

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791157

研究課題名（和文） 前頭側頭葉変性症の臨床診断法の開発

研究課題名（英文） The development of clinical diagnosis for frontotemporal lobar degeneration.

研究代表者

細川 雅人（HOSOKAWA MASATO）

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・主席研究員

研究者番号：00435116

研究成果の概要（和文）：前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症の原因分子として、近年新たに同定された TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) を脳脊髄液から定量するシステムを確立した。その結果、筋萎縮性側索硬化症と末梢神経障害であるギランバレー症候群との鑑別ができることがわかった。以上の結果より前頭側頭葉変性症の早期診断も可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We established the method for quantification of TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) that was recently identified in frontotemporal lobar degeneration (FTLD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Compared with cerebrospinal fluid of ALS and Guillain-Barré syndrome patients, TDP-43 concentration of ALS patients was significantly higher than Guillain-Barré syndrome patients. These results indicated that this method could be useful in the early diagnosis of FTLD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：前頭側頭葉変性症、TDP-43、ELISA、脳脊髄液、筋萎縮性側索硬化症

## 1. 研究開始当初の背景

前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) は、前頭・側頭葉の神経細胞脱落により、人格変化や失語症状を呈する神経変性疾患群の総称である。初老期に発症する認知症の中では、アルツハイマー病に次いで頻度が高い。歴史的には、19世紀末に Arnold Pick が、前頭・側頭葉の限局性萎縮を呈し、人格変化と失語症状を呈した症例

を報告したことに端を発し、Onari と Spatz がこれらの一群を Pick 病と命名した。彼らが Pick 病としてまとめた一群には、後にタウがその主要構成蛋白であることが判明する Pick 球を伴う例と伴わない例が含まれ、その後その診断的意義について長く議論が続くことになった。1996年にマンチェスターのグループによって提唱された FTLD という上記の概念は、このような病理学的議論に囚われること

なく、脳の前方部に変性の主座がある変性性認知症を臨床的に診断できるようになった点で画期的であり、現在まで使用されている。

FTLD は、病理学的には、Pick 病を中心とするタウ陽性封入体が出現する群（タウオパチー）と、タウ陰性ユビキチン陽性封入体が出現する群に大別されることがこの頃明らかとなった。後者の封入体の主要構成タンパクは長い間不明であったが、2006 年、それが TDP-43 であることが判明した。この封入体を有する FTLD の一部には筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) と同様の運動ニューロン疾患が合併することが知られていたが、ALS の病理マーカーの一つである脊髄のユビキチン陽性封入体の構成タンパクも TDP-43 であることが同時に判明し、FTLD と ALS が同一の病理基盤を有することが明らかになった。さらに、その後家族性および孤発性 ALS 患者において TDP-43 遺伝子変異が多数同定されるに至り、TDP-43 の異常と神経変性との直接的な関連が証明された。このような流れを受け、2008 年の国際 FTD 会議において、タウ陽性 FTLD を FTLD-tau、TDP-43 陽性 FTLD を FTLD-TDP と呼ぶことが決定した。

FTLD-TDP 患者の死後脳から調整した不溶性画分の生化学的解析の結果、蓄積した TDP-43 はリン酸化および断片化を受けていることが判明している。代表者が所属する研究チームは、リン酸化特異抗体を作製することにより、C 末端側のリン酸化部位を同定するとともに、これらの抗体を用いた免疫プロットにより検出される断片のパターンが、TDP-43 陽性病理像と相関することを見出した。これらの結果は、TDP-43 のリン酸化および断片化が疾患の病理過程に深く関わる変化であることを示唆しており、このような異常 TDP-43 を定量的に検出することにより、疾患の早期診断や他の神経変性疾患との鑑別診断が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

前頭側頭葉変性症および筋萎縮性側索硬化症の原因分子として近年新たに同定された TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) を定量するシステムを確立し、疾患の早期診断・早期治療に寄与することを目的とする。具体的には、ヒト体液中の異常 TDP-43 を検出する ELISA システムを構築する。患者脳に蓄積した TDP-43 には、リン酸化および断片化が生じていることから、これらの異常を特異的に測定することが有効と考えられる。アルツハイマー病では、すでに脳

脊髄液中のアミロイド  $\beta$  およびタウの異常を ELISA で検出することが可能であるが、TDP-43 の検出を組み合わせることにより、神経変性疾患の診断精度が向上するとともに、将来の異常タンパク特異的な根本治療の開発につながることを期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫沈降

