

201231007A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と
新規治療法創出に関する研究

(H22-難治-一般-007)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 成人
(公益財団法人 東京都医学総合研究所)

平成25(2013)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法創出に関する研究班 ----- 1
研究代表者 長谷川 成人

II. 分担研究報告

1. 神経変性疾患の細胞内異常タンパク質伝播に関する検討 ----- 8
長谷川 成人
2. 患者脳に蓄積した TDP-43 のプリオン様性質 ----- 14
野中 隆
3. ALS 患者脳に蓄積する TDP-43 のプロテオミクス解析 ----- 17
亀谷 富由樹
4. 家族性筋萎縮性側索硬化症 ALS-6 の病因蛋白質 FUS の蓄積により発病する
前頭側頭型認知症の神経病理学的解析 ----- 20
秋山 治彦
5. TDP-43 proteinopathy 動物モデルの構築 ----- 23
細川 雅人
6. 家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子学のおよび病理学的研究 ----- 27
新井 哲明
7. 原発性側索硬化症：その神経病理と生化学的所見について ----- 31
高橋 均
8. ALS の神経細胞封入体で TDP-43 と FUS は共存するか？ ----- 34
岡本 幸市
9. 高齢者連続剖検例での TDP43 の網羅的免疫組織学的検索 ----- 37
村山 繁雄
10. 三重県北勢部の病院の筋萎縮性側索硬化症剖検例の再評価 ----- 40
吉田 眞理
11. TDP-43 の C 末端領域の凝集に関わる配列の同定 ----- 42
久永 眞市
12. 霊長類 ALS モデルにおける TDP-43 の脳内伝播 ----- 44
横田 隆徳
13. TDP-43 mRNA の制御機構 ----- 47
小野寺 理

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 50

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 56

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法創出に関する研究班

研究代表者：長谷川成人

(公財)東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室 参事研究員

研究要旨

本研究班は ALS の発症、進行に深く関与する TDP-43 の異常を中心に、患者剖検脳の解析から、その病態を再現する細胞、動物モデルの作製を行い、神経難病 ALS の治療薬、治療法を開発することを目的とする。患者脳の解析からは、蓄積する異常 TDP-43 が病型ごとに異なること(長谷川)、FUS 異常を伴う ALS や FTLD はそれぞれ特徴的病理を示すこと(秋山、岡本)、原発性側索硬化症(PLS)の場合においても TDP-43 病理が特徴的で一つの疾患単位であること(高橋)、高齢者連続剖検例において神経細胞質内蓄積は前頭葉にのみ認められ type A 型蓄積であること(村山)、異常翻訳後修飾を受けていること(亀谷)などを明らかにした。また異常 TDP-43 は、正常な TDP-43 を異常な構造に変換する能力を有することを細胞導入実験より明らかにした(野中)。この異常 TDP-43 のプリオン様性質が ALS や FTLD の臨床、病理型を決定している可能性が考えられる。TDP-43 の動物モデルについては、カニクイザル第 6 頸髄利き手側に注入したヒト野生型 TDP-43 が対側の脳皮質一次運動野第 5 層の Betz 細胞でも発現が確認され病変が広がる可能性が示唆された(横田)。また野生型マウスに異常 α シヌクレインを接種すると内在性の α シヌクレインが異常となり、その病変が広がることが証明された(細川、長谷川)ことから、TDP-43 についても同様のモデルの構築が期待される。遺伝子解析では、*SOD1*、*TARDBP*、*FUS* の異常がそれぞれ、家族性 ALS の 25%、9.4%、9.4%と欧米とほぼ同様の頻度であることが示された(新井)。また三重県の ALS/FTD 家系において *C9ORF72* 遺伝子異常を有する例が報告された(吉田)。基礎的検討として、患者脳の病態を再現する細胞モデルを用いて TDP-43 の凝集に関わる配列の同定を行った(久永)。また TDP-43 は自身のエクソン 6 内でのスプライシングを誘発し、かつ polyA site の使われ方を変化させることにより自己の mRNA 量を調節することを明らかにした(小野寺)。

研究分担者：

野中 隆	東京都医学総合研究所 病態細胞生物学研究室 副参事研究員
亀谷富由樹	東京都医学総合研究所 病態細胞生物学研究室 次席研究員
秋山 治彦	東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト 参事研究員
新井 哲明	筑波大学大学院 人間総合科学研究科 精神病態医学教室 准教授
細川 雅人	東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト 主席研究員
高橋 均	新潟大学脳研究所 病理学分野 教授
岡本 幸市	群馬大学大学院 医学系研究科 神経内科 教授
村山 繁雄	東京都健康長寿医療センターバイオリソースセンター 研究部長
吉田 眞理	愛知医科大学 加齢医科学研究所 所長
久永 真市	首都大学東京 理学研究科 神経分子機能研究室 教授
横田 隆徳	東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学 教授
小野寺 理	新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野 教授

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) や前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTLD)の患者

脳の変性細胞内には TDP-43 の異常病変が認められ、その病変の広がりや臨床症状との密接な関係が示されている。また家族性および孤発性 ALS において TDP-43 の遺伝子変異が多数発見され、ALS 発症への関与が遺伝学的にも証明されている。孤発性 ALS 患者の 90% 以上に TDP-43 の異常病変が認められることから、TDP-43 は ALS の根本治療の中心的ターゲットと言える。

本研究班では、ALS 患者剖検脳脊髄に蓄積する TDP-43 の神経病理、生化学解析から、TDP-43 異常蓄積の分子機構を解明すると共に、それをもとに病態を再現する試験管内、細胞、動物モデルを構築し、ALS における分子病態形成機構と運動ニューロン変性機構を明らかにし、異常 TDP-43 を標的とした新しい ALS の予防、診断、治療法を創出することを目標とする。

B. 研究方法

1. 患者脳の病理、生化学解析

ALS, PLS, FTLD など、脳病理組織標本について、pTDP-43(pS409/410), FUS, tau, p α Syn, p62 などの免疫組織化学染色を行い、神経病理学的解析を行った。また、一部の症例については、患者剖検脳よりサルコシル不溶性画分を調製し、イムノブロット解析、さらには陽性バンドを切り出して、ゲル内トリプシン消化後、LC/MS/MS 解析を行った。

