

201231007B

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22～24年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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. 研究分担者ごとの総合研究報告

1. ALS, FTLD の異常 TDP-43 の病態形成、進行機構に関する検討 ----- 8
長谷川 成人
2. シード依存的な細胞内 TDP-43 蓄積モデルの開発とその応用：不溶化 TDP-43
のプリオン様性質の解明 ----- 17
野中 隆
3. 患者脳に蓄積する異常 TDP-43 の生化学的解析 ----- 21
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 ----- 24
秋山 治彦
5. 脳脊髄液中の TDP-43 の検出と TDP-43 proteinopathy 動物モデルの構築 ----- 31
細川 雅人
6. TDP-43 および FUS に関する遺伝子学的・病理組織化学的解析 ----- 38
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 ----- 47
高橋 均
8. ALS の神経細胞封入体で TDP-43 と FUS は共存するか？ ----- 50
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 ----- 53
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 ----- 56
吉田 真理
11. TDP-43 の C 末端領域の凝集に関わる配列の同定 ----- 58
久永 眞市
12. 霊長類 ALS モデルにおける TDP-43 の脳内伝播 ----- 60
横田 隆徳
13. TDP-43 mRNA の制御機構 ----- 63
小野寺 理

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 66

総合研究報告書

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

ALSの発症、進行に深く関与するTDP-43の異常を中心に、剖検脳解析、病態を再現する細胞、動物モデルの構築を行った。患者脳に蓄積する異常TDP-43は病型ごとに異なり、少なくとも3種類の構造の違いがあること、その異常TDP-43は、正常なTDP-43を自身と同じ異常構造に変換する能力を有することを明らかにした。また、原発性側索硬化症(PLS)はALSとは区別される疾患と考えられること、高齢者連続剖検例ではTDP-43蓄積は多くが側頭葉にのみ認められ、type A型であること、FUS異常を伴うALSやFTLDはそれぞれ特徴的病理を示すことなどを明らかにした。動物モデルの構築は、カニクイザル第6頸髄利き手側に注入したウイルスベクターで発現したヒト野生型TDP-43が対側の大脳皮質一次運動野第5層のBetz細胞でも確認され病変が広がる可能性が示唆された。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を証明した。遺伝子解析から、SOD1変異は家族性ALSの25%、TARDBP、FUS変異はそれぞれ9.4%であり、欧米とほぼ同様の頻度であった。C9ORF72遺伝子異常を有する例も三重県のALS/FTD家系に報告された。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。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することにより自己のmRNA量を調節することを示した。

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; FTLN)の患者脳、脊髄の変性細胞内には核蛋白質の一種であ

る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の密接な関係が示されている。家族性および孤発性ALSにおいて発症と連鎖するTDP-43遺伝子(TARDBP)の変異が多数発見され、その発症への関与は遺伝学的にも証

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、ALS の根本治療の中心標的といえる。

本研究班では、ALS 患者脳、脊髄に蓄積する TDP-43 の神経病理、生化学解析から、TDP-43 異常病変が生じる分子機構を解明すると共に、病態を再現する試験管内、細胞、動物モデルを構築し、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

病型の異なる TDP-43 異常を伴う剖検例(Type A, B, C、あるいは ALS, PLS, FTLD など臨床診断された症例)について、ホルマリン固定した脳病理組織標本、あるいは凍結組織から抽出した蛋白質を、pTDP-43(pS409/410), FUS, tau, p α Syn, p62 などの抗体により免疫化学染色し、神経病理、生化学的解析を行った。また、一部の試料については、サルコシル不溶性画分を調製し、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. 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。

3. 培養細胞実験

TDP-43 のプラスミドを発現した SH-SY5Y 細胞に、様々な病型の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 抗体などを用いて免疫組織化学、イムノブロット解析を行った。

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 で一週間放置し、線維化した。線維化 α シヌクレイン、可溶性 α シヌクレインを野生型マウス(C57BL)脳の黒質に接種し、一定期間後、免疫組織染色、生化学解析を行った。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、病理組織検査、PCR 解析を行った。

