

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02356

研究課題名(和文) プリオン様蛋白の神経回路伝播と細胞応答

研究課題名(英文) Propagation of prion-like proteins and cellular responses

研究代表者

長谷川 成人 (HASEGAWA, Masato)

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・分野長

研究者番号：10251232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な疾患の剖検脳に蓄積するタウの生化学的解析から、患者脳に蓄積するタウは疾患ごとに異なる異常構造をとっていること、それが生化学的に区別できることを明らかにした。またADの原因遺伝子である APPがタウの伝播に促進的に働くことが示された。TDP-43の凝集に関わる配列を同定し、その合成ペプチドが線維を形成してプリオン様活性を有することも報告した。また断片化した シヌクレイン線維が最も高いプリオン様活性を示すことを明らかにした。さらに、ヒトにより近いモデルとして シヌクレイン伝播を再現するマームセットモデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed pathological tau in various neurodegenerative diseases and found that the C-terminal banding pattern of the insoluble tau is distinct for each disease, suggesting that the band patterns reflect different conformations of tau molecular species. We also showed that extracellular region of APP is involved in uptake of tau fibrils into cells, raising the possibility that APP influences cell-to-cell spreading of tau pathologies in AD. In addition, we identified that residues 274-353 are responsible for the conversion of TDP-43 to amyloid-like fibrils and that templated aggregation of TDP-43 by seeding with different peptides induces various types of TDP-43 pathologies. Regarding alpha-synuclein, we showed that fragmented amyloid-like aggregates of short alpha-synuclein fibrils are the key pathogenic seeds that trigger prion-like conversion, and that the propagation is recapitulated in wild-type marmoset by inoculation of sonicated mouse alpha-synuclein fibrils.

研究分野：神経病理学

キーワード：タウ シヌクレイン TDP-43 伝播

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患では変性する部位の細胞内に異常タンパク質の蓄積病変が観察され、その病変の分布や広がりや症状、あるいは病状の進行と密接な関係があることが知られている。この細胞内異常タンパク質がプリオンのように自身を鋳型に正常分子を異常型に変換、増殖、細胞間を伝播することで、病変が広がり病状が進行するという考えが提唱され、実験的にもこれを支持する報告がなされている。

2. 研究の目的

本研究は、神経変性疾患の異常タンパク質がどのように形成され、どのように細胞間を伝播するのか、そのメカニズムを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

- 1) 患者脳に蓄積するタウについて、様々な疾患脳から不溶性画分を調製し、生化学的に解析すると同時に超微形態も観察した。
- 2) タウの伝播に関係する分子として APP が関与する可能性について検討した。
- 3) TDP-43 の凝集機序を明らかにするため、欠損変異体を作製して凝集に関わる領域を検討した。
- 4) α シヌクレインに関して、どのような種類の分子がプリオン様特性を発揮するのか検討した。
- 5) ヒトに近いモデルとして小型霊長類のマーマセットを用いて α シヌクレイン伝播が再現されるか検討した。

4. 研究成果

- 1) アルツハイマー病(AD)、ピック病(PiD)、進行性核上性麻痺(PSP) 皮質基底核変性症(CBD)、タウ遺伝子変異例(MAPT)の患者剖検脳に蓄積する不溶性タウ(異常型タウ)について、様々な抗体を用いたイムノプロット解析、電子顕微鏡観察、さらには、トリプシン耐性領域のイムノプロット解析、アミノ酸配列及び質量分析など、詳細な解析を行った。その結果、疾患ごとに、蓄積するタウの分子種が異なるだけでなく、その線維の形態や重合構造が異なることが示された。
- 2) タウの細胞間伝播に関わる分子として、ADの原因遺伝子 APP が関わっている可能性を示したところ、APP を発現した細胞に外からタウ線維を添加すると、タウ線維が APP の細胞外領域に結合してとりこまれ、細胞内の正常タウを異常型に変換して線維化、凝集を引き起こすことが示された。
- 3) TDP-43 の凝集に関わる配列として、274-313、354-373 が同定された。それぞれの配列、及びその前後について、40 アミノ酸ペプチドを合成し、線維化傾向を調べた結果、234-273、274-313、314-353 の3種類のペプチドが線維形成しやすいこと、合成ペプチドを細胞内に導入すると、274-313、314-353 の合

