

proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet.* 2012; 91(2): 320-9

6. 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 γ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* 2012; 4 (4): 344-352

7. 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, David M. A. Mann, Tamaoka A: Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy *Brain* 2012; 135 (11): 3380- 91

8. Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima M, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama S, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H: Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology* 2012; 32 (6): 593- 603

9. 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

2.学会発表

1. Sabbagh M, Seibyl J, Akatsu H, Ouchi Y, Beach T, Charny A, Barthel H, Senda K, Murayama S, Ishii K, Leverenz J, Ghetti B, Ironside J, Roth K, Hoffmann A, Schulz- Schaeffer W, Reininger C, Sabri O: Results of a multicentre phase 3 trial on florbetaben for β -amyloid brain PET in Alzheimer disease. 2012 AAN, Florida, April, 2012.

2. Morimoto S, Kokubo Y, Kihira T, Saito Y, Takahashi H, Kuzuhara S, Murayama S: Immunochemical and immunocytochemical studies of tauopathy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ Parkinson dementia complex (PDC)- Kii. 2012 AANP Meeting, Chicago, June, 2012.

3. Schulz-Schaeffer W, Hoffmann A, Sabri O, Seibyl J, Akatsu H, Takao M, Beach TG, Murayama S, Ghetti B, Ironside J, Leverenz J, Roth K, Reininger C, Sabbagh M: Detection of β -amyloid by florbetaben PET: histopathological verification in a global phase 3 clinical trial.

4. Morimoto S, Kokubo Y, Saito Y, Hasegawa M, Kihira T, Yoshida S, Takahashi H, Yoshida M, Kuzuhara S, Murayama S: Establishment of pathology center for ALS/ PDC- Kii, Japan. 2012 AAIC, Vancouver, July 2012

5. Nakamoto FK, Takao M, Maeda D, Ikemura K, Hayashi T, Ito S, Takahashi Y, Fukayama M, Tsuji S, Murayama S: FUS-immunopositive

inclusions and compound Pick bodies in frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease (FTLD- MND- FUS). FTD 2012, Manchester, September 2012.

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。

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

報告者：吉田真理¹⁾、岩崎靖¹⁾、三室マヤ¹⁾、辰己新水¹⁾、酒井素子²⁾、久留聡²⁾、小長谷
正明²⁾、家田俊明³⁾、伊藤益美⁴⁾、森恵子⁴⁾

所属：1) 愛知医科大学加齢医科学研究所、2) 国立鈴鹿病院神経内科、
3) 四日市市民病院神経内科 4) 小山田記念温泉病院神経内科

研究要旨

C9ORF72 遺伝子異常を呈した三重県の ALS/FTD 家系が報告されたので、*C9ORF72* 遺伝子異常の有無の可能性を三重県北勢部の ALS 剖検 7 例について、抗リン酸化 TDP-43 抗体、抗 p62 抗体、抗 UBQLIN2 抗体で免疫組織学的に検討した。7 例の死亡時年齢は平均 61 歳、罹病期間は平均 5 年 8 ヶ月、三重県内出身 5 名、千葉県と不明が各 1 名、家族歴は 2 例に記載されていた。5 例は ALS-TDP（紀伊 ALS-PDC1 例を含む）を示したが、小脳顆粒細胞の ubiquilin、p62 染色はすべて陰性であった。2 例は ALS-SOD1 であった。

A. 研究目的

2006 年に筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）のエピキチン陽性封入体の構成成分が TDP-43 であることが同定され、孤発性 ALS の大部分の症例が TDP-43 陽性封入体を形成することが確認された。また TDP-43 遺伝子変異を示す家族性 ALS も同定され、TDP-43 は孤発性・家族性 ALS の病態形成に密接に関与することが確認された。一方、2011 年に第 9 染色体短腕 21 領域に連鎖する家族性 FTD-ALS において原因遺伝子 *C9ORF72* が同定された。C9FTD/ALS は TDP-43 proteinopathy を呈し、小脳の顆粒細胞、海馬顆粒細胞に ubiquilin 陽性、p62 陽性かつリン酸化 TDP-43 陰性封入体を認めることが特徴とされる。*C9ORF72* 陽性 FTD/ALS の疾患頻度は本邦では低いとされたが、*C9ORF72* 遺伝子異常を呈した三重県の ALS/FTD 家系が報告された。そこで、地域集積性がある可能性も推測し、三重県北勢部の ALS 剖検例の再検討が必要と考え、免疫組織学的に *C9ORF72* 遺伝子異常の特徴的病理像の有無を探索した。

B. 研究方法

三重県北勢部 3 病院の ALS 剖検 15 例中 7 例の

ホルマリン固定、パラフィン包埋切片の小脳、海馬、脊髄を免疫組織学的に検討した。抗リン酸化非依存性 TDP-43 抗体（rabbit polyclonal、Proein Tech、熱湯 20 分、98%ギ酸 20 分、3000 倍）抗リン酸化 TDP-43 抗体（PSer409/410 rabbit polyclonal、熱湯 20 分、98%ギ酸 20 分、3000 倍）、抗 ubiquitin 抗体（rabbit polyclonal、Dako、熱湯 20 分、98%ギ酸 20 分、2500 倍）、抗 p62 抗体（polyclonal、Progen、熱湯 20 分、400 倍）抗 UBQLIN2 抗体（mouse monoclonal、5F5、Abnova、10000 倍）および（rabbit polyclonal、Acris、熱湯 20 分、98%ギ酸 20 分、150 倍）で染色した。

C. 研究結果

7 例の死亡時年齢は平均 61 歳（42～84 歳）、男女比は 3：4、罹病期間は平均 5 年 8 ヶ月（1 年 5 ヶ月～8 年）、出身は 5 名が三重県内（桑名、亀山、鈴鹿など）、1 名は千葉県、不明が 1 名、家族歴は 2 例に記載されていた。臨床像は下位運動ニューロン障害が優位なものが 2 例、上位および下位運動ニューロン障害ともに認めた例が 4 例、上位運動ニューロン障害が優位であったものが 1 例であった。紀伊半島の ALS/PDC

に合致する病理像を示す1例に認知症を認めましたが、パーキンソニズムは全例みられなかった。病理学的に5例のLMNにTDP-43 proteinopathyを認めたが(紀伊半島のALS/PDCを含む)、小脳顆粒細胞のubiquilin、p62染色はすべて陰性、海馬歯状回顆粒細胞はリン酸化TDP-43抗体陽性NCIを認める1例に陽性像を認めた以外は4例で陰性だった。また2例(家族歴なし)はLewy body-like hyaline inclusion、後索中間根帯・Clarke柱・脊髄小脳路変性を認めubiquilin、p62は陰性だった(遺伝子は未検)。

