

201317087A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業

異常タンパク伝播仮説に基づく神経疾患の
画期的治療法の開発

(H25-神経・筋-一般-002)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 成人
(公益財団法人 東京都医学総合研究所)

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 異常タンパク伝播仮説に基づく神経疾患の画期的治療法の開発 1
研究代表者 長谷川 成人

II. 分担研究報告

1. α シヌクレインのプリオン様伝播 8
長谷川 成人
2. 患者脳に蓄積した不溶化TDP-43はプリオン様の性質を有する 12
野中 隆
3. ALSおよびFTLD-TDP患者脳中に蓄積したTDP-43のプロテアーゼ耐性断片の解析 15
亀谷 富由樹
4. 本邦におけるFTLD-FUSの特徴 17
秋山 治彦
5. TDP-43 proteinopathy動物モデルの作製 21
細川 雅人
6. Parkinson病およびLewy小体型認知症における延髄のリン酸化 α -synuclein陽性構造の検討 --- 24
新井 哲明
7. C9ORF72変異を有する日本人ALSの一剖検例 27
高橋 均
8. 運動ニューロン疾患でみられるELP3抗体陽性封入体 31
藤田 行雄
9. レビー小体関連 α シヌクレイオパチー (Lewy body- related α - synucleinopathy: LBAS) の
脊髄内伝播に関する研究 34
村山 繁雄
10. 急速に呼吸筋麻痺が進行し好塩基封入体を認めたALS 37
吉田 眞理
11. TDP-43の凝集に関わる配列 39
久永 眞市
12. 霊長類ALSタンパク伝播モデル作製の試み 42
横田 隆徳
13. TDP-43量は自己mRNAのpolyA選択、スプライシング、核貯留の協働により制御される 45
小野寺 理

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 48

IV. 研究成果の刊行物・別刷 51

V. 平成 25 年度班会議プログラム 222

総括研究報告書

「異常タンパク伝播仮説に基づく神経疾患の画期的治療法の開発」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 認知症・高次脳機能研究分野 分野長

研究要旨

本研究班は神経疾患に認められる異常タンパク質病変を手がかりに、患者剖検脳の解析、病態を再現する細胞、動物モデルの検討、構築を行い、その発症、進行機序を解明して、治療薬や治療法の開発に役立てることを目的とする。本年度はALSやFTLDの原因分子であるTDP-43は、患者脳に蓄積する異常TDP-43がプリオン様の特性を持ち、正常分子を異常に変換する能力があることを培養細胞系で明らかにした(野中)。またその責任領域はプリオンと相同性の高い領域の配列が関与していることを示した(亀谷、久永)。TDP減少時には2段階の細胞質内TDP-43 mRNAを増加させる量的制御機構が働くことが示唆された(小野寺)。髄液TDPが診断に使える可能性も示された(細川)。FUS異常を伴うALSやFTLDについては、国内と欧米では状況が異なること(秋山)、経過がはやい症例が多く、ALS-TDPとは臨床像に違いがあること(吉田)、転写に関与する因子がFUS蓄積に関わっていること(藤田)などが示された。欧米でALSの中で割合が最も高いとされるC9ORF72例についても、国内唯一の剖検例の詳細な病理報告がなされた(高橋)。患者脳組織における病変の広がりについては、PD/DLBにおける延髄呼吸中枢に α Synの蓄積が認められること(新井)、脊髄は末梢自律神経系・脳幹進展系で下流にあり、一次感覚神経系では逆行性に進行する傾向が示された(村山)。実験モデルとしては、野生型マウスに線維化したリコンビナント α シヌクレイン、あるいは患者脳由来の α Synを接種すると内在性の α シヌクレインが異常となり、病変が広がることが証明された(長谷川)。TDP-43のモデルについては、患者脳由来の異常TDP-43を含む画分をカニクイザルに接種する実験を試みているが、現時点で特に症状は見られない(横田)。

研究分担者：

野中 隆	東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室 副参事研究員
亀谷富由樹	東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室 次席
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
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
新井 哲明	筑波大学医学医療系臨床医学域精神医学 准教授
高橋 均	新潟大学脳研究所 病理学分野 教授
藤田 行雄	群馬大学大学院 脳神経内科学 講師
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 理工学研究科生命科学専攻 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

多くの神経変性疾患には疾患に特徴的な異常蛋白質の病変が認められ、その病変の脳内での広がりや臨床症状、病状の進行が密接に関係するこ

とが示されている。アルツハイマー病(AD)におけるタウ、パーキンソン病(PD)やレビー小体型認知症(DLB)における α シヌクレイン(α Syn)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性症(FTLD)に

における TDP-43 などでの病変である。我々は、このような細胞内に生じた異常タンパク質が、正常分子を異常に変換し、それが細胞から細胞へと伝播することで、蛋白質の異常病変が脳内に広がり、病気が進行すると考えると神経疾患の病態の主要なメカニズムが説明できると考えている。本研究班は、神経変性疾患の病態を形成する細胞内異常タンパク質がプリオン様の特性をもち、それが細胞から細胞へ伝播するのか、どのように伝わるのか、それを制御することはできるかなどの問題について、神経病理学、細胞生物学、神経化学、薬学などを専門とする研究者が集まり、詳細な検討を行うことにより、動物モデルの構築、病変進展メカニズムの解明を行い、治療薬、治療法の開発に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

1. 患者脳の病理、生化学解析

AD, PD, DLB, ALS, FTLD などの患者脳の病理組織標本については、種々の特異的抗体 (tau, p α Syn, pTDP-43(pS409/410), FUS, p62, ユビキチン, ユビキリン, anti-C9orf72 など) の免疫組織化学染色を行い、神経病理学的解析を行った。また、一部の症例については、患者剖検脳の凍結組織からサルコシル不溶性画分を調製し、イムノブロット解析、さらには陽性バンドを切り出して、ゲル内トリプシン消化後、LC/MS/MS 解析を行った。

2. 培養細胞実験

過剰発現は、全長あるいは部分欠損変異 TDP-43 を挿入したプラスミドをトランスフェクションし、SH-SY5Y 細胞に一過性に発現し、その局在や凝集を観察した。培養細胞に凝集核シードを添加する実験では、一過性に全長、あるいは部分欠損 TDP-43 を発現した 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)、あるいは合成ペプチド、あるいはそれを線維化したものをトランスフェクション試薬と共に導入し、数日間培養したのち