成ペプチド線維を導入した細胞において、異常リン酸化 TDP-43 の凝集体が細胞質に形成されることを見出した。

- 4) 様々な条件下でインキュベートした α シヌクレインのプリオン様活性を細胞とマウスで検討した結果、超音波処理の時間が長く、断片化 α シヌクレイン線維の量が増加するほどシード活性が高くなることが示された。
- 5) 野生型マーマセットにマウス α シヌクレイン線維を接種すると、3 ヶ月後に、内在性マーマセット α シヌクレインが異常リン酸化されて蓄積し、病変が脳内に伝播することを確認した。病変は線条体から黒質に逆行性に広がり、黒質のチロシン水酸化酵素陽性のドパミン神経細胞が減少することが観察された。異常 α シヌクレイン構造物は β シート結合蛍光試薬でも検出された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 24 件)

1. Mano T, Nagata K, Nonaka T, Tarutani A, Imamura T, Hashimoto T, Bannai T, Koshi-Mano K, Tsuchida T, Ohtomo R, Takahashi-Fujigasaki J, Yamashita S, Ohyagi Y, Yamazaki R, Tsuji S, Tamaoka A, Ikeuchi T, Saido T, Iwatsubo T, Ushijima T, Murayama S, Hasegawa M, Iwata A. Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease. doi: 10.1073/pnas.1707151114. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E9645-E9654, 2017. (査読有)
2. Okada T, Keino-Masu K, Nagamine S, Kametani F, Ohto T, Hasegawa M, van Kuppevelt T, Kunita S, Takahashi S, and Masu M, Desulfation of Heparan Sulfate by Sulf1 and Sulf2 Is Required for Corticospinal Tract Formation. doi: 10.1038/s41598-017-14185-3. *Sci Rep* 7: 13847, 2017. (査読有)
3. Izumikawa K, Nobe Y, Yoshikawa H, Ishikawa H, Miura Y, Nakayama H, Nonaka T, Hasegawa M, Egawa N, Inoue H, Nishikawa K, Yamano K, Simpson RJ, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N: TDP-43 stabilises the processing intermediates of mitochondrial transcripts. doi: 10.1038/s41598-017-06953-y. *Sci Rep* 7: 7709, 2017. (査読有)
4. Shimozawa A, Ono M, Takahara D, Tarutani A, Imura S, Masuda-Suzukake M, Higuchi M, Yanai K, Hisanaga SI, Hasegawa M: Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain. doi: 10.1186/s40478-017-0413-0 *Acta Neuropathol Commun* 5:12, 2017. (査読有)
5. Eguchi K, Taoufiq Z, Thorn-Seshold O, Trauner D, Hasegawa M, Takahashi T: Wild-type monomeric α -synuclein can impair vesicle endocytosis and synaptic

