

Japan Neuroscience Society and the Korean Society of Brain and Neuroscience: Molecular Mechanisms underlying Parkinson Disease. Yokohama, Japan [2014,9. 12.]

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.]

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.]

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.]

Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological proteins in neurodegenerative diseases. 2014 Yonese BK21 PLUS - Igakuken Joint Symposium, Seoul, Korea [2014, 6. 19.]

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.]

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]

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.]

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.]

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.]

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.]

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GRESS シンポジウム, 京都 [2014, 10. 4.]

H：知的所有権の取得状況（予定を含む）

1：特許取得

該当無し

2：実用新案登録

該当無し

3：その他

該当無し

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

α シヌクレイン凝集体のプリオン様性質

研究分担者：野中 隆

東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト・病態細胞生物研究室

研究要旨

α シヌクレインは、パーキンソン病やレビー小体型認知症の患者脳に蓄積するレビー小体の主要な構成タンパク質である。近年、 α シヌクレイン凝集体のプリオン様活性がマウスにおいて示されているが、その詳細な機構は不明な点が多い。本研究では、*in vitro* 及び培養細胞系を用いて、 α シヌクレイン凝集体のプリオン様性質について生化学的に検討した。その結果、可溶性 α シヌクレインの蓄積過程において、 α シヌクレイン凝集体はシードおよび鋳型として機能し、可溶性 α シヌクレインの凝集体形成に寄与することが判明した。すなわち、患者脳に蓄積する α シヌクレイン凝集体にはプリオン様の性質が備わっていることが示唆された。

A. 研究目的

多くの神経変性疾患では、患者脳の神経細胞内に、それぞれの疾患に特徴的な異常タンパク質凝集体が出現する。アルツハイマー病ではタウ、パーキンソン病では α シヌクレイン、前頭側頭葉変性症や筋萎縮性側索硬化症では TDP-43 といったタンパク質が、それぞれの疾患で認められる異常凝集体の主要な構成タンパク質として同定された。これらの異常凝集体が出現する部位は、神経細胞脱落(細胞死)が認められる部位とよく一致することから、凝集体形成により神経細胞に細胞死が誘導されると考えられているが、その形成や細胞死誘導機構に関しては不明な点が多い。本研究では、 α シヌクレインに着目し、その細胞内蓄積機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

野生型および各種変異型 α シヌクレインのリコンビナントタンパク質を調製し、これを *in vitro* で線維化した。これをシードとして可溶性 α シヌクレイン溶液に添加し、この凝集体形成の過程をチオフラビンによる蛍光強度測定法により観察し、凝集体のシード効果を検討すると共に、生じた線維をトリプシン処理し、イムノブロット法により凝集体の鋳型効果について検討した。また *in vitro* で作製した線維を培養細胞に導入し、そのシード・鋳型効果について解析した。

(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

in vitro での可溶性 α シヌクレインの凝集体形成過程において、種々の α シヌクレイン凝集体がシードおよび鋳型として機能し、可溶

性 α シヌクレインが凝集することを見いだした。また、培養細胞内に α シヌクレイン凝集体を効率よく導入する方法により解析した結果、培養細胞内においても α シヌクレイン凝集体はシードとして作用し、プラスミド由来の可溶性 α シヌクレインが細胞内蓄積することが示された。また、導入した凝集体を鋳型として細胞内の可溶性 α シヌクレインが蓄積し、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。

D. 考察

以上の結果より、in vitro および培養細胞の系において、 α シヌクレイン凝集体はプリオン様の性質を有することが判明した。この系を用いて、 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を行い、新規治療薬開発を試みる。

E. 結論

α シヌクレイン凝集体はプリオン様の性質を有する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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.*, 16: 4345-4356 *: corresponding author

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*, 124: 344-349

野中隆, 長谷川成人 (2015) α シヌクレイン凝集体のプリオン様性質. *細胞*, 47: 20-23.

野中隆, 長谷川成人 (2014) TDP-43. *神経内科*, 81: 630-636.