(倫理面への配慮)

剖検脳の組織、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受け、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組換え DNA 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). 長谷川らは、FTLD-TDP 19 例 (Type A 6 例, Type B 8 例, Type C 5 例)について、不溶性 TDP-43 を抽出し、TDP-43 の C 末断片を比較、またプロテアーゼ耐性 TDP-43 のバンドパターンの違いを検討した。その結果、TDP-43 の C 末端バンドパターン、プロテアーゼ耐性バンドのいずれも、神経病理学的分類(Type A~C)に一致して、区別されることを示し、病型により TDP-43 の重合様式が異なることを示した。

また、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、マウス脳内で内在性 α シヌクレインがヒト線維化 α シヌクレインの接種により異常に変換されることを証明した。

2) 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。

3) 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。その結果、TDP-43 の C 末端断片の切断部位を決定すると同時に、C 末端はプロテアーゼ耐性領域を形成していること、その近傍に異常リン酸化を含む翻訳後修飾が存在することを明らかにした。

4) 秋山らは、1973 年以降、研究室に蓄積された 66 例の FTLD の脳病理組織標本について、tau、TDP-43、FUS の免疫組織化学染色を行い、9 例が FTLD-FUS であることを確認した。FTLD-FUS には好塩基性封入体病 (basophilic inclusion body disease: BIBD)、神経細胞中間径フィラメント封入体病 (neuronal intermediate filament inclusion disease: NIFID)、非定型的ユビキチン封入体陽性 FTLD (atypical FTLD with ubiquitin inclusions: aFTLD-U) の 3 病型が知られているが、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。

5) 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。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。

また、動物モデルの解析として GRN ノックアウトマウスの解析を行った。その結果、12、24 ヶ月齢のノックアウトマウスの視床において、p62 陽性の構造が認められた。構造は、ニューロピルに顆粒状に染色されるものが多いが、一部は円形の封入体様および突起様の構造もみられた。

6) 細川らは、ALS 患者および末梢神経障害であるギランバレー症候群 (GBS) 患者の CSF 中 TDP-43 の検出をサンドイッチ ELISA にて行った。その結果、ALS 患者 CSF 中の TDP-43 濃度が GBS 患者に比べ、有意に高いことが示された。また、ALS の発症メカニズムを明らかにしていくとともに、病態モデルマウスを用いた薬物のスクリーニング及び薬物治療へつなげるために、TDP-43 proteinopathy モデルマウスを作製した。免疫組織化学染色によって神経細胞内にリン酸化 TDP-43 陽性封入体を確認した。

7) 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。その結果、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。

8) 岡本らは TDP-43 陽性封入体を有する孤発性 ALS 12 例の脊髓ミラー切片を pTDP-43 抗体と抗 FUS 抗体で免疫染色し比較した。その結果、

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 からは独立した疾患であると考えられた。

9) 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。その結果、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。

10) 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。その結果、*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。

11) 横田らは、ヒト野生型 TDP-43 を組み込んだ pAAV-IRES-hrGFP ベクターをカニクイザル第 6 頸髄利き手側に注入し、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。

12) 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。

13) 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のところ 4 型に分類されているが、解析した 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できることが明らかとなった。PLS については、この 4 型とは異なる新しい病型である可能性が高い。

FUS の蓄積を伴う症例については、蓄積分子自体が異なり、ALS-TDP からは独立した疾患である。また *C9ORF72* 変異例も変異によって生じたリピート部分が翻訳された異常蛋白質が蓄積することが明らかとなった。

細胞への異常タンパク質導入実験より、患者脳に蓄積する異常 TDP-43 は、プリオン病における異常プリオンと極めて類似した性質、すなわち、正常分子を異常に変換する性質が存在することが明らかとなった。したがって、TDP-43 が蓄積する疾患群において、中枢神経系における TDP-43 病変の拡がりには、プリオン様の伝播メカニズムと同じように起こることが示唆される。詳細な機構は不明ではあるが、治療戦略を考える上で、今後極めて重要である。