D. 考察

C9ORF72 遺伝子変異を伴うFTD/ALSでは小脳顆粒細胞、海馬歯状回顆粒細胞にリン酸化TDP-43陰性、ubiquitin、p62、ubiquilin陽性封入体が出現することが特徴である。三重県北勢部のALS剖検例のスクリーニングでは、このパターンに合致する病理像は確認されなかった。一方、病歴上は孤発性であるものの、病理学的にALS-SOD1が2例確認され、家族性ALSが孤発性ALSの中に潜在していることが再確認された。今後は臨床、病理、遺伝子を含む多様な解析をすすめることが重要である。

E. 結論

抗p62抗体、抗ubiquilin抗体免疫染色による三重県北勢部の病院のALS7例の予備的検討では、*C9ORF72*陽性例に特徴的な所見として報告された小脳顆粒細胞、海馬歯状回顆粒細胞のubiquilin陽性封入体は陰性だった。さらに症例を追加して検討する予定である。

G. 研究発表

論文発表

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. 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
5. 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

学会発表

1. 田村拓也 他. 明らかな家族歴を確認できないSOD1遺伝子Gly93Ser変異が同定された筋萎縮性側索硬化症の1剖検例. 第53回日本神経病理学会総会学術研究会 新潟市 2012年6月30日

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

なし

TDP-43 の C 末端領域の凝集に関わる配列の同定

研究分担者：久永 眞市¹⁾

研究協力者：下中 翔太郎^{1,2)}、野中 隆²⁾、長谷川 成人²⁾

¹⁾ 首都大学東京 理工学研究科生命科学専攻 神経分子機能研究室

²⁾ 東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能分野 病態細胞生物研究室

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及び前頭側頭葉変性症 (FTLD) のユビキチン陽性封入体 (UbIs) の主成分として核蛋白の TDP-43 が同定され TDP-43 の蓄積機構が注目されている。本研究では、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試みた。TDP-43 の C 末端側の配列を 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を行った。その結果、274-293、294-313、354-373 を欠損させた 3 種の欠損体において、欠損のない C 末断片に比べ、凝集体形成能の劇的な低下が観察された。このことは、これらの配列が、TDP-43 の凝集体形成に必要な配列であるということを示している。凝集体が形成されるプロセスを考える際に、これらの配列の関与を考慮することで、ALS、FTLD の根治療法確立に向けた TDP-43 の凝集メカニズムの解明に役立てることができると考えられる。

37°Cにて2日間培養した。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭葉変性症 (FTLD) などの神経変性疾患において、TDP-43 が主要成分であるユビキチン陽性封入体 (ubIs) が変性部位に認められ、細胞脱落との関わりが示唆されている。本研究では TDP-43 の凝集、蓄積に必須の配列を同定することを目的とした。この配列が明らかになれば、TDP-43 の蓄積メカニズムの解明だけでなく、治療や予防法の構築につながる事が期待される。

B.研究方法

TDP-43 の C 末端側の 214 番目の残基から 414 番目の残基までについて 20 残基ずつを順に欠損させた C 末端断片 162-414 を、GFP との融合蛋白として発現するコンストラクト 9 種類を作製した。これらの欠損変異体と、欠損なしの断片をヒト神経芽細胞 SH-SY5Y にトランスフェクションし、

欠損なしの断片と欠損変異体を一過性に発現させた SY5Y 細胞を、共焦点蛍光顕微鏡にて 488nm の波長で GFP タンパク質の発現、凝集を観察した。凝集体を形成した場合に、凝集体を形成しないものよりも強い蛍光を発することから、凝集体だけを検出するように閾値を設定して輝度抽出を行い、得られた輝度を積算して凝集体形成を定量化した。

また、界面活性剤である Sarkosyl (Sar) を 1%含むバッファーで細胞を回収、超音波処理した後、超遠心を行った細胞の上清を Sar 可溶性 (sup)、沈殿を Sar 不溶性 (ppt) として分画した。それぞれの画分に対して、抗 GFP 抗体、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410: 疾患中に見られる異常リン酸化部位に対する抗体) を用いてイムノブロットを行って、不溶化 TDP-43 を検出、定量した。

C.研究結果

発現させた C 末端断片の部分欠損体の内、214-233、234-253、254-273 を欠損させた 3 種の欠損体において、欠損なしの断片や他の欠損体のものと異なる、細かいドット状パターンの凝集体が観察された。しかしながら、蛍光強度の減少や Sar 不溶性リン酸化 TDP-43 の減少などは確認できなかった。一方、274-293、294-313、354-373 を欠損させた 3 種の欠損体において、蛍光顕微鏡の観察による凝集体形成の減少とイムノブロット解析による Sar 不溶性のリン酸化 TDP-43 の減少が確認された。

D. 考察

214-233、234-253、254-273 を欠損させた場合に、細かいドット状の凝集体が形成された理由は不明であるが、これらの領域は RNA 認識配列として働くドメインであり、RNA に結合する二次構造を取ることが予測されている配列であることから、これらの部分欠損が凝集体の形態に変化を及ぼした可能性が考えられる。

274-293、294-313、354-373 の配列を欠損した変異体については、蛍光顕微鏡観察、イムノブロットの両方で形成される凝集体の減少が確認されたことから、これらのアミノ酸配列が、凝集体の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。274-313 の配列は、実際の FTL D-MND (運動ニューロン病を伴う FTL D) 患者脳の不溶性画分の質量分析においてしばしば検出される配列である。また患者脳不溶性 TDP-43 をトリプシンやキモトリプシン処理した場合においてもプロテアーゼ耐性を示すことから線維化した TDP-43 の強固なコア部分を形成していると推測される。

E. 結論

274-293、294-313、354-373 のアミノ酸配列の欠損によって、TDP-43 の C 末端断片(162-414)の凝集体形成能は劇的に低下したことから、274-313、354-373 の配列は、TDP-43 の凝集に関与していると結論される。今後さらなる検討が必

要であるが、TDP-43 の凝集、蓄積モデルの再構築や、凝集を抑制する薬剤等の開発に大きく貢献すると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Hisanaga S., and Asada A. Cdk5-induced neuronal cell death: the activation of the conventional Rb-E2F G1 pathway in post-mitotic neurons. *Cell Cycle*, (2012) 11, 2049.
- 2). 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 novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner. *J Neurosci*, (2012) 32, 6587–6599.
- 3). 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.
- 4). Shahpasand S, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M, and Hisanaga S. Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, (2012) 32, 2430-2441.