野中隆 (2014) 神経変性における細胞内 TDP-43 凝集体の意義の解明. *遺伝子医学 MOOK*, 26: 67-71.

野中隆 (2014) TDP-43 の神経細胞間伝播. *医学のあゆみ*, 250: 513-515.

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.

2. 学会発表

Takashi Nonaka, Hisao Masai, Masato Hasegawa. Phosphorylation of TDP-43 by casein kinase 1 delta facilitates

mislocalization and intracellular aggregate formation of TDP-43. Alzheimer's Association International Conference (AAIC2014); 2014. 7. 15. Copenhagen, Denmark

Takahashi M, Nonaka T, Kametani F, Hisanaga S, hasegawa M. Treatment of cells expressing APP with tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. Alzheimer's Association International Conference (AAIC2014); 2014. 7. 16. Copenhagen, Denmark

野中隆, 認知症関連タンパク質のプリオン様性質と細胞モデル, 第33回日本認知症学会学術集会・シンポジウム (招待講演), 2014年11月29日, 横浜

Takashi Nonaka. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. Neuroscience 2014 · Symposium (招待講演), 2014. 9. 11, Yokohama

野中隆, 神経変性疾患の患者脳に蓄積する異常タンパク質の解析, 第14回日本蛋白質科学会・ワークショップ (招待講演), 2014年6月25日, 横浜

高橋宗聖, 野中隆, 久永真市, 長谷川成人, APP 発現によるタウ蓄積の亢進, 第33回日本認知症学会学術集会・ポスター発表, 2014年11月29日, 横浜

下中翔太郎, 野中隆, 久永真市, 長谷川

成人, TDP-43 の C 末端領域の凝集に関わる配列の同定, 第33回日本認知症学会学術集会・ポスター発表, 2014年11月29日, 横浜

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

●日本

出願番号: 2007-549210

名称: タンパク質重合体の重合核となりうるタンパク質

又はその重合体が導入された細胞及びその製造法

登録番号: 5665258

登録日: 2014/06/14

発明者: 野中隆、渡辺小百合、増田雅美、長谷川成人

出願番号: 2010-507197

名称: TDP-43 蓄積細胞モデル

登録番号: 5667872

登録日: 2014/12/19

発明者: 野中隆、新井哲明、秋山治彦、長谷川成人、山下万貴子

●米国

出願番号: 12/667624

名称: TDP-43 凝集物に特異的に結合する抗体

登録番号: 8940872

登録日: 2015/01/27

発明者: 長谷川成人、新井哲明、野中隆、亀谷富由樹、秋山治彦

外国出願 各国移行 出願番号:

PCT/JP2012/062794 名称: 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
発明者：野中隆他 4 名 移行国：米国、欧
州、中国、(日本)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

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器を用いた微量解析

研究分担者：氏名 亀谷富由樹¹⁾

研究協力者：氏名 矢崎正英²⁾、池田修一²⁾、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

2) 信州大学医学部 脳神経内科 リウマチ・膠原病内科

研究要旨

ホルマリン固定パラフィン包埋組織からレーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いて微量組織を切り取り、タンパク質を抽出し、酵素消化した。その後液体クロマトグラフィー質量分析器 (LC-MSMS) を用いて切り取った組織に存在していたタンパク質を同定した。種々のアミロイド沈着組織を解析し、この方法の有用性を明らかにした。

A. 研究目的

レーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いて切り取った組織中に存在するタンパク質を液体クロマトグラフィー質量分析器を用いて網羅的に解析し、異常蓄積物等についての情報を得る。

B. 研究方法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織を 6 μm でスライスし、コンゴレッド染色後、アミロイド沈着糸球体をライカ AS LMD システムで切り取った。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、その

後 20 分間の超音波処理し、酵素を加えて酵素分解を行った。分解物は DiNa-VelosPro LC-MSMS で解析した。

(倫理面への配慮)