2. 培養細胞実験

予め全長 TDP-43 のプラスミドを一過性に発現した SH-SY5Y 細胞に、様々な患者脳より調製した不溶性画分 (TDP-43 の細胞内凝集体が含まれる画分) をトランスフェクション試薬と共に導入した。数日間培養したのち細胞を回収し、抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学的解析や、可溶性画分と不溶性画分に分画して抗リン酸化 TDP-43 抗体などによるイムノ

ブロットを行った。

3. 遺伝子解析

本邦における FALS 例 32 例、SALS 例 279 例の血液から DNA を抽出し、SOD1、TARDBP、FUS の遺伝子解析を行った。また、TARDBP の G298S 変異が同定された 1 例の剖検脳を用い、免疫組織化学的・生化学的解析を施行し、蓄積した TDP-43 の病理生化学的特徴を SALS のそれと比較検討した。

4. 動物実験

ヒト α シヌクレイン、マウス α シヌクレインを大腸菌に発現、精製し、37°C で一週間しんとうすることにより線維化した。線維化した α シヌクレイン、あるいは可溶性 α シヌクレインを野生型マウス (C57BL) 脳の黒質に 10 μ g 接種し、一定期間の後、半球は固定し、免疫組織染色を行い、半球はサルコシル可溶性、不溶性画分を調製し、イムノブロットによる生化学的検討を行った。また、カニクイザルの実験は、サル第 6 頸髄利き手側にヒト野生型 TDP-43 を組み込んだ pAAV-IRES-hrGFP ベクターを注入し、注入側が完全麻痺となる約 4 週後に解剖して、脳の病理組織検査、PCR 解析を行った。

5. TDP-43 の発現制御に関する実験

Hela, HEK293T 細胞に LipofectamineTM2000 (Invitrogen) を使用し、トランスフェクションし、細胞は 72 時間後に回収した。RNeasy plus mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出し、Superscript® VILO™ cDNA synthesis kit を用いて cDNA を構築し、mRNA の定量を行った。定量リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq™ (Takara) を用い、Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (Takara TP850) により解析した。

(倫理面への配慮)

剖検脳の生化学解析は、それぞれの施設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。ウイルスベクターの使用を含む DNA 組換え実験、動物実験は、各施設の組換え DNA 実験委員会、動物倫理委員会の実験指針に基づいて実施した。

C. 研究結果

1. 患者脳の病理、生化学解析

秋山らは、9 例の FTLD-FUS(神経病理学的には 5 例が BIBD, 2 例が NIFID)を免疫組織学的に解析したが、3 病型の分類は典型例においては明確であるものの、その境界が明瞭でないものもあった。また本邦では西欧諸国に比べて aFTLD-U が少なく、BIBD が症例の過半数以上を占めるという特徴が見られた。

高橋らは、臨床病理学的に PLS の特徴を示した 2 剖検例について、病的 TDP-43 (pTDP-43) 沈着の広がりとその程度、さらにその生化学的プロファイルについて解析した結果、PLS は UMN 症状を初発・主症状とし、LMN はほぼ保たれる臨床病理学的にユニークな TDP-43 異常症と考えられた。

岡本らは TDP-43 陽性封入体を有する孤発性 ALS 12 例の脊髄ミラー切片を pTDP-43 抗体と抗 FUS 抗体で免疫染色し比較した結果、異常 TDP-43 の蓄積が FUS の局在に影響を及ぼしている可能性が示された。一方、ALS-FUS 例では、FUS 陽性封入体自体には TDP-43 の共存は認めず、ALS-FUS は ALS-TDP から独立した疾患であると考えられた。

吉田らは、三重県北勢部 3 病院の ALS 剖検 15 例中 7 例について、小脳、海馬、脊髄を免疫組織学的に検討したが、*C9ORF72* 変異例に特徴的な小脳顆粒細胞、海馬歯状回顆粒細胞の ubiquilin 陽性封入体の所見は見られなかった。

村山らは、高齢者ブレインバンク連続登録例

の海馬・第三側頭回、延髄、腰髄について、pS409/410 の免疫染色を行った結果、133 例中、脊髄陽性例 42 例、延髄陽性例 35 例、海馬側頭葉陽性例 47 例であった。いずれかの部位に陽性所見を認めるものは 65 例で、全体のほぼ半数であった。

亀谷らは ALS 患者脳に蓄積した TDP-43 を電気泳動し、pS409/410 抗体陽性バンドを切り出し、in gel トリプシンおよびキモトリプシン消化して LC-MS/MS 解析を行った結果、TDP-43 に生じているリン酸化部位を含む翻訳後修飾、断片化された切断部位を明らかにした。

2. 遺伝子解析

新井らは、本邦における FALS 例 32 例、SALS 例 279 例の血液から DNA を抽出し、*SOD1*、*TARDBP*、*FUS* の遺伝子解析を行った。その結果、FALS 例 32 例中、*SOD1* 変異が 8 例、*TARDBP* 変異が 3 例、*FUS* 変異が 3 例に同定された。以上から、各々の変異の FALS における頻度は、*SOD1* 変異が 25%、*TARDBP* 変異および *FUS* 変異が 9.4%であった。SALS 例 279 例では、*SOD1* 変異が 2 例(0.72%)に認められたのみであった。

TARDBP の G298S 変異が認められた FALS 例の病理学的解析では、TDP-43 陽性の神経細胞質内封入体およびグリア細胞内封入体が、脊髄、海馬領域、内包、視床等に多数出現していた。リン酸化 TDP-43 特異抗体を用いた脳の不溶性画分のイムノプロットでは、45kDa のバンド、~25kDa のバンド、スメアが検出され、SALS 例と同じパターンであった。

3. 培養細胞実験

野中らは病型の異なる剖検脳から不溶化 TDP-43 を調製し、シードとして細胞に導入した結果、導入したシードの C 末端断片のパターンとほぼ同じパターンを有する TDP-43 の蓄積が培養細胞内において認められた。すなわち、

