

令和元年6月11日現在

機関番号：82609

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26117005

研究課題名(和文) タンパク質の老化基盤と病原性タンパク質の伝播機構

研究課題名(英文) Molecular bases of pathogenic proteins and mechanisms of the propagation

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) 106,900,000円

研究成果の概要(和文)：MSA患者脳から抽出した異常型 シヌクレインは、DLB患者から抽出したものよりも高いプリオン様活性を示し、合成線維がそれ以上の活性を有していた。切断が シヌクレインの伝播特性に与える影響について検討した結果、ヒト シヌクレインのC末端およびN末端切断の両方が線維の多形を誘導し、異なる交差播種活性を示すことが判明した。C9ORF72リピートはpoly-GAの凝集体が形成され、TDP-43の細胞内凝集を誘導することが判明した。興味深いことに、Poly-GA凝集体はTDP-43の細胞内凝集を誘導したが、タウまたは シヌクレインの蓄積は誘導しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シヌクレインが蓄積する疾患はパーキンソン病やレビー小体型認知症、多系統萎縮症などいくつかあるが、その病態が異なる理由として、異なる異常構造の シヌクレインが伝播することによっておこる可能性を示唆した。また、C9ORF72の遺伝子変異は欧米ではALSの原因で最も多い変異と報告されているが、その原因が変異によって生じるGA-repeat蛋白が凝集し、TDP-43が異常型に変化する足場を形成する可能性があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：MSA-syn showed similar seeding activity to the synthetic fibrils, although DLB-syn showed a lower seeding activity (Tarutani et al, Acta Neuropathol Commun 2018). N-terminally 10- or 30-residues-truncated human -syn fibrils induced more abundant -syn pathologies than WT fibrils in mice, whereas other truncated fibrils induced less abundant pathologies (Terada et al, J Biol Chem 2018). Abnormal expansion of a hexanucleotide repeat in an intron of C9ORF72 induced aggregation of poly-GA protein, which may be the mechanism to induce TDP-43, but not tau or -syn (Nonaka et al, Hum Mol Genet 2018).

研究分野：神経病理

キーワード：タウ シヌクレイン TDP-43 C9ORF72 神経変性 プリオン 伝播

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、ある特定の神経細胞群が原因不明の変性を起こして脱落することにより、失われた神経細胞が担っている認知機能や運動機能等の脳機能に障害が出現し、徐々に進行して死に至る難病である。80年代後半から分子遺伝学の進歩に伴い病気の発症原因となる遺伝子が次々と同定され研究が飛躍的に発展した。しかしながら、未だその根本治療法は見出されておらず、人口の高齢化に伴い、患者数は増加の一途をたどっている。近年、神経変性疾患の病態形成、進行を説明する新しい考え方が提唱され、大きな注目を集めている。タンパク質は、細胞内で作られ、あるべき構造に折り畳まれ、ある場所に運ばれ、一定期間役割を果たして分解、除去される。しかしながら、老化によりタンパク質の品質管理機能が低下すると、不良タンパク質が増加し、その中に異常プリオンのような、自身を鋳型に正常分子を異常型に変換する能力をもつものが現れ、それが徐々に増殖する。異常型分子は一つの細胞に留まらず、細胞間を伝わって伝播し、病変が拡大、病気が進行する。研究代表者は、世界に先駆けて細胞モデルでの検証、野生型マウスにおける動物モデルでの検証、さらには実際に患者脳由来の異常タンパク質がプリオン様性質をもつことを提示してきた。

### 2. 研究の目的

神経変性疾患の患者脳に蓄積するタンパク質に、異常型プリオンと同じように正常型分子を異常型に変換する能力があるのか、またその変換の強さ、効率はどの程度か、プリオンとの構造の共通点と相違点は何か、どのような機序で細胞間を伝わるか、などについて、培養細胞への導入実験、及び動物への接種実験等を行って明らかにする。プリオン病における PrP プリオンに関しては、それぞれの PrP プリオンを、同一人物内である auto-propagation、ヒトからヒトである allo-、種を越えた感染である xeno-、というように分類し、さらに PrP のアミノ酸を越えた感染であるのか越えない感染であるのかで、trans-sequence または cis-sequence と分類し、さらに PrP の異常化を促進する条件 conversion-prone condition なのか、抑制する conversion-resistant condition なのかを分類できるように感染実験を行う。