倫理審査委員会の承認を得て、研究を行っている。

C. 研究結果

(1) ホルマリン固定パラフィン包埋組織から LMD を用いて微量組織を切り取りそのなかに存在するタンパク質を解析し、この方法を有用性を明らかにした (図)。

(2) 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つた複数例の解析を行った。(A)糸球体4個から、変異fibrinogen、ApoE、vitronectin、vimentin、complement C3、C4、SAPを同定した。(B)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。

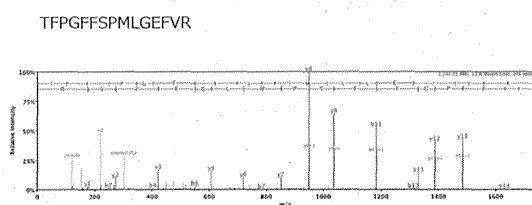


図 LMDおよびLC-MSMSを用いてホルマリン固定パラフィン包埋組織より同定されたペプチド。

D. 考察

LMDとLC-MSMSの組み合わせで、微量のホルマリン固定パラフィン包埋組織より、効率よくタンパク質を抽出し、その組織に存在するタンパク質を同定でき、アミロイド症、神経変性疾患等の解析に有用と考えられた。

E. 結論

LMDとLC-MSMSの組み合わせは、ホルマリン固定パラフィン包埋組織の解析ツールとして優れている。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kametani F, Haga S, Accumulation of carboxy-terminal fragments of APP increases phosphodiesterase 8b. *Neurobiology of Aging* [Available online 7 October 2014]
- (2) 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.
- (3) Kametani F, S100A9/Mrp14 Plays an Important Role in A β Amyloidosis Enhancement. *Journal of Neurology & Stroke* 1, 00006, 2014

2. 学会発表

- (1) 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*
- (2) 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
- (3) 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
- (4) 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

(5) 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

Ⅷ. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当なし

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

側坐核におけるタウ蓄積と神経回路

研究分担者：秋山治彦¹

研究協力者：林禪¹，河上緒¹，青木直哉¹，東晋二¹，細川雅人¹，池田研二¹，女屋光基²，大島健一³，新里和弘³，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
- 2) 下総精神医療センター
- 3) 都立松沢病院

研究要旨

神経原線維変化型認知症(TPD)の側坐核におけるタウ蓄積について、剖検脳を用いて検討した。TPD 側坐核のタウ蓄積はアルツハイマー病(AD)より高度で、多くは密な tangle 形成を伴わないびまん性蓄積の形を示した。TPD 側坐核ではタウ陽性細胞の密度が高い部位と低い部位とが存在し、striosome であるか matrix であるかにより異なっていると考えられた。TPD と AD との海馬辺縁系および側坐核におけるタウ蓄積の差は、神経線維連絡とタウ蓄積との関係を示唆している。

A. 研究目的

神経原線維変化型認知症 (tangle predominant dementia: TPD) は A β 沈着を欠き、海馬辺縁系に限局して高度のタウ蓄積～神経原線維変化 (neurofibrillary tangle: NFT) 形成を伴う緩徐進行性の認知症疾患である。TPD では海馬辺縁系の NFT、特に神経細胞が消失した後に残される ghost tangle が高密度で見られる一方、新皮質にはほとんど NFT を認めない。臨床的には Alzheimer 病(AD)よりも高齢発症で進行が遅く、記憶力障害が病像の中心をなす。都立松沢病院の連続剖検例を

検討するなかで、側坐核に高度のタウ蓄積を認めた症例に遭遇したことをきっかけとして、これまでに本研究室に蓄積されていた TPD 症例の側坐核のタウ蓄積を、免疫組織化学染色を用いて再検討した。さらに、高感度免疫染色が可能なパラフォームアルデヒド短時間固定・凍結標本による詳細な解析や新鮮凍結試料の生化学的解析も行い、タウ蓄積の性状、分布、密度と神経回路との関連を調べた。