細胞を回収し、pTDP-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イムノブロット解析を行った。

3. 動物実験

ヒト α Syn、マウス α Syn を大腸菌に発現、精製後、37°C で一週間振盪することにより線維化した。線維化した α Syn、可溶性 α Syn、あるいは DLB 患者脳不溶性画分を野生型マウス (C57BL) 脳の黒質に接種し、一定期間の後、半球は固定し、免疫組織染色を、半球はサルコシル可溶、不溶性画分を調製し、イムノブットによる生化学的検討を行った。また、カニクイザルの実験は、2 頭に対して麻酔下に椎弓切除術を行い、第 6 頸髄の利き手側の前角細胞付近に、1 頭は孤発性 ALS 患者脳から抽出し、培養細胞系でシード効果が確認できたサルコシル不溶性画分 (5 μ l)、もう 1 頭は対照として、非 ALS 患者脳から抽出したサルコシル不溶性画分 (5 μ l) を注入した。アップルテストなどの行動解析に加え、前肢筋の針筋電図や正中神経の末梢神経伝導検査を行い、注入 32 週後に解剖し、神経病理学的検査を行った。

4. TDP-43 の発現制御に関する実験

TDP-43 exon6 を含むミニジーンを作成し、HEK293T 細胞にトランスフェクションした。siRNA により内在性 TDP-43 をノックダウンし、これに伴うミニジーン由来の mRNA を、ノザンブロットングおよび定量リアルタイム PCR により解析した。

(倫理面への配慮)

剖検脳の生化学解析は、それぞれの施設の倫理委員会に研究の申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。ウイルスベクターの使用を含む DNA 組換え実験、動物実験は、各施設の組換え DNA 実験委員会、動物倫理委員会の実験指針に基づいて実施した。またサルの実験は、医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて

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之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

1. TDP-43

野中らは、ALS や FTL D 患者脳に蓄積する異常 TDP-43 にプリオン様の特性、すなわち正常の TDP-43 を異常型に変換する能力があるかどうか、培養細胞モデルを用いて検討した。あらかじめ TDP-43 を発現させた細胞に患者脳由来の異常 TDP-43 を添加、導入し、TDP-43 の細胞内局在や生化学解析を行った結果、患者脳由来の異常 TDP を添加した場合に細胞内に発現した正常 TDP-43 がリン酸化を受けて、細胞内に蓄積することを明らかにした。また、疾患により TDP-43 蓄積病理は異なり、主に A, B, C の 3 型に分類されているが、それぞれ異なる病型の患者脳由来の TDP-43 を導入すると、導入した異常 TDP-43 と類似の生化学バンドパターンをとって蓄積することも明らかにした。さらに、この患者脳由来の異常 TDP-43 のプリオン様の性質は熱やプロテアーゼ消化に対して高度な耐性を示し、細胞間を伝播する可能性が示された。

亀谷らは、ALS (Type B) および FTL D-TDP (Type C) 患者脳の不溶性 TDP-43 をトリプシン (100 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 30 分) 消化後、そのトリプシン耐性 TDP-43 を質量分析にて解析を行った。その結果、ALS 患者からは、276-414 と 294-414 の断片が、FTL D-TDP (Type C) 患者からは、273-414 と 276-414 の断片が検出された。このことから、疾患によってプロテアーゼ耐性領域、すなわちアミロイド線維の中心構造が異なることが示された。いずれもプリオンとの相溶性が高い領域であることから、正常を異常に変換する異常 TDP-43 のプリオン様性質に関わっている領域と考えられた。

久永らは、GFP タグ付 TDP-C 末端断片 (162-414) の部分欠損変異体を SH-SY5Y 細胞に一過性に発

現させ、蛍光顕微鏡観察とイムノブロット解析により、凝集体形成に影響する配列を探索した結果、glycine-rich domain の 274-293、294-313 を欠損させると凝集体形成が著しく阻害されることを見いだした。次に、それらの配列のペプチドを合成し、37 $^{\circ}$ C で振盪後、thioflavin S 蛍光測定、電子顕微鏡観察、培養細胞モデルへの導入により、その線維形成能、シード能を検討した。その結果、274-313 のペプチドは、Thioflavin S 陽性の線維構造を形成し、また SY5Y 細胞内に導入すると、全長 TDP-43 を凝集させるシード能を有することが明らかになった。患者脳のプロテアーゼ耐性領域としても同定された領域内の 274-313 の配列そのものが強い凝集能を有しており、TDP-43 の凝集、及びその伝播において中心的な役割を担っていることが示唆された。

細川らは、ALS 患者及び末梢神経障害であるギランバレー症候群 (GBS) 患者の CSF 中の TDP-43 の検出をサンドイッチ ELISA にて行い、ALS 患者 CSF 中の TDP-43 濃度が GBS 患者に比べ有意に高いことを示し、ALS と末梢神経障害の鑑別診断に TDP-43 の髄液検査が使える可能性を示唆した。

小野寺らは、ALS 罹患組織で認められる核内 TDP-43 の減少状態における TDP-43 mRNA の動態を解析し、核内 TDP-43 が減少すると、核内に保持されている遠位 polyA 付加部位を使用した TDP-43 mRNA が細胞質に移行すること、これに加え、新しく転写される mRNA は、近位 polyA 付加部位を使用し、exon6 内のスプライシングが抑制され、細胞質に移行することを示した。この 2 段階の細胞質内 TDP-43 mRNA を増加させる量的制御機構が TDP-43 減少時に働いている可能性を示唆した。

2. FUS

藤田らは、ALS の病因として RNA 関連蛋白の異常が指摘されていることから、Elongator complex protein (ELP) に注目し、抗 ELP3 抗体を用

いた神経病理学的検討を行った。その結果 ALS の脊髄前角細胞内には ELP3 抗体陽性の様々な形態を示す封入体が存在しており、これらは TDP-43 および FUS と共存していることを見いだした。ELP3 は RNA 代謝に関連する蛋白であること、微小管の α -tubulin のアセチル化を促進することで微小管の安定と細胞内物質輸送を制御するが、この異常により様々な蛋白やオルガネラの輸送に障害が生じ、運動ニューロン死につながる可能性が示唆された。