導入したシードを鋳型として、それと同様な構造を有する TDP-43 凝集体が培養細胞内において再現されることが判明した。また、この不溶化 TDP-43 のプリオン様の性質について詳細に検討した結果、いずれのタイプの患者脳由来の不溶化 TDP-43 は、トリプシン、キモトリプシンあるいはプロテイナーゼ K 処理を行った後でもシードとして作用することが判明した。

4. 動物モデル

細川らは、理化学研究所より *GRN* hemizygotic マウスを入手し、交配により *GRN*-KO マウスを作製した。このマウスと東京都医学総合研究所で作製された TDP-43 (G298S), TDP-43 (M337V) トランスジェニックマウスとの交配をおこない TDP-43 (G298S)/*PGRN* +/-, TDP-43 (M337V)/*PGRN* +/- を作製し、その解析を行った。TDP-43 (G298S) と TDP-43 (G298S)/*GRN* +/- マウスのどちらの系統においても脊髄にリン酸化 TDP-43 陽性の封入体様構造が観察された。さらに、10 ヶ月齢の TDP-43 (M337V)/*GRN* +/-, TDP-43 (M337V) マウス脳を調べたところ、どちらの系統においても視床下部で、リン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体様構造が観察された。これまでのところ、視床下部でのみリン酸化 TDP-43 陽性封入体が観察されており、延髄においては観察されなかった。

横田らは、カニクイザル第 6 頸髄利き手側にヒト野生型 TDP-43 を組み込んだ pAAV-IRES-hrGFP ベクターを注入し、注入側が完全麻痺となる約 4 週後に解剖して、脳の病理組織解析を行った。その結果、大脳において GFP は発現しておらず、外因性 TDP-43 は対側の大脳皮質一次運動野第 5 層の Betz 細胞に発現していた。このことから、TDP-43 が逆行性軸索輸送により伝播した可能性が考えられた。

長谷川らは、ヒト α シヌクレイン、マウス α シヌクレインを大腸菌に発現、精製し、線維化

した後、野生型マウス (C57BL) 脳の黒質に接種し、一定期間の後、免疫組織染色、イムノブロットによる生化学的解析を行った。その結果、接種からわずか 90 日で異常 α シヌクレインの病変が観察され、生化学解析の結果、マウスの内在性の α シヌクレインが異常に変換されたものであることが判明した。

5. 基礎検討

久永らは、TDP-43 の C 末端側の欠損変異体を作製し、細胞に発現させて、TDP-43 の凝集に必要な配列の同定を行った。その結果、TDP-43 の 274-313、354-373 の配列が、TDP-43 の凝集に関与する配列として特定された。

小野寺らは、TDP-43 の mRNA の制御機構の破綻が本症の背景にあると考え、この制御機構を明らかとすることを目的とした。その結果、TDP-43 はエクソン 6 内のスプライシングを介したナンセンス依存性 mRNA 分解機構によって mRNA 量を調整すると結論された。加えて、TDP-43 過剰存下では、より遠位の polyA site を使用させることが判明した。

D. 考察

TDP-43 の異常病変は病型により現在 4 つに分類されているが、少なくとも Type A, B, C については、TDP-43 の C 末端断片のバンドパターンやプロテアーゼ耐性 TDP-43 のバンドパターンから生化学的にも区別される。今回解析した PLS はいずれも病理学的には Type B とは異なり、Type A に近く、生化学的 ALS のそれとは明らかに異なっていた。このことから、PLS は ALS とは異なる一つの疾患と考えられる。

FUS 例についても、TDP-43 と共局在するという報告もあるが、検討した結果においてそのようなケースは非常に稀であり、ALS-FUS は ALS-TDP からは独立した疾患であると考えられる。

また *C9ORF72* 変異例も TDP-43 の病理を伴う場合が多いが、最近リピート部分が翻訳されたものが蓄積することが判明した。

細胞モデルの検討から、患者脳に蓄積する不溶化 TDP-43 には、プリオン病における異常プリオンに極めて類似した性質が存在することが明らかとなった。したがって、TDP-43 が蓄積する TDP-43 プロテノパチーと称される疾患において、中枢神経における TDP-43 凝集体の拡がりには、プリオン様の伝播メカニズムを介することが示唆される。その詳細な機構は不明ではあるが、異常タンパク質の伝播する可能性は、神経変性疾患全般の新たな治療戦略を考える上で、今後重要なファクターになると思われる。

線維化したヒト α シヌクレインを接種したマウスにおいて、内在性のマウス α シヌクレインが蓄積し、それが時間経過と共に広がったことは、細胞内異常タンパク質の脳内伝播を証明したことになる。今後、TDP-43 について同様の結果が期待されることから、患者脳由来の異常 TDP-43、あるいは合成した線維化 TDP-43 を脳に接種する実験を検討していく予定である。

E. 結論

患者脳の解析からは、蓄積する異常 TDP-43 が病型ごとに異なる。FUS 異常を伴う ALS や FTL D はそれぞれ特徴的病理を示す。原発性側索硬化症(PLS)は ALS とは異なる特徴的な TDP-43 病理を示す。高齢者連続剖検例において神経細胞質内蓄積は側頭葉にのみ認められ type A 型蓄積である。蓄積する TDP-43 はリン酸化をはじめとする異常翻訳後修飾を受けている。異常 TDP-43 は、正常な TDP-43 を異常な構造に変換する能力を有する。この異常 TDP-43 のプリオン様性質が ALS や FTL D の臨床、病理型を決定している可能性が考えられる。カニクイザル第 6 頸髄利き手側に注入したヒト

野生型 TDP-43 が対側の脳皮質一次運動野第 5 層の Betz 細胞でも発現が確認され病変が広がる可能性が示唆される。野生型マウスに異常 α シヌクレインを接種すると内在性の α シヌクレインが異常となり、その病変が広がることが証明された。TDP-43 についても同様のモデルの構築が期待される。*SOD1*, *TARDBP*, *FUS* の異常が家族性 ALS の 25%, 9.4%, 9.4% を占める。*C9ORF72* 遺伝子異常を有する例が三重県の ALS/FTD 家系に同定された。患者脳の病態を再現する細胞モデルを用いて TDP-43 の凝集に関わる配列を同定した。TDP-43 は自身のエクソン 6 内でのスプライシングを誘発し、かつ polyA site の使われ方を変化させることにより自己の mRNA 量を調節する。

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. 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
3. 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.