B. 研究方法

免疫組織化学および病理組織染色には、

ホルマリン固定パラフィン標本、および4%パラフォルムアルデヒド固定・ショ糖液中保存の凍結浮遊切片を用いた。側坐核を含む線条体前方部、および海馬を含む側頭葉下面の標本を対象とした。また一部の症例で新鮮凍結試料から Sarkosyl 不溶画分を調製し immunoblot も行った。症例として TPD のほか、年齢をほぼ一致させた AD および非神経疾患例を用いた。(倫理面への配慮)

剖検脳の解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理基準に準拠することとし、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

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た[文献 4, Table 3]。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を示した[文献 4, Figure 2]。しかし、sarkosyl 不溶画分の生化学的解析では AD や TPD 海馬と同様、3R+4R パターンを示し、タウ凝集蓄積の機序は基本的には類似しているものと思われた[文献 4, Figure 5]。これらの結果は、TPD の海馬辺縁系におけるタウ蓄積が固い神経原線維変化を形成している場合が多い点と比較して、病期の後のステージになって生じることを示唆している。

また TPD 側坐核のタウ蓄積は密度が高い部位と低い部位とが存在し、進行例標本の弱拡大観察では、まだら模様を形成していた[文献 4, Figure 1]。隣接切片の tyrosine hydroxylase (TH) 染色と比較すると、TH 陽性線維が疎な領域においてタウ陽性細胞が高頻度に見られた。側坐核を含む線条体は、matrix と呼ばれる背景組織の中に striosome と呼ばれる島状の領域が散在する構造をとる。成体では TH 終末は matrix の方が striosome より密度が高いとされており、タウ陽性細胞は主として striosome に存在すると考えられた。

D. 考察

AD ではタウ蓄積は海馬 CA1~海馬支脚よりも嗅内皮質の方が高度である。一方、TPD では海馬 CA1~海馬支脚の方が嗅内皮質より多数の神経原線維変化が存在し、進行して ghost tangle が大半を占めるようになる前であれば、ニューロピルのタウ蓄積も高度である。海馬・辺縁系から側坐核への投射は主として 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。側坐核におけるタウ蓄積が AD より TPD において高度である背景には、TPD の方が AD より CA1~支脚のタウ病変が高度であること、それとともに、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、が推測された。

大脳皮質から線条体への投射の起始細胞は striosome と matrix とで異なっており、striosome は辺縁系皮質からの入力を多く受け、matrix は新皮質からの入力を多く受ける。TPD 側坐核のタウ蓄積が、海馬辺縁系からの入力が密な striosome に高頻

度に認められること、matrix への投射が主である新皮質には TPD ではほとんどタウ蓄積が生じないことは、海馬からの投射を介して側坐核にタウ異常蓄積が伝播するという推測を支持する所見であると思われる。

E. 結論

TPD の側坐核では AD よりも高度なタウ異常蓄積が認められた。この TPD と AD との差は、両疾患における海馬・辺縁系のタウ異常蓄積の分布の違い、およびタウ蓄積が神経回路を介して拡がることから説明できると考えられる。

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, 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.* 2015 Feb;74(2):158-65. doi: 10.1097/NEN.0000000000000158.
- 2) 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.* 2014 2:88. doi: 10.1186/PREACCEPT-1296467154135944.
- 3) Serrano GE, Sabbagh MN, Sue LI, Hidalgo JA, Schneider JA, Bedell BJ, Van Deerlin VM, Suh E, Akiyama H, Joshi AD, Pontecorvo MJ, Mintun MA, Beach TG. (2014) Positive florbetapir PET amyloid imaging in a subject with frequent cortical neuritic plaques and frontotemporal lobar degeneration with TDP43-positive inclusions. *J Alzheimers Dis.* 42(3):813-821. doi: 10.3233/JAD-140162.
- 4) 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(1):40. doi: 10.1186/2051-5960-2-40.
- 5) 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(16):4345-4356. doi: 10.1093/hmg/ddu152
- 6) Mochizuki Y, Kawata A, Hashimoto T, Akiyama H, Kawakami H, Komori T, Oyanagi K, Mizutani T, Matsubara S. (2014) An autopsy case of familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS R521G mutation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 15(3-4):305-8. doi: 10.3109/21678421.2014.881500.
- 7) 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 alpha-synuclein-immunoreactive retinal neuronal elements in Parkinson's disease subjects. *Neurosci Lett* 571:34-38. doi: 10.1016/j.neulet.2014.04.027.
- 8) Kawakami I, Katsuse O, Aoki N, Togo T, Suzuki K, Isojima D, Kondo D, Iseki E, Kosaka K, Akiyama H, Hirayasu Y. (2014) Autopsy case of concurrent Huntington's disease and neurofibromatosis type 1. *Psychogeriatrics.* 14(1):81-86. doi: 10.1111/psyg.12040.
- 9) 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. doi: 10.1212/WNL.000000000000204.