- fidelity via tubulin polymerization at the calyx of Held. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0179-17.2017. *J Neurosci* 37: 6043-6052, 2017. (査読有)
6. Tanaka Y, Suzuki G, Matsuwaki T, Hosokawa M, Serrano G, Beach TG, Yamanouchi K, Hasegawa M, Nishihara M. Progranulin regulates lysosomal function and biogenesis through acidification of lysosomes. doi: 10.1093/hmg/ddx011. *Hum Mol Genet* 26:969-988, 2017. (査読有)
 7. Hosokawa M, Kondo H, Serrano GE, Beach TG, Robinson AC, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M, Arai T: Accumulation of multiple neurodegenerative disease-related proteins in familial frontotemporal lobar degeneration associated with granulin mutation. doi: 10.1038/s41598-017-01587-6. *Sci Rep* 7:1513, 2017. (査読有)
 8. Urrea L, Segura-Feliu M, Masuda-Suzukake M, Hervera A, Pedraz L, Aznar J, Vila M, Samitier J, Torrents E, Ferrer I, Gavín R, Hasegawa M, José Antonio del Río: Involvement of Cellular Prion Protein in α -Synuclein Transport in Neurons. doi:10.1007/s12035-017-0451-4. *Mol Neurobiol* 2017. (査読有)
 9. Tarutani A, Suzuki G, Shimozawa A, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga S, and Hasegawa M. The Effect of Fragmented Pathogenic α -Synuclein Seeds on Prion-like Propagation. doi: 10.1074/jbc.M116.734707. *J Biol Chem* 291: 18675-88, 2016. (査読有)
 10. Imamura K, Sahara N, Kanaan N, Tsukita K, Kondo T, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Kawakami K, Hotta A, Yawata S, Watanabe D, Hasegawa M, Trojanowski J, Lee V, Suhara T, Higuchi M, and Inoue H. Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons. doi: 10.1038/srep34904. *Sci Rep* 6:34904, 2016. (査読有)
 11. Oikawa T, Nonaka T, Terada M, Tamaoka A, Hisanaga S, Hasegawa M. α -Synuclein Fibrils Exhibit Gain of Toxic Function, Promoting Tau Aggregation and Inhibiting Microtubule Assembly. doi: 10.1074/jbc.M116.736355. *J Biol Chem* 291: 15046-56, 2016.(査読有)
 12. Kimura T, Hosokawa T, Taoka M, Tsutsumi K, Ando K, Ishiguro K, Hosokawa M, Hasegawa M, Hisanaga S. Quantitative and combinatory determination of in situ phosphorylation of tau and its FTDP-17 mutants. doi: 10.1038/srep33479. *Sci Rep*. 6:33479, 2016. (査読有)
 13. Kim C, Lv G, Lee JS, Jung BC, Masuda-Suzukake M, Hong CS, Valera E, Lee HJ, Paik SR, Hasegawa M, Masliah E, Eliezer D, Lee SJ. Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of α -synuclein fibril. doi: 10.1038/srep30891. *Sci Rep* 6:30891, 2016. (査読有)
 14. Kametani F, Obi T, Shishido T, Akatsu H, Murayama S, Saito Y, Yoshida M, & Hasegawa M. Mass spectrometric analysis of accumulated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis brains. doi: 10.1038/srep23281. *Sci Rep* 6: 23281, 2016. (査読有)
 15. Shimonaka S, Nonaka T, Suzuki G, Hisanaga SI, Hasegawa M. Templated aggregation of TDP-43 by seeding with TDP-43 peptide fibrils. doi: 10.1074/jbc.M115.713552. *J Biol Chem* 291: 8896-907, 2016. (査読有)
 16. Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. Gain-of-function proflin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. doi: 10.1093/hmg/ddw024. *Hum Mol Genet* 25:1420-33, 2016.(査読有)
 17. Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H, Hasegawa M. Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. doi: 10.1074/jbc.M115.695379. *J Biol Chem* 291:5473-83, 2016.(査読有)
 18. Taniguchi-Watanabe S, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tarutani A, Murayama S, Saito Y, Arima K, Yoshida M, Akiyama H, Robinson A, Mann D, Iwatsubo T, Hasegawa M. Biochemical classification of tauopathies by immunoblot, protein sequence and mass spectrometric analyses of sarkosyl-insoluble and trypsin-resistant tau. doi: 10.1007/s00401-015-1503-3. *Acta Neuropathol* 131: 267-80, 2016. (査読有)
 19. Tan R, Kril J, McGinley C, Hassani M, Suzukake M, Hasegawa M, Remika M, Kiernan M, Halliday G. Cellerbeller neuronal loss in ALS cases with ATXN2 intermediate repeat expansions. doi: 10.1002/ana.24565. *Ann Neurol* 79:295-305, 2016.(査読有)
 20. Kimura T, Hatsuta H, Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Ishiguro K, Akiyama H, Murayama S, Hasegawa M, Hisanaga S. The abundance of nonphosphorylated tau in mouse and human tauopathy brains revealed by the use of Phos-tag method. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.009. *Am J Pathol* 186: 398-409, 2016. (査読有)
 21. Ikeda C, Yokota O, Nagao S, Ishizu H, Oshima E, Hasegawa M, Okahisa Y, Terada S, Yamada N. The relationship between development of neuronal and astrocytic tau pathologies in subcortical nuclei and progression of argyrophilic grain disease. doi: 10.1111/bpa.12319. *Brain Pathol*. 26:488-505, 2016. (査読有)

