

201419085A

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

(H26-神経・筋-一般-002)

平成26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27(2015)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」研究班 ----- 1
研究代表者 長谷川 成人

II. 分担研究報告

1. 異常 α シヌクレインの神経回路伝播 ----- 15
長谷川 成人
2. α シヌクレイン凝集体のプリオン様性質 ----- 21
野中 隆
3. レーザーマイクロダイセクションと
液体クロマトグラフィー質量分析機を用いた微量解析 ----- 25
亀谷 富由樹
4. 側坐核におけるタウ蓄積と神経回路 ----- 28
秋山 治彦
5. プログラニュリンの減少はタウのリン酸化を亢進させる ----- 32
細川 雅人
6. TDP-43 欠損変異体発現が与える Poly(A)+RNA 局在への影響 ----- 36
新井 哲明
7. 臨床的に ALS-D と診断され、特異な病理組織学的所見を呈した
Globular glial tauopathy の 1 例 ----- 40
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 ----- 44
藤田 行雄
9. Midbrain 4 repeat tauopathy の検討 ----- 47
村山 繁雄
10. PSP と CBD におけるアストロサイトのタウ陽性封入体の相違 ----- 52
吉田 眞理
11. APP による線維化タウの細胞内への取り込みと蓄積の促進 ----- 54
久永 眞市
12. 線維化 α シヌクレインの線条体への接種による
孤発性パーキンソン病霊長類モデルの作製 ----- 58
横田 隆徳
13. ALS ではいつ細胞障害が始まるのか？ TDP-43 陽性封入体との関係 ----- 60
小野寺 理

- III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 65

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））

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

代表者：長谷川成人

(公財) 東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能分野 分野長

研究要旨

本研究班は神経疾患に認められる疾患特徴的な細胞内異常タンパク質病変を中心に、剖検脳の解析、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。本年度はパーキンソン病、レビー小体型認知症患者に蓄積する異常 α シヌクレインが神経回路を介して伝播することをマウスモデルで実証した(長谷川)。また ALS や FTLD の原因分子である TDP-43 の毒性機序を明らかにした(野中、新井、藤田、小野寺)。またプログラニューリンがタウのリン酸化を亢進させることを示した(細川)。さらに異常タンパク質のリセプターとして APP が関与している可能性を示唆した(久永)。また解析手法としてレーザーマイクロダイセクションと質量分析を用いた微量解析法を開発した(亀谷)。タウについては、神経原線維型認知症の側坐核に高度なタウ蓄積があり、それが神経回路を介して広がる可能性(秋山)、臨床的に ALS-D と診断され、特異な病理組織学的所見を呈した Globular glial tauopathy の詳細な病理報告(高橋)、PSP と CBD におけるアストロサイトのタウ陽性封入体の相違に関する報告(吉田)、高齢者コホートトリソース 342 例の形態病理・分子病理学的検討(村山)について報告した。また、カニクイザルを用いた検討で、 α シヌクレイン線維を脳に接種する実験の試みについて報告がなされた(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
藤田 行雄	群馬大学大学院 医学系研究科 神経内科 講師
村山 繁雄	東京都健康長寿医療センター 神経内科 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 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

特定の神経細胞群が変性する神経変性疾患は、疾患ごとに特徴的な異常タンパク質の病変が認められ、その病変分布と臨床症状に相関が認められる。また病変の広がりや病状の進行にも密接な関係が示されており、細胞内異常タンパク質のプリオン様伝播がそのメカニズムとして注目されている。本研究班は、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)における TDP-43 などの細胞内異常タンパク質について、どのように正常分子を異常型に変換、増殖するのか、またどのように細胞から細胞へ伝播して、異常病変が脳内に広がるのかなどについて、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), 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、あるいはパラフィン切片からレーザーマイクロダイセクションにて組織を切り出して、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て培養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 を発現した細胞に、患者脳より調製した不溶性画分 (細胞内凝集体が含まれる画分)、あるいは合成した線維化タンパク質をトランスフェクション試薬と共に、あるいは試薬無しで導入し、数日間培養したのち細胞を回収し、それぞれの異常を認識する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で一週間振とうすることにより線維化した。線維化した α Syn、可溶性 α Syn を野生型マウス(C57BL)脳の黒質に接種し、一定期間の後取り出し、一部を固定、免疫組織染色、一部を凍結し、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、mSyn, hSyn を精製し、線条体 (被殻) に接種し、行動解析を行った。接種から3ヶ月後(mSyn 接種 1頭, hSyn 接種 1頭), 5ヶ月後(mSyn 接種 1頭), 12ヶ月後(hSyn 接種 1頭)に解剖し、 α -Syn を含む異常な凝集の有無を確認した。

4. TDP-43 の発現に関する実験

孤発性 ALS 患者の脊髄前角運動神経細胞を、TDP-43 の封入体の有無、核内 TDP-43 の有無により分け、TDP-43 が関連する核内の GEM 小体の数、TDP-43 mRNA の細胞内局在の変化を免疫蛍光染色法にて比較検討した。

(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 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の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. α シヌクレイン

昨年度、線維化 α シヌクレイン(α Syn)を野生型マウスの脳に接種すると内在性マウス α Syn

が異常型に変化し、リン酸化されて蓄積することを示したが、それがどこからどのように広がるのか十分に明らかではなかった。そこで病変が出現する初期像を観察するため、線維化 α Syn の接種後 1 ヶ月に脳を摘出し、固定後、PSer129 抗体により免疫染色を行った。その結果、中脳に接種したマウスの脳では、接種した中脳の周辺や扁桃体に限局して病変が認められたのに対し、線条体に接種したマウスでは、脳全体に激しく広がった病変が観察され、線条体、黒質、扁桃体、そして大脳皮質に広範な異常リン酸化 α Syn の病理が検出された。また、嗅内野に接種したマウスでは、中脳、線条体に接種したマウスとは異なり、主に嗅内野に濃縮された病変が観察され、一部は海馬の歯状回や CA3 などにも病変が伝播していることが認められた。以上のように接種する部位を変えただけで、病変の広がりが大きく変わること、また病変は神経回路に沿って広がることが強く示唆された。

また、異常プリオンのように、正常分子を自身と同じ異常型に変換するかどうかについて、*in vitro* の系で検討した結果、種々の α Syn 凝集体がシードおよび鋳型として機能して、正常 α Syn を凝集させること、培養細胞内においても、導入した凝集体を鋳型として細胞内の可溶性 α Syn が蓄積し、鋳型と同じ構造の凝集体が形成されることも明らかとなった。

2. TDP-43

TDP-43 の毒性については、以前から様々な議論があるが、培養細胞系に TDP-43 の全長、および様々な欠損変異体を発現し、その毒性が生じる機序を詳細に調べた結果、全長 TDP-43 は過剰発現によりアポトーシスを誘導すること、C 末端断片は凝集体を形成し、ELP3 を含め、様々な転写因子を巻き込むことにより弱い毒性を示すことが明らかとなった。また、TDP-43 の C 末端側断片の強発現では、細胞質

において Poly(A)⁺ RNA の凝集体形成が生じ、それにより転写・翻訳の異常が生じる可能性が示唆された。

加えて、ALS 患者の残存脊髄前角細胞にて、GEM 小体の数が減少すること、TDP-43 mRNA の細胞内局在が変化することを示してきたが、これらの変化は TDP-43 陽性封入体の有無にかかわらないこと、TDP-43 mRNA の細胞内局在は TDP-43 細胞質内封入体を認める物で有意に異常であることを明らかにした。

