

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究班

研究代表者 小久保 康昌

三重大学大学院地域イノベーション学研究所

研究要旨

2012年に剖検となった2例(2012-2, -3)の脳皮質、脳髄における異常病変の組織、生化学解析を行うと共に、大家系の家族例4例(2012-2を含む)の脳に蓄積するタウ、 α シヌクレイン(α S)、TDP-43の再検討を行った。2012-2, -3例は、皮質、脳髄にリン酸化 S、タウの蓄積が確認された。また、大家系の4症例においては、いずれもAD型のタウ、神経細胞型の S、type A-TDP-43の蓄積が検出された。三重県南部の家族例は、タウ、 α S、TDP-43の3病変の出現を特徴とすると考えられる。

研究分担者氏名：長谷川成人

所属機関名：東京都医学総合研究所

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受け、実験指針に従って行った。

A.研究目的

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群(PDC)の患者脳、脊髄に蓄積する異常病変を免疫組織、生化学的に解析し、その特徴を明瞭にすると共に、発症や進行のメカニズムを解明し、治療に役立てることを目的とする。

B.研究方法

2012年に剖検となった2例(2012-2, -3)の脳皮質及び脳髄、凍結組織が保管されている大家系の家族例4例(1998-1、2001-1、2012-2、2013-3)の前頭葉あるいは海馬(傍回)から、Sarkosyl不溶性画分を調製し、蓄積するタウ、 α S、TDP-43を各種抗体により検出、解析した。用いた抗体は、抗タウ抗体 (HT7、AT8、RD3、RD4、anti-4R、pS396、T46)、抗リン酸化 α S抗体 (mAb PS129)、抗TDP-43抗体 (poly pS409/410)である。

2012年の2例については、凍結脳の一部をホルマリン固定後、ピラトーム切片を作製し、免疫組織染色を行うことで、細胞病理の観察も行った。

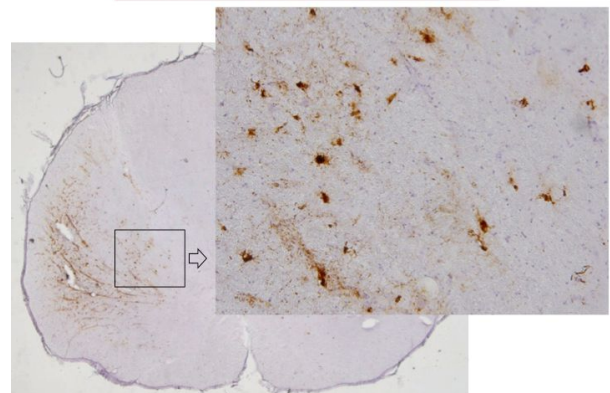
(倫理面への配慮)

C.研究結果

1. 2012-2 (PDC)の組織、生化学解析

60歳でパーキンソニズムを発症、72歳で亡くなられた女性(2012-2: 大家系の1員)について、側頭葉、脳髄の免疫組織染色を行ったところ、一部の血管周囲のグリア細胞がAT8強陽性を示し、加えて白質にastrocytic plaque様の病変が観察された。また灰白質には神経細胞内のタウ病変も観察された。