吉田らは、臨床経過が早く、急速に呼吸不全が進行し、全経過 5 ヶ月で死亡した 35 歳の ALS 例について詳細な神経病理学的な解析について報告した。FUS 陽性封入体は運動系を超えて広い範囲に認められたが、TDP-43 は陰性であり、中心前回と脊髄錐体路の変性は極めて軽かった。

ALS—FUS の細胞病理像には ALS-TDP との病態の相違を反映する像がみられることを示唆した。

秋山らは、研究室に蓄積された約 70 例の FTLD 症例のホルマリン固定標本を、オートクレーブ処理後、複数の抗 FUS 抗体、および抗 α -internexin 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。そこで抽出された 10 例の FTLD-FUS について文献に従い病型分類を行ったところ、6 例が BIBD であり、欧米では最多を占めるとされる atypical FTLD-U は 1 例のみであった。非遺伝性疾患においてこのような民族差が存在することは、何らかの遺伝的あるいは環境的 risk factor が存在することを示唆する。

3. C9ORF72

高橋らは、C9ORF72 変異を有する ALS (c9ALS) として本邦唯一の剖検例の病理像を検討した。孤発性 ALS と同様、神経変性は上・下位運動ニューロン系に局限しており、本疾患に特異的とされる p62, ubiquitin, ubiquilin 陽性、かつ TDP-43 陰性の胞体内封入体が小脳顆粒細胞や海馬歯状回などに認められた。これらの封入体は、異常リピートから翻訳されるジペプチドリピート (DPR) 蛋白

を認識する抗体によっても認識された。本症例の病理像は欧米人 c9ALS と共通であるが、DPR 蛋白と神経変性との関連は明らかではなく、今後の検討が必要と考えられた。

4. α シヌクレイン (α Syn)

新井らは、DLB および PD で早期から高炭酸換気応答 (Ventilatory response to hypercapnia: VRH) が低下することに着目し、DLB および PD 患者の延髄呼吸中枢における α Syn の蓄積について検討した。その結果、両群の縫線核、孤束核、ventrolateral medulla において、p α Syn 陽性の Lewy 小体、Lewy neurites (LN)、Lewy dots (LD) が認められた。 α Syn 蓄積による延髄呼吸中枢の機能低下が、VRH 低下の原因となっている可能性が示唆された。

村山らは、東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンクの 796 剖検例について、嗅球、扁桃核、中脳、青斑核、延髄、胸髄、脊髄、及び胸部交感神経節、副腎等の p α Syn 蓄積を検索した。その結果、265 例に脊髄の p α Syn 病変が認められた。脊髄の病変は脳幹の下流に属する結果であったが、嗅球・扁桃核経路からは独立していた。後核の病変は尾側優位であった。一次感覚ニューロン領域では脊髄後核、後根、後根神経節の頻度順であった。これらの結果などから、脊髄は末梢自律神経系・脳幹進展系で下流に属し、一次感覚運動神経系では中枢枝を逆行する傾向を認めた。

5. タウ

長谷川らは、AD 脳剖検脳から調製した不溶性タウを、3-repeat (3R) タウ特異抗体である RD3、および 4-repeat (4R) タウ特異抗体である RD4 などを用いて解析したところ、RD4 のエピトープ内 N279 に脱アミド化が起こっていること、そのため、RD4 の反応性が著しく低いこと、PSP や CBD などの 4R タウだけが蓄積する疾患においては、N279 の脱アミド化の程度は低いことを明らかにした。AD 脳に蓄積するタウは 3R タウと 4R タウが、その微小管結合領域であるリピート配列の部

分を介して逆平行 β シート構造をとって重合することにより、特徴的な重合核を形成し、それが正常の3Rタウと4Rタウの両方の分子の構造変化を引き起こして、PHFという特異な線維構造をもつ病理を形成している可能性が示唆される。

6. 動物モデル

細川らは、出生時からの TDP-43 の過剰発現による悪影響を除くため、ドキシサイクリン(Dox)誘導型の TDP-43 トランスジェニックマウスを作製した。Dox-off 系の CamK2a-tTA と交配したマウスでは、それぞれの TDP-43 の発現が免疫組織化学染色および生化学解析で検出され、後天的に TDP-43 を過剰発現できることを確認した。現時点では神経細胞内において TDP-43 の異常凝集体は観察されていない。

横田らは、霊長類 ALS モデルにおいて、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ことを試みた。培養細胞系で患者脳由来の TDP-43 が正常 TDP-43 を異常に変換することを確認した後、カニクイザル2頭に対して麻酔下に椎弓切除術を行い、第6頸髄の利き手側の前角細胞付近に、ALS 患者脳および非 ALS 患者脳から抽出したサルコシル不溶性蛋白画分を注入した。注入32週後に解剖し、神経病理学的検査を行ったが、TDP-43 の異常局在やリン酸化の所見は認められなかった。

長谷川らは、ヒト α Syn、マウス α Syn 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 Syn の病変が観察され、生化学解析の結果、マウスの内在性の α Syn が異常に変換されたものであることが判明した。さらに DLB 患者脳から調製した不溶性画分をマウスの脳に接種する実験においても、頻度は合成 α Syn 線維よりも低いものの、

同様の病変が認められた。また、ヒト α Syn とマウス α Syn についての比較を行った結果、マウス α Syn の方がヒト α Syn よりも効率よく病理を起こさせることも示された。以上の結果は線維化したヒト α Syn が種の壁を超えてマウス α Syn を異常に変換することを個体レベルで示したものといえる。