同様の細胞内異常タンパク質の伝播について、動物レベルでその証明を行った。線維化したヒト α シヌクレインを野生型マウスの脳内に接種したところ、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ることが示された。この実験により、細胞内異常タンパク質の細胞間の伝播が証明されたことにな

り、今後、TDP-43 についても同様の結果が期待される。

E. 結論

患者脳解析から、蓄積する異常 TDP-43 が病型ごとに異なること、FUS 異常を伴う ALS や FTLD はそれぞれ特徴的病理を示すこと、原発性側索硬化症(PLS)は ALS とは異なる特徴的な TDP-43 病理を示すこと、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 型蓄積であること、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ことなどを明らかにした。

遺伝子解析から、*SOD1*, *TARDBP*, *FUS* の異常が本邦の家族性 ALS の 25%, 9.4%, 9.4% を占め、それぞれ発症に重要な分子であることが示された。

細胞実験から、患者脳異常 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示した。またその中心的な部分は C 末端のプロテアーゼ耐性部分にあること、また、その凝集に必要な配列を同定した。また、TDP-43 はそのエクソン 6 内でのスプライシング誘発により自己の mRNA 量を調節することが示された。

動物実験から、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に変換され蓄積し、その病変が広がることを証明された。ヒト野生型 TDP-43 発現するウイルスベクターをカニクイザル第 6 頸髄利き手側に注入すると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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

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. 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.
3. 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.
4. Hasegawa M, et al (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. J Mol Neurosci 45:480-485
5. 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.
6. Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Niizato K, Tsuchiya K, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Kobayashi Z, Akiyama H: Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy.

- Neuropathology 30: 170-181, 2010
7. 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
 8. 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
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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

ALS, FTLD の異常 TDP-43 の病態形成、進行機構に関する検討

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⁾，亀谷富由樹¹⁾，新井哲明^{2,3)}，秋山治彦²⁾，辻浩史^{1,4)}，
玉岡晃⁴⁾，David Mann⁵⁾

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⁾ 筑波大学大学院・神経病態医学分野

⁵⁾ マンチェスター大学

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）、前頭側頭葉変性症（FTLD）の中心的病理蛋白質である TDP-43 の解析を行い、その C 末端バンドパターンが疾患、病理型によって異なること、一人の患者においてはどの部位をとっても同じパターンをとることを示すと共に、それが TDP-43 の異常構造の違いを反映していることを明らかにした。類似の蓄積を示す α シヌクレインについて、異常分子の脳内投与で内在性マウス α シヌクレインが構造変化し、その病変が脳全体に広がることを直接証明した。異常 TDP-43 も同様に細胞から細胞へ伝播して広がる可能性が考えられる。異常 TDP-43 の伝播を抑制する薬剤や治療法の開発が今後の重要な課題と考えられる。本研究で構築したモデルを用いた薬剤の探索や評価が期待される。

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) は治療法のない難病であるが、患者脳の変性細胞内には TDP-43 の異常病変が明らかとなった。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 発症の関係が遺伝学的にも証明された。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、また、その病変の広がりや臨床症状が密接に関係することが示されていることから、異常 TDP-43 は ALS の根本治療の中心的ターゲットである。

患者脳に蓄積する異常 TDP-43 の高感度、かつ特異検出抗体として、リン酸化 TDP-43 に対する抗体が確立され、様々な疾患に蓄積する TDP-43 の解析が進むと、疾患によって、異常

TDP-43 の病理形態が異なること、またその分布が臨床症状と密接な関係があることなどが明らかとなってきた。ALS, FTLD-TDP はその病理型の違いによって、現在 4 型に分類されており、短い変性神経突起内封入体 (dystrophic neurites: DN) と細胞内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions; NCI) が主体の type A、NCI が主体の type B、変性突起が特徴的な type C、さらには核内封入体 (intranuclear inclusions: INI) が主体の type D であり、それぞれ、プログラニューリン変異を伴う FTLD が type A、ALS や運動ニューロン疾患を伴う FTLD が type B、semantic dementia (SD) の多くが type C、Valosin-containing protein (VCP) の変異による骨パジェット病と前頭側頭葉型痴呆を伴う遺伝性封入体筋炎 (IBMPFD) が type D と報告されている。本研究では ALS、および FTLD (type C) の様々な脳