SH-SY5Y 細胞へ各種 GFP-TDP-43 発現プラスミドをトランスフェクションし、3 日間培養後培養上清を回収した。培養上清 400  $\mu$ l に抗 GFP 抗体が結合したアガロースビーズ (MBL, D153-8) を 20  $\mu$ l 加え、室温で 2 時間混和した。RIPA buffer でビーズを洗浄後、SDS-PAGE サンプルバッファーを 50  $\mu$ l 加え、95°C で 5 分間加熱した。サンプル 10  $\mu$ l を 10% SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を 3%ゼラチンでブロッキング後、ProteinTech ポリクローナル抗体 (3,000 倍希釈) を室温で 1 晩反応させた。膜を洗浄後 HRP 標識抗ウサギ抗体 (Bio-Rad, 20,000 倍希釈) を反応させ、ECL plus (GE Healthcare) を用いて培養上清中の TDP-43 を検出した。

### (2) TDP-43 検出 ELISA

異なる 2 種類の抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法を用いて CSF 中の全長 TDP-43 濃度を測定した。用いた抗 TDP-43 抗体は下記の通りである。Abnova モノクローナル抗体、ProteinTech モノクローナル・ポリクローナル抗体、pS409/410 モノクローナル抗体、pS403/404 ポリクローナル抗体、TDP-43 C 末ポリクローナル抗体 (405-414)、以下自作のラットモノクローナル抗体 (8 種類)、TDP (319-333) ポリクローナル抗体 (2 種類)、TDP (341-355) ポリクローナル抗体 (2 種類)。以上の抗体を様々な組合せで試行し、最適な capture/detection 抗体の選定をおこなった。使用した CSF は ALS: 14 例、GBS: 7 例であった。CSF は Aurum Serum Protein Kit (Bio-Rad) のカラムに通し、アルブミン、イムノグロブリンなどを除去したものを用いた。2 次抗体にビオチン標識抗マウス IgG、あるいはウサギ IgG (Jackson Laboratory) を使用し、その後 HRP 標識アビジン-ビオチン複合体 (Vector Laboratory) を反応させた。従来は発色法により検出をおこなっていたが、検出感度を高めるため、化学発光法 (Chemiluminescent Ultra Sensitive AP Microwell, BioFX) を用いた。

### (3) imTag PCR 法を用いた高感度検出

imTag PCR キット (有限会社 ケアティス) を用いて、CSF 中に含まれる極微量の TDP-43 の検出をおこなった。2 次抗体より前までの方法は 2 の全長 TDP-43 検出 ELISA と同じである。2 次抗体に核酸のタグが付いており、それを PCR 反応によって増幅し、微弱なシグナルをとらえた。

(4) マイクロビーズを用いた高感度検出  
Bio-Plex system (Bio-Rad) を用いて CSF 中 TDP-43 の高感度検出を試みた。マイクロビーズに Abnova モノクローナル抗体を capture 抗体として結合させた。ビーズを 96 well プレートに分注後洗浄し、サンプル、スタンダード、コントロールを 50  $\mu$ l ずつ加えた。アルミホイルで遮光後、300 回転/分で 60 分間振盪した。ビーズを洗浄後、ビオチン化した ProteinTech ポリクローナル抗体を detection 抗体として加えた。30 分の反応後 2  $\mu$ g/ml のストレプトアビジン-PE を 10 分間反応させ、洗浄後 Bio-Plex 200 system で計測をおこなった。ALS: 20 例, AD: 14 例, GBS: 15 例, FTL D: 3 例, CBD: 3 例, MND: 2 例, PSP: 1 例, コントロール: 11 例の CSF を用いた。

(5) Polymer 法を用いた脳脊髄液中 TDP-43 の測定

Proseek (Olink Bioscience) を用いて CSF 中 TDP-43 の検出をおこなった。Proseek Probemaker A と ProteinTech モノクローナル抗体、Probemaker B と ProteinTech ポリクローナル抗体を室温でインキュベーションして連結し、Probe A と Probe B を作製した。96 well プレートにスタンダードとサンプル、Probe A, B をそれぞれ加え 37°C で 2 時間インキュベーションし、Probe A, B を CSF 中の TDP-43 に結合させた。次に DNA ポリメラーゼを加え、相補鎖を合成し、リアルタイム PCR 用の鋳型を作製した。リアルタイム PCR 装置 (StepOnePlus, applied biosystems) を使用してターゲット領域を増幅し、得られたデータを解析することにより、CSF 中 TDP-43 の濃度を測定した。ALS: 21 例, AD: 14 例, GBS: 15 例, NPH: 9 例, FTL D: 4 例, CBD: 3 例, PSP: 1 例, コントロール: 11 例の CSF を用いた。