D. 考察

神経変性疾患に認められるタンパク質の異常病変は疾患、病型ごとに特徴的な形態、分布をとることが知られ、それぞれ病変の本体となる分子が同定されてきた。AD の神経原線維変化を形成するタウ、PD や DLB のレビー小体、レビー突起を構成する α Syn、ALS や FTLD の細胞内封入体を構成する TDP-43 などである。また、病変を構成するタンパク質の種類が同じ場合でも、疾患の種類や病型ごとに、その蓄積形態が異なることが示されており、神経病理学者がタイプ分類を行っている。例えば TDP-43 が蓄積する FTLD は FTLD-TDP と総称されるが、その異常病変の特徴から、Type A, B, C, D の4つの病型に現在分類されている。さらにその分類と合致するように、蓄積する 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 のバンドパターンが、病型ごとに区別できることが示されている。このような違い、多様性がなぜ生じるのかは極めて重要であり、変性疾患の中心的課題の一つである。野中らは、培養細胞の系において、Type A, B, C の患者剖検脳から抽出した異常 TDP-43 を培養細胞に導入すると、細胞内で発現する TDP-43 が添加した異常 TDP-43 と酷似した C 末端断片のバンドパターンをとって蓄積することを示した。この結果は、患者脳の異常 TDP-43 が異常プリオンと同じような機構で、正常 TDP-43 を自身と同じ構造に変化させていることを示すものであり、変性疾患病理の特徴と多様性がプリオンの概念で説明できることを強く示唆する。

FUS と TDP-43 については、RNA 結合蛋白質と

いう点で共通であり、RNA を介した何らかの発症機構がある可能性が指摘されているが、FUS についても細胞内封入体として蓄積する病理があることも共通している。ただ、FUS の場合、TDP-43 やタウ、 α Syn の病変とは異なり、異常リン酸化のような正常と異常を区別できる明らかな翻訳後修飾は今までのところ判明していない。TDP-43 がチオフラビン陽性を示し、アミロイド線維という形態をとって蓄積するのに対し、FUS はチオフラビン陰性であることも最近報告された。この違いは何を意味するのか、今後の更なる解析が必要と思われる。

C9ORF72 の変異例についても *C9ORF72* 遺伝子の非翻訳領域に存在する GGGGCC リピートから、開始コドン非存在下の特殊な翻訳機構により翻訳されるジペプチドリピート (DPR) 蛋白が蓄積していることが報告され、高橋らも国内の唯一の剖検例でこれを確認した。翻訳の開始点により、poly Gly-Ala, poly Gly-Pro, poly Gly-Arg の三種のタンパク質が翻訳されて蓄積するが、これらは抗 ubiquitin 抗体、抗 ubiquilin 抗体に陽性であった。この症例の神経病理は、孤発性 ALS と同様の神経変性所見に加え、海馬歯状回と小脳顆粒細胞に最も多く認められ、前頭葉・側頭葉の皮質、尾状核、視床、中脳水道周囲灰白質、中脳黒質の神経細胞内にも認められた。DPR 蛋白と TDP-43 の病理は一部重なるところもあるが多くは関連がなく、両者のつながり、及び神経変性との関連は明らかではない。

α Syn の病変の広がりや臨床像の相関については様々な報告があるが、本研究班でも新井らが DLB/PD の早期診断に有用と考えられる高炭酸換気応答と α Syn 病理の関連が示唆された点は大変興味深い。また村山らの高齢者ブレインバンク連続剖検例の解析により、 α Syn の病変が神経回路を経て広がっている可能性が高く、脊髄の病変は脳幹の下流にあり、嗅球・扁桃核経路とは独立して広がること、一次感覚ニューロン領域では脊髄後核、後根、後根神経節の順であることが明らか

となり、一次感覚運動神経系では中枢枝を逆行性に進行することが示唆された。この検討は、 α Syn の病変進展、進行機序を明らかにする上で極めて重要と思われる。

タウについては、Braak らによる解析で明らかとなった AD の進展様式が有名であり、細胞間伝播による病変の広がりを示唆する基礎的報告が相次いでいるが、剖検脳の生化学解析結果に基づいた報告は少ない。最近、3R タウ、4R タウ特異抗体を用いて得られた解析結果から、AD において、タウは 4R タウから 3R タウへとその蓄積病変が変化するという趣旨の論文が報告された。しかしながら、この報告で使用した RD4 抗体はそのエピトープ内の N279 の脱アミド化により大きく反応性が変化すること、さらにはタウのプロセッシングの程度、すなわちエピトープの露出具合により RD3、RD4 の反応性が変わることから、免疫組織染色だけで結論を導くことには注意が必要である。

動物モデルの構築では、野生型マウスの脳内に線維化 α Syn、あるいは DLB 脳の患者不溶性画分を接種することにより、PD や DLB の病態と区別がつかないような生化学的、形態学的な異常蓄積を再現することができた点は大きな進歩であり、これまでにない画期的な変性疾患動物モデルといえる。細胞内の異常蛋白質病変がどのようにして細胞間を伝わるのかは全く不明であり、その解明が今後の大きな課題であるが、現象としては神経回路を介して異常病変が時間経過と共に広がっていることが認められる。類似の現象がタウや TDP-43 でもおこる可能性が十分に考えられ、接種する異常タンパク質の種類をかえた実験や、サルに患者脳不溶性画分を接種する実験も試みられている。

E. 結論

ALS、FTLD 患者脳に蓄積する異常 TDP-43 はプリオン様の性質を有し、細胞内に発現した TDP-43 を自身と同じ異常な構造に変換することが示さ

れた。またその責任領域はプリオンと相同性の高い領域の 276-414 がアミロイド線維の中心をつくり、274-313 がその凝集に最も重要である可能性が示唆された。TDP-43 の発現は制御されており、減少時には 2 段階の細胞質内 TDP-43 mRNA を増加させる量的制御機構がある。FUS 異常を伴う ALS や FTLN は、国内と欧米では状況が異なるがある程度の割合で存在し、TDP-43 の ALS/DFTLN とは、病態形成機序や臨床像に違いがある可能性が示唆された。C9ORF72 変異例は国内では少ないが、TDP-43 が蓄積する ALS と同じ神経病理を示し、翻訳産物である DPR の蓄積病変が認められる。 α Syn の蓄積は、PD/DLB で延髄呼吸中枢にも認められ、脊髄は末梢自律神経系・脳幹進展系の下流、一次感覚神経系では逆行性に進行する傾向がある。野生型マウスに線維化 α Syn、あるいは患者脳由来の α Syn を接種すると内在性の α シヌクレインが異常となり、病変が広がる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