部位における TDP-43 の C 末端断片の解析を行うと共に、そのバンドパターンの違いが異常構造の違いによるものであることを多数例の解析により検討した。さらにプロテアーゼ処理後、そのバンドパターンの違いを比較検討した。さらに TDP-43 と類似の細胞内異常蓄積をおこし、その病変の広がりや臨床症状と密接に関係する 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(異常 α シヌクレイン)を野生型マウスの脳内に接種するという実験を行った。また、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 TDP-43 の病態を形成できるかどうかについても検討をはじめた。

B. 研究方法

FTLD-TDP 19 例 (神経病理学的分類の type A が 6 例, type B が 8 例, type C が 5 例)を対象とした。剖検脳、あるいは脊髄より、サルコシル不溶性画分を調製し、pS409/410 抗体を用いたイムノブロットを行い、TDP-43 の C 末端断片を比較、観察した。また、それらの脳の不溶性画分をトリプシンまたはキモトリプシンで処理した後にイムノブロットを行い、プロテアーゼ耐性 TDP-43 について各疾患におけるバンドパターンの違いを検討した。

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後、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 注入し、一定期間の後、半球は固定し、免疫組織染色を行って観察すると共に、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。

(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. 患者脳に蓄積する異常 TDP-43 の C 末端バンドパターンの病型による違い

解析した患者剖検脳の全例において、異常リン酸化された TDP-43 が 45 kDa に検出され、さらに 18~26 kDa の C 末端断片のバンドが認められた。その C 末端断片のバンドパターンは、予想通り、神経病理学的な分類に一致して、それぞれ異なるバンドパターンを示した。

TDP-43 の病理形態は全体的には type A~D に分類できるものの、脳の様々な部位で詳しく観察すると、その形態は、細胞の種類や部位によって異なっている。そこで、典型的な ALS の 3 例、FTLD-TDP の 1 例について、患者脳の様々な部位から TDP-43 を抽出し、その生化学解析を行った。その結果、どの部位をとっても、量の違いはあるが、その C 末端断片のバンドパターンに違いは認められなかった。

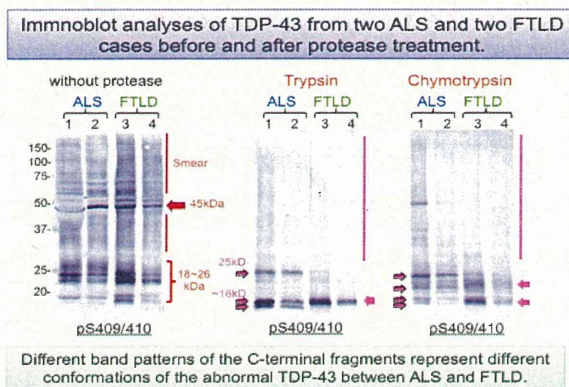
2. プロテアーゼ耐性 TDP-43 バンド

TDP-43 のバンドパターンは、FTLD-TDP の病理分類に一致して、それぞれの疾患で異なっていた。そこでこのバンドパターンの違いをさらに検討するため、不溶性画分を未変性条件で、トリプシン、あるいはキモトリプシンなどのプロテアーゼ処理を行い、プロテアーゼに耐性を示すバンドの比較を行った。この方法は、異常プリオンの検出やプリオン病の病型サブタイピングに使われる方法と基本的には同じ方法である。プロテアーゼ処理後の試料を電気泳動後、PVDF 膜に転写し、pS409/410 抗体を用いてイムノブロット解析を行ったところ、

