

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591024  
 研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭型認知症の脳に蓄積する核内蛋白質の解析と病態の解明  
 研究課題名（英文）Analyses of the nuclear protein that aggregates in brains of patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration  
 研究代表者  
 新井 哲明（ARAI TETSUAKI）  
 財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・主任研究員  
 研究者番号：90291145

研究成果の概要（和文）：TDP-43 は、前頭側頭葉変性症(FTLD-U)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)の特徴的病理所見であるユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白である。細胞内に蓄積した TDP-43 はリン酸化および断片化されている。我々は、リン酸化 TDP-43 特異抗体の作製に成功し、蓄積 TDP-43 の C 末端側のリン酸化部位を同定した。さらに、これらの抗体を用いた解析により、断片化のパターンは FTLD-U の TDP-43 病理サブタイプによって異なること、リン酸化および断片化した TDP-43 の蓄積は、アルツハイマー病やレビー小体型認知症などの他の多くの認知症性疾患においても生じることを見出した。以上から、TDP-43 の異常は広く神経変性に関与している可能性が高い。さらに、TDP-43 凝集体を形成する細胞モデルを構築し、TDP-43 の断片化が蓄積を促進する要因の一つであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：TAR DNA-binding protein of  $M_r$  43 kDa (TDP-43) is a major component of the tau-negative and ubiquitin-positive inclusions that characterize amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration which is now referred to as FTLD-TDP. Concurrent TDP-43 pathology has been reported in a variety of other neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, forming a group of TDP-43 proteinopathy. Accumulated TDP-43 is characterized by phosphorylation and fragmentation. There is a close relationship between the pathological subtypes of FTLD-TDP and the immunoblot pattern of the C-terminal fragments of phosphorylated TDP-43. These results suggest that proteolytic processing of accumulated TDP-43 may play an important role for the pathological process. In cultured cells, transfected C-terminal fragments of TDP-43 are more prone to form aggregates than full-length TDP-43. Understanding the mechanism of phosphorylation and truncation of TDP-43 and aggregate formation may be crucial for clarifying the pathogenesis of TDP-43 proteinopathy and for developing useful therapeutics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：封入体、神経変性疾患、認知症、運動障害、リン酸化、人格変化

### 1. 研究開始当初の背景

認知症を呈する疾患は、65歳未満の初老期に発症するものと、65歳以上の老年期に発症するものに大別される。初老期に発症する認知症性疾患の中では、アルツハイマー病が最も多く、次いで前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal lobar degeneration: FTL) が頻度が高い。FTLDは、タウオパチーと総称されるタウ陽性封入体を伴う群と、タウ陰性ユビキチン陽性封入体を伴う群に分けられる。後者の群では、しばしば筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) と同様の運動ニューロン変性を伴う。

多くの認知症性神経変性疾患の脳においては、特定の蛋白質の細胞内蓄積が神経変性の原因になっていると考えられている。例えば、アルツハイマー病におけるタウやパーキンソン病における $\alpha$ -シヌクレインである。また、これらの蓄積蛋白質の多くはユビキチン化していることが知られている。ユビキチンは、細胞内で不要な蛋白質に結合し、プロテアソームによる分解の指標となる分子である。タウや $\alpha$ -シヌクレインは、ユビキチン化はされたものの何らかの原因で分解されずに蓄積し、神経変性に関与していると考えられる。上記のFTLDおよびALSにおいても、ユビキチン化された何らかの蛋白質が蓄積していると考えられたが、それが何であるかは長い間不明であった。2006年、我々およびペンシルバニア大学のグループの研究結果から、TDP-43という核蛋白質の細胞内蓄積がFTLDとALSの両疾患脳に生じていることが始めて示された。これにより、TDP-43の蓄積機構を解明し、それを防ぐことによる疾患の予防・治療法開発の可能性が出てきた。そのためには、まず患者脳内に蓄積したTDP-43にはどのような異常が生じているのかを蛋白質化学的に明らかにするとともに、細胞あるいは動物を用いた実験でその異常が疾患と同様の病変を引き起こすことを証明する必要がある。