別掲

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

別掲

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））

「異常タンパク伝播仮説に基づく神経疾患の画期的治療法の開発」

分担研究報告書

α シヌクレインのプリオン様伝播

研究分担者：長谷川成人¹⁾

共同研究者：鈴掛雅美¹⁾、久保真城¹⁾、野中隆¹⁾、赤津裕康²⁾、

吉田眞理³⁾、村山繁雄⁴⁾、Mann David⁵⁾、秋山治彦¹⁾

¹⁾ 東京都医学総合研究所, ²⁾ 福祉村病院長寿医学研究所, ³⁾ 愛知医科大学加齢医学研究所, ⁴⁾ 東京都健康長寿医療センター, ⁵⁾ マンチェスター大学

研究要旨

α シヌクレイン(α Syn)はパーキンソン病(PD)や多系統萎縮症(MSA)などの神経疾患に出現する神経細胞、グリア細胞内の線維性病理解構造物の主成分である。病変の広がりや臨床症状が相関することから、 α Syn 異常病変が神経変性に関わっていることが示唆される。本研究では野生型マウスに線維化 α Syn の接種を行い、マウスの脳内で病変が出現するか、またその病変が脳内で広がるかを検討した。その結果、線維化 α Syn は脳内で正常 α Syn を異常に変換し、その病変が時間経過とともに広がることが確認された。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患では、神経細胞やグリア細胞内に異常タンパク質の蓄積病変が認められ、その広がりや臨床症状が密接に関係していることが示されている。我々は、細胞内に生じた異常タンパク質が、正常分子を異常に変換し、それが細胞から細胞へと伝播することで、蛋白質の異常病変が脳内に広がり、病気が進行するという仮説を提唱し、その検証を行っている。今年度は、線維化した α シヌクレイン(α Syn)を野生型マウスの脳に接種し、マウス脳内で PD 患者に見られるような α Syn 異常病変が形成されるのかについて検討を行った。以下に示すような

病変を再現する動物モデルを構築し、病変進展メカニズムを解明すると共に、治療薬、治療法の評価に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

ヒト、あるいはマウス α Syn を大腸菌に発現、精製後、試験管内で振とうすることにより、線維化 α Syn を調製した。これを野生型マウス(C57BL)の中脳黒質の右側に $10\mu\text{g}$ 接種した。コントロールとして可溶性 α Syn を接種した。接種後、一定期間の後、マウスの脳における α Syn の病変を免疫組織化学、生化学的に解析した。生化学解析は、右脳と左脳を別に分け、常法によりサルコシル不溶性画分を調製し、リン酸化 α Syn 特異抗体 pS129、ヒト α Syn 特異抗

体 LB509、マウス α Syn 特異抗体などを用いてイムノブロット解析を行った。

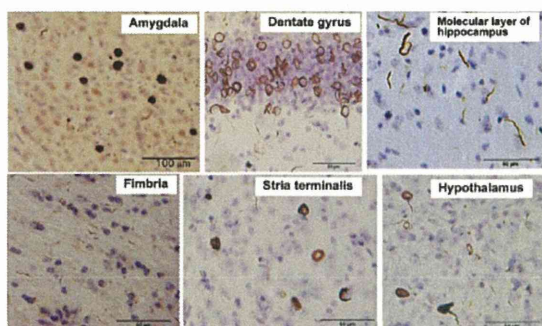
免疫組織染色は、マウス脳をパラホルムアルデヒドにて還流固定後、ビブラトームにて厚さ $50 \mu\text{m}$ の切片を作製し、各種抗体を用いてアビジン-ビオチン法により染色を行った。

(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。

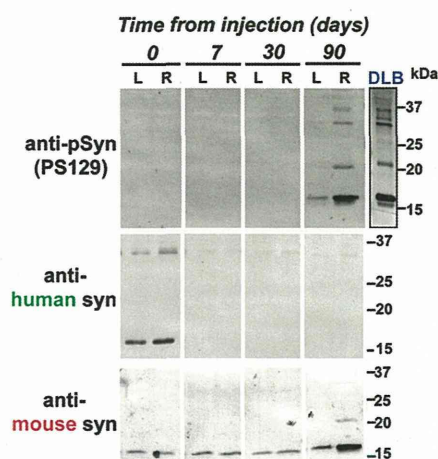
C. 研究結果

線維化 α Syn の接種後 15 ヶ月のマウス脳を pS129 抗体により染色を行ったところ、驚いたことに、接種部位である中脳黒質をはじめ、それ以外にも扁桃核、歯状回、海馬、分界条、視床下部、皮質、脳梁など、広い範囲において、突起様、レビー小体様、あるいはリング状のリン酸化 α Syn 病変が認められた。



これらの異常病変は他の α Syn 抗体にも陽性を示し、一部はユビキチン抗体、p62 抗体に陽性を示した。そこで、次に異常病変がいつから、どのように生じるのかを明らかにするため、接種直後から、7 日、30 日、90 日の後、マウスから接種側である右脳と反対側である左脳を取り出し、サルコシル不溶性画分を調製して蓄積する α Syn を解

析した。その結果、接種後 0 日では、接種したヒト α Syn 線維が不溶性画分にヒト α Syn 特異抗体 LB509 にてバンドが検出されたが、接種から 7 日後以降、それらは分解されバンドは消失した。接種後 90 日で、右半球優位にリン酸化 α Syn バンドが検出された。また、そのバンドパターンは、レビー小体型認知症患者脳の不溶性画分と区別がつかないものであった。さらにマウス α Syn 特異抗体での解析により、リン酸化、蓄積した α Syn はマウスの内因性 α Syn であることが明確に示された。