FTLD-TDP では、type A, B, C がそれぞれ少しずつ異なるパターンを示し、また ALS 患者の TDP-43 は FTLD の type B と同じバンドパターンを示した。

3. 質量分析によるプロテアーゼ耐性領域の解析

ALS 患者に蓄積する TDP-43 と FTLD type C 患者に蓄積する TDP-43 について、トリプシン処理後も分解されない、トリプシン耐性バンド (~16kDa)の解析を質量分析を用いて行った。



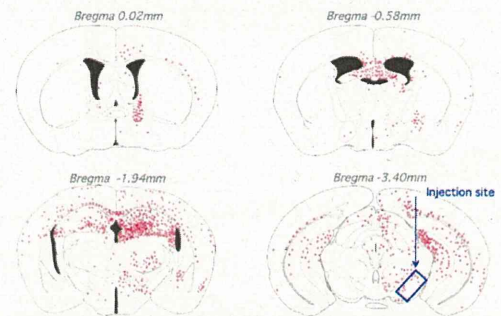
電気泳動後、ゲル内(すなわち変性条件下)でトリプシン消化し、この消化ペプチドを LC/MS/MS 解析することにより切断部位やどの領域を含むかを解析した。その結果、ALS の ~16kDa TDP-43 バンドからは最も N 末端側のペプチドとして、276-414 と 294-414 の消化ペプチドが、FTLD type C の 16kDa TDP-43 バンドからは 273-414 と 276-414 の消化ペプチドが検出され、それぞれ、少し異なる部位で切断が起きていることが示唆された。C 末端側は、pS409/410 を認識するリン酸化特異抗体で反応することから、最 C 末端まで含まれるもとと考えられた。

4. 野生型マウス脳における異常蛋白質病変の広がり、伝播の実証

精製したリコンビナント α シヌクレインを試験管内で線維化し、それを野生型マウスに接

種し、一定期間をおいた後、マウスの脳内の変化を免疫組織染色、およびイムノブロット解析により検討した。接種 15 ヶ月後にマウス脳を固定し、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結果、異常リン酸化 α シヌクレイン病変が脳全体、特に接種側の半球に強く広がっていることが観察された。病変は注入部位の黒質では少なく、扁桃体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た。また、突起様構造物も広く観察された。

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

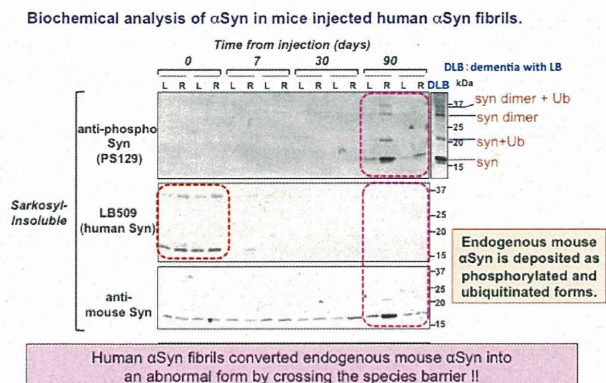


Spread of the pathology cannot be explained by simple diffusion

一方、線維化しないリコンビナント 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。

蓄積した異常 α シヌクレインが注入しヒト 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かを明らかにするため、生化学的解析を行った。異常 α シヌクレインを認識する PS129 リン酸化特異抗体、ヒト syn 特異抗体、マウス syn 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 syn 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ていた。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、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)。