2. 学会発表

- 1). Shimonaka S, Nonaka T, Hisanaga S., Hasegawa M. Identification of sequence responsible for aggregation of C-terminal fragment of TDP-43. The 17th Takeda Science Foundation Symposium □ on Bioscience, Osaka [2012. 12. 6]
- 2). 下中翔太郎, 野中隆, 久永真市, 長谷川成人. TDP-43 の C 末端領域の凝集に関わるドメインの同定. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡 [2012. 12. 15]

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 特になし

霊長類 ALS モデルにおける TDP-43 の脳内伝播

研究分担者： 横田隆徳¹⁾
共同研究者： 大久保卓哉¹⁾，田尻美緒¹⁾，関口輝彦¹⁾，木村展之²⁾，
内原俊記³⁾，水澤英洋¹⁾

- 1) 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学（神経内科）
- 2) 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター
- 3) 東京都医学総合研究所 脳病理形態研究室

研究要旨

我々が構築した世界初の霊長類 ALS モデルにおいて、カンクイザル第 6 頸髄利き手側に注入したヒト野生型 TDP-43 は対側の大脳皮質一次運動野第 5 層の Betz 細胞でも発現が認められた。TDP-43 の伝播機序を解明するため、pAAV-IRES-hrGFP ベクターを用いてヒト野生型 TDP-43 と hrGFP を同時に過剰発現させ、脳における外因性 TDP-43 の拡がりを解析した。サル脊髄に同様の手法でベクターを注入し、注入側が完全麻痺となった 4 週後に解剖し、脳の病理組織検査、PCR 解析を行った。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。今後、逆行性輸送による蛋白伝播の可能性を証明すべく、ALS 患者脳から蛋白不溶性画分を抽出してサル脊髄に直接注入することにより、蛋白伝播霊長類モデルを新たに構築する予定である。

A.研究目的

我々がこれまでに構築した世界初の霊長類 ALS モデルにおいて、カンクイザル第 6 頸髄利き手側に注入したヒト野生型 TDP-43 は対側の大脳皮質一次運動野第 5 層の Betz 細胞でも発現が認められた。

TDP-43 の伝播機序を解明する目的で、pAAV-IRES-hrGFP ベクターを用いてヒト野生型 TDP-43 と hrGFP を同時に過剰発現させ、脳における外因性 TDP-43 の拡がりを解析した。

B.研究方法

カンクイザル第 6 頸髄利き手側にこれまでと同様の手法でヒト野生型 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。

（倫理面への配慮）ウイルスベクターの使用を含む DNA 組換え実験は、東京医科歯科大学組換え DNA 実験委員会の実験指針に基づいて実施した（承認番号：2011-074）。

医薬基盤研究所医科学霊長類センターでは、長年に渡る霊長類を用いた動物モデル研究により培った技術に基づいて実験を行い、特に外科手術や安楽死ではサルの苦痛を最小限にする配慮を行った（承認番号：DS24-20）。

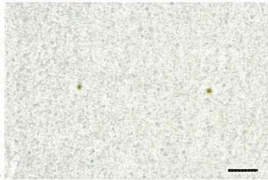
C.研究結果

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。

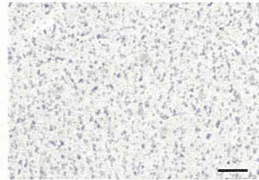
サル大脳一次運動野第5層 Betz細胞で外因性TDP-43の発現が認められたが、GFPの発現は認められなかった。



Anti Flag stain



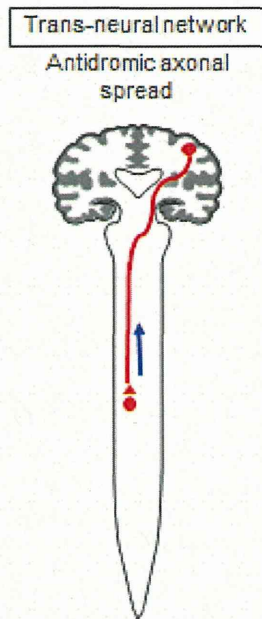
Anti hrGFP stain



Scale bar: 100 μm

D.考察

サル脊髄において pAAV-IRES-hrGFP ベクターで過剰発現した外因性野生型ヒト TDP-43 は、サル大脳皮質一次運動野の第5層 Betz細胞で発現していたが、GFPは発現しておらず、TDP-43の逆行性軸索輸送による伝播の可能性が考えられた。



E.結論

我々の霊長類 ALS モデルにおいて、外因性野生型ヒト TDP-43 は、逆行性輸送による伝播にてサル大脳皮質一次運動野に到達した可能性が考えられた。

ALS 患者脳から抽出した不溶性蛋白画分をサル脊髄に直接注入するという手法で、同様の蛋白伝播病態が再現できるかどうかを今後検討していく予定である。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. 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 mislocalization of TDP-43. *Brain* 2012 ;135(Pt 3):833-46.
2. 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.

2.学会発表

1. 大久保卓哉, 田尻美緒, 関口輝彦, 笹栗弘貴, 木村展之, 内原俊記, 水澤英洋, 横田隆徳. TDP-43 過剰発現霊長類モデルにおける TDP-43 の拡がり. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京. 2012.5.23.
2. Yokota T, Sasaguri H, Ohkubo T, Mizusawa H, Regional Cytoplasmic TDP-43 mislocalization is recapitulated in non-human primate mimicking ALS. The 64th AAN Annual Meeting. New Orleans. Apr 26th, 2012.
3. Tajiri M, Ohkubo T, Kimura N, Kawakami C, Teraoka S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Propagation of TDP-43 in non-human primate model of ALS. The 35th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society. Nagoya. Sep 18-21st, 2012.
4. Ohkubo T, Tajiri M, Sekiguchi T, Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. The Annual meeting of American Neurological Association. Boston. Oct 7-9th,

2012.

5. Ohkubo T, Sasaguri H, Tajiri M, Kimura N, Ono F, Hirai T, Enomoto M, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalizaion of TDP-43. The Annual meeting of Society for Neuroscience. New Orleans. Oct 15th, 2012.
6. Tajiri M, Ohkubo T, Kimura N, Kawakami C, Teraoka S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Propagation of TDP-43 in non-human primate model of ALS. The Annual meeting of Society for Neuroscience. New Orleans. Oct 15th, 2012.