### 3. 研究の方法

① 種々の変性疾患の患者剖検脳から異常タンパク質を含む画分を調製し、培養細胞系を用いて正常分子を異常型に変換するプリオン様活性があるかを検討する。また野生型、過剰発現マウスの脳への接種実験を行い、病理が形成されるか免疫組織、生化学的解析を行う。

② どのような種類の異常分子に最も強いプリオン様活性が認められるか、分画を行った試料を培養細胞、マウス脳に接種して検討する。同時に、プロテアーゼ、熱、オートクレーブ、ギ酸処理など、プリオン活性を抑制する処理や薬剤についての検討を行う。

③ 異常プリオンの検出法として開発された異常タンパク質増幅法が、タウ、 $\alpha$  シヌクレイン、TDP-43 などに適用できないか、患者脳由来の試料を用いて検討を進める。

④ 脳の接種部位を変え、時間経過を追って異常病変の広がり、伝播様式を解析すると共に、電子顕微鏡観察等を行い、シナプスを越えるメカニズムや細胞間伝播について解析する。

⑤ 培養細胞で効果があった薬剤についてはマウスに投与し、伝播の抑制効果を評価する。

⑥ プリオン病については、種々のノックインマウスへの感染実験を行い、その発症を評価することにより、プリオンの感染、伝播機構の解明を行う。具体的には、異常プリオンの種類ごとに、ヒトからヒトへの感染が成立しない auto-propagation か、ヒトからヒトへの感染実験が成立する allo-propagation か、種を越えて感染する xeno-propagation か、アミノ酸配列を越えて感染する trans-sequence か、越えない cis-sequence か、分類を行う。

### 4. 研究成果

多くの神経変性疾患の原因となるタウに関しては、様々なタウオパチー患者脳に蓄積する異常型タウを生化学、蛋白質化学的に詳細に解析し、AD, PiD, PSP, CBD, FTDP-17 について、その線維の中心構造を形成する領域の配列を明らかにした。またそれぞれの疾患脳から異常型タウを調製し、それを野生型マウスの脳に接種すると6~9ヶ月後に患者脳のタウ病変とよく似た異常型タウ病変が形成されることを明らかにした。パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症の神経変性の原因となる $\alpha$ シヌクレインに関しても、レビー小体として蓄積する異常型 $\alpha$ シヌクレインとMSAのオリゴドンドロサイトに蓄積する異常型 $\alpha$ シヌクレインのプリオン様シード活性が著しく異なることを培養細胞モデルや野生型マウスへの接種実験によって示した。またその細胞モデルや野生型マウスに病変を引き起こす最小量についても希釈系列を作って導入する実験を行って決定した。さらに合成 $\alpha$ シヌクレイン線維、MSAの異常型 $\alpha$ シヌクレイン線維のプリオン様活性については、どのような処理をすれば不活性化するかについて検討を加え、異常型プリオンと同様の処理(134℃, 20分の処理、あるいは1% SDS と組み合わせたオートクレーブ処理)が完全不活性化には必要であることを明らかにした。その他、

ALS/FTLD の原因遺伝子として知られる C9ORF72 の反復の異常伸長について、TDP-43 病変形成との関連について検討を行い、C9ORF72 リピートは、ATG 非依存的翻訳により、ジペプチドリピートタンパク質(DPRs)を産生し、リピート伸長によって poly-GA の凝集体が形成されること、またそれが TDP-43 の細胞内凝集を誘導することを明らかにした。