4. 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
5. 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* 2012; 124:383-394.
6. Akiyama H, Hosokawa M, Kametani F, Kondo H, Chiba M, Fukushima M, Tabira T, 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* 2012; 32:390-397.
7. Aoki N, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Arai T, Togo T, Miyazaki H, Kondo H, Ishizu H, Uchikado H, Katsuse O, Hirayasu Y, Akiyama H, Progressive nonfluent aphasia: a rare clinical subtype of FTLN-TDP in Japan. *Neuropathology* 2012; 32:272-279.
8. Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H: Atypical FTLN-FUS associated with ALS-TDP: a case report. *Neuropathology* 33: 83-86, 2013.
9. Soma K, Fu Y-J, Wakabayashi K, Onodera O, *et al.* Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 54-60, 2012.
10. Tada M, Coon EA, Osmand AP, *et al.* Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. *Acta Neuropathol* 124: 749-760, 2012.
11. Mizuno Y, *et al.* Comparison of phosphorylated TDP-43-positive inclusions in oculomotor neurons in patients with non-ALS and ALS disorders. *J Neurol Sci* 315:20-25, 2012.
12. Saito Y, Inoue T, Zhu G, Kimura N, Okada M, Nishimura M, Kimura N, Murayama S, Kaneko S, Shigemoto R, Imoto K, Suzuki T. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and Abeta generation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2012; 7: 50.
13. Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y and the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Altered β -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* 2012; 4 (4): 344-352.
14. Funabe S, Takao M, Saito Y, Hatsuta H, Sugiyama M, Ito S, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Hattori N, Murayama S: Neuropathologic analysis of Lewy- related alpha- synucleinopathy in olfactory mucosa. *Neuropathology* 2013; 33: 47-58.
15. Mori F, Tanji K, Kon T, *et al.* FUS immunoreactivity of neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012; 38: 322-328.
16. Mori F, Tanji K, Odagiri S, *et al.* Ubiquitin-related proteins in neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease. *Pathol Int.* 2012; 62: 407-411.
17. Mori F, Tanji K, Odagiri S, *et al.* Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease.

- Acta Neuropathol 2012;124: 149-151.
18. Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, et al. Optineurin immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions of polyglutamine diseases (Huntington's, DRPLA, SCA2, SCA3) and intranuclear inclusion body disease. Acta Neuropathol 2012; 123: 747-749.
 19. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, et al. The TRK-Fused Gene Is Mutated in Hereditary Motor and Sensory Neuropathy with Proximal Dominant Involvement. Am J Hum Genet 2012; 91, 320–329.
 20. Takano, T., Tomomura, M., Yoshioka, N., Tsutsumi, K., Terasawa, Y., Saito, T., Kawano, H., Kamiguchi, H., Fukuda, M., and Hisanaga S. LMTK1/AATYK1 is a bovel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner. J Neurosci, (2012) 32, 6587– 6599.
 21. Asada A, Saito T, and Hisanaga S. Subcellular localization of active Cdk5 is determined by its own kinase activity. J Cell Sci, (2012) 125, 3421-3429.
 22. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ono F, Ohkubo T, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Ueno T, Yamamoto M, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Uchihara T, Kuwabara S, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalizaion of TDP-43. Brain 2012 ;135(Pt 3):833-46.
 23. Kanouchi T, Ohkubo T, Yokota T. Can regional spreading of amyotrophic lateral sclerosis motor symptoms be explained by prion-like propagation? J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012 ; 83(7):739-45.
 24. Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kato T, Watanabe N, Yamahira A, Kondo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. PLoS One. 2012;7(8):e43120.
 25. Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012 Sep 25.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

神経変性疾患の細胞内異常タンパク質伝播に関する検討

研究分担者：長谷川成人（東京都医学総合研究所、病態細胞生物研究室）
研究協力者：鈴掛雅美¹⁾，野中隆¹⁾，新井哲明^{2,3)}，David Mann⁴⁾，秋山治彦²⁾
¹⁾ 東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室
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⁾ マンチェスター大学

研究要旨

患者脳脊髄に蓄積する TDP-43 のイムノブロット解析から、筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭葉変性症（FTLD-U）に出現する異常 TDP-43 が、細胞から細胞へ伝播して広がる可能性が示唆されている。本年度は、マウス脳に異常 TDP-43 を接種する実験を試みると同時に、TDP-43 と類似の細胞内蓄積を α シヌクレインについて、線維化したリコンビナント α シヌクレインを野生型マウス脳内に接種する実験を行った。その結果、脳内における α シヌクレインの異常蓄積とその病変の広がりを再現することに成功した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis; ALS）や前頭側頭葉変性症（frontotemporal lobar degeneration; FTLD）の患者脳の変性細胞内には TDP-43 の異常病変が認められ、その病変の広がりや臨床症状が密接に関係していることが示されている。また家族性および孤発性 ALS において TDP-43 の遺伝子変異が多数発見されたことから、TDP-43 の異常と ALS 発症は遺伝学的にも証明されている。

孤発性 ALS 患者の 90% 以上に TDP-43 の異常病変が認められることから、TDP-43 は ALS の根本治療の中心的ターゲットと言える。

これまでの解析において、ALS や FTLD 患者の TDP-43 の異常病変は、中枢神経系の広い領域に広がって見られること、またその広がりや臨床症状が強く相関することが示されている。また、昨年度は TDP-43 の病理、生化学が、その病型によって区別可能なことを明らかにした。すなわち ALS, FTLD-TDP はその病理型の違いによって、短い DN と NCI が主体の type A,

細胞内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions; NCI) が主体の type B, 変性突起 (dystrophic neurites; DN) 主体の type C, そして核内封入体 (intranuclear inclusions: INI) が主体の type D に分類されるが、患者脳に蓄積する TDP-43 の C 末端断片が病型ごとに区別できること、さらにその違いはプロテアーゼ耐性中心の構造を反映していることを多数例の解析から明らかにした。また一人の患者脳においては、脳や脊髄の部位が違っていても、蓄積する TDP-43 のバンドパターンが同じことが示された。この結果は実際の患者脳において、一つの細胞で生じた異常 TDP-43 が細胞間を伝播して脳全体に広がった可能性を示唆する。

