

## 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析

研究分担者：長谷川成人<sup>1)</sup>

研究協力者：小久保康昌<sup>2)</sup>、葛原茂樹<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 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

<sup>2)</sup> 三重大学大学院地域イノベーション学研究科 <sup>3)</sup> 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部

### 研究要旨

三重県南部の家族性認知症-パーキンソン症候群の発症、進行機序解明を探るため、大家系の患者剖検脳4例について、タウ、シヌクレイン、TDP-43の生化学解析を行った。その結果、抗タウ抗体を用いた解析からは、4症例のいずれにおいても、アルツハイマー型タウのバンドパターン(60, 64, 68kDのトリプレット、C末端断片)が検出された。シヌクレイン、TDP-43についても、症例によって程度の違いがあるが、抗リン酸化シヌクレイン抗体、抗リン酸化TDP-43抗体に陽性を示す反応が検出された。TDP-43とシヌクレインの蓄積には比例関係が認められた一方、タウと、TDP-43あるいはシヌクレインの蓄積量には逆相関が認められた。

### A. 研究目的

三重県南部に多発する認知症-パーキンソン症候群の発症、病態形成機構を解明することを目的とし、これまで剖検となった大家系(A家系)の4症例について、保存されている凍結から不溶性画分を調製し、タウ、シヌクレイン、TDP-43の異常病変の生化学解析を行う。

### B. 研究方法

症例番号、臨床診断、及び解析部位(括弧内)は以下の通りである。1998-1(ALS with D)(前頭葉)、2001-1(ALS with A)(海馬)、2012-2(PDC)(海馬傍回)、2013-3(PDC)(海馬傍回)。それぞれ、0.5gの凍結組織から通常の方法に従ってサルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、各種抗体によるイムノプロット解析を行った。用いた抗体は、抗タウ抗体(HT7, AT8, RD3, RD4, anti-4R, pS396, T46)、抗リン酸化 $\alpha$ Syn抗体(mAb PS129)、抗TDP-43抗体(poly pS409/410)である。

(倫理面への配慮)

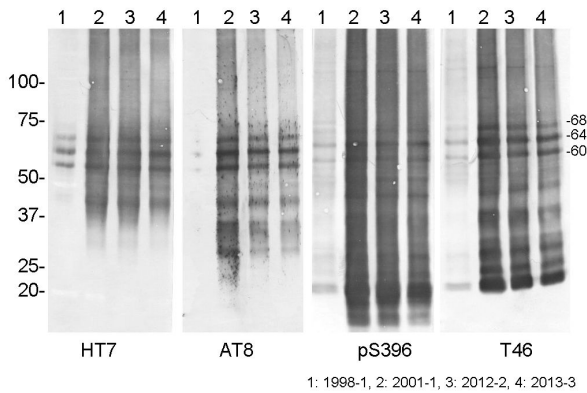
剖検脳の免疫組織、生化学解析については東京都医学総合研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

### C. 研究結果

#### 1. タウのイムノプロット解析

症例1998-1は他の3例に比べてタウ蓄積が少ないものの、いずれの症例においても、アルツハイマー病とよく似た、60, 64, 68kDaの全長リン酸化タウのバンド、レーン全体がスメア状に染まる反応、複数のC末端断片が検出された。

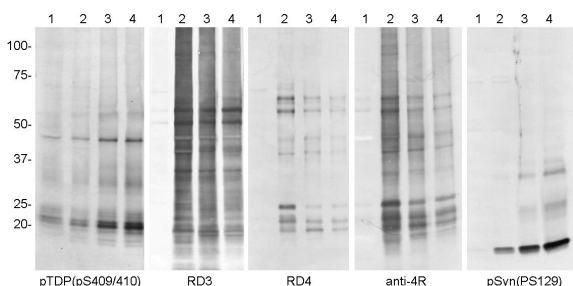
アルツハイマー病患者3例から調製した不溶性タウのバンドパターンとの比較も行ったが、紀伊の大家系4例に検出されたタウの病変は、RD3, anti-4R, T46いずれの抗体においても検出されるバンドパターンもアルツハイマー病のそれらと区別がつかなかった。



1: 1998-1, 2: 2001-1, 3: 2012-2, 4: 2013-3

## 2. TDP-43, シヌクレインの生化学解析

TDP-43 については、解析した 4 例全てにおいて、45kDa の全長リン酸化 TDP-43、18~26kDa の C 末端断片、およびスミア状の反応が検出された。また C 末端断片のバンドパターンは type A-FTLD-TDP のバンドパターンに類似していた。また、シヌクレインについても、1998-1 は軽微であったが、4 例全てにおいてリン酸化シヌクレイン陽性の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やパーキンソン病のそれと類似していると思われた。



それぞれの異常タンパク質の蓄積の程度は、TDP-43 と シヌクレインに比例関係が認められ、逆にタウと TDP、あるいはタウと シヌクレインは逆相関するよう見えた。

## D. 考察

今回解析した大家系の 4 例は蓄積量の程度の違いはあれ、いずれもリン酸化タウ、リン酸化 syn、リン酸化 TDP-43 の 3 種類の異常タンパク質の蓄積が認められた。また、タウのバンドパターンはアルツハイマー病のそれと、TDP-43 は type A-FTLD のそれ、シヌクレインは DLB/PD

のそれと区別がつかないバンドパターンであり、ある程度均質な生化学的特徴を示しているように思われた。同じ家系の患者において、基本的には同じ生化学的特徴を有した蛋白質の異常病変が起こっていることが示唆された。

## E. 結論

大家系の症例 4 例全てにおいて、タウ、TDP-43、Syn の異常蓄積が確認された。今回解析した部位については、タウの蓄積病変はどの症例も、アルツハイマー病のそれと区別できない生化学的特徴を有し、3R、4R タウの蓄積が認められた。TDP-43 は生化学的に type A 型バンドパターン、Syn は DLB と同じ神経細胞型バンドパターンと思われた。TDP と Syn の病変の程度が相関し、タウ病変の程度は他の病変と逆相関を示した。

## 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

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.

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.

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/topics/2013/0704.html>