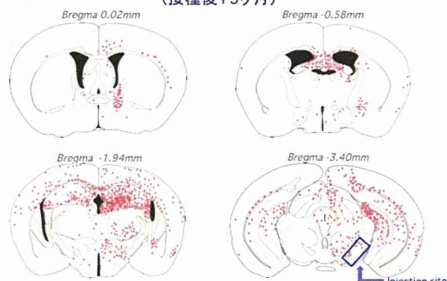


線維化 α Syn を接種したマウスにおいて、病理構造が認められた個体の割合を調べると、可溶性のヒト α Syn またはマウス α Syn を接種した群では、リン酸化 α Syn 陽性の構造物は認められなかった。一方、ヒト α Syn 線維を接種した群およびマウス α Syn 線維を接種した群では、投与側においてはリン酸化 α Syn, Ub, p62 陽性の病理が 80% の個体に認められ、非接種側にも 79% のマウスで病理構造物の伝播が認められた。また、マウスの線維を接種した群ではすべての個体にリン酸化 α Syn 病理が認められ、非投与側でもすべての個体で病変の伝播が

認められた。

α Syn 線維接種マウスにおける病理の出現部位を以下に赤い点で示す。

α シヌクレイン線維接種マウス脳 病理出現部位
(接種後15ヶ月)



α -Syn病理の分布から周辺組織への拡散ではなく、選択的に広がっている傾向がある

接種部位である右脳の中脳黒質周辺だけでなく、海馬や皮質にも病理のひろがり認められ、非接種側である左半球にも数は少ないが病理が認められた。また、接種部位からはなれた部位についても右半球優位ながら左半球にも α Syn 病理が認められた。接種部位からより離れたところでは、 α Syn 病理は決まった部位に集中する傾向が見られた。

α Syn のノックアウトマウスに線維化 α Syn を接種してもこのような異常病変は起こらなかった。

D. 考察

以上の結果から、接種した異常 α Syn が内在性マウス α Syn を異常に変換し、 α Syn 病変を形成され、細胞間を伝わり、時間経過と共に脳内に広がったと考えられる。

α Syn 病理の分布を見ると、接種部位の周辺組織に拡散している、というよりは決まった領域に選択的に広がる傾向が見られた。病変が出現する部位についてまとめると、線条体、扁桃体、分界条は接種部位から遠く離れているにも関わらず、早期から病理が出現した。黒質との関係性を調べて

みると、線条体は黒質からの入力を受けている領域であり、扁桃体についても黒質からの投射が知られている領域である。さらに分界条は扁桃体からの遠心性線維の通過点として知られている。以上の結果は、 α Syn 病理が神経回路を介して広がった可能性を強く示唆する。

このモデルは α Syn 病態の形成、進行メカニズムの解明、さらに新規治療法開発に有用と考えられる。同様の手法は他の細胞内蓄積蛋白質であるタウや TDP43 にも応用可能と考えられる。

E. 結論

野生型マウス脳に凝集核となる α Syn 線維を注入することで、内在性のマウス syn が蓄積した α Syn 病理が形成された。

α Syn 病理は接種部位から生じ、神経回路を経て伝播する可能性が示唆された。

以上の結果から、線維化 α Syn は異常プリオンと同様の性質を有し、脳内で正常 α Syn を異常に変換し、その病変が広がることで病気が進行すると考えられる。

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

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136:1128-38.

Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like Properties of Pathological

TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep.* 4:124-34.

Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PLoS One* 8:e67433.

Mann DMA, Rollinson S, Robinson AC, Callister J, Snowden JS, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson YS and Pickering-Brown S. (2013) Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Comm* 1: 68.

Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Comm* 1: 54.

Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Ishobe T, Hasegawa M, Hisanaga SI (2013) Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. *J Biol Chem* 288: 7968-77.

2 : 学会発表

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

Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Symposium 3S05a, Yokohama [2013. 9. 13]

長谷川成人 神経変性疾患の細胞病理を形成する蛋白質のプリオン様特性 第8回臨床ストレス応答学会, 松本 [2013. 11. 16]

長谷川成人 神経変性疾患の分子基盤と進行機序 —患者脳の解析から導かれた新しい考え方とその検証— 平成25年度 文部科学省 新学術領域研究 生命科学系3分野 がん・ゲノム・脳 支援活動合同シンポジウム [2013. 8. 6]

長谷川成人 神経変性疾患の原因となるタンパク質の構造異常とその伝播 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎 [2013. 11. 20]

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

2013年7月、米国科学誌「Cell Reports (セルリポート)」での論文発表について、東京都広報部よりプレスリリースすると共に、東京都医学総合研究所のホームページにて成果の概要を掲載。
<http://www.igakuken.or.jp/research/to pics/2013/0704.html>

患者脳に蓄積した不溶化 TDP-43 はプリオン様の性質を有する

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

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

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭葉変性症の患者脳に出現するユビキチン陽性の細胞内凝集体の主要な構成タンパク質として TDP-43 が見出された。今年度は、我々が開発した「シード依存的な細胞内 TDP-43 蓄積モデル」を用いて、患者脳に蓄積する不溶化 TDP-43 の諸性質について検討した。その結果、患者脳由来の不溶化 TDP-43 は熱やプロテアーゼ消化に対して高度な耐性を示し、また細胞間を伝播する可能性が明らかとなり、プリオン様の性質を有することが判明した。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）や前頭側頭葉変性症（FTLD-TDP）の患者脳に出現するユビキチン陽性の細胞内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、患者脳由来の不溶化 TDP-43 を凝集核（シード）として細胞内に導入する培養細胞モデルを利用して、患者脳由来の不溶化 TDP-43 の性質について検討した。

B.研究方法

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

（倫理面への配慮）

本研究計画は、東京都医学総合研究所の倫理委員会の承認を受けている。

C.研究結果

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

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

D. 考察

以上の結果より、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 プロテインopathie 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と考えられる。

E. 結論

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

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H (2013) Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *Int J Neurosci*, in press.

Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DM, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Commun*, 1: 54.

Liu R, Yang G, Nonaka T, Arai T, Jia Wand, Cynader MS. (2013) Reducing TDP-43 aggregation does not prevent its cytotoxicity. *Acta Neuropathol Commun*, 1: 49.

Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep.*, 4:124-134

Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PLoS ONE*, 8: e67433

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M. (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain*, 136: 1128-1138

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

野中隆, 長谷川成人 (2014) 患者脳に蓄積した TDP-43 のプリオン様性質. *Dementia Japan*, 28: 28-34.

野中隆, 長谷川成人 (2013) 脳内に蓄積した TDP-43 凝集体のプリオン様性質. *細胞工学*, 32: 1076-1078.