- 10) 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(2):303-5. doi: 10.1007/s00401-013-1191-9.

2. 学会発表

- 1) 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]
- 2) 小林 禪, 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]
- 3) 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]
- 4) 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]
- 5) 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]
- 6) 長谷川成人, 近藤ひろみ, 齊藤祐子, 初田裕幸, 村山繁雄, 秋山治彦: AD 脳に蓄積するタウの解析. 第 55 回日本神経病理学会 [2014.6.6, 東京]
- 7) 長谷川成人, 團彩帆, 高橋宗聖, 近藤ひろみ, 齊藤祐子, 初田裕幸, 村山繁雄, 秋山治彦: AD 脳に蓄積する 4R タウの N279 の脱アミド化. 第 55 回日本神経病理学会 [2014.6.7, 東京]
- 8) 鈴木寿臣, 女屋光基, 野島照雄, 富永格, 織田辰郎, 三村將, 小林智則, 長谷川成

人, 秋山治彦: タウ P301L 変異が確認された FTDP-17 の 1 例. 第 55 回日本神経病理学会 [2014.6.7, 東京]

- 9) 後藤 潤, 後藤昇, 秋山治彦, 塩田清二: 第 3 脳室の原発性脳室内出血: 脳室の動脈血供給に関する解剖学的誤解. 第 55 回日本神経病理学会 [2014.6.7, 東京]

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

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

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

研究分担者：細川雅人¹⁾

研究協力者：新井哲明^{1), 2)}、増田一鈴掛雅美³⁾、近藤ひろみ⁴⁾、松脇貴志⁵⁾、西原真杉⁵⁾、長谷川成人³⁾、秋山治彦¹⁾

- 1) 東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト, 3) 病態細胞生物学, 4) ヒストロジーセンター
- 2) 筑波大学医学医療系臨床医学域精神医学
- 5) 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学

研究要旨

グラニュリン (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、様々なタウオパチーに関与している可能性が報告された。プログラニュリン (PGRN) の減少がタウに対してどのような影響を及ぼすかを P301L タウ/GRN[±]-マウスを作製して検討した。月齢が進むにつれて、P301L タウ/GRN[±]-マウスでは P301L タウマウスに比べ、タウのリン酸化が亢進していた。このリン酸化の亢進は cyclin dependent kinases の活性化によるものであると推察された。GRN 遺伝子変異はタウオパチーの危険因子である可能性が示唆された。

A. 研究目的

グラニュリン (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。その後、GRN 遺伝子変異はアルツハイマー病 (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た。そこで我々はプログラニュリン (PGRN) の減少がタウに対してどのような影響を及ぼすかを検討した。

B. 研究方法

P301L タウトランスジェニックマウスと

GRN ノックアウトマウスを交配し、P301L タウ/GRN[±]-マウスを作製した。13、19 ヶ月齢の脳を摘出し、免疫ブロッティング及び免疫組織化学染色をおこなった。

(倫理面への配慮)

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

免疫ブロッティングでは 13 ヶ月齢の P301L タウ/GRN[±]-マウスにおいて、P301L

タウマウスに比べ、トリス可溶性画分中のリン酸化タウ量が増加していた。また 19 ヶ月齢では、P301L タウ/*GRN*^{+/-}マウスにおいて界面活性剤不溶性画分中のリン酸化タウ量が増加していた (Figure 1)。

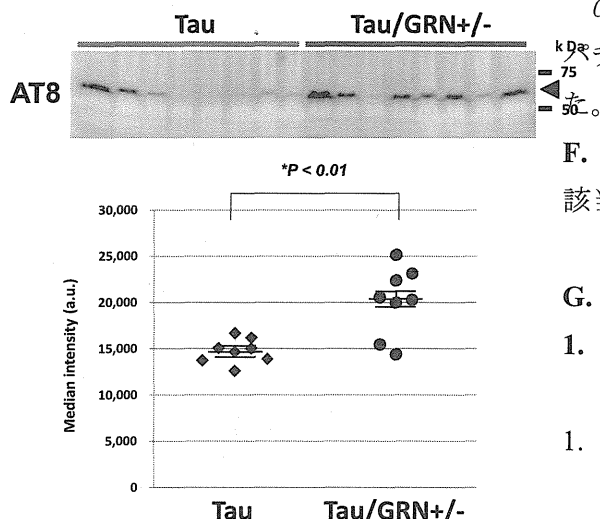


Figure 1. サルコシル不溶性画分中のリン酸化タウ量比較 (19 ヶ月齢)

免疫組織化学染色では P301L タウ/*GRN*^{+/-}マウスにおいてリン酸化タウ陽性細胞が増加していた。抗リン酸化基質抗体を用いたイムノブロッティングで cycline dependent kinases (CDKs) によるリン酸化の亢進が観察された (Figure 2)。

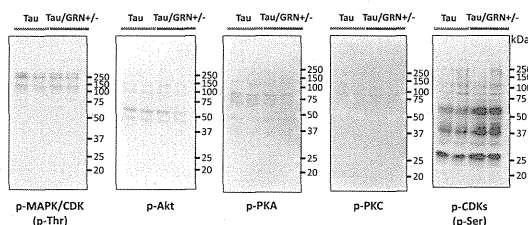


Figure 2. リン酸化基質抗体によるイムノブロット (13 ヶ月齢)

D. 考察

PGRN の減少が CDKs を活性化し、タウのリン酸化を亢進させることが推測された。

E. 結論

GRN 遺伝子変異が AD や CBD などのタウオパチーの危険因子となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Hosokawa M**, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H. Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *International Journal of Neuroscience* 124(5): 344-349 (2014)
2. Yamashita M, Nonaka T, Hirai S, Miwa A, Okado H, Arai T, **Hosokawa M**, Akiyama H, Hasegawa M. Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Human Molecular Genetics* 23(16): 4345-4356 (2014)
3. Kawakami I, Hasegawa M, Arai T, Ikeda K, Oshima K, Niizato K, Aoki N, Omi K, Higashi S, **Hosokawa M**, Hirayasu Y, Akiyama H. Tau

- accumulation in the nucleus accumbens in tangle-predominant dementia. *Acta Neuropathologica Communication* 2(1): 40 (2014)
4. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, **Hosokawa M**, Kubo M, Shimosawa A, Akiyama H, Hasegawa M. Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathologica Communication* 2(1): 88 (2014)
5. Kondo D, Hino H, Shibuya K, Fujisawa K, Kosaka K, Hirayasu Y, Yamamoto R, Kasanuki K, Minegishi M, Sato K, **Hosokawa M**, Arai T, Arai H, Iseki E. An autopsied case of corticobasal degeneration showing severe cerebral atrophy over a protracted disease course of 16 years. *Neuropathology* Epub ahead of print (doi: 10.1111/neup.12188.)
6. Akitake Y, Katsuragi S, **Hosokawa M**, Mishima K, Ikeda T, Miyazato M, Hosoda H. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behaviors, and neurodevelopment of offspring. *Neutrition Research* 35(1): 76-87 (2015)
7. **Hosokawa M**, Arai T, Masuda-Suzukake M, Kondo H, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H. Progranulin reduction is associated with increased tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 74(2): 158-165 (2015)
2. 学会発表
1. 細川雅人、新井哲明、増田一鈴掛雅美、近藤ひろみ、松脇貴志、西原真杉、長谷川成人、秋山治彦. タウトランスジェニックマウスにおいてプログロニューリンの減少はタウのリン酸化に影響を与える 第61回 日本実験動物学会 札幌 2014年5月15-17日
2. 木村妙子、細川智永、堤弘次、初田裕幸、鈴掛一増田雅美、細川雅人、福島寛美、石黒幸一、秋山治彦、村山繁雄、長谷川成人、久永眞市. Analysis of Tau phosphorylation in Tauopathy using Phos-tag SDS-PAGE. 第55回 日本神経病理学会 東京 2014年6月5-7日
3. 秋武義治、桂木真司、細川雅人、池田智明、細田洋司. 妊婦の摂取栄養が子供の脳と精神に及ぼす影響 第3回 日本DOHaD研究会学術集会 東京 2014年7月25-26日
4. Kawakami I, Kobayashi Z, Arai T, 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? The 9th International Conference on Frontotemporal

Dementias (Vancouver, B.C. Canada)

2014年10月23-25日

5. 細川雅人、新井哲明、増田一鈴掛雅美、近藤ひろみ、松脇貴志、西原真杉、長谷川成人、秋山治彦. プログラニューリンの減少はタウのリン酸化を亢進させる 第33回 日本認知症学会 横浜 2014年11月29日-12月1日

Ⅷ. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

TDP-43 欠損変異体発現が与える Poly (A)⁺ RNA 局在への影響

研究分担者: 新井哲明¹⁾

研究協力者: 東晋二¹⁾、細川雅人²⁾、秋山治彦²⁾、朝田隆¹⁾

1) 筑波大学医学医療系臨床医学域精神医学

2) 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

前頭側頭葉変性症 (FTLD) および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者脳で認められる断片化 TDP-43 の転写・翻訳機構への影響を明らかにするため、培養細胞における各 TDP-43 断片の発現と Poly(A)⁺ RNA の細胞内局在との関係について検討した。その結果、TDP-43 の C 末端側断片の強発現により、細胞質内において C 末端側断片と Poly(A)⁺ RNA が共局在する凝集体形成が認められた。FTLD および ALS の患者脳では、TDP-43 の C 末端側断片の細胞内凝集が生じていることから、その病態機序に RNA の細胞内局在の異常が関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

TDP-43 は、DNA/RNA と結合するドメイン構造を有し、転写・翻訳の調節に関与する。FTLD および ALS の患者脳内に出現する細胞内凝集体の主要構成成分であり、リン酸化および断片化を受けている点が特徴である。このような TDP-43 の凝集から神経変性に至るメカニズムは不明である。

本研究では、患者脳で認められる断片化 TDP-43 の転写・翻訳機構への影響を検討するため、TDP-43 欠損変異体を作成し、各 TDP-43 断片の発現と Poly(A)⁺ RNA の細胞内局在との関係について解析した。

B. 研究方法

FLAG-tag 融合の全長 TDP-43 と N-末端領域または RNA 認識モチーフ (RNA-recognition motif; RRM), C-末端領域などを削除した欠損変異体の plasmid を作成し、形質導入によって HeLa 細胞に強発現させた。

Cy3-Oligo-dT(30) による Fluorescent *in situ* hybridization 法により細胞内の Poly(A)⁺ RNA を標識し、その後抗 FLAG 抗体によって強発現された全長もしくは欠損変異体 TDP-43 を免疫染色した。これらの局在を共焦点顕微鏡にて観察し、それぞれのドメイン領域が RNA 局在に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

筑波大学および東京都医学総合研究所の倫理規定を遵守し、プライバシーの保護には十分配慮した。

C. 研究結果

全長 TDP-43 の強発現は Poly(A)⁺ RNA の局在に影響を与えなかったが、TDP-43 断片の強発現により Poly(A)⁺ RNA の細胞内局在が変化した。

NLS を含む TDP-43 の N 末端側断片 (2-104) の核内の強発現により、核内の Poly(A)⁺ RNA のほとんどは消失し、細胞質に局在するようになった。

TDP-43 の C 末端側断片 3 種類 (101-414, 202-414, 214-414) の強発現は、いずれも細胞質内において Poly(A)⁺ RNA の凝集を引き起こした。ただし、101-414 断片と 202-414 断片の強発現では、これらの断片と Poly(A)⁺ RNA の共局在が確認されたが、RRM のほとんどを失った最短の C 末端側断片である 214-414 断片の強発現では Poly(A)⁺ RNA の凝集のみが認められ、214-414 断片の共局在は確認できなかった。

D. 考察

培養細胞における TDP-43 断片の強発現は、Poly(A)⁺ RNA の細胞内局在を変化させることが明らかとなった。

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ており、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。この凝集体において、最短の C 末端側断片 (214-414) の共局在が確認できなかった理由は不明であるが、凝集体内で FLAG のエピトープがマスクされた可能性も考えられるため、今後抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学染色によりさらに検討が必要と思われた。

E. 結論

FTLD および ALS の患者脳では、TDP-43 の C 末端側断片の細胞内凝集が生じていることから、その病態機序に RNA の細胞内局在異常による転写・翻訳障害が関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo D, Hino H, Shibuya K, Fujisawa K, Kosaka K, Hirayasu Y, Yamamoto R, Kasanuki K, Minegishi M, Sato K, Hosokawa M, Arai T, Arai H, Iseki E: An autopsied case of corticobasal degeneration showing cerebral atrophy over a protracted disease course of 16 years. *Neuropathology*, in press
2. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake

- M, Kondo H, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H: Progranulin reduction is associated with tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, in press
3. Tamura M, Nemoto K, Kawaguchi A, Kato M, Arai T, Kakuma T, Mizukami K, Matsuda H, Soya H, Asada T: Long-term mild-intensity exercise regimen preserves prefrontal cortical volume against aging. *Int J Geriatr Psychiatry*, in press
 4. 新井哲明: タウオパチー病理変化の基礎. *Dementia Japan* 29, in press
 5. 新井哲明: TDP-43 蛋白症. 神経病理診断の標準化 I. 病理と臨床, in press
 6. 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
 7. Yamashita M, Nonaka T, Hirai S, Miwa A, Okado H, Arai T, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M: Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Hum Mol Genet* 23: 4345-4356, 2014
 8. Kawakami I, Hasegawa M, Arai T, Ikeda K, Oshima K, Niizato K, Aoki N, Omi K, Higashi S, Hosokawa M, Hirayasu Y, Akiyama H: Tau accumulation in the nucleus accumbens in tangle-predominant dementia. *Acta Neuropathol Commun* 2: 40, 2014
 9. Arai T: Significance and limitation of the pathological classification of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology* 34: 578-588, 2014
2. 学会発表
 1. 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
 2. 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
 3. 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
 4. 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
 5. 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
6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 細川雅人, 新井哲明, 鈴掛雅美, 近藤ひろみ, 松脇貴志, 西原真杉, 長谷川成人, 秋山治彦: タウトランスジェニックマウスにおいてプログラニユリンの減少はタウのリン酸化に影響を与える. 第 61 回日本実験動物学会, 札幌札幌, 2014 年 5 月 15 日
 12. 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) の臨床病理像. 第 55 回日本神経学会総会学術研究会, 東京, 2014 年 6 月 6 日
 13. 新井哲明: 分子生化学からみた PSP と CBD. Super Expert Session 3, PSP と CBD: 鑑別は可能か, 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014 年 5 月 24 日
- H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)
1. 特許取得 該当なし。
 2. 実用新案登録 該当なし。
 3. その他 該当なし。