TDP-43 の異常病変は検出できない。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。また変異や部分欠損体を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らないと考えられる。

TDP-43 と類似の細胞内異常タンパク質の蓄積の例として、タウや α シヌクレインがあげられるが、最近我々は、線維化した α シヌクレインや DLB 患者脳不溶性画分を野生型マウスの脳内に接種することで、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に成功した。この結果は、TDP-43 においても同様の実験によりマウス脳内で病変を再現できる可能性を示唆する。そこで 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、PGRN ノックアウトマウス、V337M-TDP43 発現 Tg マウス、さらには野生型マウスの脳に FTLD-TDP や ALS の患者脳不溶性画分を接種して経過観察を行っているが、接種後数ヶ月の時点では、いずれの場合においても異常 TDP-43 の蓄積病変は検出されていない。

α シヌクレインの場合、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多いことが大きな要因考えられる。ALS、FTLD-TDP 患者脳不溶性画分に蓄積する異常 TDP-43 の量は DLB 患者剖検脳の異常 α シヌクレインの量よりも少ないと思われるため、より多くの異常 TDP-43 を人口的に合成することが望まれる。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。細胞モデルを用いて解析した結果、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た。さらにその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 TDP-43 の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

ヒト TDP-43 の野生型、G298S 変異型、M337V 変異型、部分欠損体(TDP- Δ NLS& 187-192)、及び GFP タグを付加した 2 種類の C 末端断片 GFP-TDP43 (218-414)、GFP-TDP-43 (162-414)、核移行シグナルを除いた変異体(TDP- Δ NLS)を Thy1 プロモータのもとで発現するマウスの作出を行った。蛋白の発現が確認されたものについては、下肢の反射異常を中心とする運動機能

の異常が生後早い時期から観察されるものが多かった。一方、トランスジーンによる全長のヒト TDP-43 は内在性 TDP-43 と同じく、細胞核に局在し、患者脳で認められる TDP-43 異常病変は観察されなかった。

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。この結果は、ALS や 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可能性を示唆する。そこで剖検脳から異常 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、経過を観察している。

TDP-43 の凝集に必要な配列として、その C 末端 274-313 の 40 アミノ酸を同定した。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、マウスの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 FTL, 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). Tsuji 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.
- 13). 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.
- 14). 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.
- 15). Hasegawa M, et al (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 45:480-485.
- 16). 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.
- 17). 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.
- 18). 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.
- 19). Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem*. 285: 34885-98, 2010.
- 20). Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T,

Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.

21). Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010.

22). Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010.

23). Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H. TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-4, 2010.

24). Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 395: 445-56, 2010.

25). Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaka M, Fujishiro H, Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181

26). 山下万貴子、野中隆、長谷川成人. (2010) TDP-43 凝集体形成阻害化合物の検索 最新医学 65: 1597-1602

27). 野中隆、長谷川成人. (2010) 細胞内 TDP-43 蓄積のメカニズム 最新医学 65: 1572-157

28). 長谷川成人、新井哲明. (2010) TDP-43 蓄積症の発見 最新医学 65:1558-1565

2.学会発表

1). Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 4th Korea-Japan Symposium, Seoul, Korea [2013. 2. 26]

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

3). 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]

4). 長谷川成人: 非アルツハイマー型認知症研究の前線 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]

5). 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]

6). 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]

7). 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]

- 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]
- 20). Hasegawa M: Molecular pathology of TDP-43 proteinopathies. 3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, 2011. 8. 2, Melbourne.
- 21). 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.
- 22). 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.
- 23). Suzukake M, Watanabe S, Suzuki N, Hisanaga S, Hasegawa M. Evaluation of the tau aggregation