3. タウ

グラニューリン(*granulin: GRN*)遺伝子変異は、タウ陰性・TDP-43 陽性封入体蓄積を伴う家族性前頭側頭葉変性症において同定されたがその後、アルツハイマー病(AD)や皮質基底核変性症(CBD)を含む様々なタウオパチーに関与していることが報告されている。*PGRN* ノックアウトマウスと P301L タウマウスを掛け合わせて、タウの蓄積を検討した結果、*GRN* の減少によりタウ蓄積が増悪することが示された。

また、神経病理学解析から、臨床的には典型的な ALS-D の像を呈し、病理像も上位・下位運動ニューロン変性が明らかであり、臨床的には ALS と診断された症例が AT8 陽性の *globular astrocyte* タウオパチーであったことが高橋より報告された。*globular astrocyte* に関しては、近年、4 repeat tauopathy に属する一群として概念が提唱されている。これは、特徴的な形態 (*globular*) の封入体をオリゴデンドロサイトやアストロサイト胞体内に有するものである。

吉田らは、PSP と CBD の神経細胞とグリア細胞のタウ封入体の背景にあるタウ凝集の相違を明らかにすることで、2 疾患の本質的なタウ凝集の違いを明確にすることを検討し、PSP の *Tuft-shaped astrocyte* はアストロサイトの近位部に、CBD の *astrocytic plaque* は遠位部にタウ凝集をおこし、両者の病態の相違を反映して

いることを示した。

また、村山らは324例の連続開頭剖検例(平均82.5歳)中脳をタウアイソフォーム特異抗体免疫染色により、4Rタウオパチー35例を抽出、他の変性疾患を伴わない8例を、純粋型として分類した。タウC末抗体を用いた免疫プロットにより、PSPパターン2例、CBDパターン1例を同定した。

また秋山らは、神経原線維変化型認知症(TPD)の側坐核ではADを上回る頻度でタウ陽性神経細胞が認められ、多くは高度な神経原線維変化形成を伴わないびまん性蓄積の形であることが示した。

久永らは、タウとAPPの過剰発現型細胞の培地中にタウ線維を添加し、イムノプロットや免疫染色により解析した結果、APPがタウ線維の細胞内への取り込み、その後の細胞内正常タウの線維化、蓄積を引き起こすことが示された。

4. 手法開発

ホルマリン固定パラフィン包埋組織からの構成タンパク質の同定を試みた。コンゴレッド陽性のアミロイド沈着糸球体を6 μ mスライス切片から、ライカAS LMDシステムで切り取り、その後、10mM Tris/1 mM EDTA/0.002% Zwittergent 溶液中で96°C、90分間インキュベートし、20分間の超音波処理、酵素を加えて酵素分解の後、VelosPro LC-MSMSで解析した。その結果、免疫組織化学分析でアミロイドタンパク質を同定できなかった糸球体4個から、変異fibrinogen、ApoE、vitronectin、vimentin、complement C3、C4、SAPを同定した。また、糸球体6個からIg kappa light chain vitronectin、amyloid p component、ApoE、ApoAIV、collagenを同定した。沈着していたアミロイドタンパク質はそれぞれ、変異fibrinogen、Ig kappa light chainと判明した。

5. サルモデル

野生型マウスへの線維化 α Syn接種により、マウス内在性正常 α シヌクレインが異常型に変換されることから、サルでも同様のことがおこるかどうか検討した。mSyn 450 μ gを接種したカニクイザル2頭は、接種3ヶ月後、5ヶ月後までの行動観察で運動障害を認めず、また解剖脳においても接種した線条体及び周囲の神経細胞にも抗リン酸化 α -Syn抗体、抗ヒト α -Syn抗体で陽性の異常構造物は確認できなかった。さらにカニクイザルに近い種であるヒト α Syn 1250 μ gを接種した2頭でも接種12ヶ月後まで行動観察を継続したが、やはり運動障害は認めず、解剖脳病理でも同様に異常構造物を認めなかった。一方で、同時期に10 μ gのmSyn及びhSynを接種したマウスでは、接種した線条体の他、扁桃核、中脳黒質、大脳皮質等に抗リン酸化 α -Syn抗体陽性の異常構造物が広範囲に確認された。

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。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。

今年度は、線維化 α Synの接種部位を変えると接種部位の神経連絡に沿った病変の広がりを示すことを明らかにした。また伝播様式は神経回路を介して、逆向性に広がる可能性が強く示唆された。病変は神経細胞にしかみとめられず、オリゴデンドログリアやアストログリアなどはまったくリン酸化 α Syn病変は確認できなかった。この結果は、接種部位を変えても神経細胞にしか線維化 α Synが取り込まれることがなく、結果的に神経回路内での広がりが起こっていることを強く示唆する。

以上の結果は、最初に形成された神経細胞の異常をきっかけにして、全く異なる選択性をもって病変が広がり、それが広がった部位の神経細胞の変性により、異なった症状となって現れる可能性を強く示唆するものである。これらの系を用いて、 α シヌクレインのプリオン様活性を抑制する化合物などの探索、評価を行い、新規治療薬開発が進むことが期待される。

TDP-43 については、RNA 結合蛋白であることから、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、過剰発現すると細胞周期に影響を与えてアポトーシスを誘導することを明らかにした。また C 末端は凝集体を形成するが、その毒性はアポトーシスを誘導するほどは強くない、転写因子などを巻き込むことによる弱いものであることが示唆された。

培養細胞における TDP-43 断片の発現は、Poly(A)⁺ RNA の細胞内局在を変化させることも示された。NLS を含む TDP-43 の N 末端側断片の核内発現により、核内の Poly(A)⁺ RNA が失われ、細胞質だけに局在するようになる機序は不明であるが、この断片が核内の Poly(A)⁺ RNA を核外に排出する、あるいは核内での Poly(A)⁺ RNA の分解の促進や不安定化に関与するなどの可能性が考えられる。

また、ALS 患者の脊髄前角細胞内の TDP-43 陽性封入体は RNA 代謝に関連する蛋白質である ELP3 に対する抗体で染色され、また、蛍光 2 重染色では TDP-43 と ELP3 は封入体内で共存していることを確認された。用いた 10 種類の ELP3 抗体のうち C 末を認識する抗体でのみ封入体は染色され、これら封入体に含有されるのは ELP3 の断片化など何か修飾を受けたものである可能性が考えられた。

タウについては、アルツハイマー病をはじめ、多くの認知症疾患で多様な蓄積病変が認められることから、疾患進行に関わる重要な因子と考えられる。細川らはタウ陰性・TDP-43 陽性

封入体蓄積を伴う家族性前頭側頭葉変性症において同定されたグラニューリン(*granulin: GRN*) 遺伝子変異による成長因子グラニューリンの減少が、アルツハイマー病(AD)や皮質基底核変性症(CBD)を含む様々なタウオパチーにも関与する可能性を示唆した点は重要である。

また、高橋らは、臨床的に ALS-D と診断され、特異な病理組織学的所見を呈した *Globular glial tauopathy* の 1 例を報告したが、これは特徴的な形態 (*globular*) の封入体をオリゴデンドロサイトやアストロサイト胞体内に有するものである。その臨床像は FTD/MND を基本として錐体外路症状を伴う。コンセンサスでは、臨床像と主要な変性部位から Type I~Type III の亜型に分類されているが、今後注目して行く必要がある病型と考えられる。

また秋山らが報告した TPD における側坐核のタウ蓄積についても、海馬・辺縁系からの投射は主として CA1~支脚から発し、嗅内皮質から側坐核への直接の投射はほとんど認められないことなどから、神経線維連絡にもとづくタウ異常凝集の海馬から側坐核への伝播が生じていることが推測され興味深い。