野中隆, 長谷川成人 (2013) 細胞内異常タンパク質凝集体の細胞間伝播: 神経変性疾患の病態進行に関する新たなメカニズム. *基礎老化研究*, 37: 7-11.

2.学会発表

Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Yoshida M, Murayama S, Mann D, Akiyama H and Hasegawa M; **PRION-LIKE PROPERTIES OF PATHOLOGICAL TDP-43 AGGREGATES IN DISEASED BRAINS.** The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases; 2013. 3. 7. Florence, Italy

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H and Hasegawa M; Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases; 2013. 3. 9. Florence, Italy

野中隆, 新井哲明, 長谷川成人. 患者脳に蓄積した TDP-43 のプリオン様性質. 第 32 回日本認知症学会学術集会, 2013.11.9 松本

野中隆. 患者脳に蓄積した TDP-43 のプリオン様性質. H25 年度脳内環境夏の班会議ワークショップ・シンポジウム発表, 2013.8.30 京都

野中隆, 鈴掛 (増田) 雅美, 新井哲明, 赤津裕康, 小尾智一, 吉田眞理, 村山繁雄, Mann David, 秋山治彦, 長谷川成人 患者脳に蓄積した TDP-43 のプリオン様性質 第 54 回日本神経病理学会総会,

2013.4.25 東京

鈴掛 (増田) 雅美, 野中隆, 細川雅人, 笈川貴行, 新井哲明, Mann David, 秋山治彦, 長谷川成人 レビー小体型認知症患者脳不溶性画分の脳内接種は野生型マウス脳にレビー小体病理を形成させる 第 54 回日本神経病理学会総会, 2013.4.25 東京

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

ALS および FTLD-TDP 患者脳中に蓄積した TDP-43 の プロテアーゼ耐性断片の解析

研究分担者：亀谷富由樹¹⁾
研究協力者：辻浩史²⁾、玉岡晃²⁾、吉田眞理³⁾、長谷川成人¹⁾

- 1) 公益財団法人東京都医学総合研究所・病態細胞生物
- 2) 筑波大学・医学医療系・神経内科
- 3) 愛知医科大学・加齢医科学研究所・神経病理部門

研究要旨

脳内に異常蓄積した TDP-43 凝集体の立体構造が疾患ごとに異なっていることが電気泳動・イムノブロットング解析によって明らかにされている。本研究では TDP-43 凝集体をプロテアーゼ処理し、そのコア構造を形成する TDP-43 の基本領域を明らかにし、ALS と FTLD-TDP では脳内に蓄積している TDP-43 の構造が異なっていることが推測された。

A.研究目的

脳内に異常蓄積した TDP-43 凝集体の立体構造が疾患ごとに異なっていることが電気泳動・イムノブロットング解析によって明らかにされている。本研究では TDP-43 凝集体をプロテアーゼ処理し、その構造を形成する TDP-43 の基本領域を明らかにし、疾患ごとの違いについて解析した。

B.研究方法

ALS および FTLD-TDP 患者脳中の sarkosyl 不溶分画の TDP-43 を trypsin (100 μg/ml) で 37°C、30 分消化した。この消化物を電気泳動し、trypsin 耐性の分子量 16kDa 付近の断片をゲル内で chymotrypsin を用いて消化し、質量分析器で解析した。

(倫理面への配慮)

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

C.研究結果

ALS 患者脳からは TDP-43C 末領域の 13 ペプチドを同定し、FTLD-TDP 患者脳からは TDP-43C 末領域の 14 ペプチドを同定した。それぞれの結果から、ALS および FTLD-TDP 患者脳中に異常蓄積した TDP-43 凝集体のプロテアーゼ耐性断片はそれぞれアミノ酸残基 276-414 と 294-414 (ALS) および 273-414 と 276-414 (FTLD-TDP) からなると考えられた (図)。

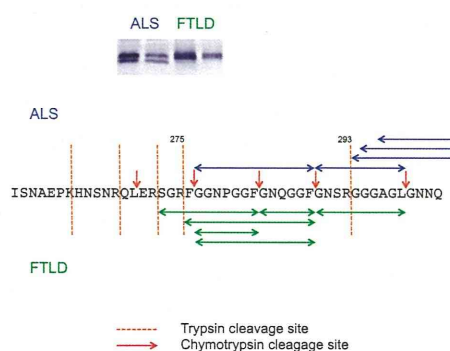


図 ALS および FTLD-TDP 患者脳中の sarkosyl

不溶分に存在する TDP-43 断片から得られた断片の N 末端部の chymotrypsin ペプチド。

D. 考察

各疾患における患者脳中の TDP-43 の電気泳動・免疫ブロットングによるバンドパターンの違いおよびプロテアーゼ耐性断片のアミノ酸領域の違いは、各疾患における異常凝集体形成初期に関わる環境、関連する要因等が異なっていることを示唆している

E. 結論

ALS および FTLD-TDP 患者脳中に異常蓄積した TDP-43 凝集体のプロテアーゼ耐性断片はそれぞれアミノ酸残基 276-414 と 294-414 (ALS) および 273-414 と 276-414 (FTLD-TDP) からなると考えられ、TDP-43 異常凝集体の基本構造が疾患ごとに異なることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann D, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathologica Communications 1: 54.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

以上なし

本邦における FTLD-FUS の特徴

研究分担者：秋山治彦¹⁾

研究協力者：小林 禅¹⁾，河上 緒¹⁾，青木直哉¹⁾，東 晋二¹⁾，細川雅人¹⁾，土谷邦秋¹⁾，村山 繁²⁾，横田 修³⁾，女屋光基⁴⁾，池田 学⁵⁾，中野今治⁶⁾，大島健一⁷⁾，新里和弘⁷⁾

所 属：¹⁾東京都医学総合研究所，²⁾認知症プロジェクト，³⁾東京都健康長寿医療センター，⁴⁾岡山大学精神科，⁵⁾下総精神医療センター，⁶⁾都立神経病院，⁷⁾都立松沢病院