プリオン感染に関しては、頭蓋内投与では、M1 プリオンも V2 プリオンも 100% 感染が成立する一方、末梢ルートでの感染では M1 プリオンは、129Met/Met では感染せず 129Val/Val で 37.5% の率で感染が成立すること、また V2 プリオンは 129Met/Met の 57% に 129Val/Val では 94% の率で感染が成立することを明らかにした。すなわち、V2 プリオンが明らかに末梢ルートでも感染しやすく、一方 M1 プリオンは感染しがたいことが感染実験から明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 84 件 ) ( すべて査読有 )

1. Kobayashi A, Iwasaki Y, Takao M, Saito Y, Iwaki T, Qi Z, Torimoto R, Shimazaki T, Munesue Y, Isoda N, Sawa H, Aoshima K, Kimura T, Kondo H, Mohri S, Kitamoto T. A Novel Combination of Prion Strain Co-Occurrence in Patients with Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Am J Pathol* 189:1276-1283, 2019. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.02.012.
2. Kobayashi A, Matsuura Y, Takeuchi A, Yamada M, Miyoshi I, Mohri S, Kitamoto T. A domain responsible for spontaneous conversion of bank vole prion protein. *Brain Pathol* 29: 155-163, 2019. doi: 10.1111/bpa.12638.
3. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Shimozawa A, Hirai S, Okado, H., Hasegawa, M. C9ORF72 dipeptide repeat poly-GA inclusions promote: intracellular aggregation of phosphorylated TDP-43. *Hum Mol Genet* 27: 2658–2670, 2018. doi: 10.1093/hmg/ddy174.
4. Terada T, Suzuki G, Nonaka T, Kametani F, Tamaoka A, and Hasegawa M. The effect of truncation on prion-like properties of  $\alpha$ -synuclein. *J Biol Chem* 293: 13910-13920, 2018. doi: 10.1074/jbc.RA118.001862.
5. Tarutani, A, Arai T, Murayama, S., Hisanaga, S.I., Hasegawa, M. Potent prion-like behaviors of pathogenic  $\alpha$ -synuclein and evaluation of inactivation methods. *Acta Neuropathol Commun* 6: 29, 2018. doi: 10.1186/s40478-018-0532-2.
6. Shimozawa A, Ono M, Takahara D, Tarutani A, Imura S, Masuda-Suzukake M, Higuchi M, Yanai K, Hisanaga SI, Hasegawa M. Propagation of pathological  $\alpha$ -synuclein in marmoset brain. *Acta Neuropathol Commun* 5: 12, 2017. doi: 10.1186/s40478-017-0413-0.
7. 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. *Hum Mol Genet* 26: 969-988, 2017. doi: 10.1093/hmg/ddx011.
8. 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. *Sci Rep* 7: 1513, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-01587-6.
9. Takeuchi A, Kobayashi A, Morita M, Kitamoto T. Application of protein misfolding cyclic amplification for the rapid diagnosis of acquired Creutzfeldt-Jakob disease. *Medical Research Archives*, Vol. 5, 1-11, 2017. doi: 10.1038/labinvest.2016.27.
10. Tarutani A, Suzuki G, Shimozawa A, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga S, and Hasegawa M. The Effect of Fragmented Pathogenic  $\alpha$ -Synuclein Seeds on Prion-like Propagation. *J Biol Chem* 291: 18675-88, 2016. doi: 10.1074/jbc.M116.734707.