また、村山らの、高齢者コホート 324 例のスクリーニングで、*preclinical CBD* 1 例、*preclinical PSP* 2 例が抽出されたという報告は、CBD/ PSP においては、頻度が少ないことを示唆する。AD やレビー小体病の発症前からさまざまなステージの症例が多数存在するものと異なり、疾患の進行スピードが早いことが、発症前段階が少ない背景が示唆される。

解析手法の開発では、ホルマリン固定、パラフィン切片からレーザーマイクロダイセクションにより切り出した組織を界面活性剤存在下で消化、抽出し、質量分析により構成タンパク質を徳的できる可能性が強く示唆された点は非常に大きい。今後、様々な症例の様々な構造物に対して、その有用性を検討していきたい。

サルモデルは、Vilaらが、びまん性レビー小体病患者脳の不溶性分画をカニクイザルの線条体に接種し、接種9ヶ月後の¹¹C-DTBZ PETで黒質ドーパミン細胞の減少と黒質での抗ヒト α -Syn抗体陽性の構造物を含む神経細胞が認められることを報告しているが、接種した局所での抗リン酸化 α -Syn抗体及び内在性の抗ヒト α -Syn抗体陽性の凝集体は認められていない。この原因が何によるのか今後の解析が必要である。

E. 結論

α Synの病変は神経回路を介して伝播することが示された。また多くの場合、正常分子は異常型分子と同じ異常構造に変換される場合が多いことも示された。TDP-43に関して、その毒性は過剰発現によるものと、凝集体を介した二つの機序があることが示された。過剰発現によるものでは、細胞周期に異常をおこし、凝集体によるものは転写因子などの機能障害が原因と考えられた。タウに関しては、様々な認知症疾患の神経変性に関わり、その病型も多様である。その蓄積を悪化させる因子として、APPやプログレニンが示された。異常タンパク分子の解析手法として、レーザーマイクロダイセクションと質量分析のくみあわせは有用と考えられる。

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, Kubo M, Shimozawa A, Akiyama H, Hasegawa M. (2014) Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol Commun.* 2:88.

2. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M,

Nonaka T, Kondo H, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H, (2015)

Progranulin Reduction Is Associated With Increased Tau Phosphorylation in P301L Tau Transgenic Mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 74: 158-165.

3. Yamashita M, Nonaka T, Hirai S, Miwa A, Okado H, Arai T, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M. (2014) Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Hum Mol Genet* 23, 23: 4345-56.

4. Yamashita S, Sakashita N, Yamashita T, Tawara N, Tasaki M, Kawakami K, Komohara Y, Fujiwara Y, Kamikawa M, Nakagawa T, Hirano T, Maeda Y, Hasegawa M, Takeya M, Ando Y. Concomitant accumulation of α -synuclein and TDP-43 in a patient with corticobasal degeneration. *J Neurol.* 2014 261:2209-17.

5. Kawakami I, Hasegawa M, Arai T, Ikeda K, Oshima K, Niizato K, Aoki N, Omi K, Higashi S, Hosokawa M, Hirayasu Y, Akiyama H. (2014) Tau accumulation in the nucleus accumbens in tangle-predominant dementia. *Acta Neuropathol Commun.* 2:40.

6. Baborie A, Griffiths TD, Jaros E, Perry R, McKeith IG, Burn DJ, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Rollinson S, Pickering-Brown S, Robinson AC, Davidson YS, Mann DM. Accumulation of dipeptide repeat proteins predates that of TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration associated with hexanucleotide repeat expansions in C9ORF72 gene. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014 in press.

7. Davidson YS, Barker H, Robinson AC, Thompson JC, Harris J, Troakes C, Smith B, Al-Saraj S, Shaw C, Rollinson S, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M,

- Pickering-Brown S, Snowden JS, Mann DM. (2014) Brain distribution of dipeptide repeat proteins in frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Commun* 2:70.
8. Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita K, Takahashi H. (2014) C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40, 783–788.
 9. Asada A, Yamazaki R, Kino Y, Saito T, Kimura T, Miyake M, Hasegawa M, Nukina N, Hisanaga S. (2014) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2. *Neurosci Lett*. 563:112-7.
 10. Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H. (2014) Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *Int J Neurosci*. 124:344-9.
 11. Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DM, Saito Y, Murayama S. (2014) 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 127: 303-305.
 12. Kametani F, Haga S, Accumulation of carboxy-terminal fragments of APP increases phosphodiesterase 8b. *Neurobiology of Aging* [Available online 7 October 2014]
 13. Nakamura A, Okigaki M, Miura N, Suzuki C, Ohno N, Kametani F, Hamaoka K, Involvement of mannose-binding lectin in the pathogenesis of Kawasaki disease-like murine vasculitis. *Clinical Immunology* 153, 64-72, 2014.
 14. Kametani F, S100A9/Mrp14 Plays an Important Role in A β Amyloidosis Enhancement. *Journal of Neurology & Stroke* 1, 00006, 2014
 15. Beach TG, Carew J, Serrano G, Adler CH, Shill HA, Sue LI, Sabbagh MN, Akiyama H, Cuenca N; the Arizona Parkinson's Disease Consortium. (2014) Phosphorylated α -synuclein-immunoreactive retinal neuronal elements in Parkinson's disease subjects. *Neurosci Lett* 571:34-38.
 16. Adler CH, Dugger BN, Hinni ML, Lott DG, Driver-Dunckley E, Hidalgo J, Henry-Watson J, Serrano G, Sue LI, Nagel T, Duffy A, Shill HA, Akiyama H, Walker DG, Beach TG. (2014) Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology*. 82(10):858-684
 17. Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Kodama T, Arai T, Kuwano R, Ikeuchi T, Takeda M: Relative ratio and level of amyloid- β 42 surrogate in cerebrospinal fluid of familial Alzheimer's disease patients with presenilin 1 mutations. *Neurodegener Dis* 13: 166-170, 2014
 18. Arai T: Significance and limitation of the pathological classification of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology* 34: 578-588, 2014
 19. Toyoshima Y, Takahashi H. TDP-43 pathology in polyglutamine diseases: with reference to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 2014; 34: 77-82, 2014
 20. Kimura T, Jiang H, Konno T, Seto M, Iwanaga K, Tsujihata M, Satoh A, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology* 34:

- 392-397, 2014
21. Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masakado-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. *C9ORF72* repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40: 783-788, 2014
 22. Shioya, A., Saito Y, Arima K, Kakuta Y, Yuzuriha T, Murayama, S., Tamaoka A: Neurodegeneration in bipolar disorders. *Neuropathology* in press
 23. Kizuka, Y., Kitazume S, Fujinawa R, Saito T, Iwata N, Saido TC, Nakano M, Yamaguchi Y, Hashimoto Y, Staufenbiel M, Hatsuta H, Murayama, S., Many H, Endo T, Taniguchi N: An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* (in press)
 24. Araki, K., Y. Nakano, A., Kobayashi, T., Matsudaira, A., Sugiura, M., Takao M, Kitamoto, T., Murayama, S., Obi T: Extensive cortical spongiform changes with cerebellar small amyloid plaques: The clinicopathological case of MV2K+C subtype in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology* (in press).
 25. Kuninaka, N., M. Kawaguchi, M. Ogawa, A. Sato, K. Arima, Murayama, S. and Y. Saito (2014). "Simplification of the modified Gallyas method." *Neuropathology* (in press).
 26. Tagawa, K., H. Homma, A. Saito, K. Fujita, X. Chen, S. Imoto, T. Oka, H. Ito, K. Motoki, C. Yoshida, H. Hatsuta, Murayama, S., T. Iwatsubo, S. Miyano and H. Okazawa (2014). "Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain." *Hum Mol Genet* (in press)
 27. Hasegawa, H., Liu, L., Tooyama, I., Murayama, S., Nishimura, M. The FAM3 superfamily member ILEI ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid-beta precursor. *Nat Commun* 2014; 5: 3917.
 28. Ishibashi, K., Ishiwata, K., Toyohara, J., Murayama, S. and Ishii, K. "Regional analysis of striatal and cortical amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease." *Eur J Neurosci* 2014; 40(4): 2701-2706.
 29. Ito, S., Takao, M., Hatsuta, H., Kanemaru, K., T. Arai, Y. Saito, M. Fukayama and S. Murayama (2014). "Alpha-synuclein immunohistochemistry of gastrointestinal and biliary surgical specimens for diagnosis of Lewy body disease." *Int J Clin Exp Pathol* 7(4): 1714-1723.
 30. Iwata, A., K. Nagata, H. Hatsuta, H. Takuma, M. Bundo, K. Iwamoto, A. Tamaoka, Murayama, S., T. Saido and S. Tsuji (2014). "Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation." *Hum Mol Genet* 23(3): 648-656.
 31. Matsumoto, H., R. Sengoku, Y. Saito, Y. Kakuta, Murayama, S. and I. Imafuku (2014). "Sudden death in Parkinson's disease: a retrospective autopsy study." *J Neurol Sci* 343(1-2): 149-152.
 32. Miyashita, A., Y. Wen, N. Kitamura, E. Matsubara, T. Kawarabayashi, M. Shoji, N. Tomita, K. Furukawa, H. Arai, T. Asada, Y. Harigaya, M. Ikeda, M. Amari, H. Hanyu, S. Higuchi, M. Nishizawa, M. Suga, Y. Kawase, H. Akatsu, M. Imagawa, T. Hamaguchi, M. Yamada, T. Morihara, M. Takeda, T. Takao, K. Nakata, K. Sasaki, K. Watanabe, K. Nakashima,

- K. Urakami, T. Ooya, M. Takahashi, T. Yuzuriha, K. Serikawa, S. Yoshimoto, R. Nakagawa, Y. Saito, H. Hatsuta, Murayama, S., A. Kakita, H. Takahashi, H. Yamaguchi, K. Akazawa, I. Kanazawa, Y. Ihara, T. Ikeuchi and R. Kuwano (2014). "Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population." *J Alzheimers Dis* 41(4): 1031-1038.
33. Nagao, S., O. Yokota, C. Ikeda, N. Takeda, H. Ishizu, S. Kuroda, K. Sudo, S. Terada, Murayama, S. and Y. Uchitomi (2014). "Argyrophilic grain disease as a neurodegenerative substrate in late-onset schizophrenia and delusional disorders." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 264(4): 317-331.
34. Oikawa, N., H. Hatsuta, Murayama, S., A. Suzuki and K. Yanagisawa (2014). "Influence of APOE genotype and the presence of Alzheimer's pathology on synaptic membrane lipids of human brains." *J Neurosci Res* 92(5): 641-650.
35. Qina, T., N. Sanjo, M. Hizume, M. Higuma, M. Tomita, R. Atarashi, K. Satoh, I. Nozaki, T. Hamaguchi, Y. Nakamura, A. Kobayashi, T. Kitamoto, Murayama, S., H. Murai, M. Yamada and H. Mizusawa (2014). "Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene." *BMJ Open* 4(5): e004968.
36. Saito, Y., T. Miyasaka, H. Hatsuta, K. Takahashi-Niki, K. Hayashi, Y. Mita, O. Kusano-Arai, H. Iwanari, H. Ariga, T. Hamakubo, Y. Yoshida, E. Niki, Murayama, S., Y. Ihara and N. Noguchi (2014). "Immunostaining of oxidized DJ-1 in human and mouse brains." *J Neuropathol Exp Neurol* 73(7): 714-728.
37. Sakurai, K., A. M. Tokumar, T. Nakatsuka, Murayama, S., S. Hasebe, E. Imabayashi, K. Kanemaru, M. Takao, H. Hatsuta, K. Ishii, Y. Saito, Y. Shibamoto, N. Matsukawa, E. Chikui and H. Terada (2014). "Imaging spectrum of sporadic cerebral amyloid angiopathy: multifaceted features of a single pathological condition." *Insights Imaging* 5(3): 375-385.
38. Xie, C., T. Miyasaka, S. Yoshimura, H. Hatsuta, S. Yoshina, E. Kage-Nakadai, S. Mitani, Murayama, S. and Y. Ihara (2014). "The homologous carboxyl-terminal domains of microtubule-associated protein 2 and TAU induce neuronal dysfunction and have differential fates in the evolution of neurofibrillary tangles." *PLoS One* 9(2): e89796.
39. Yamada, M., M. Tanaka, M. Takagi, S. Kobayashi, Y. Taguchi, S. Takashima, K. Tanaka, T. Touge, H. Hatsuta, Murayama, S., Y. Hayashi, M. Kaneko, H. Ishiura, J. Mitsui, N. Atsuta, G. Sobue, N. Shimozawa, T. Inuzuka, S. Tsuji and I. Hozumi (2014). "Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan." 2014; *Neurology* 82(8): 705-712.
40. 伊藤 岳, 西澤 正豊, 小野寺 理 【神経細胞変性のメカニズム】 炎症と神経変性 : *Brain Medical* 26 卷 3 号 Page259-263(2014.10)
41. 酒井 直子, 石原 智彦, 小野寺 理, 西澤 正豊 【神経症候群(第2版)-その他の神経疾患を含めて-】 変性疾患 運動ニューロン疾患 筋萎縮性側索硬化症 遺伝性 ALS ALS10(TARDBP 遺伝子変異による ALS) : 日本臨床(0047-1852)別冊神経症候群 II Page491-495(2014.03)
42. Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S,

- Camu W, Neitzel B, Onodera O, van Rheenen W, Pinto S, Weber M, Smith B, Proven M, Talbot K, Keagle P, Chesi A, Ratti A, van der Zee J, Alstermark H, Birve A, Calini D, Nordin A, Tradowsky DC, Just W, Daoud H, Angerbauer S, DeJesus-Hernandez M, Konno T, Lloyd-Jani A, de Carvalho M, Mouzat K, Landers JE, Veldink JH, Silani V, Gitler AD, Shaw CE, Rouleau GA, van den Berg LH, Van Broeckhoven C, Rademakers R, Andersen PM, Kubisch C. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. *J Med Genet.* 2014 Jun;51(6):419-24.
43. Kimura T, Jiang H, Konno T, Seto M, Iwanaga K, Tsujihata M, Satoh A, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology.* 2014 Aug;34(4):392-7.
- 44.
2. 学会発表
1. 長谷川成人: α シヌクレイン. 第8回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 2014. 京都 [2014, 10. 4.]
2. Hasegawa M: Prion-like features in alpha-synucleinopathies. XVIIIth International Congress of Neuropathology 2014. W3: Prion-like mechanisms in neurodegenerative disorders. Rio de Janeiro, Brazil [2014,9. 15.]
3. Hasegawa M: Pathological alpha-synuclein spreading explain the disease progression. Neuroscience 2014. Joint Symposium of the Japan Neuroscience Society and the Korean Society of Brain and Neuroscience: Molecular Mechanisms underlying Parkinson Disease. Yokohama, Japan [2014,9. 12.]
4. 長谷川成人: 神経変性疾患における細胞内異常タンパク質の伝播. 第2回 アミロイドーシス研究会 学術集会, 東京 [2014, 8. 22.]
5. 長谷川成人: シヌクレイノパチーの細胞間伝播メカニズム, 動物モデルでの検討. 7th J-CAN 2014 シヌクレイノパチーの病態・治療研究最前線. 東京 [2014, 8. 23.]
6. 長谷川成人: 神経疾患に認められる異常蛋白質のプリオン様性質. 静岡県中部認知症治療懇話会, 静岡 [2014, 7. 8.]
7. Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological proteins in neurodegenerative diseases. 2014 Yonese BK21 PLUS - Igakuken Joint Symposium, Seoul, Korea [2014, 6. 19.]
8. 長谷川成人: 「異常蛋白質はシナプスを越えるのか」. 第55回日本神経病理学会総会学術研究会 シンポジウム 2, 東京 [2014, 6. 7.]
9. Hasegawa M: Prion-like mechanism in propagation of Lewy body disease. 55th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Symposium: Propagation and Transmission of Misfolded Proteins and Pathologies in Prion Disease and Other Protein-Misfolding Disorders, Hakata [2014. 5. 24]
10. 長谷川成人: 「 α シヌクレインの伝播について」第8回進行期パーキンソン病研究会, 名古屋 [2014, 5. 30.]
11. 長谷川成人: 「神経変性疾患の病態進行とプリオン仮説」川棚神経科学の会, 特別講演 3, 長崎 [2014, 12. 6.]
12. 長谷川成人, 「タウは認知症治療標的として魅力的か?」, 第33回日本認知症学会学術集会 シンポジウム, 横浜 [2014, 11. 30.]
13. Hasegawa M: Prion-like properties of pathological proteins from diseased brains. Brain Conference 2014, Symposium 4 「Pathological

propagation in neurodegenerative diseases] Seoul, Korea [2014, 11. 6.]

14. Takahashi N, Nonaka T, Kametani F, Hisanaga S, Hasegawa M, Treatment of cells expressing amyloid precursor protein with tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau.

Alzheimer's Association International Conference, Copenhagen, Denmark, 2014.7.14

15. 亀谷富由樹, 羽賀誠一, アルツハイマー前駆体タンパク質C末断片の細胞内蓄積によるホスホジエステラーゼの増加, 第57回日本神経化学学会大会. 奈良, 2014.9.30

16. 亀谷富由樹, 吉長恒明, 鈴木彩子, 矢崎正英, 池田修一, 各種アミロイドタンパク質に付随するタンパク質の解析, 第2回日本アミロイドーシス研究会学術集会, 東京, 2014.8.22

17. 亀谷富由樹, 池田修一, 脳アミロイドアンギオパチー (CAA) アミロイドのプロテオミクス解析, 第33回日本認知症学会学術集会, 横浜, 2014.12.1

18. 本井ゆみ子, 松本信英, 石黒幸一, 神戸泰紀, 亀谷富由樹, 長谷川成人, 服部信孝, タウオパチーモデルマウスにおいて切断タウは微小管重合能の加齢変化をひきおこす, 第56回日本神経学会学術大会, 新潟, 2014.5.21

19. 秋山治彦. 神経細胞と脳の炎症. 第33回日本認知症学会 (会長講演) [2014.11.29, 横浜]

20. 小林 禅, 河上 緒, 新井哲明, 横田修, 大島健一, 新里和弘, 秋山治彦, 水澤英洋: 本邦における behavioral variant of frontotemporal dementia (bvFTD) 35例の臨床病理像. 第55回日本神経病理学会 [2014.6.6, 東京]

21. 齊藤祐子, 塩谷彩子, 田中洋子, 梅戸克之, 村田美穂, 村山繁雄, 西澤正豊, 柿田明美, 渡辺宏久, 吉田眞理, 藤村晴俊, 高梨雅史, 佐藤敬造, 斎藤義朗, 秋山治彦, 有馬邦正: 生前同意ブレインバンク事務本部の進捗状況. 第55回日本神経病理学会 [2014.6.6, 東京]

22. 東 晋二, 羽賀千恵, 河上緒, 長谷川成人, 大島健一, 新里和弘, 女屋光基, 秋山治彦: 外傷性脳損傷の脳における神経変性疾患関連たんぱく質の凝集体分布の検討. 第55回日本神

経病理学会 [2014.6.6, 東京]

23. 池田智香子, 横田修, 長尾茂人, 石津秀樹, 森定ゆみ, 寺田整司, 中島良彦, 秋山治彦, 内富庸介: 運動症状及び非運動症状で初発した皮質基底核変性症における臨床病理学的特徴の比較検討. 第55回日本神経病理学会 [2014.6.6]

24. 新井哲明, 安部秀三, 栗田裕文, 大川恵子, 池嶋千秋, 太刀川弘和, 池田学, 烏帽子田彰, 北村立, 松岡照之, 安野史彦, 横田修, 朝田隆: 地域型認知症疾患医療センターに入院した認知症患者に認められるBPSDの実態. 第33回日本認知症学会学術集会, 横浜, 2014年12月1日

25. 新井哲明: 認知症性神経変性疾患におけるタウの重要性. 第33回日本認知症学会学術集会, 横浜, 2014年11月30日

26. Arai T, Kawakami I, Kobayashi Z, Yokota O, Niizato K, Oshima K, Hosokawa M, Akiyama H: Does frontotemporal dementia associated with chorea suggest the diagnosis of frontotemporal lobar degeneration with fused in sarcoma positive inclusions of the basophilic inclusion body disease subtype? 9th International Conference on frontotemporal dementias. Vancouver, Canada, October 23-25, 2014

27. 根本清貴, 田村昌士, 新井哲明, 朝田隆: 80歳以上の健常後期高齢者の Tc-99m ECD 脳血流 SPECT データベースの開発. 第19回日本神経精神医学会, つくば市, 2014年10月1日

28. 東晋二, 新井哲明, 朝田隆: TDP-43 欠損変異体発現が与える Poly(A)+RNA 局在への影響. 第19回日本神経精神医学会, つくば市, 2014年10月1日

29. 根本清貴, 田村昌士, 加藤守匡, 松田博史, 新井哲明, 征矢英昭, 朝田隆: 軽度運動による高齢者の楔前部および前頭前野における脳血流. 第19回日本神経精神医学会, つくば市, 2014年10月1日

30. 関根彩, 根本清貴, 神崇慶, 新井哲明, 朝田隆: 激越うつ病と診断されていた、嗜銀性顆粒認知症と Lewy 小体型認知症の合併が疑われた一例. 第19回日本神経精神医学会, つくば市, 2014年10月1日

31. 畑中公孝, 新井哲明, 岩切雅彦, 井出政行, 田中芳郎, 朝田隆: 頻回のパニック発作および不安焦燥感が持続した非定型的認知症の1剖検例. 第19回日本神経精神医学会, つくば市, 2014年10月1日

32. Arai T, Abe S, Kurita H, Ikeda M, Eboshida A, Kitamura T, Matsuoka T, Yasuno F, Yokota O,

- Asada T: Clinical characteristics of demented patients with prolonged stay in a psychiatric hospital in Japan. Alzheimer's Association International Conference 2014, Copenhagen, Denmark, July 14, 2014
33. 新井哲明: 前頭側頭型認知症の臨床病理の新知識. ワークショップ1 精神科医が知っておくべき神経学の新知識, 第110回日本精神神経学会学術総会, 横浜, 2014年6月26日
- 高橋 均. 異常蛋白はシナプスを超えるか—
34. TDP-43 —. 日本神経病理学会, 東京, 2014年6月5日~7日
- 竹内亮子, 他田真理, 志賀 篤, 今野卓哉, 豊
35. 島靖子, 小野寺 理, 西澤正豊, 柿田明美, 高橋 均. 筋萎縮性側索硬化症の TDP-43 大脳皮質組織像の多様性: 臨床病理および生化学的検討. 日本神経病理学会, 東京, 2014年6月5日~7日
36. 竹内亮子, 豊島靖子, 三浦 健, 青木賢樹, 池内 健, 西澤正豊, 柿田明美, 高橋 均. 臨床的に ALS-D と診断され, 得意な病理組織学的所見を呈した Globular glial tauopathy の1例. 日本神経病理学会, 東京, 2014年6月5-7日
37. Izumi Y, Sumikura H, Fujita K, Kamada M, Shimatani Y, Miyamoto R, Koizumi H, Miyazaki Y, Hatsuta H, Nodera H, Nishida Y, Murayama S, Kaji R: Autopsy-proven Amyotrophic Lateral Sclerosis Coexisted with Parkinson Disease: A Novel Association of TDP-43 Proteinopathy and α -Synucleinopathy. The 66th AAN Annual Meeting. April 26-May 3, 2014, Philadelphia, PA, USA
38. Marwan Sabbagh, John Seibyl, Andrew Stephens, Henryk Barthel, Ishii K, Takao M, Akatsu H, Murayama S, Christopher Rowe, Ana Catafau, Walter Schulz-Schaeffer, Osama Sabri: A negative florbetaben PET scan reliably excludes amyloid pathology as confirmed by histopathology in a large Phase 3 trial. The 66th AAN Annual Meeting. April 26-May 3, 2014, Philadelphia, PA, USA
39. Takao M, Murayama S, Sumikura H, Nogami A, Uchino A, Nakano Y, Hatsuta H, Obata M, Hirose N: Neuropathologic Analysis of 59 Centenarian Brains. The 90th Annual Meeting of the American Association of Neuropathologists. June 12-15 2014, Portland, OR, USA
40. Satake W, Ando Y, Tomiyama H, Kashihara K, Mochizuki H, Murayama S, Takeda A, Hasegawa K, Tsuji S, Yamamoto M, Murata M, Hattori N, Toda T: Exome sequencing of Parkinson's disease in order to identify genetic variants with high disease-risk. 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. June 8-12, 2014, Stockholm Sweden
41. Sengoku R, Sumikura H, Takao M, Hatsuta H, Nogami A, Uchino A, Saito Y, Murayama S: Clinicopathological characteristics of pure type Lewy body disease with dementia (Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies). 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. June 8-12, 2014, Stockholm Sweden
- Miyamoto R, Takeuchi T, Sumikura H, Fujita K, 42. Mure H, Morigaki R, Goto S, aaaa, Izumi Y, Kaji R: An autopsy case of predominant generalized dystonia in a patient with cerebellar atrophy. 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. June 8-12, 2014, Stockholm Sweden
43. Sanjo N, Higuma M, Hizume M, Furukawa F, Nakamura Y, Kitamoto T, Hamaguchi T, Morikawa F, Aoki M, Tanaka F, Nishizawa M, Takeda M, Inuzuka T, Sato K, Murai H, Murayama S, Satoh K, Harada M, Uyama N, Fujita K, Saito N, Takumi I, Tsukamoto T, Yamada M, Mizusawa H: Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. Asian Pacific Prion Symposium 2014 in Jeju. July 6-7, 2014, Jeju Korea
44. Takatsuki H, Satoh K, Atarashi R, Sano K, Iwasaki Y, Yoshida M, Takao M, Mihara B, Murayama S, Nishida N: Wide distribution of seeding activity in sporadic CJD patients. Asian Pacific Prion Symposium 2014 in Jeju. July 6-7, 2014, Jeju Korea
45. Andrew Stephens, Henryk Barthel, Ishii K, Takao M, Akatsu H, Murayama S, Christopher Rowe, Norman Koglin, Ana Catafau, Walter Schulz-Schaeffer, Marwan Sabbagh, Osama Sabri, John Seibyl: A negative florbetaben PET scan reliably excludes amyloid pathology as confirmed by histopathology. Alzheimer's Association International Conference 2014. July 12-17, 2014, Copenhagen, Denmark.
46. Kitazume S, Kizuka Y, Fujinawa R, Saito T, Iwata N, Saido T, Nakano M, Yamaguchi Y, Hashimoto Y, Matthias Staufenbiel, Hatsuta H, Murayama S, Many H, Endo T, Taniguchi N: Glycosylation regulates degradation of BACE1 in lysosome. Alzheimer's Association International Conference 2014. July 12-17, 2014, Copenhagen, Denmark.
47. Kanemaru K, Kanemaru A, Murayama S: Assessment of CSF α -synuclein levels distinguish dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International

Conference 2014. July 12-17, 2014, Copenhagen, Denmark.

48. Murayama S, Saito Y, Members of the Brain Bank Committee, the Japanese Society of Neuropathology: 18th International Congress of Neuropathology 2014. September 14-18, 2014, Rio de Janeiro, Brazil

49. Uchino A, Takao M, Saito Y, Sumikura H, Nakano Y, Hatsuta H, Nishiyama K, Murayama S: Incidence of TDP-43 proteinopathy in aging human brain. 18th International Congress of Neuropathology 2014. September 14-18, 2014, Rio de Janeiro, Brazil

50. Murayama S, Saito Y: The Brain Bank for Aging Research Project, Tokyo, Japan. Brain Conference 2014 The 3rd Congress of Asian Society of Neuropathology. November 6-8, 2014, Seoul, Korea

51. Fujita Y, Okamoto K, Fujita S, Ikeda Y. ELP3-positive inclusion in motor neuron diseases. JOINT CONGRESS OF EUROPEAN NEUROLOGY. (Istanbul, Turkey), 2014

52. 加藤泰介 小山哲秀 須貝章弘 豊島靖子 柿田 明美 高橋均 西澤正豊 小野寺理 筋萎縮性側索硬化症運動神経細胞における TDP-43 mRNA の細胞内局在解析 2014 年度包括脳冬のワークショップ 2014 年 12 月 東京

53. 小山哲秀 須貝章弘 今野卓哉 加藤泰介 石原智彦 西澤正豊 小野寺理 TDP-43 mRNA 量調節機構の解明 2014 年度包括脳冬のワークショップ 2014 年 12 月 東京

54. 石原智彦, 柿田明美, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊 Aberration of the spliceosome in amyotrophic lateral sclerosis 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月福岡

55. 今野卓哉 小山哲秀 逸見文昭 小山美咲 須貝章弘 加藤泰介 石原智彦 西澤正豊 小野寺理 ALS 関連 TARDBP 遺伝子変異は自身の選択的スプライシングに影響をおよぼすか? 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月福岡

56. 石原智彦 志賀篤 小山哲秀 柿田明美 西澤正豊 高橋均 小野寺理 ALS での Stasimon ヒトホモログ mRNA のスプライシング異常の検討 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月福岡

57. 伊藤岳 小山哲秀 有泉優子 木村篤史 西澤正豊 小野寺理 TDP-43 発現低下時におけるミトコンドリア・ダイナミクスの検討 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月福岡

58. 須貝章弘 小山哲秀 加藤泰介 今野卓哉

石原智彦 西澤正豊 小野寺理 核内 TDP-43 減少は細胞質内 TDP-43 mRNA 増加をもたらす 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月福岡

59. 須貝章弘 小山哲秀 加藤泰介 志賀篤 今野卓哉 小山美咲 石原智彦 西澤正豊 小野寺理 Coordinated autoregulation of TDP-43 and its implication for TDP-43 pathology 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月福岡

60. Akihide Koyama, Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Takuya Konno, Tomohiko Ishihara, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera: TDP-43 is autoregulated by multiple excisions of introns in exon6 and reservation of mRNA in nucleus by TDP-43. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. September 2014, Yokohama

61. Atsushi Shiga, Chigusa Kondo, Sachiko Hirokawa, Tamao Tsukie, Akinori Miyashita, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera: Alternation of miRNA expression in TDP-43 depleted spinal motor neuron. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. September 2014, Yokohama

62. Taisuke Kato, Akihide Koyama, Akihiro Sugai, Yasuko Toyoshima, Hitoshi Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera: Analysis of intracellular distribution of TDP-43 mRNA in affected spinal motor neuron with ALS. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. September 2014, Yokohama

63. Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Akihide Koyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera: Endogenous TDP-43 over-expression model with disrupted auto-regulation : 10th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. October 12 – 15, 2014 Hilton San Diego Resort & Spa, San Diego, California

64. Osamu Onodera, Masatoyo Nishizawa, Hitoshi Takahashi: Update in amyotrophic lateral sclerosis: he XVIII International Congress of Neuropathology. ICN 2014, will be held in Rio de Janeiro, Brazil, in September 14-18

65. Osamu Onodera: RNA metabolism and ALS. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. September 2014, Yokohama

Ⅱ. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 特許査定 3 件、特許申請 1 件
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

異常 α シヌクレインの神経回路伝播

研究分担者：長谷川成人¹⁾

共同研究者：鈴掛雅美¹⁾，野中隆¹⁾，下沢明希¹⁾，細川雅人¹⁾，秋山治彦¹⁾

¹⁾ 東京都医学総合研究所

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マウス α Syn を異なる脳領域(黒質、線条体、嗅内野)に接種し、どのように病変が広がるのか、またその広がりや違いが見られるかを検討した。その結果、接種部位によってまったく異なる病変の出現、広がりや示すこと、病変は神経回路を介して広がるように見えること、さらに、線条体に接種した場合に顆粒状のタウや TDP-43 の病変も観察され、他のタンパク質病変も誘導される可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

昨年度、我々は大腸菌に発現、精製したヒト、あるいはマウス α シヌクレイン(α Syn)を試験管内で線維化し、それを野生型マウス(C57BL マウス)の脳に接種して、マウス脳内でパーキンソン病(PD)患者に見られるような α Syn の異常病変が形成されるか検討を行ない、マウスの脳内に発現する内在性 α シヌクレインが異常リン酸化されて蓄積すること、その病変が時間経過と共に広がることを報告した。今年度は、黒質、線条体、嗅内野と三カ所の異なる部位に線維化 α シヌクレインの接種を行い、接種部位によって、病変出現部位が変わるのかわるか、またその広がりがどうなるのか、な

どについて検討することを目的とした。

細胞内異常タンパク質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ことにより、治療薬、治療法の評価に役立てたいと考える。

B. 研究方法

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 (C57BL/6J) マウスの中脳黒質(A-P: -3.0 mm; M-L: -1.3 mm; D-V: -4.7 mm from the bregma and dura)、線条体(A-P: 0.2 mm; M-L: -2.0 mm; D-V: -2.6 mm)、嗅内野(A-P: -3.1 mm; M-L: -4.0 mm; D-V: -2.7 mm)の右側に 10μ 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。免疫組織染色では、マウス脳をリン酸緩衝ホルマリンにて固定後、ピブラトームにて厚さ $50 \mu\text{m}$ の切片を作製し、リン酸化 α シヌクレイン抗体 P Ser129 をはじめ、リン酸化タウ抗体 (AT8, AP422) やリン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410) など、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。また、免疫組織染色の感度をあげるため、様々な検討を行った結果、30分間のギ酸処理と 100°C , 30分間の熱処理が有効であったため、をしてから、一次抗体の反応を一晩行い、アビジン-ビオチンシステムを使って染色すると感度よく染色される。

(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実施した。

C. 研究結果

病変が出現する初期像を観察するため、線維化 α Syn の接種後 1 ヶ月に脳を摘出し、固定後、P Ser129 抗体により免疫染色を行った。その結果、中脳に接種したマウスの脳では、接種した中脳の周辺や扁桃体に局限して病変が認められたのに対し、線条体に接種したマウスでは、脳全体に激しく広がった病変が観察され、線条体、黒質、扁桃体、そして大脳皮質に広範な異常リン酸化 α Syn の病理が検出された。また、嗅内野に接種したマウスでは、中脳、線条体に接種したマウスとは異なり、主に嗅内野に濃縮された病変が観察され、一部は海馬の歯状回や CA3 などにも病変が伝播していることが認められた。以上のように接種する部

位を変えただけで、病変の広がりが大きく変わることも、また病変は神経回路に沿って広がることも強く示唆された。

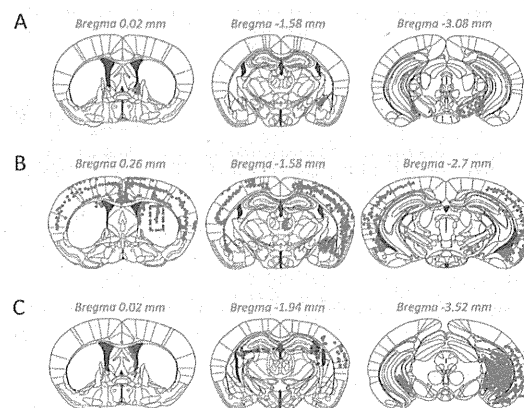


図 1. 線維化 α Syn 接種後一ヶ月後のリン酸化 α Syn 病変の広がり (A: 黒質に接種, B: 線条体に接種, C: 嗅内野に接種)。

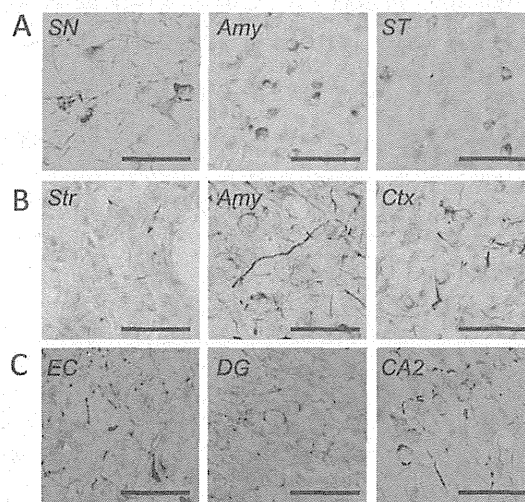


図 2. 接種部位を変えた場合のリン酸化 α Syn 病変 (A: 黒質に接種, B: 線条体に接種, C: 嗅内野に接種, SN: 黒質, Str: 線条体, ST: 分界条, Amy: 扁桃体, EC: 嗅内野, DG: 歯状回, Ctx: 皮質, CA2: 海馬 CA2)。

続いて、 α Syn 病変に加え、他の異常病変が起こっていないか検討するため、リン酸化タウ、リン酸化 TDP-43 を検出する抗体で免疫組織染色を行った。その結果、黒質に線維化 α Syn を接種したマウスでは何の