22. Takahashi M, Miyata H, Kametani F, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga S, Hasegawa M. Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. doi: 10.1007/s00401-015-1415-2. *Acta Neuropathol* 29: 895- 907, 2015. (査読有)
23. 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. doi: 10.1097/NEN.000000000000158. *J Neuropathol Exp Neurol* 74:158-65, 2015. (査読有)
24. 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. doi: 10.1111/nan.12178. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 41:601-12, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 29 件)

1. 長谷川成人 孤発性タウオパチーの分子病態 第 36 回日本認知症学会学術集会シンポジウム, 2017.
2. 長谷川成人 タウ、 α シヌクレインの伝播. 第 12 回 臨床ストレス応答学会大会 シンポジウム, 2017.
3. Hasegawa M: TDP-43 prions. Joint Meeting of PACTALS & Brain Protein Aging and Dementia Control, 2017. 9. 21. Kyoto.
4. Hasegawa M: α Synuclein. World Congress of Neurology (WCN2017), 2017.
5. Hasegawa M: FTLTDP-43 and FTLTDP-FUS. Emerging Concepts in the Biology of Frontotemporal Lobar Degeneration, Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2017, 2017.
6. 長谷川成人 α シヌクレイン伝播の動物モデル. 第 58 回 日本神経病理学会学術集会, 2017.
7. Hasegawa M: Tau / TDP-43 prions, Invited Lectures: Expansion of prion concept, PRION 2016, 2016.
8. Hasegawa M: α Synuclein prions, Luncheon Seminar 4, PRION 2016, 2016.
9. 長谷川成人 PSP/CBD 脳に蓄積するタウの生化学解析 第 57 回日本神経学会学術大会 シンポジウム, 2016.
10. Tarutani A, Suzuki G, Shimozawa A, Nonaka T, Hisanaga S, Hasegawa M: Pathogenic α -synuclein species in prion-like seeded aggregation. 第 39 回 日本神経科学学会大会, 2016.

11. 長谷川成人 神経変性疾患における異常タンパク質の伝播. 第 20 回日本神経感染症学会 特別企画 「日本人研究者の発見: アミロイドーシスの伝播と神経系」, 2015.
12. 長谷川成人 タウオパチーの生化学. 第 9 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres オープニングセミナー8, 2015.
13. Hasegawa M, Molecular analyses of pathological tau in tauopathy brains. Brain Protein Aging and Dementia Control. 1st International Symposium. Molecular bases of brain protein aging, 2015. 他

〔図書〕(計 12 件)

1. Hasegawa M, Nonaka T, Masuda-Suzukake M. Prion-like mechanisms and potential therapeutic targets in neurodegenerative disorders. *Pharmacol Ther* 172:22-33, 2017.
2. Nonaka T and Hasegawa M. TDP-43 prions. Prion Disease (ed. S. Prusiner), *Cold Spring Harb Lab Press*, New York, 2017, pp451-460.
3. Hasegawa M, Nonaka T, Masuda-Suzukake M. α -Synuclein: Experimental pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6, 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/dementia/Neuropathol/toppage.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 成人(HASEGAWA, Masato)
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・分野長
研究者番号: 10251232