

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590390

研究課題名(和文) 家族性前頭側頭型認知症におけるエンドソーム関連蛋白 CHMP2B 機能異常の研究

研究課題名(英文) Genetical, morphological, and functional analysis of CHMP2B in a patient of familial FTD

研究代表者

豊島 靖子 (Toyoshima, Yasuko)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：20334675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：我々が経験した家族性FTDの家系において、報告されているcharged multivesicular body protein 2B (CHMP2B)遺伝子の変異や、発現しているCHMP2B蛋白の異常を検索した。症例ではTDP-43 (-)、ユビキチン (+)の封入体が脳皮質の錐体神経細胞内に認められた。CHMP2B 遺伝子異常は認められなかったが、m-RNA のC末側が短縮し、アミノ酸が変化するというスプライシングバリエーションの存在を確認した。このバリエーションは正常群にも認められるため、直ちに病的とは考えられないが、症例では量的に多い傾向があった。

研究成果の概要(英文)：The charged multivesicular body protein 2B gene (CHMP2B) was recently associated with frontotemporal lobar degeneration (FTLD) associated to chromosome 3 in a Danish FTLD family (FTD-3). We report a Japanese family of FTD-3 that developed FTLD in 6 members of 3 successive generations. Interestingly, 4 members of 2 successive generations had gastric cancer, and FTLD and gastric cancer cosegregated in the two family members. CHMP2B encode a component of the heteromeric ESCRT-III complex (endosomal sorting complex required for transport III). Dysfunction of the endosomal systems may lead FTLD and cancer. We observed ubiquitin-positive and TDP-43-negative neuronal intracytoplasmic inclusions as previously reported. We could not find any mutation in the CHMP2B gene, however, we observed shorten splicing variant of the m-RNA. The variant showed modified amino acid sequence in the C-terminal.

研究分野：神経病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

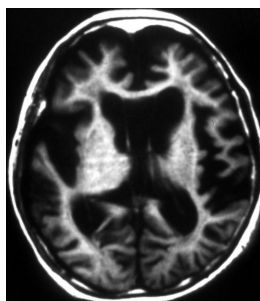
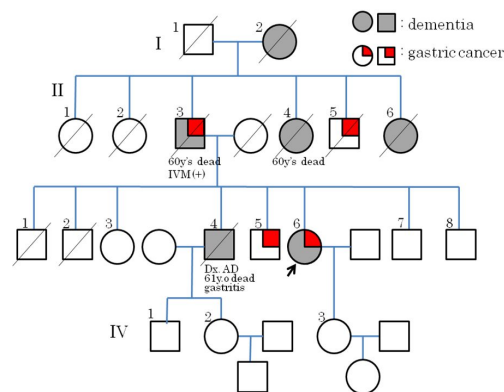
キーワード：前頭側頭型認知症 CHMP2B オートファジー ユビキチン陽性封入体 ALS

1. 研究開始当初の背景

前頭-側頭葉型認知症 (FTD) は全認知症患者の約 10% を占め、人格変化や行動異常が前面に出るため、本人ならび介護者の負担が極めて大きい。FTD のなかでは、病理組織学的にタウオパチーである Pick 病が有名であるが、タウの蓄積を認めない FTD があることが知られていた。近年、TDP-43 が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の二次運動ニューロンや FTD 患者の大脳皮質のニューロンの細胞体に異常蓄積していることが発見され、FTD の中に ALS との関連が示唆されるものがあることがわかってきた。さらに、異常構造物の多くがユビキチン化されていることから、これら一連の疾患はユビキチンオパチー (ubiquitinopathy) と総称されるようになった。しかし、FTD の中には TDP-43 も異常蓄積を認めないものがあり、そのような病理組織所見を呈するデンマークの FTD 家系で CHMP2B 遺伝子の変異が発見された。この家系の患者脳では、ユビキチン免疫染色陽性の神経細胞内封入体を認めるが、TDP-43 免疫染色ではこの封入体が染色されないことが特徴的であった。

2. 研究の目的

我々は、病理組織学的にデンマーク家系の所見と同一で、家族性の FTD を経験した(下図)。興味深いことに我々の家系では胃癌の発症者が多く、この家系においてデンマーク家系で報告された CHMP2B 遺伝子の変異や、発現している CHMP2B 蛋白の異常を検索することが目的であった。



発端者の頭部 MRI
T1 強調画像。高度の前頭葉、側頭葉萎縮を認める

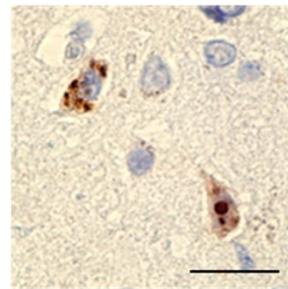
3. 研究の方法

実際の患者脳組織を用いて病理組織学的検索を行った後、CHMP2B 遺伝子の異常や脳で発現している m-RNA の解析、Western blotting を行う。CHMP2B のゲノムレベルでの異常が見つからない場合は、ESCRT-III に含まれ、CHMP2B と複合体を形成する分子も視野に入れて研究を進めた。