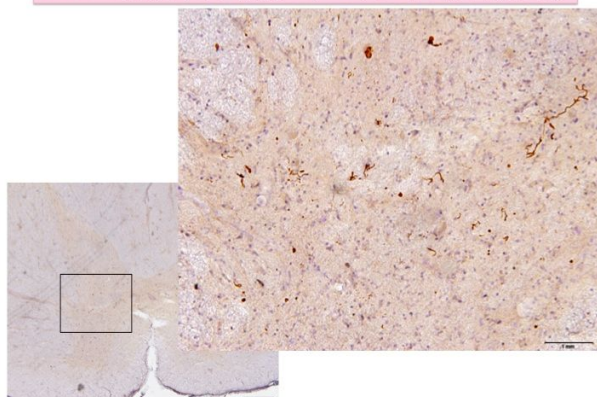
2012-2脳髄のAT8陽性構造物



また、多数のリン酸化 α S陽性の皮質型レビー小体やレビー突起と思われる病変が脳皮

質及び胸髄の灰白質に認められた。

2012-2胸髄のリン酸化 α シヌクレイン陽性構造物



2. 2012-3 (PDC)の組織、生化学解析

60歳でパーキンソンニズムを発症、75歳で亡くなられた男性(2012-3)は、側頭葉白質に astrocytic plaque 様タウ陽性構造物が多数認められ、神経細胞にも多数の NFT が観察された。胸髄のタウ病変はごく少数の神経細胞に認められるのみであった。リン酸化 α S 病変は側頭葉だけでなく、胸髄の神経細胞においても強く認められた。TDP-43 の異常所見は側頭葉、胸髄のいずれにおいても検出できなかった。

2012-2, -3 例の大脳皮質、胸髄におけるタウ、 α S の生化学解析では、大脳皮質において、AD 型のリン酸化タウバンドパターンとリン酸化 α S の蓄積が確認された。胸髄のタウについては検出が困難であった。

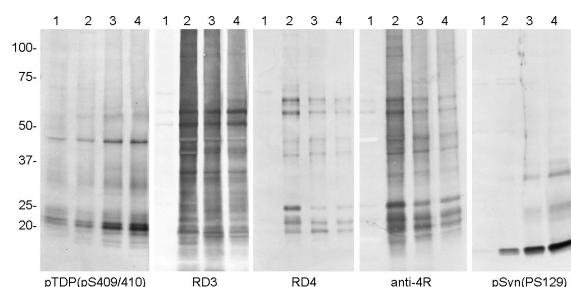
3. 大家系の剖検例(1998-1, 2001-1, 2012-2, 2013-3)のタウ、TDP-43、 α S の解析

1998-1 は解析部位が前頭葉のためか、他の3例に比べてタウ蓄積量が少なかった。しかしながら、いずれの症例においても、AD 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。

AD 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、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 AD のそれらと区別がつかなかった。

また、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、およびスメ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、 α S 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 α S 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。



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

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

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 α S、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 AD のそれと、TDP-43 は type A-FTLD のそれと、 α S 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。

神経変性疾患の病理は多様であるが、多くの場合、細胞内異常蛋白病変は一種類の蛋白質の病変が主であり、疾患ごとに特徴的な異常構造をとる。そしてどの脳部位を調べても基本的には同じ特徴を示す場合がほとんどである。しかしながら、三重県南部に多発する家族性 PDC の場合、タウ、

α S、TDP-43 の 3 種類の異常病変が混在して出現するのが特徴のように見える。また、タウに関しては、生化学的には、AD 型のタウバンドパターンを示すことが多いが、免疫組織学的には、AD-type の病理に加えて 4R タウオパチーの病理が混在しているように見え、AD とは少し異なるように感じられる。生化学では、AD 病変が強いと 4R タウ病変が埋もれて検出できない可能性が考えられる。

複数の種類の異常蛋白質病変が同時に起こっている状況を見ると、患者脳において、タウ、S、TDP-43 など、もともと線維化しやすい蛋白質が異常を起こしやすい、あるいは異常化したものが分解、除去されにくいような、何らかの遺伝的背景、あるいは環境的背景が存在するのかもしれない。

E. 結論

大家系の家族例 4 例全てにおいて、タウ、TDP-43、 α S の異常蓄積が確認された。タウの蓄積病変はどの症例も、AD のそれと区別できない生化学的特徴を有し、3R タウ、4R タウの蓄積が認められた。ただ組織学的には通常の AD とは少し異なる病変と思われた。TDP-43 は生化学的に type A 型バンドパターン、 α S は PD/DLB と同じ神経細胞型バンドパターンと思われた。今回解析した部位においては、TDP-43 と α S 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. 研究発表

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.

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.

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]

Hasegawa M, et al: Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester [2012/09/05].

Nonaka T, et al: Intracellular seeding model reproduces characteristic feature of affected neurons in TDP-43 proteinopathy. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester [2012/09/05].

Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Nonaka T, Hasegawa M: Inoculation of recombinant alpha-synuclein fibrils can induce alpha-synuclein pathology in wild-type mice. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester [2012/09/05].

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>

2012年9月、英国科学雑誌「Brain (ブレイン)」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/2012/0908.html>