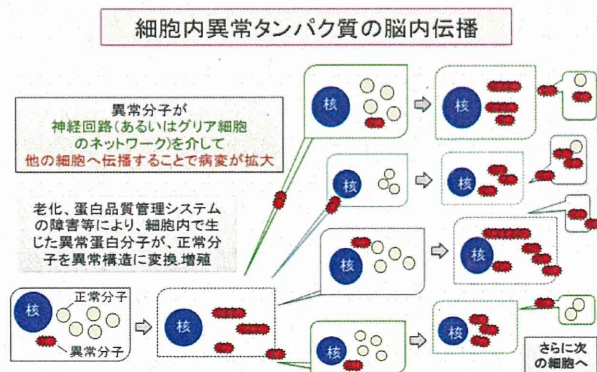


すなわち、接種した異常ヒト α シヌクレインにマウスの内在性 α シヌクレインが相互作用して、異常構造に変換され、それが蓄積、広がったことが示された。ヒトとマウスの α シヌクレインのアミノ酸配列は95%相同であり、7カ所のアミノ酸が異なっている。プリオン病において、プリオンの種間の配列の違いにより、その感染効率に違いがあることが示されていることから、マウス α シヌクレインに対するそれぞれのシードによる線維化促進効果を検討した。その結果、マウス α シヌクレイン線維の方が、ヒト α シヌクレイン線維よりも、マウス α シヌクレインをより効率よく、線維化するという結果が示された。

そこで次にマウス 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ところ、接種したマウス全てにおいて、異常リン酸化 α シヌクレインの病変が出現した。ヒト α シヌクレイン線維を接種した群では約80~90%の割合で病変の出現がみられたことを考えると、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における α シヌクレイン異常病変を起しやすいたことが示唆される。

D. 考察

ALS 及び FTLD-TDP に蓄積する TDP-43 は、C 末断片のバンドパターンが異なることが示され、病型により異なった TDP-43 の蓄積が示された。さらにこの TDP-43 の C 末端バンドの違いはプロテアーゼ耐性 TDP-43 のバンドパターンと対応しており、病型によって蓄積する異常 TDP-43 の構造が異なることを反映しているものと考えられた。ALS と FTLD-TDP type B で同一のパターンを示したことは、運動ニューロン障害の発症に共通する TDP-43 凝集体の関与が考えられる。ALS でも FTLD でも、一人の患者の様々な部位に様々な形態の異常 TDP-43 病変が認められるが、それを生化学的に解析すると、どの脳部位にも同じ異常構造を持った TDP-43 が蓄積していることが明らかとなった。このことは TDP-43 が多様な構造変化をとりうるにも関わらず、一人の患者では様々な脳部位において同じ病変が広がっていることを意味する。次の α シヌクレインの脳内伝播の実験的証明を考慮すれば、一カ所で生じた TDP-43 の異常病変が、細胞間を伝わって正常 TDP-43 を異常に変化することで、その病変が広がったと考えることができる(下図)。



線維化した α シヌクレインを野生型マウスの脳内に接種した結果、マウスの内在性 α シヌクレインが構造変化し、蓄積し、さらにその病変が時間経過に伴って広がったことは、申請者が提唱する「細胞内異常タンパク質伝播仮説」

実験的に証明するものである。今後の解析とメカニズムの解明が必要であるが、異常 α シヌクレインは神経回路を介して広がった可能性が強く示唆される。

E. 結論

1. FTLD, ALS 患者脳、脊髄に蓄積する異常 TDP-43 の C 末端バンドパターンは、神経病理学的分類(type A~C)に一致して、異なるバンドパターンを示し、それは TDP-43 の重合様式の違いによるものと考えられた。TDP-43 の構造変化(重合様式の違い)によって、その病理や臨床像が決定される可能性が考えられる。
2. 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 FTLD, 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(thiosemicarbazono)-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 (2011) Phosphorylated α -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 25: 4127-37.

14). 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.

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 α -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, Nonaya 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 Spreading of Pathological a-synuclein in Brain. The 17th Takeda Science Foundation Symposium □on Bioscience, Osaka [2012. 12. 6]
- 2). 長谷川成人：レビー小体と α シヌクレイン. 第6回レビー小体型認知症研究会(レビー小体発見100周年記念大会), 横浜 [2012.11.10]
- 3). 長谷川成人：非アルツハイマー型認知症研究の前線 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]
- 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 inhibitors and immunization with phosphorylated tau peptides in tauopathy model mice. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.
- 24). 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.
- 25). Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]
- 26). 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]
- 27). 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]
- 28). 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]
- 29). 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]
- 30). 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], 東京 [2010/04/24]
- 31). 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]
- 32). 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]