11. Oikawa T, Nonaka T, Terada M, Tamaoka A, Hisanaga S, Hasegawa M.  $\alpha$ -Synuclein Fibrils Exhibit Gain of Toxic Function, Promoting Tau Aggregation and Inhibiting Microtubule Assembly. *J Biol Chem* 291: 15046-56, 2016. doi: 10.1074/jbc.M116.736355.
12. 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. *Sci Rep* 6: 23281, 2016. doi: 10.1038/srep23281.
13. Shimonaka S, Nonaka T, Suzuki G, Hisanaga SI, Hasegawa M. Templated aggregation of TDP-43 by seeding with TDP-43 peptide fibrils. *J Biol Chem* 291: 8896-907, 2016. doi:10.1074/jbc.M115.713552
14. Tanaka Y, Nonaka T, Suzuki G, Kametani F, Hasegawa M. Gain-of-function profilin 1 mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis cause seed-dependent intracellular TDP-43 aggregation. *Hum Mol Genet* 25: 1420-33, 2016. doi: 10.1093/hmg/ddw024.
15. 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 $\delta$  Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J Biol Chem* 291: 5473-83, 2016. doi: 10.1074/jbc.M115.695379.
16. 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. *Acta Neuropathol* 131: 267-80, 2016. doi: 10.1007/s00401-015-1503-3.
17. Takeuchi A, Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Morita M, Uno S, Kitamoto T. Distinctive properties of plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in cell-protein misfolding cyclic amplification. *Lab Invest* 96: 581-7, 2016. doi: 10.1038/labinvest.2016.27.
18. Kobayashi A, Matsuura Y, Iwaki T, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi H, Murayama S, Takao M, Kato S, Yamada M, Mohri S, Kitamoto T. Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease MM1+2C and MM1 are Identical in Transmission Properties. *Brain Pathol.* 2016, 26: 95-101. doi: 10.1111/bpa.12264.
19. Kobayashi A, Teruya K, Matsuura Y, Shirai T, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Mohri S, Kitamoto T. The influence of PRNP polymorphisms on human prion disease susceptibility: an update. *Acta Neuropathol.* 2015, 130:159-70. doi: 10.1007/s00401-015-1447-7.
20. Kobayashi A, Parchi P, Yamada M, Brown P, Saverioni D, Matsuura Y, Takeuchi A, Mohri S, Kitamoto T. Transmission properties of atypical Creutzfeldt-Jakob disease: a clue to disease etiology? *J Virol.* 2015, 89:3939-46. doi: 10.1128/JVI.03183-14.

[学会発表](計40件)

1. Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological tau in neurodegenerative diseases. ICN2018 Symposium 12, Protein Propagation in Neurodegeneration, 2018.
2. Hasegawa M:  $\alpha$ Synuclein in Parkinson's disease and related disorders. WCP2018 KYOTO (18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology), 2018.
3. Hasegawa M: Transmission of  $\alpha$ Synuclein. 16th International Symposium on Amyloidosis (ISA2018), 2018.
4. Hasegawa M:  $\alpha$ Synuclein. XXIII World Congress of Neurology (WCN2017), 2017.
5. Hasegawa M: FTLT-TDP-43 and FTLT-FUS. Emerging Concepts in the Biology of Frontotemporal Lobar Degeneration, Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2017, 2017.

〔図書〕(計 4件)

1. Hasegawa M, Nonaka T, Masuda-Suzukake M.  $\alpha$ -Synuclein: Experimental pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: (ed. S. Prusiner), Cold Spring Harb Lab Press, New York, 305-318, 2017.
2. Nonaka T and Hasegawa M. TDP-43 prions. Prion Diseases, *Cold Spring Harb Perspect Med* Chapter 41: a024463, 2017. (ed. S. Prusiner), Cold Spring Harb Lab Press, New York, pp451-460, 2017.
3. 長谷川成人：認知症発症メカニズムの新しい説. 脳の神秘を探ってみよう. 朝日新聞出版, 日本, pp102-111, 2017.
4. Hasegawa M. Molecular biology of dementia with Lewy bodies. *Dementia with Lewy Bodies* Springer: (ed. K. Kosaka), Springer Nature, Japan, pp41-55, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：北本哲之

ローマ字氏名：(KITAMOTO, tetsuyuki)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院医学系研究科・医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20192560

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：ローマ字氏名

野中 隆：(NONAKA, takashi)

樽谷 愛理：(TARUTANI, airi)

下沢 明希：(SHIMOZAWA, aki)

細川 雅人：(HOSOKAWA, masato)

鈴木 元治郎：(SUZUKI, genjiro)

鈴掛 雅美：(SUZUKAKE, masami)

竹内 敦子：(TAKEUCHI, atsuko)