### 2. 研究の目的

(1)FTLD-U および ALS 患者脳に蓄積したTDP-43は異常なリン酸化を受けているが、その病的意義は不明であり、リン酸化部位も明らかにされていない。これらを明らかにするため、リン酸化TDP-43を特異的に認識するポリクローナル抗体を作製し、剖検脳を用いた免疫組織化学的・生化学的解析を行った。  
(2)TDP-43の異常はFTLD-UとALSに特異的な

ものと当初考えられたが、その後アルツハイマー病 (AD) などの他の神経変性疾患にもTDP-43の蓄積が認められる例があることが報告された。しかしながら、これらの報告に用いられた市販抗体はリン酸化非依存性であり、生化学的解析もなされていないことから、蓄積したTDP-43の性状については不明な点が多く、FTLD-Uとの関係やTDP-43蓄積の病的意義も不明であった。そこで、自ら作製したリン酸化TDP-43 (pTDP-43) 特異抗体を用い、AD、レビー小体型認知症 (DLB)、嗜銀顆粒病、ハンチントン病例について免疫組織化学的・生化学的解析を行った。

(3)TDP-43の蓄積機構やそれによる細胞障害機構、蓄積抑制による治療薬開発などのために培養細胞や実験動物を用いたTDP-43蓄積モデルの開発が必要である。そこで、まず培養細胞を用い、TDP-43の細胞内凝集体モデルの構築を試みた。

### 3. 研究の方法

(1)TDP-43中に存在する50ヶ所のセリン/スレオニン部位中36ヶ所を選んでリン酸化ペプチドを作製し、ウサギに免疫した。血清中の抗体価およびその特異性について、ELISAおよび患者剖検脳を用いた免疫組織化学・生化学的検討により評価した。免疫反応性および特異性が確認できた抗体を用い、種々の疾患の患者剖検脳の免疫組織化学染色および不溶性画分の免疫プロットを行い、蓄積したTDP-43の異常を明らかにした。

(2)SH-SY5Y細胞を用い、種々のTDP-43の欠損変異体を発現させることにより、核移行シグナル(NLS)を同定するとともに、TDP-43の蓄積について免疫組織化学的・生化学的に解析した。

### 4. 研究成果

(1)TDP-43のC末端側のリン酸化ペプチドに対する抗体は、FTLDおよびALSの脊髄に出現する神経細胞内封入体を陽性に染色したが、神経細胞核は染色しなかった。これらの抗体で認識される異常構造の数は、抗ユビキチン抗体およびリン酸化非依存性抗TDP-43抗体を用いた免疫染色によるものより多かった。両疾患の剖検脳から調製したサルコシル不溶性画分の免疫プロットでは、45kDaと25kDaのバンドおよびスミアが陽性を示し、これらの免疫反応はサンプルの脱リン酸化により消失した。以上の結果から、作製した抗体は患者脳に蓄積したpTDP-43を特異的に認識することが証明された。これらの結果は、

pTDP-43 を特異的に認識する抗体の作製および蓄積 TDP-43 のリン酸化部位を世界で初めて成功した点で画期的である。TDP-43 の C 末端側のリン酸化は疾患特異的な現象であり、FTLD-U および ALS の病理過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) すべての疾患で高頻度に pTDP-43 の蓄積を認め、少なくとも TDP-43 の C 末端側のリン酸化は全ての疾患に共通に生じていることが示唆された。AD および DLB では、大脳新皮質の pTDP-43 陽性構造のパターンが FTLD-U の Type 3 に類似し、さらにこれらの症例の不溶性画分のイムノプロットで認められた C 末断片のパターンも、以前我々が明らかにした FTLD-U の Type 3 に一致した。PGRN 遺伝子変異による FTLD-U は必ず Type 3 を示すことや、家族性 AD で PGRN の変異を有する例が最近報告されていることから、これらの例では PGRN の遺伝子レベルあるいは蛋白レベルでの異常がある可能性が示唆された。また、これらの一連の結果は、TDP-43 の異常が、当初予想されたよりも広く神経変性に関与する可能性を示唆している。