4. 研究成果

1) 病理組織学的検討

症例の大脳皮質錐体神経細胞にはユビキチン陽性、TDP-43 陰性の胞体内封入体 (NCIs) が認められた。



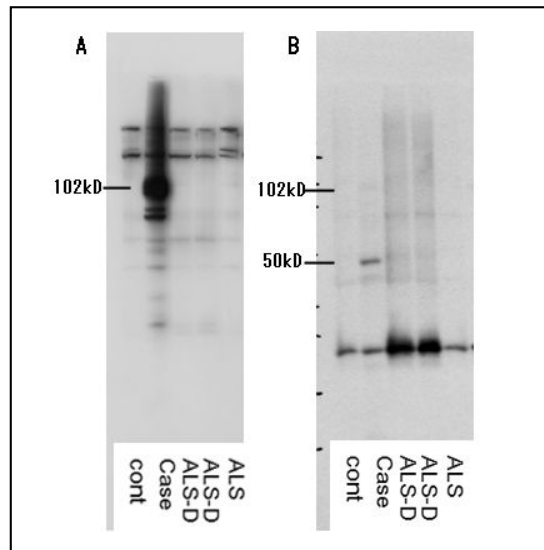
発端者の大脳皮質ユビキチン免疫染色。神経細胞の胞体が顆粒状に染まるものと、球形の封入体を有するものが認められる。

2) CHMP2B 遺伝子異常の検索

凍結脳組織から抽出した DNA を用いて遺伝子の検索を行ったが、異常を指摘できなかった。

3) Western-blotting

凍結脳組織から抽出した蛋白からサルコシルを用いて不溶分画を取り出した。この分画に封入体が含まれることが予想されたためコントロール症例と共に CHMP2B 抗体で Western blotting を行った。



その結果、対照にはない 102kD のバンドが不溶分画にみられた。このバンドは、CHMP2B 蛋白の中央部を認識する抗体 (A) では検出されるが、C-末を認識する抗体 (B) では検出されない(上図)。このことから本症例の封入体には C-末に変異をもつ異常蛋白が関与しているものと考えられた。

4) CHMP2B の m-RNA の検討

ゲノムレベルの変異が認められなかったため、脳組織から m-RNA を抽出し CHMP2B の RT-PCR を行って、transcription 段階の異常を検討した。その結果、症例では C 末側が短縮し、異なるアミノ酸配列を有するスプライシングバリエントが存在していた。

このバリエントは少量正常対照にも認められ、直ちに病的とは言えないが、量的に多く封入体との関係が示唆された。

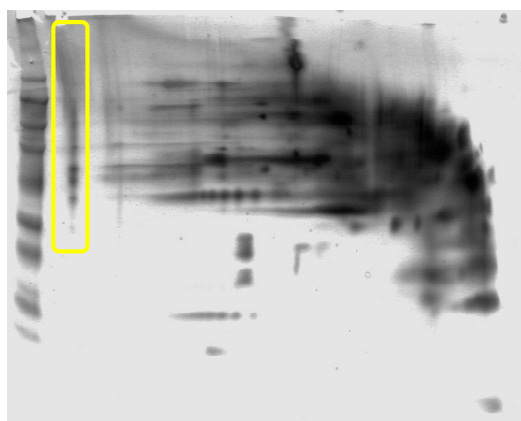
5) CHMP2B を含む異常構造物の推定

CHMP2B はエンドソーム輸送系の ESCRT-3 という大きな複合体の一部に組み込まれて機能する。本症例では通常では認められない高分子のバンドが Western blotting で認められており、ESCRT-3 自体が異常構造物(封入体)に含まれていることが疑われた。そこで、分子の高次構造を保ったまま二次元電気泳動を行いコントロールと比較した。

Blue-native 二次元電気泳動でみると、高分子のところにはコントロールでは認められない縦のスポット群が認められた(黄色枠)。CHMP2B 抗体でのプロットを行い、この複合体が異常構造物であることを確認中である。

高分子

低分子



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Toyoshima Y, Takahashi H. TDP-43 pathology in polyglutamine diseases: with reference to amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 34(1): 77-82, 2014 (査読あり)
2. Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Shiga A, Tanaka H, Shimohata M, Kimura K, Morita T, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H. Transportin 1 accumulates in FUS inclusions in adult-onset ALS without

FUS mutation. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 39(5): 580-4, 2013 (査読あり)

3. Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, Yokoseki A, Arakawa K, Sekine Y, Shimohata T, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Onodera O, Takahashi H. Sporadic ALS with compound heterozygous mutations in the SQSTM1 gene. *Acta Neuropathol* 126(3): 453-9, 2013 (査読あり)
4. Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Autophagy-related proteins (p62, NBR1 and LC3) in intranuclear inclusions in neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett.* 522(2): 134-8, 2012 (査読あり)
5. Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Ikeda T, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Ubiquitin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. *Acta Neuropathol.* 124(1): 149-51, 2012 (査読あり)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA Yasuko)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：20334675

(2) 研究分担者

池内 健 (IKEUCHI Takeshi)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：20372469

高橋 均 (TAKAHASHI Hitoshi)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：90206839

(3) 連携研究者

()

研究者番号：