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

TDP-43 mRNA の制御機構

研究分担者： 小野寺理¹ 小山哲秀² 須貝章弘³ 今野卓哉³ 小山美咲¹ 石原智彦³
西澤正豊³

所属：1) 新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野 2) 新潟大学研究機構超域学術院 3) 新潟大学脳研究所 神経内科学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の TDP-43 病理の特徴は、核内蛋白である TDP-43 の核からの消失と、細胞質内での封入体の形成である。しかし、何故、このような変化が起こるのかは解明されていない。一方、TDP-43 はその mRNA の量を厳格にコントロールしていることが明らかになってきている。このシステムの存在は、細胞は TDP-43 の量の変化に脆弱である可能性を示唆している。我々は 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した。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。さらに、TDP-43 の mRNA は核内に蓄積する傾向があり、特にそれは遠位の polyA site を持つ物に強かった。これらの機構により TDP-43 は自己の mRNA を通じて、自己発現量を調節する。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態に TDP-43 が深く関わっていることは疑う余地がない。ALS の TDP-43 病理の特徴は、核内蛋白である TDP-43 の核からの消失と、細胞質内での封入体の形成である。しかし、何故、このような変化が起こるのかは解明されていない。一方、TDP-43 はその mRNA の量を厳格にコントロールしていることが明らかになってきている。このシステムの存在は、細胞は TDP-43 の量の変化に脆弱である可能性を示唆している。

我々は 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。

B.研究方法

Hela, HEK293T 細胞は、37°C/5%CO₂ 条件下で

10%FBS を含む Dulbecco's modified Eagle Medium で培養した。トランスフェクションは LipofectamineTM2000 (Invitrogen) を使用し、細胞は 72 時間後に回収した。

回収した細胞は 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。

TDP-43 myc 安定発現細胞は Flp-in Expression system(Invitrogen)を用いて構築した。

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)

特に倫理面での配慮が必要な物はない。

C.研究結果

TDP-43 mRNA は、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構を阻害する CHX にて処理することにより増加した。この CHX 処理により増加する産物は、TDP-43 のエクソン 6 内で 2 つのイントロン (ie6-1, ie6-2) がスプライシングされているものであった。



TDP-43が蓄積

この産物は、本来の終止コドンを失い、新たな最終エクソンと新たな終止コドンを作り出す。これは、最終エクソンから、50 塩基以上に終止コドンが存在するというナンセンス依存性 mRNA 分解機構を惹起する条件を満たす (図 1)。さらにこの機構では、まず ie6-1 のスプライシングが行われることが重要であり、その後に ie6-2 のスプライシングがおこることを示した。これらの結果から、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した。

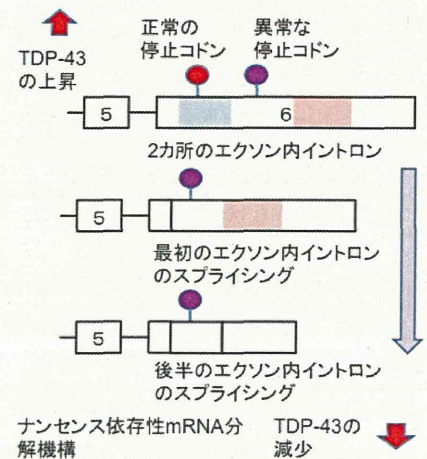
加えて、TDP-43 は poly A 結合部位の使用状況を変化させることを示した。外来性の TDP-43 存在下では、より遠位の polyA 結合部位を使用するようになった。さらに、TDP-43 の mRNA は核内に蓄積する傾向があり、特にそれは遠位の polyA 結合部位を利用する物に強かった。

D.考察

過剰な TDP-43 はエクソン 6 内の選択的スプライシングを惹起し、さらに polyA 結合部位の使い方を変化させ、長い 3'-UTR を持つ mRNA を産生した。エクソン 6 内のスプライシングは、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構の条件を満たし、実際、同機構の阻害剤により、この産物の増加を認めた。

一方、TDP-43 の増加は遠位部の polyA 結合部位を利用する TDP-43 mRNA の増加をもたらした。この mRNA は核内に貯留する傾向を認めた。

図1 TDP-43 はエクソン6の選択的スプライシングを介し自己の発現を調節する



mRNA の翻訳には、細胞質への移動が必要であり、この機構も、TDP-43 の自己調節機能の一端を担っていると想定された。

TDP-43 は現在まで30種類以上の変異が報告されているが、そのほとんどすべてがエクソン 6 に集中している。本研究を通じて、我々は TDP-43 のエクソン 6 が自己蛋白量調節機構において重要な役割を担っていることを明らかとした。今後、ALS で見いだされた変異が、この自己蛋白調節機構にどのような影響を与えるかを明らかにしていきたい。

E.結論

TDP-43 は TDP-43 によりエクソン 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。この機構により mRNA 量を調節する。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

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.

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.

2.学会発表

第 53 回 日本神経学会総会 (2012 年 5 月 23 日)
石原智彦, 志賀篤, 横尾麻衣子, 有泉優子, 横関明男, 譚春鳳, 柿田明美, 西澤正豊, 高橋均, 小野寺理. 「ALS 患者神経組織ではスプライシング関連機能性 RNA が低下する」

Society For Neuroscience 2012, (New Orleans, Oct,17,2012) Tomohiko Ishihara, Atsushi Shiga, Akio Yokoseki, Akiyoshi Kakita, Masatoyo Nishizawa, Hitoshi Takahashi, Osamu Onodera
'Reduction of U12 snRNAs in nervous tissues with TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis'

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

【研究成果の刊行に関する一覧表】

原著・症例報告

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M.	Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain	Brain			in press
Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Isobe T, Hasegawa M, Hisanaga S.	Isomerase Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau Protein at Cyclin-dependent Kinase (Cdk5)-dependent Alzheimer Phosphorylation Sites.	J Biol Chem	288	7968-77	2013
Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, 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.	Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTLN, PSP, and CBS.	Parkinsonism Relat Disord.	19	15-20	2013
Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A.	Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy.	Brain	135	3380-91	2012
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.	Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells.	Sci Transl Med.	4	145ra104	2012
Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Lim S, Paterson BM, Donnelly PS, Crouch PJ, White AR.	Inhibition of TDP-43 accumulation by bis(thiosemicarbazono)-copper complexes.	PLoS One	7	e42277	2012
Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S.	α -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan.	J Neuropathol Exp Neurol.	71	625-30	2012
Wang Y, Shi M, Chung KA, Zabetian CP, Leverenz JB, Berg D, Srujijes K, Trojanowski JQ, Lee VM, Siderowf AD, Hurtig H, Litvan I, Schiess MC, Peskind ER, Masuda M, Hasegawa M, Lin X, Pan C, Galasko D, Goldstein DS, Jensen PH, Yang H, Cain KC, Zhang J.	Phosphorylated α -synuclein in Parkinson's disease.	Sci Transl Med.	4	121ra20	2012
Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M, Hisanaga S.	Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease.	J Neurosci.	32	2430-41	2012
Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M.	Methylene Blue Reduced Abnormal Tau Accumulation in P301L Tau Transgenic Mice.	PLoS One	7	e52389	2012
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	83-6	2013

