

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591108

研究課題名（和文）リン酸化 TDP-43 の測定系の確立と免疫電顕による細胞内局在の検討

研究課題名（英文）Establishment of immunoassay system for phosphorylated TDP-43 and the study of the localization of phosphorylated TDP-43 using the immunoelectron microscopy

## 研究代表者

藤田 行雄 (FUJITA YUKIO)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70420172

研究成果の概要（和文）：TDP-43 および FUS などの DNA/RNA 関連蛋白に関して研究を施行した。その結果、新規の *TARDBP* 遺伝子変異を見だし、その臨床病理像の詳細な報告をした。さらに *FUS* 遺伝子変異を有する ALS の報告、*FUS* 陽性封入体を有する孤発性 ALS の報告、ALS モデル動物の神経細胞変性に関する報告、TDP-43 と FUS の関連についてなど広く研究を行い国際誌、国際学会で発表した。

## 研究成果の概要（英文）：

Several studies about DNA/RNA binding proteins such as TDP-43 and FUS have examined. I found a novel *TARDBP* gene mutation in familial ALS patients and published the clinical and pathological findings of them in detail. Furthermore, I published the reports about a patient with familial ALS with *FUS* mutation, a patient with sporadic ALS with numerous FUS-positive inclusions, and the mechanism of neuronal degeneration of the model rats of ALS. I also read the paper about the relationship between TDP-43 and FUS at the international meetings.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：筋萎縮性側索硬化症、TDP-43、FUS、RNA 関連蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は代表的な神経変性疾患であり、国内外で多数の広範な研究がなされているが、一部の遺伝性のタイプ以外では神経細胞の変性機序はなお解明されておらず、確実な治療法も見つかっていない。

い。また、ユビキチン陽性封入体を有する前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) は、臨床的には他の疾患との鑑別が困難な例も多く、その確定診断には神経病理学的な検索が必要な状況である。近年 ALS と FTLD-U で認められるユビキチン陽性タウ陰性神経細胞内封入体の

構造物の主要構成蛋白として TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定され、現在ではこれらの疾患は TDP-43 proteinopathy として認識されるようになった。神経細胞内の TDP-43 の働きは十分に解明されていないが、リン酸化された TDP-43 が神経細胞死と関連していることが示唆されている。さらに、2009 年には TDP-43 と構造的、機能的に類似点の多い *fused in sarcoma (FUS)* が家族性 ALS (FALS) の原因遺伝子として同定された。FUS は TDP-43 と同じく DNA/RNA binding protein であり、ALS の神経細胞変性に関して RNA 関連蛋白の異常が注目されている。

(2) ALS で剖検例では神経病理学的に本来核に存在する TDP-43 が核の染色性を失い、その細胞質内に封入体を形成することが知られている。しかし、TDP-43 の核-細胞質間の移行についての超微形態的検討はなく、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 血清・髄液中のリン酸化 TDP-43 を測定するエライザ系を確立し、リン酸化 TDP-43 が TDP-43 proteinopathy のバイオマーカーとなるのか否か検討する。これにより ALS の早期診断が可能となれば、今後臨床治験、さらには根本的な治療薬の早期からの使用が可能となる。

(2) 本来核に存在する TDP-43 が細胞質内に異常蓄積するメカニズムを解明する。

(3) 顔面神経引き抜き損傷および切断損傷ラットの神経細胞変性機序にヒト ALS と同様のメカニズムがあるのか検討する。

(4) 当科で保存している ALS 剖検例から *TARDBP* および *FUS* 遺伝子変異を有する症例を見だし、その変異の頻度と臨床・病理学的な対応を検討する。さらに神経細胞質内封入体を有する細胞において、TDP-43 と *FUS* がいかなる局在を持っているのか検討する。

## 3. 研究の方法

(1) リン酸化 TDP-43 抗体を作製し、その感度について検討する。この抗体を用いて血清・髄液のリン酸化 TDP-43 を測定するエライザ系を構築する。その後、患者および正常対照の血清・髄液サンプルを測定する。