研究要旨

前頭側頭葉変性症（frontotemporal lobar degeneration: FTLD）のうち，RNA 結合蛋白質のひとつである FUS が蓄積する群，FTLD-FUS は稀な疾患で，現在，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 FTLD（atypical FTLD with ubiquitin inclusions: aFTLD-U）の 3 病型に分類されている。当研究室に蓄積された約 70 例の FTLD 症例のうち，10 例が FTLD-FUS であった。内訳は，6 例が BIBD であり，欧米では最多を占めるとされる aFTLD-U は 1 例のみであった。非遺伝性疾患におけるこのような民族差は，何らかの（遺伝的あるいは環境的）risk factor の存在を示唆している。今後の検討課題である。なお 6 例の BIBD のうち 3 例で，FTLD の臨床診断基準においてはむしろ除外項目とされる，舞踏病様不随意運動が認められ，現状では困難である FTLD-FUS の生前診断の一助になると考えられる。

A. 研究目的

欧米では前頭側頭葉変性症（Frontotemporal lobar degeneration: FTLD）患者のかなりの割合が家族性に発病するとされ，*C9orf72*，*GRN*，*MAPT* などが頻度の高い遺伝子として知られている。しかし，本邦では家族性 FTLD は稀であり，かつ，その多くは *MAPT* 変異によって生じる。現在のところ，このような民族差が生じる理由はわかっていない。FUS が蓄積する FTLD-FUS は FTLD の数%～10%前後をしめる孤発性疾患で，basophilic inclusion body disease (BIBD)，neuronal intermediate filament inclusion disease (NIFID)，atypical FTLD with ubiquitinated inclusions (aFTLD-U) の 3 亜型に分類され，欧米ではその中で aFTLD-U が最も頻度が高いと報告されている。当研究室にはこれまでの多施設との共同研究により 70 例を超える FTLD 剖検脳が集積されており，その中に相当数の FTLD-FUS 例が含まれる。本邦には他にこのような

施設はなく，免疫組織化学による FUS 病変を中心に FTLD-FUS の病理組織学的検討をおこなった。

B. 研究方法

ホルマリン固定パラフィン標本を用い，オートクレーブ処理の後，複数の抗 FUS 抗体，および抗 α -internexin 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。予備的検討の結果にもとづき 10 例の FTLD-FUS を検索対象とした。

FTLD-FUS の病型分類は欧米の文献に従い，BIBD は HE 染色で相当数の細胞体内封入体（neuronal cytoplasmic inclusions: NCI）が確認でき，FUS 免疫組織化学染色において多様な形態の NCI が認められること，NIFID は NCI の形態は BIBD と同様であるが α -internexin 免疫染色に明らかに陽性の NCI が存在すること，aFTLD-U は，NCI を HE 染色で見つけることが難しく，新皮質における NCI の形態は小型・

円形のものが大半を占め、海馬歯状回などに核内封入体 (neuronal intranuclear inclusions: NII) を認めること、を目安とした。

(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

10 例の FTLD-FUS の病理亜型は、BIBD : 6 例、NIFID : 2 例、aFTLD-U : 1 例、分類不能 : 1 例であった。分類不能とした症例は、前頭側頭型認知症として長い経過の後、末期に筋萎縮性側索硬化症の症状を呈し、病理学的には脊髄を中心とした ALS 様の TDP-43 蓄積と、大脳における変性神経突起内 Fus 蓄積が主要な所見であった。上記の 3 病型のいずれにも当てはまらず、また各疾患の頻度を考えた場合 TDP-43 病変と FUS 病変が偶然に合併する可能性はきわめて低いことから、この症例をどのようにとらえたらよいかは現時点では明らかではない。

1 例のみ認められた aFTLD-U では、欧米の文献で述べられている所見に比べて核内封入体の出現が少なく、細胞質封入体の形態もやや多型性を示すように思われた。2 例の NIFID のうち 1 例は compound Pick body と呼ばれる二重構造の封入体が認められるのに対して、もう 1 例はそれを欠いていた。10 例中 6 例が BIBD であったことから、本邦では FTLD-FUS の主要病型は BIBD であると考えられた。

なお、臨床記録を解析したところ、この 6 例の BIBD のうち半数、3 例において、経過中、舞踏病などの不随意運動が認められた。

D. 考察

MAPT, *GRN* などの変異による家族性 FTLD の発

病頻度は、地域・民族の遺伝的背景の違いにより異なると考えられる。Lund & Manchester の FTLD 分類にある Frontal Lobe Degeneration (FLD) に相当する症例が本邦で認めたいことについて、以前、池田が、欧米の歴史における Vikings の活動とともに北欧から拡がった可能性があることを指摘したことがある。最近見いだされた *C9orf72* の 6 塩基リピート伸長に伴う FTLD~ALS が、やはり北欧に偏った分布を示すことについて、現在、欧米で同様の説が出されている。*C9orf72* 変異例は本邦ではきわめて稀であり、これらの議論は共通の問題をとりあげたものではないかと推察される。

FTLD-FUS は孤発性の疾患であり、本邦において BIBD が FTLD-FUS の過半数を占める一方、欧米で最も多いとされる aFTLD-U がきわめて稀であることは、病因・病態を解明してゆくにあたり注目に値する。やはり孤発性の疾患である FTLD-TDP において、本邦では (臨床的には) 意味性認知症、それに対応する病理型である type C 蓄積が多い点、欧米と異なっている。これら FTLD 領域に観察される、非遺伝性の疾患群における民族差を、遺伝的背景にもとづく何らかの risk factors の違いにより説明できるのか、あるいは環境要因が影響を与えているのか、今後の研究課題であると思われる。

なお臨床的な観点では、6 例中 3 例の BIBD において、経過中、舞踏病が観察されたことは、生前の診断に際して有用である可能性がある。現在の FTLD の臨床診断基準において、舞踏病などの不随意運動の合併はむしろ除外項目とされている。FTD の臨床像を示し、30~40 代と、FTD としても若年発症の症例で舞踏病を合併した時は、FTLD-FUS、とりわけ BIBD である可能性を考慮すべきである。

E. 結論

FTLD-FUS, FTLD-TDP においては、これらの疾患が孤発性であるにもかかわらず、本邦と欧米との間に病型分布の差が認められる。このような民族差の背景を解明することで、これらの疾患の病因に迫ることができるかも知れない。