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
Suzuki N, Kato S, Kato M, Warita H, Mizuno H, Kato M, Shimakura N, Akiyama H, Kobayashi Z, Konno H, Aoki M.	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	779-88	2012
Aoki N, Higashi S, Kawakami I, Kobayashi Z, Hosokawa M, Katsuse O, Togo T, Hirayasu Y, Akiyama H.	Localization of fused in sarcoma (FUS) protein to the post-synaptic density in the brain.	Acta Neuropathol.	124	383-94	2012
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.	32	272-9	2012
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	32	390-7	2012
Mochizuki Y, Isozaki E, Takao M, Hashimoto T, Shibuya M, Arai M, Hosokawa M, Kawata A, Oyanagi K, Mihara B, Mizutani T.	Familial ALS with FUS P525L mutation: two Japanese sisters with multiple systems involvement.	J Neurol Sci.	323	85-92	2012
Tanjina Sharmin, Tomomitsu Satho, Keiichi Irie, Mineo Watanabe, Masato Hosokawa, Yukihiro Hiramatsu, Parimal Talukder, Takahiro Okuno, Shodai Tsuruda, Saori Uyeda, Yukie Fukumitsu, Yukihiro Nakashima, Reiko Eyanagi, Akihisa Toda, Nobuhiro Kashige, Fumio Miake	The possibility of Pyriproxyfen as an adjuvant to promote Th1 immune response	Microbiology and Immunology			in press
Akitake Y, Nakatani Y, Kamei D, Hosokawa M, Akatsu H, Uematsu S, Akira S, Kudo I, Hara S, Takahashi M	Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in Alzheimer's disease and its deletion mitigates Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model	Journal of Neuroscience Research			in press
Soma K, Fu Y-J, Wakabayashi K, Onodera O, Kakita A, Takahashi H	Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	Neuropathol Appl Neurobiol	38	54-60	2012
Kosaka T, Fu Y-J, Shiga A, Ishidaira H, Tan C-F, Tani T, Koike R, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H	Primary lateral sclerosis: upper-motor-predominant amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobar degeneration - immunohistochemical and biochemical analyses of TDP-43.	Neuropathology	32	373-84	2012
Tada M, Coon EA, Osmand AP, Kirby PA, Martin W, Wieler M, Shiga A, Shirasaki H, Tada M, Makifuchi T, Yamada M, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Paulson HL	Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study.	Acta Neuropathol	124	749-60	2012
Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K	Comparison of phosphorylated TDP-43-positive inclusions in oculomotor neurons in patients with non-ALS and ALS disorders	J Neurol Sci	315	20-5	2012
Makioka K, Yamazaki T, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K	Activation and alteration of lysosomes in multiple system atrophy	Clin Neurosci Neuropathol	23	270-6	2012

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
Ushikubo M, Okamoto K	Circumstances surrounding death and nursing difficulties with end-of-life care for individuals with ALS in central Japan	International Journal of Palliative Nursing	18	S54-S60	2012
Furuta N, Ikeda M, Hirayanagi K, Fujita Y, Amanuma M, Okamoto K	A Novel GJA1 mutation in oculodentodigital dysplasia with progressive spastic paraplegia and sensory deficits	Internal Medicine	51	93-8	2012
Sohmiya M, Wada N, Tazawa M, Okamoto K, Shirakura K	Immediate effects of physical therapy on gait disturbance and frontal assessment battery in Parkinson's disease	Geriatrics and Gerontology International			in press
Ikeda M, Hirayanagi K, Arai M, Kakuda S, Makioka K, Furuta N, Takai E, Kasahara H, Tsukagoshi S, Fujita Y, Amari M, Takatama M, Okamoto K	Encephalopathy with amyloid angiopathy and numerous amyloid plaques with low levels of CSF A β 1-40/A β 1-42	Amyloid	19	186-90	2012
Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi H, Okamoto M, Takamatsu K, Ota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K	Clinical features of SCA36: A novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan)	Neurology	79	333-41	2012
Nawa M, Kage-Nakadai E, Aiso S, Okamoto K, Mitani S, Matsuoka M	Reduced Expression of BTBD10, an Akt Activator, leads to motor neuron death	Cell Death and Differentiation	19	1398-407	2012
Furuta N, Makioka K, Fujita Y, Ikeda M, Takatama M, Matsuoka M, Okamoto K	Reduced expression of BTBD10 in anterior horn cells with Golgi fragmentation and pTDP-43-positive inclusions in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis	Neuropathology			in press
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.	7	50	2012
Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J	Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population.	Amyotroph Laterl Scler	13	562-6	2012
Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T	Enhanced antigen retrieval of amyloid β immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid β pathology in Alzheimer disease and its mouse model.	J Histochem Cytochem	60	761-9	2012
Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima M, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama S, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H	Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum.	Neuropathology	32	593- 603	2012
Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, Murayama S, Ihara Y	Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Suspected limited efficacy of γ -secretase modulators.	Neurobiol Aging	34	1101-4	2013