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得

「タンパク質重合体の重合核となりうるタンパク質又はその重合体が導入された細胞及びその製造法」

フランス : 1964918 特許査定日 : 2011/10/05

英国 : 1964918 特許査定日 : 2011/10/05

ドイツ : 1964918 特許査定日 : 2011/10/05

2.実用新案登録 特になし

3.その他 特になし

シード依存的な細胞内 TDP-43 蓄積モデルの開発とその応用：不溶化 TDP-43 のプリオン様性質の解明

野中 隆，長谷川成人

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

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。我々は、患者脳より調製した不溶化 TDP-43 を細胞内に導入するという新しい方法を開発し、「シード依存的な細胞内 TDP-43 蓄積モデル」の構築に成功した。このモデルを用いて、不溶化 TDP-43 のシード効果について検討した結果、患者脳由来の不溶化 TDP-43 には、自身を鋳型として同じ構造の異常 TDP-43 凝集体のコピーを作り出すという、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、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開発し、これを用いて細胞内に異常 TDP-43 が蓄積する細胞モデルの構築を試みた。また本モデルを用いて、患者脳由来の不溶化 TDP-43 の性質決定を行った。

B.研究方法

最近我々は、市販のリポフェクション試薬を用いて、*in vitro* で調製したリコンビナントタンパク質の線維を培養細胞内に導入する方法を開発した。この方法を用いると、リコンビナントタンパク質の線維だけでなく、患者脳由来の界面活性剤不溶性画分（患者脳に出現する細胞内凝集体が含まれる画分）も同様に細胞内に導入できることが判明した。そこでこの方法を用いて、新たな細胞内 TDP-43 蓄積モデルの構築を試みた。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

その結果、蛍光顕微鏡による観察において、本来ならば細胞内で不溶化しないプラスミド由来の全長 TDP-43 がリン酸化を受けて細胞内で凝集体を形成することが判明した。またイムノブロットにおいては、不溶性画分に全長 TDP-43 の蓄積および C 末端断片が顕著に検出された。特に C 末端断片のバンドパターンは、シードとして加えた患者由来の不溶性画分のバンドパターンとほぼ同じであった。この結果は、細胞内において、外から加えた不溶化 TDP-43 が凝集のシードとなって可溶性 TDP-43 が蓄積することを示唆している。さらに、乳酸脱水素酵素（LDH）漏出アッセイにより、このような TDP-43 の凝集体を形成する細胞において細胞死が認められた。この結果より、細胞内において全長 TDP-43 が蓄積することにより細胞死が引き起こされる可能性が考えられる。

さらにこのモデルを用いて、患者脳由来の不溶化 TDP-43 のシード能について詳細に検討した。患者脳に蓄積する TDP-43 は、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) に分類され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、その 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。さらに、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。また、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

以上のように、細胞死が認められ、かつこれまでよりも患者脳の異常を良く再現した細胞内 TDP-43 蓄積モデルの構築に成功した。このモデルでは、全長の TDP-43 の蓄積に依存した細胞死が生じており、これまでに報告のない新しいモデルであると考えられる。このモデルを用いて、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 プロテイナーゼ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。

E. 結論

TDP-43 プロテイナーゼ患者脳より調製した不溶化 TDP-43 をシードとして、細胞内に TDP-43 の凝集体を効率よく作製することに成功した。これらの凝集体は、患者脳に見られる異常 TDP-43 の封入体と性質などが極めてよく似ており、患者脳の異常を再現する良い細胞モデルであると言える。また患者脳より調製した不溶化 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

Tanaka S, Kodama T, Nonaka T, Toyoda H, Arai M, Fukazawa M, Honda Y, Honda M, Mignot E. Transcriptional regulation of the hypocretin/orexin gene by NR6A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403: 178-183, 2010

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: 34885-34898, 2010

Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Fujishiro H and Akiyama H. Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30: 372-380, 2010

Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga S, 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: