

445-456, 2010

Takahashi M, Tin Y, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, and Arai T (2012) Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 510: 48-52.

Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A, 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. Comm.* 417: 116-121

Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng DC, Price KA, Liddell JR, Caragounis A, Li QX, Masters CL, Nonaka T, Hasegawa M, Bogoyevitch MA, Kanninen KM, Crouch PJ, White AR (2011) C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol. Neurodegener.* 6: 57

Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci.* 45: 480-485

Nonaka T* and Hasegawa M.* (2011) In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases: New cellular models of neurodegenerative diseases. *Communicative & Integrative Biology.* 4: 501-502 (*: corresponding author)

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 のシード依存の細胞内凝集体形成. *臨床神経学*, 52: 1056-1058.

2.学会発表

Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M (2010) Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting, San Diego, USA [2010/11/13]

野中隆 (2010) 細胞内異常タンパク質の蓄積機構とその制御. 第29回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 細川雅人, 秋山治彦, 長谷川成人 (2010) TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導. 第29回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

辻浩史, 宅間浩, 中馬越清隆, 富所康志, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 山下万貴子, 野中隆,

亀谷富由樹, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 玉岡晃 (2010) TDP-43 proteinopathy に認める TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. 第 29 回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

鈴掛雅美, 野中隆, 久永真市, 長谷川成人 (2010) モデルマウスを用いたタウ凝集阻害薬、ペプチドワクチンの評価. 第 29 回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

團彩帆, 野中隆, 村山繁雄, 初田裕幸, 新井孝夫, 長谷川成人 (2010) RD4 エピトープ内に起こっている翻訳後修飾によるタウの生理機能変化. 第 29 回日本認知症学会学術集会, 名古屋 [2010/11/06]

Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H (2010) Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]

Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H (2010) Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]

野中隆 (2010) 細胞内に TDP-43 が蓄積する神経変性疾患モデルの構築とその応用. 第 9 回国際バイオ EXPO・バイオアカデミックフォーラム, 東京 [2010/07/02]

辻浩史, 長谷川成人, 野中隆, 新井哲明, 山下万貴子, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 宅間浩, 富所康志, 中馬越清隆, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 玉岡晃 (2010) 筋萎縮性側索硬化症に蓄積する TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. 第 51 回日本神経学会総会, 東京 [2010/05/21]

野中隆, 長谷川成人 TDP-43 による運動ニューロン変性の分子病態 第 52 回日本神経学会学術大会, シンポジウム 2011. 5. 20 名古屋

長谷川成人, 野中隆, 辻浩史, 山下万喜子, 増田雅美, 玉岡晃, 村山繁雄, 新井哲明, 秋山治彦; 神経変性疾患における蛋白糖仮説; 第 52 回日本神経学会学術大会, シンポジウム; 2011. 5. 20 名古屋

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, 渡辺小百合, 増田雅美, 長谷川成人. (2011. 10. 5) EUROPIAN PATENT SPECIFICATION: 1964918, タンパク質重合体の重合核となりうるタンパク質またはその重合体が導入された細胞及びその製造法

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

出願

TDP-43 蓄積細胞モデル (特許出願 PCT/JP2009/054826), 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人, 山下万喜子

野中隆, 鈴掛雅美, 山下万貴子, 秋山治彦, 長谷川成人. 神経変性疾患関連タンパク質の不溶性凝集体の増幅方法, 出願番号: 特願 2011-252522, 出願日: 2011 年 11 月 18 日

2.実用新案登録

3.その他

患者脳に蓄積する異常 TDP-43 の生化学的解析

亀谷富由樹¹⁾

長谷川成人¹⁾

1) 公益財団法人東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野

研究要旨

ALS および FTLD 患者の脳中に蓄積する異常 TDP-43 の蓄積機序に関する知見を得ることを目的とし、(1) ALS および FTLD 患者の脳中に蓄積する異常 TDP-43 に関して、プロテアーゼ耐性のコアとなる領域の解析、(2) 蓄積した異常 TDP-43 に生じた翻訳後修飾解析を行った。

以下すべて 10 ポイント程度

A.研究目的

ALS および FTLD 患者の脳中に蓄積する異常 TDP-43 に関して、プロテアーゼ耐性のコアとなる領域の解析、および蓄積した異常 TDP-43 に生じた翻訳後修飾解析を行い、TDP-43 の蓄積機序に関する知見を得ることを目的とした。

B.研究方法

(1) TDP-43 のプロテアーゼ耐性のコアとなる領域の解析

ALS および FTLD 患者脳 Sarkosyl 不溶画分をトリプシンで 30 分間限定酵素消化した。この消化物を SDS 電気泳動し、異常蓄積した TDP-43 のトリプシン耐性断片 (ALS:25kDa および 16kDa、FTLD:16kDa) を切り抜き、ゲル内でキモトリプシン (75-150ng) を用いて 20 時間消化した。

ゲルから消化物を抽出した後、微量高速液体クロマトグラフィー (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) で消化物を分離

し、直接質量分析機で測定した。データは BioWorks および Mascot にて解析した。

(2) TDP-43 の翻訳後修飾の解析

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 (75-150ng) を用いて 20 時間消化した。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 (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。

(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 および FTLD 患者脳 Sarkosyl 不溶画分をトリプシンで 30 分間限定酵素消化すると、ALS では、25kDa に 1 本および 16kD 付近に 2 本の pS409/410 抗体で検出される Trypsin 耐性バンド

が検出された。また FTLD では 16kDa に 1 本のトリプシン耐性バンドが検出され、16kDa コアはそれぞれ、277-414、271-414 の領域よりなることが明らかとなった。

(2)

```

1           50
MSEYIRVTEDEDEPIEIPSEDDGTVLLSTVTAQFFGACGLRYRNPVSQC MRGVRLVEGI
LHADAGWGNLVYVVNPKDKRKRMDETDASSAVKVKRAVQKTSDLIVLGLPWKTEQDL
100
KEYFSTFGEVLMVQVKDKLKGHSKGFGEVRFTEYETQVKVMSQRHMIDGRWCDCCKLPNS
150
KQSQDEPLRSRKVFVGRCTEDMTEDELREFFSQYGDVMDVFIPKPFRAFAFVTFADDQIA
200
QSLCGEDLIIGKISVHISNAEPKHNSNRQLERSGRFGGNPGGFGNQGFGNSRGGGAGLG
250           300
NNQGSNMGGMNFAGFASINPAMMAAAQAALQSSWGMGMMLASQQNQSGLPSGNNQNGNMQ
350
REPNDAFGSGNNSYSGSNSGAAIGWGSASNAGSGSGFNGGFGSSMDSKSSGWGM
400

```

図 1. 同定したリン酸化部位 (ピンク) と脱アミド部位 (水色)。

図に示したように、リン酸化部位および脱アミド部位が同定できた。さらに、25kDa 断片形成時の切断部位として、199-219 残基間で、複数の切断部位を同定した。

D. 考察

(1) pS409/410 で検出される Trypsin 耐性バンド検出パターン (ALS では 16-25kDa に 3 バンド、FTLD では 16kDa 付近に 1 バンド) および ALS において、C 末 380 番残基以降の非リン酸化ペプチド (382-392 および 402-412) が検出されたことから、FTLD では TDP-43 のリン酸化等の修飾が比較的均一であるのに対して、ALS ではリン酸化等の修飾が不均一であることが推定された。

(2) 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) ALS および FTLD 患者脳中の異常 TDP-43 蓄積構造物のコア構造は異なると推定された。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 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

- (1) Arai T, Hasegawa M, Nonoka 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, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181
- (2) Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DMA, Tamaoka A, Hasegawa M. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417, 116-121, 2012