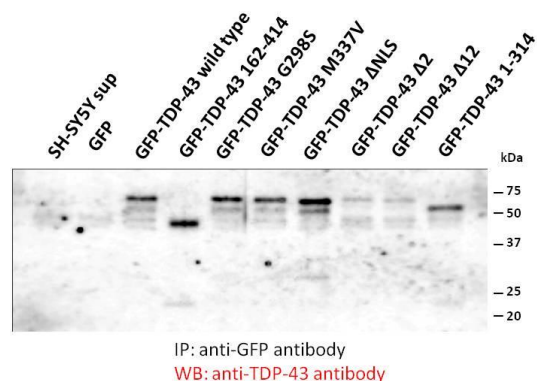
(6) 市販の ELISA キットによる脳脊髄液中 TDP-43 の測定

ヒト TDP-43 ELISA kit (USCN Life Science Inc.) を用いて CSF 中 TDP-43 の検出をおこなった。ALS: 21 例, AD: 14 例, GBS: 15 例, NPH: 9 例, FTL D: 4 例, CBD: 3 例, PSP: 1 例, コントロール: 11 例の CSF を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 免疫沈降

GFP-TDP-43 発現プラスミドをトランスフェクションした SH-SY5Y 細胞の培養上清中に、TDP-43 が分泌されるかどうかを免疫沈降法により確認した。細胞内に発現したすべてのアイソフォームが細胞外へ分泌されることがわかった (図 1)。

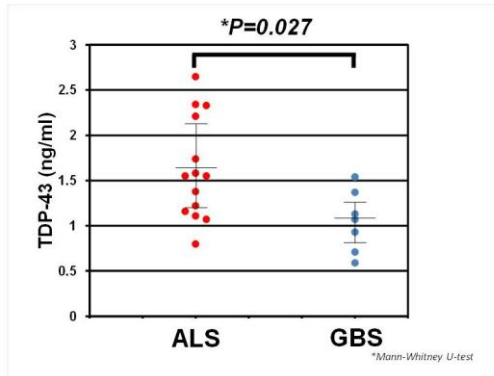


[図 1] 免疫沈降

培養上清を抗 GFP 抗体で免疫沈降後、抗 TDP-43 抗体でバンドの検出をおこなった。細胞外へ分泌されていることがわかった。

##### (2) 全長 TDP-43 検出 ELISA

人工 CSF にリコンビナント全長 TDP-43 を加えた系において、間接 ELISA 法及びサンドイッチ ELISA 法による TDP-43 の測定に成功した。検出の特異性を高めるためにサンドイッチ ELISA を採用することになった。様々な抗体の組合せを試した結果、capture 抗体には Abnova モノクローナル抗体、detection 抗体には ProteinTech ポリクローナル抗体の組合せが最適であることが判明した。それ以外の抗体の組合せではネガティブコントロールに非特異的の反応が見られるか、検出感度が低くなることがわかった。さらに検出系の見直しにより、TMB 発色法では検出限界が 2,000 pg/ml であったものを、化学発光法に替えて検出限界が 75 pg/ml に改善することができた。TMB による発色法よりも約 27 倍感度良く TDP-43 を検出することに成功した。この検出系を用いて ALS 患者および、末梢神経障害であるギランバレー症候群 (GBS) 患者の CSF 中 TDP-43 の検出を行った。ALS 患者の CSF 中 TDP-43 の濃度は  $1.62 \pm 0.15$  ng/ml (N=14), GBS 患者では  $1.05 \pm 0.13$  ng/ml (N=7) [mean  $\pm$  S.E.M] であり、Mann-Whitney U-test での統計解析の結果、 $p=0.027$  (two-tail) と有意差があることが判明した (図 2)。



〔図 2〕 脳脊髄液中 TDP-43 をサンドイッチ ELISA により検出した。ALS: amyotrophic lateral sclerosis, GBS: Guillain-Barre syndrome.

(3) imTag PCR 法を用いた高感度検出  
imTag PCR キットを用いて、CSF 中に含まれる極微量の TDP-43 の検出をおこなった。ネガティブコントロールでもシグナルの増幅が見られ、反応が特異的ではないことが判明した。

(4) マイクロビーズを用いた高感度検出  
Bio-Plex system を用いて CSF 中 TDP-43 の高感度検出を試みた。リコンビナント TDP-43 タンパクを用いた検量線によると、検出限界は 60 pg/ml 程度であったが、サンプルを測定した結果、すべてが検出限界以下であった。