(3) 候補配列として検索された 2 つの領域 (78-84 残基および 187-192 残基) の欠損変異体を SH-SY5Y 細胞に発現させた結果、78-84 残基が NLS であることが判明した。これらの欠損変異体を細胞に発現させ、さらにプロテアソーム阻害剤処理を行うと、細胞質内あるいは核内に凝集体が出現した。これらの凝集体は患者脳で見られる凝集体と大きさが似ており、ユビキチン抗体および pTDP-43 特異抗体に陽性であった。さらに、green fluorescent protein (GFP) と結合した TDP-43 の N 末端側あるいは C 末端側断片を細胞に発現させると、ユビキチンおよび pTDP-43 陽性の凝集体が認められた。以上から、ヒト疾患脳に形成される TDP-43 凝集体形成を培養細胞で再現することに成功しており、この細胞モデルは病態解明や治療薬探索に有用であると考えられた。

## 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 63 件)

- 1 Arai T, Hasegawa M, 他 10 名: Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLD and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology*, 印刷中 (査読有り)
- 2 Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M: Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular

aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genetics* 18:3353-3364, 2009 (査読有り)

- 3 Arai T, Mackenzie IRA, Hasegawa M, 他 6 名: Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 117: 125-136, 2009 (査読有り)
- 4 Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle F, Akiyama H, Hasegawa M: Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 583: 394-400, 2009 (査読有り)
- 5 Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, 他 6 名: Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 117: 151-158, 2009 (査読有り)
- 6 新井哲明, 長谷川成人, 他 5 名: 神経変性疾患の新規原因分子: TDP-43. *実験医学* 27: 1324-1332, 2009 (査読無し)
- 7 Hasegawa M, Arai T, 他 13 名: Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and ALS. *Ann Neurol* 64: 60-70, 2008 (査読有り)
- 8 新井哲明, 長谷川成人, 他 3 名: FTLD/ALS における TDP-43 蓄積. *神経内科* 68: 540-547, 2008 (査読無し)
- 9 Hasegawa M, Arai T, 他 6 名: TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism-dementia complex brains. *Brain* 130: 1386-1394, 2007 (査読有り)
- 10 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人: FTLD および ALS に出現するユビキチン陽性封入体の主要構成成分としての TDP-43 の同定. *Dementia Japan* 21: 89-103, 2007 (査読無し)

[学会発表] (計 58 件)

- 1 Arai T, Mackenzie IRA, Hasegawa M, 他 8 名: Phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's disease 2009, Vienna, Austria, July 15, 2009
- 2 Arai T, Hasegawa M, 他 12 名: Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Society for Neuroscience 2008, Washington DC, USA, November 17, 2008
- 3 Arai T, Hasegawa M, 他 13 名: Accumulation of phosphorylated

TDP-43 in neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's disease 2008, Chicago, USA, July 28, 2008

- 4 Arai T: Accumulation of phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. 26th Annual Meeting of Japanese Society for Dementia Research, Osaka, Japan, October 17, 2007
- 5 Arai T: Accumulation of phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. Second International Research Workshop on Frontotemporal Dementia in ALS, London, Ontario, Canada, June 12, 2007

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

名称: TDP-43 蓄積細胞モデル  
発明者: 野中隆、新井哲明他  
権利者: 医学研究機構  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-101899  
出願年月日: 2008.4.9  
国内外の別: 国内

名称: 遺伝子変異を用いた筋萎縮性側索硬化症の予測法  
発明者: 糸川昌成、新井誠、長谷川成人、野中隆、秋山治彦、新井哲明  
権利者: 医学研究機構  
種類: 特願 2008-095035  
番号: 特許  
出願年月日: 2008.4.1  
国内外の別: 国内

名称: TDP-43 凝集物に特異的に結合する抗体  
発明者: 長谷川成人、新井哲明他  
権利者: 医学研究機構  
種類: 特許  
番号: 特願2007-178583  
出願年月日: 2007.7.7  
国内外の別: 国内

○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:

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新井 哲明 (ARAI TETSUAKI)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・主任研究員  
研究者番号: 90291145

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

長谷川 成人 (HASEGAWA MASATO)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員  
研究者番号: 10251232