(2) 電顕用に固定された ALS 剖検例から (1) で作製した抗体を使い免疫電顕の手法を用いて検討する。

(3) 渡部らの作成した顔面神経引き抜き損傷および切断損傷ラットを用いる (Neuropathology, 2005)。損傷後各週齢のラットの顔面神経核の細胞数の変化および ALS で認められるような Golgi 装置の微細化 (Gonatas NK et al, 1992, 1994, Fujita et al. 1999) が認められるのかを抗 MG160 抗体を用いて免疫組織学的に検討する。

(4) ①これまで当科および関連病院で保存されている ALS 剖検例から DNA を抽出し、*TARDBP* および *FUS* 遺伝子変異の有無について検討する。遺伝子変異を有する例での臨床・病理学的所見を詳細に検討する。

②当科に保存されている ALS 剖検例について *FUS* 抗体を用いて全例免疫染色を施行し、孤発性 ALS において *FUS* 陽性封入体を有する例が存在するのか検討する。さらにこの検討により *FUS* 陽性封入体を有する ALS が見いだされた場合には TDP-43 および *FUS* に対する抗体による免疫 2 重染色、ミラー切片を用いた免疫染色を施行して、*FUS* 陽性封入体と TDP-43 との関係を検討する。

## 4. 研究成果

(1) TDP-43 の 409, 410 番目のセリンをリン酸化した C 末アミノ酸 12 残基配列に対して、高感度に検出するウサギポリクローナル抗体を作製した (論文 7)。これらの抗体を用いて 20 例の ALS 剖検例を用いてリン酸化 TDP-43 の異常を病理学的に検討した結果、運動ニューロン以外の神経細胞とグリア細胞および neuropil にも陽性所見を得た。このことから、ALS のリン酸化 TDP-43 の異常は中枢神経内に広く存在すること、さらに、今回作成したリン酸化 TDP-43 抗体は異常構造物だけを認識し、TDP-43 proteinopathy の病態解明に寄与する抗体であることを確認した (図 1)。



図 1 左：非リン酸化 TDP-43 抗体、右：今回作製したリン酸化 TDP-43 抗体

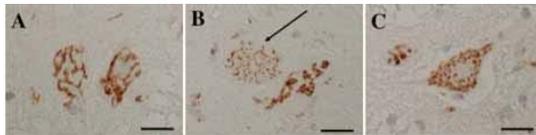
リン酸化 TDP-43 抗体は異常構造物のみを認識し周囲の正常の核に存在する TDP-43 を染色しない。

この抗体を用いて患者血清・髄液のリン酸化 TDP-43 を測定するエライザ系の確立を試みているが、その感度に問題があり現在のところ実用には至っていない。

(2) 細胞質内の TDP-43 陽性封入体が電顕で顆粒を伴う線維構造を呈することを確認した。さらに数を増やして検討中である。

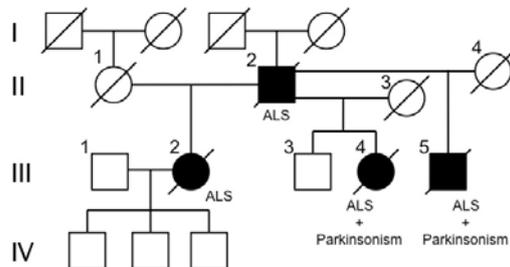
(3) 引き抜き損傷ラットでは顔面神経核の神経細胞数は損傷側において非損傷側に比べて4週齢の時点で20-30%に減少していた。それに対して切断損傷ラットでは明らかな神経細胞数の減少は認められなかった。一方、Golgi 装置の形態変化に関しては引き抜き損傷ではヒト ALS と同様の Golgi 装置の微細化が見られたが、切断損傷では Golgi 装置の連続性が失われるものの微細化は認められなかった (図 2)。このことから顔面神経引き抜き損傷ラットの神経細胞変性にはヒト ALS と同様の機序が関与していると考えられ、ALS 研究の有用なモデル動物になると考えられた。(論文 4)

図 2



A. 対照側, B. 引き抜き損傷でみられる Golgi 装置の微細化, C. 切断損傷では Golgi 装置の連続性は失われるが、微細化はみられない。

(4) ① 新規の *TARDBP* 遺伝子変異 (A315E) を有する家族性 ALS の一家系を見いだした (論文 2)。(III-2, III-4 において *TARDBP* A315E 遺伝子変異を認めた)



本家系中 4 例に ALS 症状 (黒塗り) が認められ、内 2 例ではパーキンソニズムを合併していた (III-4, III-5)。また、2 例 (III-2, III-4) の剖検所見では脊髄前角細胞など運動神経細胞の脱落とプニナ小体の存在、TDP-43 陽性の細胞質内・グリア細胞内の封入体を広範囲に認める点は共通した病理所見であったが、III-2 では後索病変を合併し、クラーク柱にも TDP-43 陽性封入体が認められた (図 3)。一方、ALS 症状に加えて parkinsonism を認めた例 (III-4) では著明な黒質変性と黒質神経細胞に TDP-43 陽性封入体が認められた (図 4)。本例では  $\alpha$ -シヌクレイン染色で異常は認められず、黒質の変性には TDP-43 が関与していると考えられた。

図 3 III-2

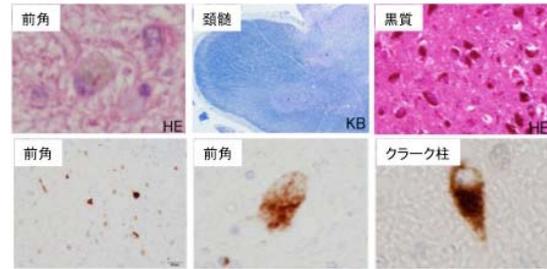
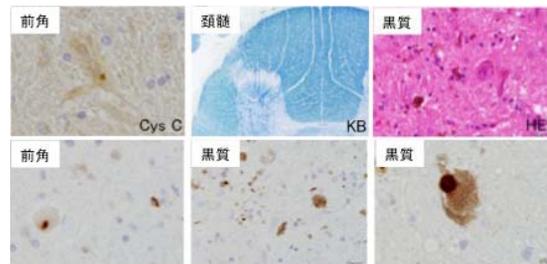


図 4 III-4



このように同一家系内で同じ *TARDBP* 遺伝子変異を有していてもその臨床症状、病理所見に差異があることはこれまで報告がなく、今後の遺伝子異常と ALS の臨床像を考える上で重要な報告である。

また、*TARDBP* 遺伝子の新規変異の他に *FUS* R521C 遺伝子変異を有する家系を見いだした (論文 5)。本例では若年発症、急速進行性の経過を示し、胸鎖乳突筋の萎縮を特徴とした。病理学的には著明な運動神経細胞の変性と好塩基性封入体、*FUS* 陽性の神経細胞内、グリア細胞内封入体の出現を特徴とした。

(4) ② 高齢発症の緩徐進行性の孤発性 ALS 例で好塩基性封入体および *FUS* 陽性封入体が多数見られる症例をみいだした (論文 3)。封入体は運動神経のみならず中枢神経内の非運動神経細胞を含め広く認められた (図 5)。この症例では *FUS* 遺伝子変異は認められず、孤発性 ALS でも *FUS* 陽性封入体を有する例があることを報告した。孤発性 ALS で *FUS* 陽性封入体を有するこのような症例は世界で数例しか報告がなく、今後の ALS 研究にとって貴重な報告であると考えられる。