(3) 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 DMA, Tamaoka A. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 なし

2.学会発表

(1) 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 細川雅人, 秋山治彦, 長谷川成人 (2010) TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導. *Dementia Japan* 24:387

(2) 辻浩史, 宅間浩, 中馬越清隆, 富所康志, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 玉岡晃 (2010) TDP-43 proteinopathy に認める TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. *Dementia Japan* 24:386

(3) Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H (2010) Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]

(4) Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H (2010) Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA[2010/10/06]

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得

2.実用新案登録

3.その他

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

研究分担者：秋山治彦¹⁾

研究協力者：小林 禪¹⁾，青木直哉¹⁾，河上緒¹⁾，東 晋二¹⁾

所 属：¹⁾東京医学総合研究所

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）から前頭側頭葉変性症（frontotemporal lobar degeneration: FTLN）にまたがる疾患の病因蛋白質として TDP-43 について、やはり RNA 結合蛋白質のひとつである fused in sarcoma: FUS が同定された。FUS の遺伝子変異は好塩基性封入体を伴う家族性 ALS（ALS-6）の原因であり、同時に ALS-6 脳脊髄には FUS の異常蓄積が生じる。一方、非家族性に発病する FTLN のうち、タウ陰性・TDP-43 陰性の群の大半に FUS 異常蓄積～神経細胞内封入体（neuronal cytoplasmic inclusion: NCI）が見出され、FTLN-FUS と呼ばれるようになった。FTLN-FUS には、従来、それぞれ好塩基性封入体病（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）、ユビキチン封入体を伴う非定型的 FTLN（atypical FTLN with ubiquitin inclusions: aFTLN-U）と呼ばれていた 3 疾患が含まれ、現在これらは FTLN-FUS の亜型とされている。西欧諸国では aFTLN-U が多いとされるが、本研究により、本邦では BIBD が最も多く、aFTLN-U は稀であることが明らかになった。ALS-6 と異なり FTLN-FUS は孤発性疾患であるため、このような民族差は今後、FUS 異常蓄積疾患の病態解明のヒントになると思われる。FUS は TDP-43 と同様、核に局在し、機能的にも類似した蛋白質である。しかし本研究において、FUS 免疫組織化学染色の感度を高めて再検討を行ったところ、ヒト剖検脳・マウス脳ともに、FUS が神経突起（主として樹状突起）にも存在していること、ヒト神経変性疾患の進行に伴い神経突起の FUS が増加することが明らかになった。FUS 分子の様々な部位に対する抗体を用いた免疫組織化学的な解析では、正常な核に局在する FUS と神経変性に伴い細胞質において増加する FUS とは抗体への反応性が異なり、分子の立体構造または他の分子との結合状態が違っていると考えられた。そして、FTLN-FUS において異常蓄積した FUS は後者と同様の免疫活性を示した。FUS の凝集蓄積過程は、tau などと同様、細胞質におけるプロセスであり、したがって細胞間での伝播も起こりうることを示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）から前頭側頭葉変性症（fronto-temporal lobar degeneration: FTLN）にまたがる疾患の病因蛋白質として TDP-43 が同定されたことをきっかけに、同じく RNA 結合蛋白質である FUS の遺伝子変異が若年発症で好塩基性封入体を伴う家族性 ALS (ALS-6) の原因遺伝子として見出され、同時に ALS-6 脳脊髄への FUS 異常蓄積が

報告された。その後、FTLN の 10% 前後を占めるタウ陰性・TDP-43 陰性 FTLN の大多数で FUS 陽性封入体が見出され (FTLN-FUS)、TDP-43 と同様、FUS も ALS から FTLN にまたがる神経変性疾患の病因蛋白質である可能性が指摘された。

FUS は正常脳では TDP-43 同様、主として細胞核に局在し、ALS-6 や FTLN-FUS では病変部の神経細胞の細胞体に封入体として蓄積する。しかしこれまでのところ、蓄積した FUS については不溶画分

に回収される割合がやや増加するという報告がひとつあったのみで、リン酸化や断片化といった生化学的異常は見出されていない。ひとつには FUS 異常蓄積をきたす疾患は頻度が低く、FUS に関する研究の多くがホルマリン固定標本のアーカイヴを対象に行われているという問題がある。さらに FUS は抗原性がホルマリン固定により失われやすく、固定が長期にわたるほど免疫染色の染色性が低下して解析を困難にしている。

FTLD については西欧諸国と本邦との間で様々な相違が指摘されてきた。たとえば、本邦では家族性 FTLD が少なく、しかも大半がタウ変異例で、プログランニューリン (progranulin: GRN) 変異例はきわめて稀である。また FTLD-TDP の亜型のうち、病理学的には type-1/C が多く、これは臨床病型として意味性認知症が多いことに対応する。西欧諸国では type-3/A が多いとされている。当研究室は本邦でも FTLD 症例の蓄積が多い。そこでまず本邦の FTLD-FUS の特徴を調べ、続いて剖検脳の免疫組織化学染色というアプローチで可能な範囲で FUS 異常蓄積の病態について解析を行った。後者においては、短時間固定の剖検脳組織標本を用いることで FUS を高感度で検出してその局在を再検討するとともに、FUS のさまざまな部位を認識する複数の異なる抗体を用い、核や封入体、神経突起における FUS の抗原性プロファイルを調べた。

B. 研究方法

1973 年以降、当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 病型が知られており、本研究も HE 染色や FUS 免疫染色を用いた従来の分類法によった。

剖検が古い時代の症例が多く、基本的には長時間ホルマリン固定を行って型どおり作製したパラフィン標本を、オートクレーブ前処理を行った上で使用した。一部の症例は剖検時に小ブロックを切り出し、氷冷 4%パラフォルムアルデヒドで短時間固定して作製した凍結切片を浮遊法により免疫染色した。後者については比較のために対照例 (非神経疾患), Alzheimer 病, FTLD-TDP の症例も用意した。

市販の抗 FUS 抗体 13 種類をテストして、固定標本でも比較的良好な反応が得られた、アミノ(N)末端側部分[1-50]×2種, 中間部分[52-400], [86-213], カルボキシル(C)末端側部分[400-450], 最 C 末の 6 種類を主として使用した。これらの抗体について、異なる抗体濃度を使用し、抗体を希釈していく過程で、核と封入体、どちらの染色が先に減弱～消失するかを調べた。二重染色には蛍光法を用い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。ヒト剖検脳やマウス脳のイムノブロット、分画法は常法に従って行った。

(倫理面への配慮)

剖検脳の解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理基準に準じることとし、剖検時に遺族の承諾を得た場合のみ剖検材料を研究に使用した。同倫理指針策定以前に剖検になった症例については、連結可能匿名化による個人情報の保護を図った上で使用した。すべての研究計画は東京都精神医学総合研究所 (23 年度に東京都医学総合研究所に改組) の倫理委員会の審査承認を受けた。

C. 研究結果

本研究では 9 例の FTLD-FUS を対象としたが、これらの症例のうち、6 例は既に臨床病理学的な報告がなされている症例である (Yokota, et al., Acta Neuropathol, 2008)。9 例の平均発症年齢は 44 歳で、発症から剖検までの平均罹病期間は 8.5 年、臨床像は 9 例中 7 例が behavioral variant of FTD であった。神経病理学的には 5 例が BIBD, 2 例が NIFID と診断された。残りの 2 例は HE 染色で細胞質封入体が明瞭ではなく、また、うち 1 例は文献的に言わ

れているよりもはるかに少ないが核内封入体が認められたことから aFTLD-U である可能性があると判断された。もう 1 例は FUS 蓄積がほとんど dystrophic neurites の形態をとる特異な病理像を示し、かつ病期の大半を bvFTD として経過した後 ALS を発症して、病理学的にも ALS-TDP に合致する TDP-43 病変を合併した例であった。本例は、従来の FTLD-FUS の 3 病型のいずれにも属しないと考えられた。

ヒト脳、マウス脳の total homogenate を用いたイムノプロットにおいて、今回使用したすべての抗 FUS 抗体で約 72kDa のバンドが検出された。しかし剖検脳組織標本の染色では、FUS のカルボキシル末端側部分 ([400-450], [500-526]) を抗原とする抗体では、核の染色性が FTLD-FUS の封入体の染色性より高かった。一方 FUS の中間部分 ([52-400], [86-213], [250-300]) を抗原とする抗体では、封入体の染色性の方が核の染色性より高かった。アミノ末端側 ([1-50]) に対する抗体は症例により異なる染色結果を示したが、傾向としては核がよく染色されることが多いように思われた。

ついで、これらの抗体を用いて、対照脳（非神経疾患）の短時間固定、浮遊切片の免疫組織染色を行った。その結果、細胞核に加え、ニューロピルに微細顆粒状の陽性構造を認め、それは脳幹から小脳にかけて特に多数観察された。FUS 陽性顆粒は使用した 6 抗体の全てで染色されたが抗体により染色性が異なり、中間部分に対する 2 抗体 [52-400], [86-213] でより強く染色された。一方、N 末側、C 末側部分に対する抗体では顆粒の染色性は弱く、それに対して核の染色性は中間部分に対する抗体よりも強かった。このような染色性の違いは封入体と核の染色性の違いと類似していた。樹状突起のマーカーとして MAP-2、また軸索のマーカーとしてリン酸化 neurofilaments、シナプスのマーカーとして synaptophysin との二重染色を行ったところ、FUS 陽性顆粒は synaptophysin と部分的に重なり、時に MAP-2 陽性神経突起（樹状突起）に沿った分布を示したが、リン酸化 neurofilaments とは明らかな空

間的関係は認められなかった。

上記により FUS がシナプスと関連して局在していることが示されたため、マウス脳から得たシナプトソーム分画をさらに synaptic vesicle と post-synaptic density に分けイムノプロットを行った。その結果、FUS は主として post-synaptic density 分画で検出された。

次にニューロピルの FUS 陽性顆粒が疾患脳においてどのような変化を示すかを、海馬～海馬傍回の切片において検討した。FUS 陽性顆粒は正常脳のこれらの部位ではあまり多く認められないが、TDP-43 異常蓄積による FTLD (FTLD-TDP) では顕著な増加が観察された。一方 Alzheimer 病においても FTLD-TDP ほどではないが軽度～中等度の増加が認められた。さらに 1 例のみであるが、FTLD-FUS は FTLD-TDP を上回る増加を示した。

D. 考察

一般に剖検は特異な臨床像を呈した症例について行われる傾向があることを考慮する必要があるが、今回の検討では、FTLD-FUS は FTLD 全体の 14%、タウ陰性 FTLD の 23% を占め、40 歳代前後の早期発症の FTLD の場合は常にその可能性を考慮すべき疾患であると思われた。この FTLD-FUS 全体の頻度は文献で報告されている西欧諸国の剖検例の場合に比較的近いが、FTLD-FUS の亜型の頻度については明らかな本邦の特徴が見出された。すなわち西欧諸国では aFTLD-U が最も多い亜型であるのに対して、我々の 9 例のうち 7 例が BIBD であり、aFTLD-U は 1 例のみ、それも病理像は核内封入体の頻度が低いなど、典型的な aFTLD-U とは言い難い面があった。非遺伝性の疾患でありながらこのような民族差が認められたことは、今後の FTLD-FUS 研究において留意すべき点であると思われる。

ホルマリン固定パラフィン標本において、正常な細胞の核に局在する FUS は C 末端側を認識する抗体で染色されやすく、封入体を形成した FUS は中間部分を認識する抗体で染色されやすいという、免疫組織化学的プロファイルの違いが認められた。し

かし、古い、アーカイブされた組織標本で得られた結果のみでは、FTLD-FUSにおいて異常蓄積～封入体形成過程でFUS分子のコンフォメーションが変化しているかどうかをただちに確定することはできない。今回得られた免疫組織化学的プロファイルの違いが、実際のFUS分子の生化学的な違いを反映したものであるかどうかについては、今後、さらに検討を加える必要がある。

正常脳において脳幹を中心にニューロピルにおける顆粒状のFUS免疫染色陽性構造を認めた。同様のニューロピル顆粒は脳にも存在していたが、正常脳では脳幹や小脳に比べて低頻度であった。二重染色、および分画法を用いた生化学解析の結果は、ニューロピルに認められるFUS陽性顆粒状構造が主として樹状突起、特にシナプスのpost synaptic densityに局在していることを示した。FUSは核においてRNAに結合し転写を調節していると考えられている。神経突起内への局在は、FUSが神経突起～末梢部位における転写制御にも関わっていることを示唆している。

ニューロピルのFUS陽性顆粒は変性疾患の大脳皮質において正常対照者に比し増加する傾向を示した。その傾向は、(1例のみの検索であるので今後の複数例での検討が必要であるが)FTLD-FUSで最も顕著に認められた。また複数例を検索し得たFTLD-TDPおよびAlzheimer病脳では、組織定量的結果、統計学的に有意にFTLD-TDP>Alzheimer>正常対照者の順でニューロピルのFUS陽性顆粒が認められた。培養下において、FUSは細胞にストレスが加わった場合、細胞質のストレス顆粒に移動することが報告されている。FTLD圏の疾患の病理機序において、神経突起における転写調節の異常が何らかの役割を果たしている可能性がある。

E. 結論

FTLD-FUSにはaFTLD-U、BIBD、NIFIDの3病型が知られているが、本邦では西欧諸国に比べてaFTLD-Uが少なく、BIBDが多い。FTLD-FUSが孤発性の疾患であることを考えると、このような民

族差は今後のFUS異常蓄積機序の解明の鍵となる可能性がある。FUSは細胞核に加え、細胞体や神経突起(特に樹状突起)にも局在し、これら細胞質に存在するFUSは核のFUSと抗体への反応性(免疫活性)が異なることから、立体構造の変化または他の分子との結合等の修飾が生じている可能性が示された。神経突起に局在するFUSは、神経変性疾患とりわけFTLD圏の疾患脳において増加した。そして、FTLD-FUSにおいて封入体を形成して異常蓄積するFUSも、この細胞質に存在するFUSと共通する免疫活性を示した。FUSの凝集蓄積過程は、tauなどと同様、細胞質におけるプロセスであり、したがって細胞間での伝播も起こりうることを示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 2012 7(12), e52389
2. 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* 2012, 135(Pat11): 3380-3391 doi:10.1093/brain/aws230
3. Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H, Atypical FTLD-FUS associated with ALS-TDP: A case report. *Neuropathology* doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01325.x. [2012, Epub ahead of print]
4. 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* 2012; 71:779-788.
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. Maesako M, Uemura K, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Ando K, Kubota M, Akiyama H, Takahashi R, Kihara T, Shimohama S, Kinoshita A, Gain of function by phosphorylation in Presenilin 1-mediated regulation of insulin signaling. *J Neurochem* 2012; 121:964-973.