今年度は、細胞内異常蛋白質伝播の実験的証拠を得るため、患者脳由来の異常 TDP-43 をマウスの脳に接種することでマウス脳に病態を形成できるかどうかを試みた。また分子は異なるがパーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症の細胞内異常蛋白質病理を形成する α シヌクレインについて、線維化したリコンビナント α シヌクレインを野生型マウスに接種す

ることで、マウス脳内に α シヌクレイン病変を再現できるか、またそれが時間経過に伴って広がるかどうかの検討を行った。

B. 研究方法

ALS患者の頭頂葉(中心前回)からサルコシル不溶性画分を調製し、それを少量の生理食塩水を加えてソニケーションにて均一にし、PGRN-KOマウス、及び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脳の黒質に5 μ L接種した。一定期間の後、脳を採取、ホルマリン固定後、切片を作製し、免疫組織染色して観察する予定である。

ヒト α シヌクレイン、マウス α シヌクレインを大腸菌に発現、精製し、37 $^{\circ}$ Cで一週間しんとうすることにより線維化した。線維化した α シヌクレイン、あるいは可溶性 α シヌクレインを野生型マウス(C57BL)脳の黒質に10 μ g接種し、一定期間の後、半球は固定し、免疫組織染色を行い、半球はサルコシル可溶性、不溶性画分を調製し、イムノブットによる生化学的検討を行った。

(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

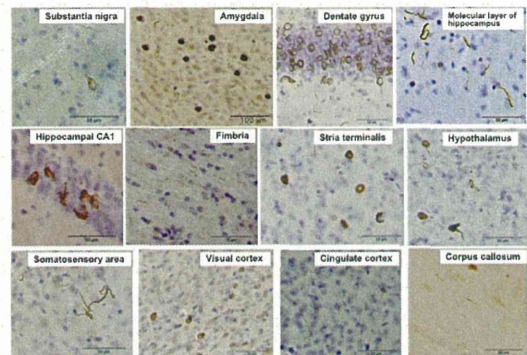
1. ALS患者の不溶性画分のマウス脳への接種

現在、接種後、6ヶ月経過したマウスの脳を固定し、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、検討をおこなっている。免疫組織染色の条件の検討を含めて、現在検討中である。

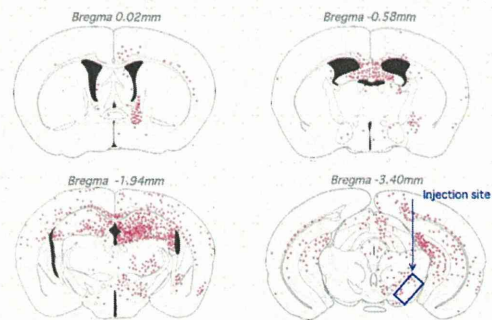
2. α シヌクレイン線維のマウス脳への接種

線維化したリコンビナント α シヌクレインを接種し、15ヶ月後にマウス脳を固定後、異常 α シヌクレインを検出するPS129抗体にて免疫組織染色を行って観察した。その結果、以下に示すように、脳の広範囲にわたって、リン酸化 α シヌクレイン病変が観察された。病変は注入部位の黒質は少なく、扁桃核や海馬歯状回に多数のレビー小体様の封入体やリング状封入体が観察されると共に、突起様構造物も広く観察された(下図)。

Immunostainings of mouse brain injected with human α Syn fibrils
(15 months after injection, anti-PS129)



Distribution of phospho-Syn pathology in human α -Syn fibril-injected mouse brain at 15 months after injection.



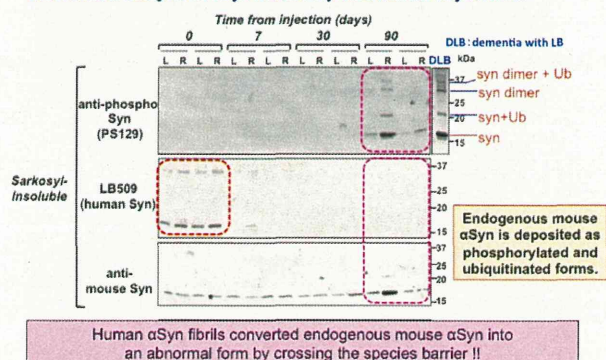
Spread of the pathology cannot be explained by simple diffusion

一方、可溶性リコンビナント α シヌクレインを接種したマウスではこのような異常病変は全く観察されなかった。

マウス脳内に蓄積した α シヌクレインが接種しヒト α シヌクレインが蓄積したものか、内在性のマウス α シヌクレインが蓄積したものを明らかにするため、生化学的解析を行った。脳を右半球と左半球に分けたのち界面活性剤サルコシルに対する不溶性画分を回収し、 α シ

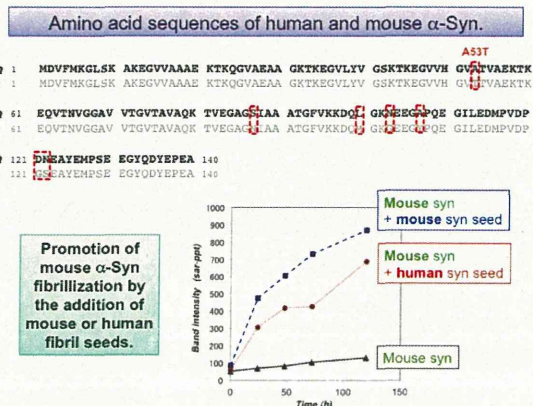
ヌクレインのリン酸化を認識する PS129 抗体、ヒト α シヌクレイン 特異抗体、マウス α シヌクレイン 特異抗体でイムノブロットを行った。その結果、接種後 0 日では、接種したヒト α シヌクレイン 線維が不溶性画分に検出されたが、接種から 7 日後以降は分解されバンドは消失した。一方、接種からわずか 90 日でサルコシル不溶性画分に右半球優位にリン酸化 α シヌクレインのバンドが検出された。さらに、個体によっては DLB 患者脳の不溶性画分と全く同じ、20k, 30k, 35k のユビキチン化や二量体 α シヌクレインのバンドも認められた。この蓄積した α シヌクレインは、ヒト α シヌクレイン 抗体には反応せず、マウス α シヌクレイン 特異抗体に反応したことから、内在性マウス α シヌクレイン がリン酸化、ユビキチン化され蓄積したことが判明した (下図)。

Biochemical analysis of α Syn in mice injected human α Syn fibrils.