病変もみられなかったが、線条体と嗅内野に接種したマウスではドット状のリン酸化タウの病変が pS396 抗体、AT8 抗体により検出された。

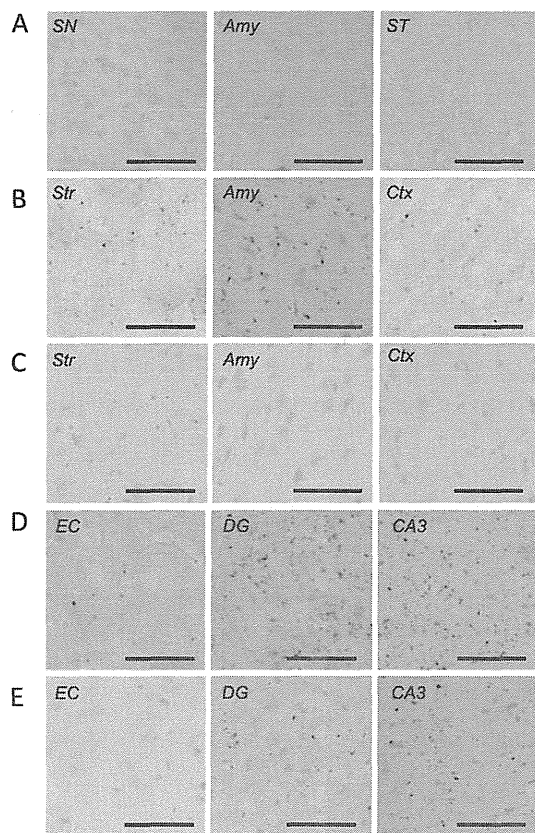


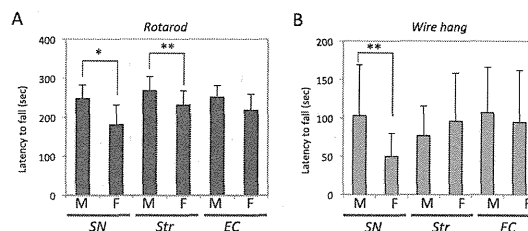
図3.リン酸化タウ陽性病変の検出 (A: 黒質に接種脳を pS396 抗体で染色, B: 線条体に接種した脳を AT8 抗体で染色, C: 線条体に接種した脳を pS396 抗体嗅内野に接種, D: 嗅内野に接種した脳を pS396 抗体で染色, E: 嗅内野に接種した脳を AT8 抗体で染色)。

類似のドット状の陽性構造がリン酸化 TDP-43 を認識する抗体でも検出された。これらの病変は一部でリン酸化 α Syn 病変と共局在することから、リン酸化 α Syn の蓄積によって二次的にタウや TDP-43 の病変の誘導されたものと考えられた。

α Syn の蓄積は不溶性画分のイムノプロット解析においてもリン酸化 α Syn 陽性バ

ンドとユビキチン化されたバンドとして検出されて確認された。

つづいて、接種部位を変えたマウスにおいて、hang wire test, rotarod test を接種マウスに異常行動が見られないか検討した。その結果、黒質に接種したマウスにおいて、線維化 α Syn を接種したマウス(F)において、hang wire test で、可溶性 α Syn を接種したマウス(M)と比較して、有意な低下が観察された。また、rotarod test においては、線条体接種したマウスにおいても優位な低下が観察された。



この結果は、異常病変が広がる部位が異なると、異なった症状となって現れる可能性も強く示唆する。

D.考察

以上の結果は、線維化 α Syn の接種部位を変えると接種部位の神経連絡に沿った病変の広がりを示すこと、またその伝播様式は逆向性に広がっていることを強く示唆する。今回は接種後一ヶ月という短期間での広がりを観察したところ、黒質へ接種した場合には、接種部位である黒質につよい病変が検出されたが、遠く離れた部位への広がりはあまりみられなかった。一方、線条体に接種したマウスでは、脳全体に広範な病変の広がりが認められ、短期間でも取り込まれる神経細胞の種類や神経回路の違いにより全く異なる病変の広がりとなることを示すものである。病変は神経細胞にしか

みとめられず、オリゴデンドログリアやアストログリアなどはまったくリン酸化 α Syn 病変は確認できなかった。この結果は、接種部位を変えても神経細胞にしか線維化 α Syn が取り込まれることがなく、結果的に神経回路内での広がりが起こっていることを強く示唆する。

線維化 α Syn を接種したマウス脳での病変はほとんどが α Syn の異常病変であったが、今回、ドット状のわずかな病変であるが、タウや TDP-43 も部位によって蓄積する可能性があることを見いだしたことは、多くの変性疾患脳で多数の異常タンパク質病変が見られることが多くあることを少し説明するのかもしれない。すなわち、一つの異常タンパク質病変が起こると同じ細胞内の凝集しやすいタンパク質も二次的に凝集し、細胞内に蓄積する可能性である。

以上の結果は、最初に形成された神経細胞の異常をきっかけにして、全く異なる選択性をもって病変が広がり、それが広がった部位の神経細胞の変性により、異なった症状となって現れる可能性を強く示唆するものである。

E. 結論

野生型マウスの脳に凝集核となる線維化 α Syn を接種することで、内在性のマウス syn が異常型に変換され、 α Syn 病理が形成された。接種部位を変えると接種部位によって全く異なる病変の広がりを示すことが強く示唆された。さらに、部位により、 α Syn 病変が強いところでは、タウや TDP-43 の変化も起こってく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様々な症状を呈することが実験的にも示された。

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

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimosawa A, Akiyama H, Hasegawa M. (2014) Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol Commun.* 2:88.

Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Kondo H, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H, (2015) Progranulin Reduction Is Associated With Increased Tau Phosphorylation in P301L Tau Transgenic Mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 74: 158-165.

Yamashita M, Nonaka T, Hirai S, Miwa A, Okado H, Arai T, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M. (2014) Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Hum Mol Genet* 23, 23: 4345-56.

Yamashita S, Sakashita N, Yamashita T, Tawara N, Tasaki M, Kawakami K, Komohara Y, Fujiwara Y, Kamikawa M, Nakagawa T, Hirano T, Maeda Y, Hasegawa M, Takeya M, Ando Y. Concomitant accumulation of α -synuclein and

TDP-43 in a patient with corticobasal degeneration. *J Neurol.* 2014 261:2209-17.

Kawakami I, Hasegawa M, Arai T, Ikeda K, Oshima K, Niizato K, Aoki N, Omi K, Higashi S, Hosokawa M, Hirayasu Y, Akiyama H. (2014) Tau accumulation in the nucleus accumbens in tangle-predominant dementia. *Acta Neuropathol Commun.* 2:40.

Baborie A, Griffiths TD, Jaros E, Perry R, McKeith IG, Burn DJ, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Rollinson S, Pickering-Brown S, Robinson AC, Davidson YS, Mann DM. Accumulation of dipeptide repeat proteins predates that of TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration associated with hexanucleotide repeat expansions in C9ORF72 gene. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014 in press.

Davidson YS, Barker H, Robinson AC, Thompson JC, Harris J, Troakes C, Smith B, Al-Saraj S, Shaw C, Rollinson S, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Pickering-Brown S, Snowden JS, Mann DM. (2014) Brain distribution of dipeptide repeat proteins in frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Commun* 2:70.

Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita K, Takahashi H. (2014) C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS.

Neuropathol Appl Neurobiol 40, 783–788.

Asada A, Yamazaki R, Kino Y, Saito T, Kimura T, Miyake M, Hasegawa M, Nukina N, Hisanaga S. (2014) Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2. *Neurosci Lett.* 563:112-7.

Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H. (2014) Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *Int J Neurosci.* 124:344-9.

Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DM, Saito Y, Murayama S. (2014) 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 127: 303-305.

2 : 学会発表

長谷川成人 : α シヌクレイン. 第8回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 2014. 京都 [2014, 10. 4.]

Hasegawa M: Prion-like features in alpha-synucleinopathies. XVIIIth International Congress of Neuropathology 2014. W3:

Prion-like mechanisms in neurodegenerative disorders. Rio de Janeiro, Brazil [2014,9. 15.]

Hasegawa M: Pathological alpha-synuclein spreading explain the disease progression. Neuroscience 2014. Joint Symposium of the