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
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			in press
Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H	Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt Jakob disease	BMJ Open Journal			in press
Mori F, Tanji K, Kon T, Odagiri S, Hattori M, Hoshikawa Y, Kono C, Yasui K, Yokoi S, Hasegawa Y, Yoshida M, Wakabayashi K	FUS immunoreactivity of neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease.	Neuropathol Appl Neurobiol.	38	322-8	2012
Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Ikeda T, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K	Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease.	Acta Neuropathol	124	149-51	2012
Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K	Optineurin immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions of polyglutamine diseases (Huntington's, DRPLA, SCA2, SCA3) and intranuclear inclusion body disease.	Acta Neuropathol	123	747-9	2012
Takano T, Tomomura M, Yoshioka N, Tsutsumi K, Terasawa Y, Saito T, Kawano H, Kamiguchi H, Fukuda M, Hisanaga S.	LMTK1/AATYK1 is a novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner.	J. Neurosci.	32	6587- 99	2012
Hayashi Y, Nihonmatsu-Kikuchi N, Hisanaga S, Yu XJ, Tatebayashi Y.	Neuropathological similarities and differences between schizophrenia and bipolar disorder : a flow cytometric postmortem brain study.	PLoS One	7	e33019	2012
Asada A, Saito T, Hisanaga S.	Phosphorylation of p35 and p39 by Cdk5 determines the subcellular location of the holokinase in a phosphorylation-site-specific manner.	J. Cell Sci	125	3421-9	2012
Yoshioka N, Asou H, Hisanaga S, Kawano H.	The astrocytic lineage marker calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1): phenotypic heterogeneity of newly born Camsap1-expressing cells in injured mouse brain.	J. Comp. Neurol.	520	1301-17	2012
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	135	833-46	2012
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.	7	e43120	2012

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
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.			in press
河上緒, 新里和弘, 新井哲明, 大島健一, 安野みどり, 湯本洋介, 小幡菜々子, 新井誠, 糸川昌成, 後藤順, 市川弥生子, 平安良雄, 岡崎祐土, 秋山治彦	32歳で発症した舞踏病様不随意運動を伴う前頭側頭型認知症の一例.	老年精神医学雑誌	23	1121-7	2012
大谷忠広, 牛久保美津子, 猪熊綾子, 富田千恵子, 池田将樹, 岡本幸市	病院と地域支援者間で実施した筋萎縮性側索硬化症のデスカンファレンス	日本プライマリ・ケア連合学会誌	35	215-21	2012

総説

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
Hisanaga and Asada	Cdk5-induced neuronal cell death: the activation of the conventional Rb-E2F G1 pathway in post-mitotic neurons.	Cell Cycle	11	2049	2012
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.	83	739-45	2012
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	臨床神経学	52	1056-8	2012
長谷川成人	細胞内異常タンパク質の伝播の可能性	Dementia Japan	27	45-53	2013
長谷川成人	神経変性疾患は「蛋白質癌」か?	Brain & Nerve	64	675-9	2012
野中隆, 長谷川成人	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	2012
野中隆, 新井哲明, 水上勝義, 長谷川成人	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	353-8	2012
野中隆, 長谷川成人	ユビキチン陽性封入体とTDP-43	生体の科学	63	528-9	2012
秋山治彦	認知症疾患モデル「TDP-43脳脊髄異常蓄積マウス」の開発	Annual Review 神経2013		75-80	2013
新井哲明, 細川雅人, 野中隆, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆	前頭側頭葉変性症の分子医学	Dementia Japan	26	334-42	2012
新井哲明, 水上勝義	早期診断と医療連携	Medicament News	2090	4-5	2012
新井哲明	前頭側頭葉変性症の分子病理	老年期認知症研究会誌	19	60-2	2012
岡本幸市	認知症を伴う運動ニューロン疾患	老年期認知症研究会誌	19	29-32	2012
藤田行雄, 岡本幸市	ALSにおけるゴルジ装置の断片化とTDP-43	生命の科学	63	416-7	2010
村山繁雄, Seung-Jae Lee, 武田篤, 鈴木則宏	パーキンソン病はプリオン病か?—シヌクレインパチーの細胞間移行—(座談会)	Frontiers in Parkinson Disease.	5	5-13	2012
村山繁雄, 齊藤祐子	【アルツハイマー病-先制医療に向けての展開】アルツハイマー病と脳老化の病理学	カレントセラピー	30	320-5	2012
村山繁雄, 齊藤祐子	アルツハイマー病と脳老化の病理学—特集 今, 認知症にどう向き合うか.	内科	109	840-5	2012
村山繁雄, 高尾昌樹, 初田裕幸, 斎藤祐子	6.ブレインバンク 第1部 病理解剖の進め方, 切り出し方法など c.特殊な部位, 手技, 検体保存	病理と臨床【臨時増刊号】	30	103-9	2012
村山繁雄, 齊藤祐子	第1部:基礎編 パーキンソン病の神経病理up to date	Progress in Medicine	32	1161-5	2012
村山繁雄, 齊藤祐子	タウ蛋白と免疫染色	検査と技術	40	749-51	2012
村山繁雄, 齊藤祐子, 丹羽真一	第II部4章新しい臨床研究の技術とプロジェクト展開 2.精神・神経疾患研究のためのブレインバンク	実験医学	30	146-55	2012
高尾昌樹, 村山繁雄, 美原盤, 吉田洋二	バイオバンク構築における病理の役割【共同研究の機転として機能する我が国のバイオバンクの実例】ブレインバンクの現状, 高齢者ブレインバンク, 美原記念病院ブレインバンクの経験から	病理と臨床	30	635-45	2012

著者名	論文タイトル名	雑誌名	巻・号	ページ	出版年
高橋英気, 望月英明, 井藤英喜, 筑井恵美子, 加藤貴行, 鄭仁熙, 徳丸阿耶, 山川通隆, 安藝良一, 沢辺元司, 高尾昌樹, 新井富生, 村山繁雄	膿瘍との鑑別が困難であった肺腫瘍・転移性脳腫瘍の1例	内科	110	469-80	2012
沢辺元司, 新井富生, 村山繁雄, 清水孝彦, 戸田行総, 古田耕, 増井徹	バイオバンク構築における病理の役割 【共同研究の起点として機能する我が国のバイオバンク】東京都健康長寿医療センターの病理由来組織バンクおよび日本における組織バンクの課題	病理と臨床	30	624-8	2012
砂川昌子, 増田義重, 沢辺元司, 足立正, 徳丸阿耶, 井藤英喜, 川田真幹, 稲松孝思, 村山繁雄, 初田裕幸	-CPC-4年間, 経管栄養をした高度認知症の1例	Geriatric Medicine	50	653-62	2012
神谷久雄, 村山繁雄, 舟邊さやか, 齊藤祐子, 福田隆浩	薬剤性パーキンソン症状との鑑別が問題となった軽度認知障害の87歳男性	BRAIN and NERVE	64	1435-42	2012
斎藤太郎, 久永眞市	神経細胞におけるCDK5の機能とその異常活性化による神経変性疾患.	実験医学	31	265-70	2013
久永眞市	Phos-tag を用いたCdk5制御サブユニットp35のin vivo リン酸化の定量的解析.	生物物理化学	56	s9	2012