ヒト α シヌクレイン とマウス α シヌクレイン はアミノ酸配列で 95% の相同性を有しているが、7 カ所のアミノ酸が異なっている。プリオン病において、プリオンの種間の配列の違いにより、その感染効率に違いがあることが示されている。そこで、このアミノ酸の配列の違いがマウス α シヌクレイン の線維化に影響があるかどうか、試験管内におけるマウス α シヌクレイン の線維化促進効果を検討した。その結果、マウス α シヌクレイン 線維の方が、ヒト α シヌクレイン 線維よりも、マウス α シヌクレイン をより効率よく、線維化するという結果が示され

た (以下右図)。



次に、脳内での α シヌクレイン の病変形成に違いがあるかどうかを検討するため、リコンビナントマウス α シヌクレイン を線維化し、マウス脳に接種する実験を行った。

その結果、ヒト α シヌクレイン 線維を接種した群およびマウス α シヌクレイン 線維接種群では投与側においてはリン酸化 α シヌクレイン、Ub, p62 陽性の病理が 80% の個体に認められ、非接種側にも 79% のマウスで病理構造物の伝播が認められた一方、マウス α シヌクレイン 線維を接種した群では個体数は少ないながら、すべての個体にリン酸化 α シヌクレイン 病理が認められ、非投与側でもすべての個体で病変の伝播が認められた。(下図)

Comparison of propagation efficiency in mice at 15 months after injection

Injection sample	Right hemisphere (injected side)			Left hemisphere (non-injected side)
	anti- α syn	anti-Ub	anti-p62	anti- α syn
Human soluble α -syn (n=8)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)
Human α -syn fibrils (n=24)	22/24 (91.6%)	21/24 (87.5%)	22/24 (91.6%)	19/24 (79.2%)
Mouse soluble α -syn (n=4)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
Mouse α -syn fibrils (n=8)	8/8 (100%)	7/8 (87.5%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)

このことから、マウス α シヌクレイン 線維の方がヒト α シヌクレイン 線維よりもマウスの脳、 α シヌクレイン 異常病変を起こしやすいことが示唆された。

α シヌクレイン 病理の出現部位は、中脳黒質以外に扁桃体、歯状回、海馬、海馬交連、分界条、上丘、視床下部、皮質などに見られ、マウスの α シヌクレイン線維とヒト α シヌクレイン線維接種の場合との大きな違いは認められなかった。病理形態も、レビー小体様のもものは扁桃体と分界条、視床下部に出現し、それ以外はレビー突起様、またはリング状の構造物であった。

D. 考察

α シヌクレイン 線維接種マウスにおける病変の主な出現部位について考察する。レビー小体様の α シヌクレイン 病理が認められた扁桃体は、中脳黒質からの入力を受けている。また、分界条は扁桃体から発した視床下部へ投射する線維が通っている。線条体は中脳黒質からの入力を受けている。歯状回はCA3へ投射しており、さらにCA1への投射が知られている。以上の結果から、 α シヌクレイン病変は神経回路を介して広がった可能性が示唆される。

E. 結論

合成 α シヌクレイン 線維による野生型マウスの脳内での異常 α シヌクレイン病変の形成、その広がりを実証することに成功した。

線維化した α シヌクレインのマウス脳への接種が α シヌクレイン 病態形成、進行の必要十分条件であることが判明した。

病理の広がりには神経回路を経ている可能性が示唆される。

このモデルマウスは α シヌクレイン 病態メカニズムの解明や、新規治療薬開発に有用であるばかりか、TDP-43の病態形成機構や治療法の開発、評価にも重要な意味をもつと思われる。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1). 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). 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(thiosemicarbazonato)-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 α -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

患者脳に蓄積した TDP-43 のプリオン様性質

野中隆¹⁾，赤津裕康²⁾，小尾智一³⁾，吉田眞理⁴⁾，村山繁雄⁵⁾，Mann David⁶⁾，
長谷川成人¹⁾

1) 東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト・病態細胞生物学研究室，2) 福祉村病院，3) 静岡てんかん・神経医療センター，4) 愛知医科大学・加齢医科学研究所，5) 東京都健康長寿医療センター・高齢者ブレインバンク，6) マンチェスター大学

研究要旨

前頭側頭葉変性症や筋萎縮性側索硬化症の患者脳などに見られる細胞内異常凝集体の主要な構成タンパク質として TDP-43 が見出された。今年度は、昨年度我々が開発した「シード依存的な細胞内 TDP-43 蓄積モデル」を用いて、患者脳に蓄積する TDP-43 のシード効果について検討した。その結果、患者脳由来の不溶化 TDP-43 は繰り返しのシード能を有し、かつ、界面活性剤、熱やプロテアーゼ消化に対して高度な耐性を示すことから、プリオン様の性質を有することが明らかとなった。

A.研究目的

前頭側頭葉変性症（FTLD-TDP）や筋萎縮性側索硬化症（ALS）の患者脳などに見られるユビキチン陽性の細胞内異常凝集体の主要な構成タンパク質として TDP-43 が同定された。本研究では、昨年度開発した患者脳より調製した不溶化 TDP-43 を凝集核（シード）として細胞内に導入する方法を用いた細胞モデルを利用して、患者脳由来の不溶化 TDP-43 のシード能について検討した。

B.研究方法

予め全長 TDP-43 のプラスミドを一過性に発現した SH-SY5Y 細胞に、様々な患者脳より調製した不溶性画分（TDP-43 の細胞内凝集体が含まれる画分）をトランスフェクション試薬と共に導入した。数日間培養したのち細胞を回収し、抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学的解析や、可溶性画分と不溶性画分に分画して抗リン酸化 TDP-43 抗体などによるイムノブロットを行った。（倫理面への配慮）

本研究計画は、東京都医学総合研究所の倫理委員会の承認を受けている。

C.研究結果

患者脳に蓄積する TDP-43 は、リン酸化

TDP-43 抗体を用いたイムノブロット解析において、その C 末端断片のパターンの違いによりいくつかのタイプ（A、B および C）に分類できることが知られている。そこで、タイプの異なる不溶化 TDP-43 をシードとして細胞に導入したところ、導入したシードの C 末端断片のパターンとほぼ同じパターンを有する TDP-43 の蓄積が培養細胞内において認められた。すなわち、導入したシードを鋳型として、それと同様な構造を有する TDP-43 凝集体が培養細胞内において再現されることが判明した。したがって、患者脳に蓄積する不溶化 TDP-43 には、プリオン病における異常プリオンのような自らを鋳型として同じ構造の異常凝集体のコピーを作り出す能力が備わっていることが示唆された。また、この不溶化 TDP-43 のプリオン様の性質について詳細に検討した。その結果、いずれのタイプの患者脳由来の不溶化 TDP-43 は、トリプシン、キモトリプシンあるいはプロテイナーゼ K 処理を行った後でもシードとして作用することが判明した。またこの不溶化 TDP-43 画分を熱処理すると、タイプごとに熱安定性が異なる可能性が示された。さらに、患者脳由来の不溶性 TDP-43 をシードとして細胞内で蓄積したプラスミド由来の TDP-43 凝集体を培養細

胞より調製し、再度それをシードとして培養細胞に処理すると、患者脳由来の不溶性 TDP-43 と同様にシードとして機能することが判明した。また、TDP-43 の凝集体を含む細胞と含まない細胞の共培養実験により、TDP-43 凝集体がエキソソームを介して細胞間を伝播する可能性が示唆された。

D. 考察

以上の結果より、患者脳に蓄積する不溶性 TDP-43 には、プリオン病における異常プリオンに極めて類似した性質が存在することが明らかとなった。したがって、TDP-43 が蓄積する TDP-43 プロテノパチーと称される疾患において、中枢神経における TDP-43 凝集体の拡がりの一部は、プリオン様の伝播メカニズムを介することが示唆される。その詳細な機構は不明ではあるが、異常タンパク質の凝集体が伝播する可能性は、神経変性疾患全般の新たな治療戦略を考える上で、今後重要なファクターになるのではないかと考えられる。

E. 結論

患者脳より調製した不溶性 TDP-43 にはプリオン様の性質があり、細胞内で蓄積した TDP-43 は細胞から細胞へと伝播する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, 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 MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H (2012) Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Transl. Med.* 4(145):145ra104.

Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Lim S, Paterson BM, Donnelly PS, Crouch PJ, White AR (2012) Inhibition of TDP-43 Accumulation by Bis(thiosemicarbazonato)-Copper Complexes. *PLoS ONE*. 7(8):e42277.

Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa KI, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya K, Yokochi 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 Relat Disord.* 19: 15-20.

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* 135 (Pt 11): 3380-91.

Masato Hosokawa, Tetsuaki Arai, Masami Masuda-Suzukake, Takashi Nonaka, Makiko Yamashita, Haruhiko Akiyama, Masato Hasegawa (2012) Methylene Blue Reduced Abnormal Tau Accumulation in P301L Tau Transgenic Mice. *PLoS ONE*, 7(12): e52389.

野中隆, 長谷川成人 (2012) 細胞内異常タンパク質の蓄積機構とその制御. *Dementia Japan*, 26: 7-12.

野中隆, 新井哲明, 水上勝義, 長谷川成人 (2012) レビー小体型認知症の神経変性機序・分子生物学. *老年精神医学雑誌*, 23: 353-358.

野中隆, 長谷川成人 (2012) ユビキチン陽性封入

体と TDP-43. 生体の科学, 63: 528-529.

野中隆, 長谷川成人 (2012) TDP-43 のシード依存
的細胞内凝集体形成. 臨床神経学, 52:
1056-1058.

2.学会発表

Takashi Nonaka, Masami Masuda-Suzukake, Makiko
Yamashita, Masato Hosokawa, Haruhiko Akiyama and
Masato Hasegawa; Intracellular seeded aggregation
and cytotoxic model of TDP-43. Alzheimer's
Association International Conference (AAIC) 2012;
2012. 7. 16. Vancouver, Canada

Takashi Nonaka, Masami Masuda-Suzukake, Yoko
Hasegawa, Mari Yoshida, Shigeo Murayama, David
Mann, Haruhiko Akiyama and Masato Hasegawa;
Intracellular seeding model reproduces characteristic
features of affected neurons in TDP-43 proteinopathy.
The 8th International Conference on Frontotemporal
Dementias; 2012. 9. 5-7. Manchester, UK

野中隆、長谷川成人 TDP-43 のシード依存
的細胞内凝集体形成 第53回日本神経学会学術大会、
シンポジウム 2012. 5. 24 東京

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

野中隆, 長谷川成人, 増田雅美, 特許第 4948845
号: 神経変性疾患治療用物質のスクリーニング方
法, 出願番号: 特願 2006-030530, 出願日: 平成
18年2月8日, 登録日: 平成24年3月16日

2.実用新案登録

3.その他

ALS 患者脳に蓄積する TDP-43 のプロテオミクス解析

亀谷富由樹¹, 小尾智一², 宍戸丈郎², 赤津裕康³, 村山繁雄⁴,
齊藤祐子⁵, 吉田眞理⁶, 長谷川成人¹

- 1 東京都医学総合研究所、病態細胞生物
- 2 静岡てんかん・神経医療センター、神経内科
- 3 医療法人さわらび会福祉村病院、長寿医学研究所
- 4 東京都健康長寿医療センター、神経病理
- 5 国立精神・神経医療研究センター
- 6 愛知医科大学、加齢医科学研究所