- Lue LF, Walker DG, Adler CH, Shill H, Tran H, Akiyama H, Sue LI, Caviness J, Sabbagh MN, Beach TG. Biochemical increase in phosphorylated alpha-synuclein precedes histopathology of lewy-type synucleinopathies. *Brain Pathol* 2012; 22:745-756.
7. Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A, Hasegawa M. 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* 2012; 417:116-121
 8. 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.
 9. 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 FTLT-DTP in Japan. *Neuropathology* 2012; 32:272-279.
 10. Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Gerhard A, Allsop D, Mann DM. Postmortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 2012; 45:188-195.
 11. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H. Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 2011, 45:480-485
 12. Maesako M, Uemura K, Kubota M, Hiyoshi K, Ando K, Kuzuya A, Kihara T, Asada M, Akiyama H, Kinoshita A. Effect of glycogen synthase kinase 3 β -mediated presenilin 1 phosphorylation on amyloid β production is negatively regulated by insulin receptor cleavage. *Neurosci* 2011, 177:298-307.
 13. Aoki N, Tsuchiya K, Togo T, Kobayashi Z, Uchikado H, Katsuse O, Suzuki K, Fujishiro H, Arai T, Iseki E, Anno M, Kosaka K, Akiyama H, Hirayasu Y. Gray matter lesions in Nasu-Hakola disease: A report on three autopsy cases. *Neuropathology* 2011, 31:135-143
 14. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Komachi H, Miki K, Yokota O, Arai T, Miake H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Fatal encephalitis in a case of hyper eosinophilic syndrome: MRI and autopsy findings. *Intern Med.* 2011, 50:1219-1225
 15. Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Akiyama H, Shibayama H, Ozaki N. Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy. *J Neurol Sci* 301:77-85, 2011
 16. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Kubodera T, Shibata N, Arai T, Miura H, Ishikawa C, Kondo H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. FALS with Gly72Ser mutation in SOD1 gene: Report of a family including the first autopsy case. *J Neurol Sci* 300:9-13, 2011
 17. 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.
 18. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG; Arizona Parkinson's Disease Consortium. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119:689-702, 2010.
 19. Coomaraswamy J, Kilger E, Wölfling H, Schäfer C, Kaeser SA, Wegenast-Braun BM, Hefendehl JK, Wolburg H, Mazzella M, Ghiso J, Goedert M, Akiyama H, Garcia-Sierra F, Wolfer DP, Mathews PM, Jucker M. Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7969-7974, 2010.
 20. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 293:6-11, 2010.
 21. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity. *Neuropathol* 30:372-380, 2010.
 22. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Clinicopathological characteristics of FTLT-DTP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss. *J Neurol Sci* 298:70-77, 2010.
 23. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Takahashi M, Yokota O, Taki K, Ishizu H, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H. Morel's laminar sclerosis showing apraxia of speech: Distribution of cortical lesions in an autopsy case. *Neuropathol* 30:76-83, 2010
 24. Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumiyama Y, Akiyama H, Arai T, Mizusawa H. Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease showing severe and circumscribed atrophy of anterior temporal lobes. *J Neurol Sci* 297:92-96, 2010.
 25. Nozaki I, Arai M, Takahashi K, Hamaguchi T, Yoshikawa H, Muroishi T, Noguchi-Shinohara M, Ito H, Itokawa M, Akiyama H, Kawata A, Yamada M. Familial ALS with G298S mutation in TARDBP: a comparison of CSF tau protein levels with those in sporadic ALS. *Intern Med* 49:1209-1212, 2010
 26. Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, Takahashi M, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett* 471:20-24, 2010
 27. 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 49:331-334, 2010
28. Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM (2010) Effect of topographical distribution of α -synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. Acta Neuropathol 120:789-801.
 29. Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM (2010) Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. Acta Neuropathol 120:55-66.
 30. 藤城弘樹, 土谷邦秋, 横田修, 湯浅和美, 新里和弘, 新井哲明, 秋山治彦 (2010) 統合失調症患者に認められた無症候性アルコール性小脳変性症の 1 剖検例. 精神医学 51:1205-1208
 31. 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, Akiyama H. Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. Neuropathology 30:170-181, 2010
 32. Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJ, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DM. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. Acta Neuropathol 119:1-4, 2010
- ## 2. 学会発表
1. 高橋晶, 新井哲明, 水上勝義, 近藤ひろみ, 大島健一, 新里和弘, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆. レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄の α シヌクレイン陽性構造の比較検討. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
 2. 堀映, 秋山治彦. 稀な頭部外傷 その 1: 脳銃創一急死例. 亜急性例, 生存例計 7 例の分析. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
 3. 河上緒, 東晋二, 青木直哉, 新里和弘, 大島健一, 安野みどり, 羽賀千恵, 下村洋子, 鈴木京子, 勝瀬大海, 都甲崇, 小林禅, 辻浩史, 玉岡晃, 長谷川成人, 新井哲明, 土谷邦秋, 平安良雄, 秋山治彦. 進行性失語が前景に立った運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症の二剖検例. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
 4. 後藤潤, 後藤昇, 秋山治彦, 塩田清二. 被殻出血が被殻の外側部分に位置する理由. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
 5. 望月葉子, 川田昭広, 新井誠, 本間琢, 渡部和彦, 秋山治彦, 川上秀史, 小森隆司, 水谷俊雄, 松原四郎. 橋核の神経細胞も脱落し, FUS 陽性構造物が広範囲な変性部位に出現したが, FUS/TLS 遺伝子変異が認められなかった家族性 ALS の 1 例. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
 6. 河上緒, 新井哲明, 池田研二, 大島健一, 新里和弘, 東晋二, 青木直哉, 水上勝義, 平安良雄, 秋山治彦. 老年期発症の幻覚妄想を認め, 辺縁系に高度タウ病変を呈した 3 剖検例. 第 31 回日本認知症学会 (つくば, 10月26日~28日)
 7. Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H (2011) Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. Neuroscience 2011 Washington D.C. USA [2011/11/14]
 8. Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H (2011) Quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's Disease 2011, Paris France [2011/07/17]
 9. Akiyama H, Kobayashi Z, Arai T, Hosokawa M, Tsuchiya K, Yokota O, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Hasegawa M (2010) Screening for FUS proteinopathy in the institutional brain collection. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA [2010/10/06]
 10. 羽賀千恵, 池田研二, 新井哲明, 石山宮子, 柳下三郎, 下村洋子, 近藤ひろみ, 細川雅人, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2010) 内嗅領皮質野に出現するユビキチン顆粒 (UPG) の再検討. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会 [2010/04/24]
 11. 横田修, Davidson Yvonne, Bigio Eileen H, 石津秀樹, 寺田整司, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, Sikkink Stephen, Pickering-Brown Stuart, Mann David MA. (2010) 進行性核上性麻痺症例におけるリン酸化 TDP-43 病理、海馬硬化、認知機能低下の関係の検討. Dementia Japan 24: 328.
 12. 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 細川雅人, 秋山治彦, 長谷川成人. (2010) TDP-43 凝集体形成による神経細胞毒性の誘導. Dementia Japan 24: 387.
 13. 小林禅, 秋山治彦, 新井哲明, 細川雅人, 長谷川成人, 横田修, 寺田整司, 土谷邦秋, 大島健一, 新里和弘, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 池田学, 小柳清光, 石津秀樹, 村山繁雄, 中野今治, 水澤英洋 (2010) 本邦における FTLN-FUS 症例の検討. Dementia Japan 24: 391
 14. 新井哲明, 松脇貴志, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 細川雅人, 近藤ひろみ, 西原真杉 (2010) プログラニューリンノックアウトマウス脳組織化学的解析. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会 東京 [2010/04/24]
 15. 辻浩史, 宅間浩, 中馬越清隆, 富所康志, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 山下万貴子, 野中隆, 亀谷富由樹, 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 玉岡晃. (2010) TDP-43 proteinopathy に認める TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. Dementia Japan 24: 386.
 16. 辻浩史, 長谷川成人, 野中隆, 新井哲明, 山下万貴子, 亀谷富由樹, 秋山治彦, 宅間浩, 富所康志, 中馬越清隆, 石井亜紀子, 石井一弘, 渡邊雅彦, 玉岡晃 (2010) 筋萎縮性側索硬化症に蓄積する TDP-43 蛋白 C 末端断片に関する検討. 第 51 回日本神経学会総会, 東京 [2010/05/21]
 17. 眞鍋雄太, 土谷邦秋, 新井哲明, 秋山治彦 (2010) パ

一キンソン病の病理所見を呈する Shy-Drager 症候群と臨床診断されていた 3 例. 第 51 回日本神経病理学総会学術研究会 東京 [2010/04/24]

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

なし.

脳脊髄液中の TDP-43 の検出と TDP-43 proteinopathy 動物モデルの構築

研究分担者：細川雅人¹⁾

研究協力者：新井哲明^{1), 2)}, 野中隆³⁾, 増田一鈴掛雅美³⁾, 山下万貴子³⁾, 辻浩史^{3), 4)}, 長谷川成人³⁾,
秋山治彦¹⁾

¹⁾ 財団法人東京都医学総合研究所 高次脳機能研究分野 認知症プロジェクト

²⁾ 筑波大学医学医療系臨床医学域精神医学

³⁾ 財団法人東京都医学総合研究所 病態細胞生物学

⁴⁾ 筑波大学医学医療系臨床医学域神経内科

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性症(FTLD)の病因タンパク質としてTDP-43が同定された。今回、剖検時及び腰椎穿刺時に採取した脳脊髄液中のTDP-43を定量的に検出するELISA法を開発した。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、有意に高いことが判明した。この結果はALSと末梢神経障害の鑑別診断をおこなうことができる可能性を示すものである。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。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)の病理マーカーの一つである脊髄のユビキチン陽性封入体の主要構成タンパクと、前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration: FTLD)で観察されるタウ陰性ユビキチン陽性封入体の主要構成タンパクが、2006年、TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)であることが判明した。この封入体を有するFTLDの一部にはALSと同様の運動ニューロン疾患が合併することがすでに知られていたが、TDP-43の発見により、FTLDとALSが同一の病理基盤を有することが明らかになった。

FTLDおよびALSの原因分子として同定されたTDP-43を定量するシステムを確立し、疾患の早期診断・早期治療に寄与するためにヒト体液中の異常TDP-43を検出する酵素結合性免疫吸着検定法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)のシステムを構築することをめざした。アルツハイマー

病では、すでに脳脊髄液(cerebrospinal fluid: CSF)中のアミロイドβおよびタウの異常をELISAで検出することが可能であるが、TDP-43の検出を組み合わせることにより、神経変性疾患の診断精度が向上するとともに、将来の異常タンパク特異的な根本治療の開発につながることを期待できる。2006年にTDP-43異常蓄積を伴う家族性FTLDの原因遺伝子の一つとしてグラニューリン(granulin: GRN)が同定された。GRN遺伝子の変異によりプログラニューリン(progranulin: PGRN)の機能低下がTDP-43異常を促進し、FTLDが発症すると考えられている。神経変性疾患関連タンパク質の異常が相互にどのような影響を与えるかを明らかにするため、TDP-43 TgマウスとGRNノックアウトマウス(KO)を交配し、PGRN発現量が低下した神経変性疾患モデルマウスを作製した。タンパク質の異常蓄積を同月齢の単独Tgマウスと比較して病変加速の有無を検討し、TDP-43蓄積と神経変性疾患の関連を調べた。これら

により ALS 発症のメカニズムを明らかにしていくとともに、TDP-43 proteinopathy モデルマウスを用いた薬物のスクリーニングへつなげる事を目的としている。

B. 研究方法

1. TDP-43 検出 ELISA

異なる 2 種類の抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法を用いて CSF 中の全長 TDP-43 濃度を測定した。用いた抗 TDP-43 抗体は下記の通りである。Abnova モノクローナル抗体、ProteinTech モノクローナル・ポリクローナル抗体、pS409/410 モノクローナル抗体、pS403/404 ポリクローナル抗体、TDP-43 C 末ポリクローナル抗体(405-414)、以下自作のラットモノクローナル抗体(8 種類)、TDP(319-333)ポリクローナル抗体(2 種類)、TDP(341-355)ポリクローナル抗体(2 種類)。抗体を様々な組合せで検討し、最適な capture/detection 抗体の選定をおこなった。使用した CSF は ALS: 13 例、GBS: 7 例であった。CSF は Aurum Serum Protein Kit (Bio-Rad) のカラムに通し、アルブミン、イムノグロブリンなどを除去したものを用いた。2 次抗体にビオチン標識抗マウス IgG、あるいはウサギ IgG (Jackson Laboratory) を使用し、その後 HRP 標識アビジン-ビオチン複合体 (Vector Laboratory) を反応させた。従来は発色法により検出をおこなっていたが、検出感度を高めるため、化学発光法 (Chemiluminescent Ultra Sensitive AP Microwell, BioFX) を用いた。

2. PGRN 機能低下 TDP-43 proteinopathy モデル動物の作製

理化学研究所より GRN hemizygotte マウスを入手し、交配により GRN-KO マウスを作製した。このマウスと本研究所病態細胞生物学研究チームにより作製された TDP-43 (G298S), TDP-43 (M337V) マウスとの交配をおこない TDP-43 (G298S)/PGRN+/-, TDP-43 (M337V)/PGRN+/- を作製した。

3. 免疫組織化学的検討

トランスジェニックマウスを十分に加齢させた後、脳と脊髄を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後 10-30 μm の厚さで切片を作製し、ビオチン化抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410 モノクローナル抗体) により免疫組織化学染色を行った。

(倫理面への配慮)

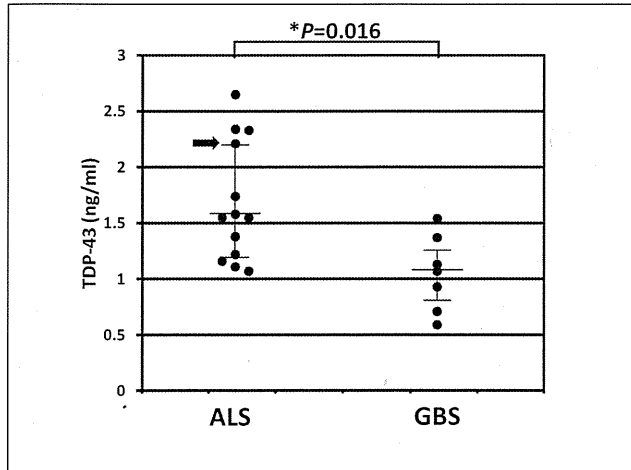
剖検時や腰椎穿刺時に採取された脳脊髄液や血漿の使用は、遺族あるいは患者の承認を得て実施することを原則とし、連結不可能匿名化による個人情報の保護を図った。詳細な研究計画に関しては、本報告者の所属研究所における倫理委員会の承認を受けた。実験動物は実験動物の倫理基準に準じて実施した。具体的な実験計画は本報告者の所属研究所における動物実験倫理委員会において承認を受けた。

C. 研究結果

1. TDP-43 検出 ELISA

人工 CSF にリコンビナント全長 TDP-43 を加えた系において、間接 ELISA 法及びサンドイッチ ELISA 法による TDP-43 の測定に成功した。検出の特異性を高めるためにサンドイッチ ELISA を採用することになった。様々な抗体の組合せを試した結果、capture 抗体には Abnova モノクローナル抗体、detection 抗体には ProteinTech ポリクローナル抗体の組合せが最適であることが判明した。それ以外の抗体の組合せではネガティブコントロールに非特異的反応が見られるか、検出感度が低くなることがわかった。さらに検出系の見直しにより、TMB 発色法では検出限界が 2,000 pg/ml であったものを、化学発光法に替えて検出限界が 75 pg/ml に改善することができた。TMB による発色法よりも約 27 倍感度良く TDP-43 を検出することに成功した。この検出系を用いて 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 の検出を行った。ALS 患者の CSF 中 TDP-43 の濃度は 1.68 ± 0.15 ng/ml (N=13), GBS 患者では 1.05 ± 0.13 ng/ml (N=7) [mean

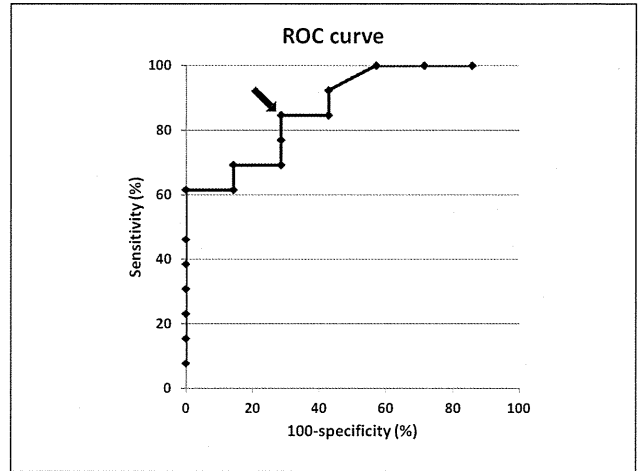
± S.E.M]であり、Mann-Whitney U-test での統計解析の結果、 $p=0.016$ (two-tail)と有意差があることが判明した (図 1)。また、スピアマン順位相関解析によって、TDP-43 濃度と年齢には相関がないことが判明した [ALS ($r=0.198$, $p=0.516$), GBS ($r=0.036$, $p=0.939$)]。



(図 1) 脳脊髄液中 TDP-43 濃度: サンドイッチ ELISA により ALS と GBS の脳脊髄液中 TDP-43 濃度を測定した。ALS (mean±SEM, 1.68 ± 0.15 ng/ml, N = 13) が GBS (1.05 ± 0.13 ng/ml, N = 7) に比べ、TDP-43 濃度が有意に高かった ($p = 0.016$, Mann-Whitney U-test)。矢印は家族性 ALS 患者を示している。

2. ROC curve

最適な感度と特異度をもたらすカットオフ値を決定するため、Receiver operating characteristic curve (ROC curve: 受信者動作特性曲線)を作成した (図 2)。縦軸に感度 (真陽性率)、横軸に 1-特異度 (偽陽性率) をプロットし、左上のポイント (感度=100%, 1-特異度=0%) から 1 番近い点を best diagnostic cut-off 値とした。Area under the ROC curve は 0.874 であることから、病態識別能は良好であることが分かった。この点におけるカットオフ値は 1.16 ng/ml であり、診断の感度は 84.6%、特異度は 71.4%であった。また、陽性予測値は 83.3%、陰性予測値は 62.5%、オッズ比は 13.75 であった。

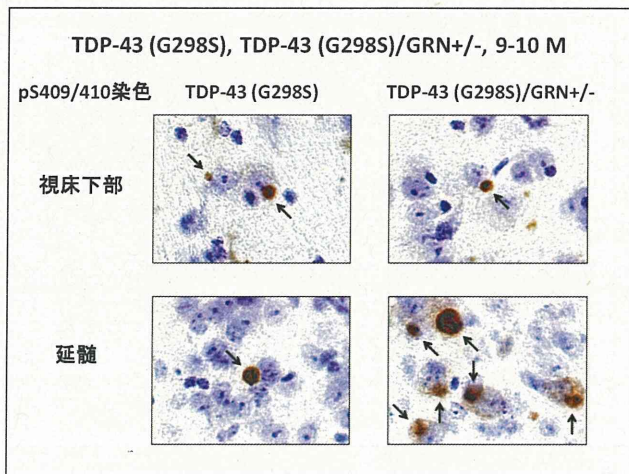


(図 2) Receiver operating characteristic (ROC) curve: 左上のポイント (sensitivity = 100%, 100-specificity = 0%) より 1 番近い点を best diagnostic cut-off 値とした (矢印)。この点における cut-off 値は 1.16 ng/ml, 感度 84.6%, 特異度 71.4%であった。Area under the ROC curve: 0.874。

3. PGRN 機能低下 TDP-43 proteinopathy モデル動物の作製と免疫組織化学的検討

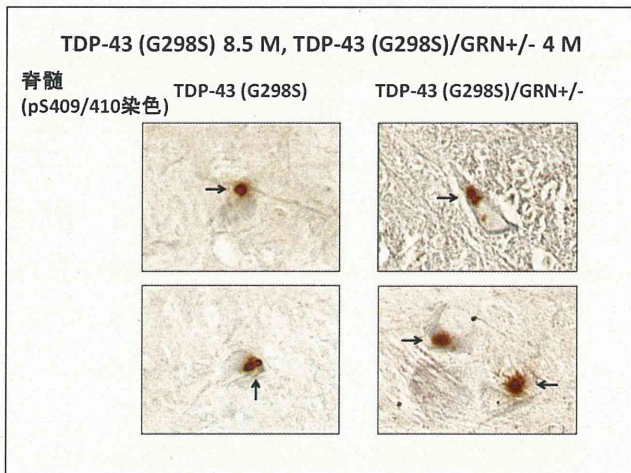
GRN hemizygote マウスの交配により GRN-KO マウスを作製した。このマウスと本研究所・病態細胞生物学チームにより作製された TDP-43 (G298S)、TDP-43 (M337V) マウスとの交配を行い、TDP-43 (G298S)/GRN+/-、TDP-43 (M337V)/GRN+/-マウスを作製後、解析可能な月齢になるまで十分に加齢させた。

TDP-43 の異常蓄積が加速しているかどうかに関して TDP-43/GRN+/-マウスと TDP-43 単独 Tg マウスとの比較を行った。9-10 ヶ月齢の TDP-43 (G298S)/GRN+/-、TDP-43 (G298S)マウス脳を抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410) で染色したところ、どちらの系統においても視床下部と延髄の特定の神経核で、リン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体が観察された。その数は延髄において TDP-43 (G298S)/GRN+/-マウスの方が多い傾向にあった (図 3)。



(図3) TDP-43 (G298S), TDP-43 (G298S)/GRN+/-マウス脳の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色：神経細胞の細胞質内に TDP-43 陽性封入体が観察された (矢印)。

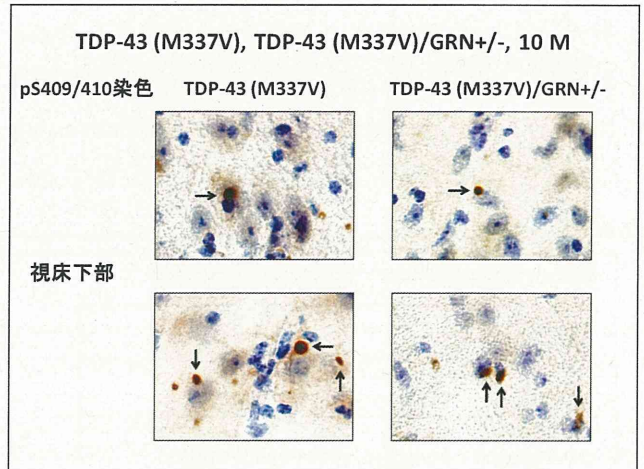
また、TDP-43 (G298S) と TDP-43 (G298S)/GRN+/-マウスの脊髄を抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410) で染色したところ、どちらの系統においてもリン酸化 TDP-43 の封入体が観察された (図4)。



(図4) TDP-43 (G298S), TDP-43 (G298S)/GRN+/-マウス脊髄の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色：神経細胞の細胞質内に TDP-43 陽性封入体が観察された (矢印)。

さらに、TDP-43 の異常蓄積が加速しているかどうかに関して 10 ヶ月齢の TDP-43 (M337V)/GRN+/-, TDP-43 (M337V) マウス脳を抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410) で染色した。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 (図5)。



(図5) TDP-43 (M337V), TDP-43 (M337V)/GRN+/-マウス脳の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色：神経細胞の細胞質内に TDP-43 陽性封入体が観察された (矢印)。

D. 考察

脳脊髄液中の TDP-43 の検出

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、有意に高いことが判明した。この結果は ALS と末梢神経障害の鑑別診断をおこなうことができる可能性を示すものである (論文投稿中)。今後はさらに多検体の CSF を収集し、TDP-43 濃度の測定を行う必要があると考えられる。また臨床応用に向けてさらに TDP-43 の検出感度を高めること、および多検体測定と少量の CSF での計測を可能にするための高感度な検出法を確立することが今後の課題である。

TDP-43 proteinopathy モデルマウスの作製

TDP-43 異常蓄積を伴う家族性 FTLD の原因遺伝子である GRN を欠損した TDP-43 (G298S)/GRN+/-, TDP-43 (M337V)/GRN+/-マウスを作製し、免疫組織化学的検討を行った。

その結果、TDP-43 (G298S) マウス、TDP-43 (G298S)/GRN+/-マウスの脊髄神経細胞、脳の神経細胞において、細胞質内にリン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体が観察された。今回の結果からは GRN 遺伝子

欠損が ALS の病変加速をひき起こしたかどうかは明らかになっていないが、TDP-43 (G298S)/GRN+/-の延髄でリン酸化 TDP-43 抗体陽性封入体の数が多い傾向にあった。今後は検体数を増やし、GRN 欠損が病変加速を引き起こすか、また ALS モデルマウスとして使用できるかどうかを検討する必要がある。

TDP-43 (M337V)、TDP-43 (M337V)/GRN+/-マウス脳の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色では、両系統ともリン酸化 TDP-43 陽性封入体が視床下部でのみ観察された。M337V 系統に関しては GRN 欠損における明らかな病変加速効果は観察されなかった。

E. 結論

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、有意に高いことが判明した。この結果は ALS と末梢神経障害の鑑別診断をおこなうことができる可能性を示すものである

ALS の発症機序解明とその治療法・治療薬開発のため、TDP-43 proteinopathy モデルマウスを確立することが急務である。今回解析したトランスジェニックマウスはその候補となる可能性がある。また、GRN 欠損 TDP-43 トランスジェニックマウスにおける病変加速の有無に関しては、さらなる詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 細川雅人、新井哲明、秋山治彦 認知症の発症に関わる遺伝子 TDP-43 老年精神医学雑誌 21 巻(5) 561-571 (2010)
2. 細川雅人、新井哲明、秋山治彦、朝田隆 前頭側頭葉変性症と遺伝要因 老年精神医学雑誌 21 巻(12) 1387-1398 (2010)
3. 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, Akiyama H. Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other

neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy.

Neuropathology 30: 170-181 (2010)

4. 新井哲明、山下万貴子、細川雅人、野中隆、小林禪、長谷川成人、秋山治彦、朝田隆 前頭側頭葉変性症の分子病理 Dementia Japan 第 25 巻 第 2 号 120-127 (2011)
5. 新井哲明、小林禪、細川雅人、長谷川成人、秋山治彦 ALS-D-FTLD-MND-FTLD-U Clinical Neuroscience 第 29 巻 第 9 号 995-998 (2011)
6. 新井哲明、細川雅人、長谷川成人、秋山治彦、朝田隆 TDP-43 分子による新たな認知症群 精神神経学雑誌 第 113 巻 第 6 号 574-583 (2011)
7. 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(4):390-397 (2012)
8. 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 Neuropathologica 124(3):383-394 (2012)
9. 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 May 29. Doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01325.x. [Epub ahead of print] (2012)
10. 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(3):334-342 (2012)
11. 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. Journal of the Neurological Sciences 323(1-2):85-92 (2012)
12. 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 DMA, Tamaoka A. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. Brain 135(Pt 11):3380-91 (2012)
13. 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(12):e52389. doi: 10.1371/journal.pone.0052389 (2012)

14. Sharmin T, Satho T, Irie K, Watanabe M, Hosokawa M, Hiramatsu Y, Talukder P, Okuno T, Tsuruda S, Uyeda S, Tamura Y, Nakashima Y, Eyanagi R, Toda A, Kashige N, Miake F. Pypriproxyfen enhances the immunoglobulin G immune response in mice. *Microbiology and Immunology*, in press
15. 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
- ## 2. 学会発表
1. 新井哲明, 松脇貴志, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 細川雅人, 近藤ひろみ, 西原真杉 (2010) プログラニューリンノックアウトマウス脳の組織化学的解析 第51回日本神経病理学会, 東京 [2010/4/25]
 2. 羽賀千恵, 池田研二, 新井哲明, 石山宮子, 柳下三郎, 下村洋子, 近藤ひろみ, 細川雅人, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2010) 内嗅領皮質野に出現するユビキチン陽性顆粒(UPG)の再検討 第51回日本神経病理学会, 東京 [2010/4/25]
 3. 新井哲明, 小林禪, 長谷川成人, 土谷邦秋, 青木正志, 横田修, 新里和弘, 大島健一, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 細川雅人, 秋山治彦 (2010) FUS proteinopathy 例の組織化学的検討 第25回日本老年精神医学会, 熊本 [2010/6/25]
 4. 小林禪, 秋山治彦, 新井哲明, 横田修, 土谷邦秋, 近藤ひろみ, 下村洋子, 羽賀千恵, 長谷川成人, 細川雅人, 大島健一, 新里和弘, 石津秀樹, 寺田整司, 女屋光基, 池田学, 小柳清光, 中野今治, 村山繁雄, 水澤英洋 (2011) 本邦におけるFTLD-FUSの病理学的特徴:9剖検例の検討. 第52回日本神経学会総会, 名古屋 [2011/05/18]
 5. 辻浩史, 長谷川成人, 野中隆, 亀谷富由樹, 山下万貴子, 増田雅美, 細川雅人, 秋山治彦, David Mann, 初田裕幸, 高尾昌樹, 村山繁雄, 齊藤祐子, 詫間浩, 富所康志, 中馬越清隆, 石井亜紀子, 石井一弘, 新井哲明, 玉岡晃 (2011) ALSおよびFTLD-TDPに蓄積するりん酸化TDP-43蛋白コンフォメーションに関する解析. 第52回日本神経学会総会, 名古屋 [2011/05/18]
 6. 青木直哉, 東晋二, 小林禪, 細川雅人, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 泉山洋子, 都甲崇, 勝瀬大海, 内門大丈, 鈴木京子, 新井哲明, 長谷川成人, 平安良雄, 秋山治彦 (2011) ニューロピルに認められるFUS陽性微細顆粒について. 第52回日本神経病理学会総会学術研究会, 京都 [2011/06/04]
 7. Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H. Quantitative determination of patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. *International Conference on Alzheimer's Disease 2011* 演題番号 P1-088, Paris France [2011/07/17]
 8. Arai T, Mizukami K, Nishihara M, Hosokawa M, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H, Matsuwaki T, Takahashi S, Asada T. Histopathological analysis of progranulin knockout mice. *International Conference on Alzheimer's Disease 2011* 演題番号 P1-002, Paris France [2011/07/17]
 9. 細川雅人, 新井哲明, 野中隆, 山下万貴子, 鈴掛雅美, 長谷川成人, 秋山治彦 メチレンブルーによるりん酸化タウ蓄積抑制効果の検討 演題番号:基 047 (211) 第30回日本認知症学会 東京 [2011/11/11]
 10. McGeer P, Schwab C, Hashioka S, Miklossy J, Hosokawa M. Inflammatory activation of cyclooxygenase-2 in age related macular degeneration. 演題番号 174.19/LL18 *Neuroscience 2011* Washington D.C. USA [2011/11/13]
 11. Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H. 演題番号 351.27/V4 *Neuroscience 2011* Washington D.C. USA [2011/11/14]
 12. 辻浩史, 長谷川成人, 野中隆, 亀谷富由樹, 山下万貴子, 増田雅美, 細川雅人, 秋山治彦, David Mann, 初田裕幸, 高尾昌樹, 村山繁雄, 齊藤祐子, 詫間浩, 富所康志, 中馬越清隆, 石井亜紀子, 石井一弘, 新井哲明, 玉岡晃 (2011) ALSおよびFTLD-TDPに蓄積するりん酸化TDP-43蛋白コンフォメーションに関する解析 第52回日本神経学会総会, 名古屋 [2011/05/18]
 13. 細川雅人, 新井哲明, 野中隆, 山下万貴子, 鈴掛雅美, 辻浩史, 長谷川成人, 秋山治彦 メチレンブルーによるりん酸化タウ蓄積抑制効果の検討 演題番号: 29P1-am081 第132回日本薬学会, 札幌 [2012/03/29]
 14. Changes in progranulin expression following focal cerebral ischemia associated with microglial activation in mice. Furukawa A, Irie K, Akitake Y, Hosokawa M, Nakano T, Muroi C, Sakamoto Y, Hiramatsu Y, Uyeda S, Fukumitsu Y, Satho T, Kashige N, Miake F, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. 演題番号: 2PJ-152 第89回 日本生理学会, 松本 [2012/03/30]
 15. Screening of The SOD1, TARDBP and FUS mutations and the pathological studies in Japanese cases with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Arai T, Arai M, Itokawa M, Yoshida M, Tamaoka A, Kobayashi Z, Hosokawa M, Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamada M, Matsui M, Kaji R, Nakajima K, Kuwano R, Takahashi S, Asada T, Akiyama H. 演題番号: P1-200 *Alzheimer's Association International Conference 2012*, Vancouver, BC, Canada [2012/07/15]
 16. Intracellular seeded aggregation and cytotoxic model of TDP-43. Nonaka T, Suzukake M, Yamashita M, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M. 演題番号: P2-143

Alzheimer's Association International
Conference 2012, Vancouver, BC, Canada
[2012/07/16]

17. Methylene blue reduced tau phosphorylation and aggregation in P301L transgenic mice. Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hasegawa M, Akiyama H. 演題番号: P3-331 Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, BC, Canada [2012/07/17]
18. Inoculation of recombinant alpha-synuclein fibrils can induce alpha-synuclein pathology in wild-type mice. Masuda-Suzukake M, Oikawa T, Hosokawa M, Nonaka T, Hasegawa M. 演題番号: P8 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester, United Kingdom [2012/09/05]
19. レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄の α -シヌクレイン陽性構造の比較検討. 高橋晶, 新井哲明, 水上勝義, 近藤ひろみ, 大島健一, 新里和弘, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆 演題番号: 039 第31回 日本認知症学会, つくば [2012/10/26-27]
20. α シヌクレイン線維の脳内接種は野生型マウス脳にレビー小体様病理を形成させる. 鈴掛(増田)雅美, 笈川貴行, 細川雅人, 野中隆, 秋山治彦, 長谷川成人 演題番号: 092 第31回 日本認知症学会, つくば [2012/10/26-27]
21. Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H. 演題番号: A-459-0001-01234 The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Firenze, Italy [2013/03/08]
22. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M. 演題番号: A-459-0002-00713, The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Firenze, Italy [2013/03/09]

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 および FUS に関する遺伝子学的・病理組織化学的解析

新井哲明^{1,2)}，細川雅人²⁾，野中隆⁴⁾，長谷川成人⁴⁾，
松脇貴志³⁾，西原真杉³⁾，秋山治彦²⁾

筑波大学医学医療系臨床医学域精神医学¹⁾，東京都医学総合研究所
認知症・高次脳機能研究分野²⁾，東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室³⁾，
東京都医学総合研究所 病態細胞生物学研究室⁴⁾

研究要旨（10 ポイント程度）

TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)と fused in sarcoma (FUS)は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)および前頭側頭葉変性症(FTLD)の患者脳において凝集蓄積し、神経変性を誘導する主要な分子である。本研究は、遺伝子変異から TDP-43 および FUS 蓄積による封入体形成を介した神経変性機序を明らかにすることを目的とし、両分子の遺伝子学的および病理組織化学的解析を行った。本邦における 32 例の家族性 ALS (FALS)および 279 例の孤発性 ALS (SALS)例について遺伝子解析を行った結果、FALS における変異の頻度は、*SOD1* が 25%、*TARDBP* および *FUS* が 9.4%と欧米とほぼ同様であり、本邦においても両遺伝子が FALS の原因遺伝子として重要であることが確認された。また、*TARDBP* 変異例に蓄積した TDP-43 の病理生化学的特徴は、SALS のそれと同様であったことから、FALS と SALS における TDP-43 を介した神経変性過程は共通である可能性が示唆された。さらに、その遺伝子変異によって蛋白の発現量が半減し、TDP-43 蓄積を介した変性が生じることが判明している *granulin (GRN)* のノックアウトマウスの組織化学的解析を行ったところ、TDP-43 の蓄積は認められなかったが、視床および脊髄の一部に p62 陽性構造が多数観察された。以上から、少なくともマウス脳においては、PGRN の発現量低下により初期に誘導される主要な分子は p62 であることが示唆され、PGRN の低下と p62 の蓄積が、神経変性にどのように関与するのかを明らかにすることが今後の課題である。FALS および FTLD に蓄積した FUS の病理生化学的特徴を TDP-43 のそれと比較検討したところ、TDP-43 は核から失われるが FUS は核の染色性が低下するものから保たれるものまでさまざまである点や、不溶性画分において TDP-43 に認められるリン酸化や断片化が FUS には認められない点などの相違が認められた。特に不溶性 FUS の生化学的性状は、変性の原因となる封入体の主要構成蛋白のそれとしては特異であり、今後さらに詳細な検討が必要であると思われる。

A. 研究目的

2006 年、筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)および前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration: FTLD)に出現するユビキチン陽性封入体の主要構成成分として核蛋白である TAR DNA-binding protein of 43 kDa ((遺伝子: *TARDBP*, 蛋白: TDP-43))が同定され、両疾患が共通の病理基盤を有することが明らかになった。さらに、2009 年家族性 ALS(familial ALS: FALS)の一型である ALS6 の原因遺伝子として

*fused in sarcoma (FUS)*が同定され、さらに FUS 蛋白は封入体の主要構成蛋白が不明なまま残されていた atypical FTLD-U、好塩基性封入体病(basophilic inclusion body disease: BIBD)、神経細胞生中間径フィラメント封入体病(neuronal intermediate filament inclusion disease: NIFID)の3つのFTLDの封入体にも含まれることが判明した。TDP-43 および FUS は、ALS および FTLD において神経変性を誘導する主要な蛋白質である。したがって、遺伝子変異から TDP-43 および FUS 蓄積による封入体形成のメカニズムを明らかにするこ