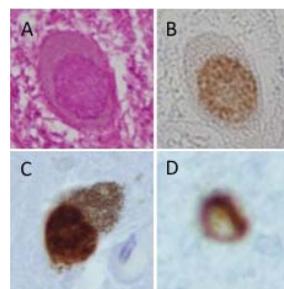


図 5 A 好塩基性封入体 (HE), B 同封入体は *FUS* 抗体で陽性. C 黒質神経細胞内の *FUS* 陽性封入体, D グリア細胞内の *FUS* 陽性封入体

この症例を含めて FUS 陽性封入体を有する ALS4 例に対して FUS 抗体, リン酸化および非リン酸化 TDP-43 抗体, ユビキチン抗体を用いて病理学的に検討した. その結果, FUS 陽性封入体を有する ALS で見られる好塩基性封入体は FUS 抗体に陽性であること, FUS 陽性封入体を有する神経細胞ではその核の FUS 抗体に対する染色性は低下するものから保たれるものまで存在していることが示された. FUS 抗体と TDP-43 抗体の 2 重染色では, FUS 陽性封入体は TDP-43 抗体に陰性であり, その神経細胞では TDP-43 抗体の染色性は核に認められた. また, 同じ FUS 陽性封入体をでも, 各症例によってユビキチン抗体による染色性に差が認められた.

#### 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 11 件)

1. Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K. Comparison of phosphorylated TDP-43-positive inclusions in oculomotor neurons in patients with non-ALS and ALS disorders. *J Neurol Sci* 315; 20-25, 2012 査読有
2. Fujita Y, Ikeda M, Yanagisawa T, Senoo Y, Okamoto K. Different clinical and neuropathological phenotypes of familial ALS with A315E *TARDBP* mutation. *Neurology* 77; 1427-1431, 2011 査読有
3. Fujita Y, Fujita S, Takatama M, Ikeda M, Okamoto K. Numerous FUS-positive inclusions in an elderly woman with motor neuron disease. *Neuropathology* 31: 170-176, 2011 査読有
4. Fujita Y, Watabe K, Ikeda K, Mizuno Y, Okamoto K. Morphological changes of Golgi apparatus in adult rats after facial nerve injuries. *Neuropathology* 31: 42-47, 2011 査読有
5. Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Okamoto K, Fujita Y, Jackson M, Ikeda M, Nakazato Y, Ikeda Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M. A Japanese ALS6 family with mutation R521C in the *FUS/TLS* gene: a clinical, pathological and genetic report. *J Neurol Sci* 296; 59-63, 2010 査読有
6. Okamoto K, Fujita Y, Mizuno Y. Pathology of protein synthesis and degradation system in ALS. *Neuropathology* 30; 189-193, 2010 査読有
7. Kadokura A, Yamazaki T, Kakuda S, Lemewre CA, Fujita Y et al. Phosphorylation-dependent TDP-43

antibody detects intraneuronal dot-like structures showing morphological characters of granulovacuolar degeneration. *Neurosci Lett* 463: 87-92, 2009 査読有

[学会発表] (計 20 件)

1. Fujita Y et al. Different clinical and neuropathological phenotypes of familial ALS with a novel A315E *TARDBP* mutation. 15th congress of the European Federation of Neurological Societies. 2011. 9. 11 (Budapest, Hungary)
2. Fujita Y et al. Motor Neuron disease with FUS pathology. BRI International Symposium 2010 (2010. 11. 22) (Niigata, Japan)
3. Fujita Y et al. FUS pathology in patients with motor neuron disease. XVIIth International Congress of Neuropathology. 2010. 9. 12 (Salzburg, Austria)

[図書] (計 3 件)

1. 藤田行雄, 岡本幸市. 認知症学(上) — その解明と治療の最新知見 — II. 基礎編 認知症関連分子生物学 各論 FUS/TLSと前頭側頭葉変性症. *日本臨牀* 69: 88-92, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤田 行雄 (FUJITA YUKIO)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 7 0 4 2 0 1 7 2

##### (2) 研究分担者

岡本 幸市 (OKAMOTO KOICHI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 0 0 1 2 4 6 5 2