単行本

著者名	論文タイトル名	書籍名	編集者名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Minegishi and Hisanaga	Cyclin-dependent kinase 5: preparation and measurement of kinase activity.	In Protein kinase technologies. Neuromethods	H. Mukai	Springer	NY	2013	in press
新井哲明	アルツハイマー病治療薬の臨床	実践治療薬	公益社団法人日本薬理学会	金芳堂	京都	2012	340-7
田代裕一, 岡本幸市	前頭葉側頭変性症の分類を教えてください	認知症診療 Q&A92	中島健二, 和田健二	中外医学社	東京	2012	86-8
田代裕一, 岡本幸市	認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症(ALS-D) の臨床的特徴は?	認知症診療 Q&A92	中島健二, 和田健二	中外医学社	東京	2012	89-90

Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain

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

1 Department of Neuropathology and Cell Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

2 Dementia Research Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8506, Japan

3 Department of Psychiatry, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

4 Centre for Clinical and Cognitive Neuroscience, Institute of Brain Behaviour and Mental Health, University of Manchester, Salford M6 8HD, Manchester, UK

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

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

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

Introduction

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

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

Received November 24, 2012. Revised January 11, 2013. Accepted January 14, 2013.

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

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

these diseases. Neuropathologically, α -synuclein lesions are believed to spread progressively throughout the brain and their spread correlates to the staging of clinical symptoms (Muller *et al.*, 2005), as in the case of tau pathology in Alzheimer's disease (Braak and Braak, 1991). Kordower *et al.* (2008) and Li *et al.* (2008) reported that embryonic neurons transplanted into the striatum of an individual with Parkinson's disease developed Lewy body-like pathologies, suggesting that pathological α -synuclein may be transmissible from diseased neurons to healthy neurons. Recent studies have also shown that exogenous α -synuclein fibrils induced Lewy body pathology in cultured neurons (Desplats *et al.*, 2009; Emmanouilidou *et al.*, 2010; Nonaka *et al.*, 2010; Volpicelli-Daley *et al.*, 2011), transgenic mouse brain (Mougenot *et al.*, 2012; Luk *et al.*, 2012b) and wild-type mouse brain (Luk *et al.*, 2012a). In addition, a growing body of evidence indicates that self-propagating protein aggregates play central roles in many neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease and Alzheimer's disease (Clavaguera *et al.*, 2009; Mougenot *et al.*, 2012; Luk *et al.*, 2012b; Stohr *et al.*, 2012). In this work, we have tested whether inoculation of insoluble α -synuclein from brains with dementia with Lewy bodies and synthetic mouse and human α -synuclein fibrils can induce α -synuclein pathology in wild-type mice. As a result, we have established a new mouse model of sporadic α -synucleinopathy using wild-type mice.

Materials and methods

Preparation of recombinant α -synuclein monomer and fibrils

Human and mouse α -synuclein were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells, as described (Masuda *et al.*, 2006b). To avoid the production of α -synuclein dimers induced by misexpression of cysteine-containing α -synuclein, the Y136-TAT construct was used (Masuda *et al.*, 2006a). α -Synuclein was purified by boiling, Q-Sepharose[®] ion exchange chromatography and ammonium sulphate precipitation, before dialysis against 30 mM Tris-HCl, pH 7.5. Recombinant proteins were centrifuged at 113 000g for 20 min at 4°C to remove insoluble materials and used as α -synuclein monomer. Protein concentrations were determined as described (Yonetani *et al.*, 2009). Purified human and mouse α -synuclein (7 mg/ml) were incubated at 37°C in a shaking incubator (200 rpm) in 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.1% NaN₃, for 72 h. α -Synuclein fibrils were pelleted by spinning the assembly mixtures at 113 000g for 20 min.

Preparation of the insoluble fraction of dementia with Lewy bodies brain

Fresh frozen brain tissue from a patient with dementia with Lewy bodies (phosphorylated α -synuclein pathology is shown in Supplementary Fig. 9) was homogenized in 18 volumes (w/v) of Buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.8 M NaCl, 1 mM EGTA, and 10% sucrose), and sarkosyl was added to the homogenate at a concentration of 2%. The mixture was incubated for 30 min at 37°C, sonicated and spun at 9100g for 10 min at 25°C. The supernatant was further centrifuged at 113 000g for 20 min at 25°C, and the sarkosyl-insoluble pellet was washed with Buffer A. The pellet was

taken up in saline, sonicated and centrifuged at 800g for 5 min. The supernatant was used for stereotaxic injection.

Stereotaxic surgery

Four- to six-month-old female C57BL/6J mice (CLEA Japan, Inc.) anaesthetized with 50 mg/kg pentobarbital sodium were injected with 10 μ g of recombinant α -synuclein monomer, fibrils or 5 μ l of insoluble fraction of dementia with Lewy bodies brain into substantia nigra (anterior-posterior: -3.0 mm; medial-lateral: -1.3 mm; dorsal-ventral: -4.7 mm from the bregma and dura) using a 10- μ l Hamilton syringe. Mice were anaesthetized with isoflurane and killed by decapitation. For immunohistochemistry, brains were fixed in 10% formalin neutral buffer solution (Wako), and for biochemical analysis, brains were snap-frozen on dry ice and stored at -80°C. All experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science.

Immunohistochemistry

Brains fixed in 10% formalin were cut on a vibratome (Leica) at 50 μ m thickness. The free-floating sections were treated with 0.5% H₂O₂ in methanol for 30 min to inactivate peroxidase and blocked with 10% calf serum in PBS. Sections were immunostained with appropriate antibodies. Antibodies used in this study are summarized in Supplementary Table 1. After incubation with the biotinylated-secondary antibody (Vector), labelling was detected using the ABC staining kit (Vector).

Confocal microscopy

For double-label immunofluorescence for phosphorylated α -synuclein and ubiquitin or phosphorylated α -synuclein and p62, brain sections were incubated overnight at 4°C in a cocktail of 1175 and anti-ubiquitin or anti-p62 antibody. The sections were then washed and incubated in a cocktail of Alexa Fluor[®] 568-conjugated goat anti mouse IgG (Molecular Probes) and Alexa Fluor[®] 488-conjugated goat anti mouse IgG (Molecular Probes). After further washing, sections were stained with TO-PRO[®]-3, coverslipped with VECTASHIELD[®] (Vector) and observed with a laser-scanning confocal fluorescence microscope (LSM5 PASCAL, Carl Zeiss).

Biochemical analysis

Mouse brains were homogenized in 20 volumes (w/v) of Buffer A, then spun at 100 000g for 30 min at 4°C, and the supernatant was retained as buffer-soluble fraction. The pellet was homogenized in 20 volumes of Buffer A containing 1% Triton[™] X-100 and incubated for 30 min at 37°C. After centrifugation at 100 000g, the Triton[™]-insoluble pellet was further homogenized in Buffer A containing 1% sarkosyl and incubated at 37°C for 30 min. Samples were spun at 100 000g for 30 min. The sarkosyl-pellet was sonicated in 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, and used for immunoblotting as sarkosyl-insoluble fraction. The samples were subjected to SDS-PAGE on 12.5% polyacrylamide gel and proteins were electrotransferred onto a polyvinylidene difluoride membrane, probed with appropriate antibodies and detected as described (Nonaka *et al.*, 2009).

Behavioural tests

Open field test

Each mouse was placed in the centre of the open field apparatus (25-cm diameter). Activity was measured by SUPERMEX system (Muromachi Kikai) over 90-min period and analysed by CompACT AMS software ver.3 (Muromachi Kikai). Total activity was measured by counting the number of photobeam interruptions over every 5-min period.

Wire hang test

Neuromuscular strength was tested with a wire hang test. The mouse was placed on a wire mesh, waved gently so that the mouse gripped the wire and then inverted. Latency to fall was recorded with a 300-s cut-off time.

Rotarod test

The Rotarod test, using an accelerating Rotarod (Muromachi Kikai), was performed by placing mice on 9-cm diameter rods and measuring the time each animal was able to maintain its balance on the rod. We used 9-cm rods to make the test more sensitive to motor skill learning (Shiotsuki *et al.*, 2010). The speed of the rotarod accelerated from 0 to 40 rpm over a 5-min period.

Y-maze test

Y-maze apparatus (Muromachi Kikai) consisted of three arms (40 cm \times 3 cm) made of grey plastic joined in the middle to form a Y shape. Mice were placed into one of the arms of the maze and allowed to explore freely the maze for an 8-min session. The alternation between arms was recorded.

Intranasal administration of abnormal α -synuclein fibrils

Twenty micrograms of recombinant α -synuclein monomer or pre-formed fibrils, or 10 μ l of insoluble fraction of dementia with Lewy bodies brain, was administered intranasally once a week for 1 month to 10-week-old female C57BL/6J mice (soluble mouse α -synuclein, soluble human α -synuclein, mouse α -synuclein fibrils, human α -synuclein fibrils and dementia with Lewy bodies extracts, $n = 5$ per group). At 21 months after the last administration, mice were anaesthetized with pentobarbital sodium and killed by perfusion with phosphate buffer (pH 7.4) and 4% paraformaldehyde in 0.1% phosphate buffer. Brains were cryosectioned and immunostained as described above.

Results

To investigate whether insoluble α -synuclein fibrils can propagate *in vivo*, we injected recombinant human α -synuclein fibrils into the substantia nigra in the right cerebral hemisphere of C57BL/6J mice. α -Synuclein fibrils were prepared using highly purified

recombinant α -synuclein (Supplementary Fig. 1A) by incubation with shaking. Formation of the fibrils was confirmed by electron microscopy (Supplementary Fig. 1B) and thioflavin S assay (data not shown). The fibrils were then collected by ultracentrifugation, sonicated and used for injection. Abnormal phosphorylated α -synuclein-positive structures were observed in the brains of mice injected with human α -synuclein fibrils at 15 months after inoculation (Fig. 1). Phosphorylated α -synuclein pathology was distributed throughout the brain including substantia nigra, amygdala, dentate gyrus, hippocampal CA1-3, molecular layer of hippocampus, fimbria, stria terminalis, hypothalamus, somatosensory area, visual cortex, cingulate cortex and corpus callosum (Fig. 1). Phosphorylated α -synuclein-positive structures were also positive for anti-ubiquitin and p62 antibodies (Fig. 2A). Co-localization was confirmed by confocal microscopy (Fig. 2B and C), indicating that these structures have the same immunoreactive properties as Lewy bodies (Kuusisto *et al.*, 2001). By contrast, no phosphorylated α -synuclein, ubiquitin or p62-positive pathology was observed in the brains of mice injected with soluble human α -synuclein (Supplementary Fig. 2). Remarkably, despite the unilateral injection of α -synuclein fibrils, phosphorylated α -synuclein-positive pathology appeared bilaterally (Fig. 3A). In the right hemisphere (injected side), phosphorylated α -synuclein pathology was seen abundantly in dentate gyrus and amygdala, whereas in the left hemisphere no pathology was seen in amygdala and only sparsely in dentate gyrus (Fig. 3A). These results strongly suggest that α -synuclein pathology propagates throughout the brain from the injection site. To understand the spreading pathway of phosphorylated α -synuclein pathology, we investigated in detail the distribution in four coronal sections at 15 months after inoculation (Fig. 3B). Near the injection level (bregma -3.40 mm), abundant phosphorylated α -synuclein pathology was present in substantia nigra, hippocampus, external capsule and entorhinal cortex in right hemisphere, whereas in the left hemisphere, sparser pathology was detected in hippocampus and external capsule (Fig. 3B). By contrast, at the level of 0.02 mm from bregma (3 mm anterior to the injection level), phosphorylated α -synuclein pathology was concentrated in stria terminalis, septal nucleus and cingulate, motor and somatosensory cortex in the right hemisphere. In the left hemisphere, phosphorylated α -synuclein pathology was detected only in septal nucleus (Fig. 3B). These results suggest that phosphorylated α -synuclein pathology does not spread by simple diffusion and the propensity to accumulate phosphorylated α -synuclein seems to differ among brain regions. The time course of spreading of phosphorylated α -synuclein pathology was analysed by immunohistochemistry and summarized in Table 1. Table 1 clearly indicates that induction of phosphorylated α -synuclein pathology in wild-type mice is time- and brain region-dependent. No signs of astrogliosis and inflammation were observed in human α -synuclein fibril-injected mice compared with soluble-human α -synuclein-injected mice at 15 months after injection (Supplementary Fig. 3).

To clarify which α -synuclein species accumulated in the mice, and when, we performed immunoblot analysis with LB509 and anti-mouse synuclein antibodies, which specifically recognize human α -synuclein and mouse α -synuclein, respectively. The antibody specificities are shown in Supplementary Fig. 1B. At a few