研究要旨

本研究では、ALS 患者脳に蓄積した TDP-43 を電気泳動し、抗 TDP 抗体、pS409/410 抗体と反応するバンドを切り抜き、in gel でトリプシンおよびキモトリプシンを用いて酵素消化した。ゲルから消化ペプチドを抽出した後、液体クロマトグラフィー質量分析機（LC-MS/MS）で解析し、患者脳に蓄積した TDP-43 に生じている翻訳後修飾、断片化する際の切断部位を明らかにした。

A. 研究目的

ALS 患者脳に異常構造物として蓄積した TDP-43 は病因と密接に関連し、高度にリン酸化され、断片化も生じている。我々は、免疫化学的な手法でリン酸化部位を明らかにし、一例ではあるが、切断部位を報告してきた。本研究では、患者脳に蓄積した TDP-43 のリン酸化部位を含む翻訳後修飾、断片化する際の切断部位等をプロテオミクス的手法を用いて解析し、その化学的性状を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ALS 患者脳に蓄積した TDP-43 を電気泳動し、抗 TDP 抗体、pS409/410 抗体と反応するバンドを切り抜き、in gel でトリプシンおよびキモトリプシンを用いて酵素消化した。ゲルから消化ペプチドを抽出した後、液体クロマトグラフィー質量分析機（LC-MS/MS、C18 キャピラリーカラム 150

mm x 0.075 mm i.d.、流速 300 nl/min、2-80% acetonitrile / 0.1 % formic acid）で解析した。データは BioWorks および Mascot にて解析した。で解析した。

（倫理面への配慮）

剖検脳の生化学解析については当研究所の倫理委員会の承認のもとに、実験指針に従って行った。

C. 研究結果

1) ALS 患者脳に蓄積した TDP-43 を含む分画を電気泳動し、TDP 抗体、pS409/410 抗体を用いたイムノブロットを行った。抗体の反応するバンドを 8 分画した（図 1）。

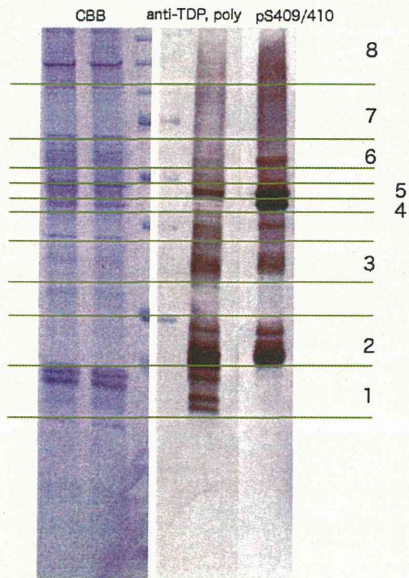


図1. ALS患者脳に蓄積したTDP-43の電気泳動およびイムノブロット。

2)得られたゲル片を乾燥後、ゲル中でトリプシンおよび気もトリプシンを用いて酵素消化した。その後、ゲル中から消化ペプチドを抽出しLC-MS/MSで分析し、TDP-43に生じているリン酸化部位を含む翻訳後修飾を明らかにした(図2)。

```

1                               50
MSEYIRVTED ENDEPIEIPS EDDGTVLLST VTAQFPGACG LRYRNPVSYQC MRGVRLVEGI

                               100
LHAPDAGWGN LVYVWNYPKD NKRKMDETDA SSAVKVKRAV QKTSDLIVLG LPWKTTEQDL

                               150
KEYFSTFGEV LMQVKKDLK TGHSGFGFV RFTEYETQVK VMSQRHMIDG RWCDCCKLPNS

                               200
KQSQDEPLRS RKVFGVGRCTE DMTEDLREF FSQYGDVMDV FIPKPFRAFA FVTFADDQIA
                               250
QSLCGEDLII KGISVHISNA EPKHNSNRQL ERSGRFGGNP GGFNQGGFG NSRGGGAGLG
                               300
NNQGSNMGGG MNFGAFSINP AMMAAAQAAL QSSWGMGMML ASQGNQSGPS GNNQNGNMQ
                               350
REPNTAFGSG NNSYSGSNSG AAIQWGSASN AGSGSGFNGG FGSSMDSKSS GWGM
                               400

```

図2. 同定したリン酸化部位(ピンク)と脱アミド部位(水色)。

3)得られたペプチドの結果から、TDP-43の断片化の際の切断部位に相当するペプチドを見だし、切断部位を明らかにできた(図3)。

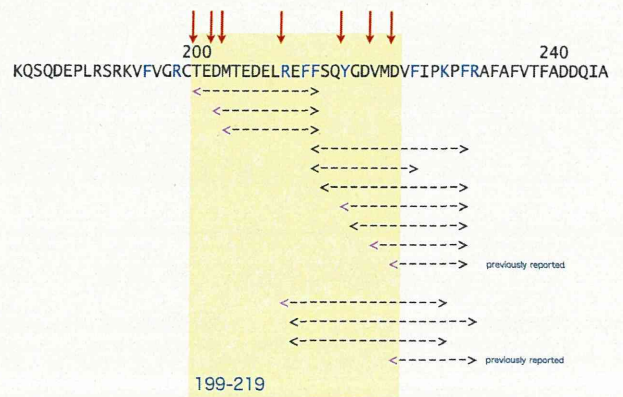


図3. 25kDaの断片が生じる際の切断部位。

*

D. 考察

今回のALS患者脳に蓄積したTDP-43の生化学的解析によって、これまで、我々が免疫化学的方法で同定したリン酸化部位を質量分析法による直接解析によって確認することができた。また、新たな翻訳後修飾(脱アミド)を明らかにできた。さらに蓄積したTDP-43の主要構成成分である25kDa断片が生じる際の切断部位を明らかにでき、従来報告のあるcaspase関与は否定できる結果であった。

E. 結論

- 1)免疫化学的手法で同定したリン酸化部位をLC-MS/MS解析でも確認した。
- 2)リン酸化以外の翻訳後修飾として、複数のAsnおよびGln残基で脱アミドが生じていることを同定した。
- 3)TDP-43断片の切断部位を明らかにし、切断の際にcaspaseが関与しないことを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M,