(5) Polymer 法を用いた脳脊髄液中 TDP-43 の測定  
Proseek を用いて CSF 中 TDP-43 の検出をおこなったが、スタンダードサンプル中の TDP-43 を濃度勾配に沿って検出できず、検量線を引くことができなかつたため、各疾患 CSF 中の TDP-43 濃度を確定させることはできなかった。

(6) 市販の ELISA キットによる脳脊髄液中 TDP-43 の測定  
ヒト TDP-43 ELISA kit を用いて CSF 中 TDP-43 の高感度検出を試みた。リコンビナント TDP-43 タンパクを用いた検量線及び使用説明書によると、検出限界は 104 pg/ml 程度であったが、サンプルを測定した結果、すべてが検出限界以下であった。

## 考察

本研究は FTLD および ALS の原因分子として同定された TDP-43 を定量するシステムを確立し、疾患の早期診断・早期治療に寄与することを目的として、CSF 中の TDP-43 を検出す

る ELISA システムを構築することをめざしたものである。

TDP-43 は核タンパクであり、正常細胞では核内に局在しているが、TDP-43 が細胞外へ分泌されるかどうかは不明であった。TDP-43 を FTLD や ALS の疾患バイオマーカーとして用いるためには、通常は核内にある TDP-43 が細胞外へ分泌される可能性を調べる必要があり、培養細胞の培養上清を用いた免疫沈降を実施した。その結果、GFP-TDP-43 プラスミドをトランスフェクションした神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞の培養上清中に TDP-43 が分泌されることがわかった (図 1)。TDP-43 には細胞外分泌シグナル配列が存在しないので、非定型分泌経路 (Nickel W. et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 10:148-55, 2009) によって細胞外へ分泌されていると推測された。

ALS 患者および末梢神経障害であるギランバレー症候群 (GBS) 患者の CSF 中 TDP-43 の検出をサンドイッチ ELISA にて行った結果、ALS 患者 CSF 中の TDP-43 濃度が GBS 患者に比べ、有意に高いことが判明した。この結果は ALS と末梢神経障害の鑑別診断をおこなうことができる可能性を示すものである。これらの結果より FTLD-TDP の早期診断も可能になると考えられる。今回、同時に測定した FTLD 患者 CSF 中の TDP-43 は ALS に比べて低値であった (data not shown)。これは今後のさらなる解析が必要であるが、今回用いた FTLD は FTLD-TDP ではなく、FTLD-tau であった可能性が高いと考えられる。本研究開始前には FTLD 患者の CSF を多検体収集して解析できると想定していたが、実際には FTLD 患者の CSF の入手は非常に困難であった。国内外の CSF バンクに問い合わせたが、FTLD の CSF を保管している所がなく、現有 3 検体の解析しか実施できなかった。今後は他のルートにより FTLD の CSF を収集することを考える必要がある。

臨床応用に向けてさらに TDP-43 の検出感度を高めること、および多検体測定と少量の CSF での計測を可能にするため、方法 3-6 にあるような高感度検出法を実施した。3 の imTag PCR 法では PCR を用いてシグナルを増幅することから、検出感度の上昇が期待されたが、TDP-43 が入っていないネガティブコントロールでもシグナルの増幅が見られ、反応が特異的ではないことが判明した。使用する抗体を替えることにより改善が可能であるかもしれないと考えている。5 の polymer 法は 1) 用いる検体の量が  $1 \mu\text{l}$  と少ない、2) 検出抗体を 2 種類使用し TDP-43 検出の特異性を高めている、3) リアルタイム PCR で微量の TDP-43 を検出するという 3 点で非常に有用であると

思われたが、実験 1 回当たりの費用が高額(約 25 万円)なため、繰り返し条件検討をおこなうことができなかった。CSF 中の微量なバイオマーカーを高感度に検出するためには、最近発表された single-molecule ELISA (Rissin DM, et al. Nat Biotech, 28: 595-599, 2010)を導入するなどの必要があると考えられる。

#### 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 8 件)

- ① Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in APP and APP/tau transgenic mice.  
Haruhiko Akiyama, Masato Hosokawa, Fuyuki Kamentani, Hiromi Kondo, Momoko Chiba, Masako Fukushima, Takeshi Tabira. Neuropathology 査読有、(2011 年) in press, PMID:22129094
- ② TDP-43 分子による新たな認知症群  
新井哲明、細川雅人、長谷川成人、秋山治彦、朝田隆、精神神経学雑誌、査読無、第 113 巻 第 6 号 574-583 (2011 年)  
PMID: 21815469
- ③ 認知症臨床に役立つ生物学的精神医学第 3 回 前頭側頭葉変性症と遺伝要因  
細川雅人、新井哲明、秋山治彦、朝田隆、老年精神医学雑誌、査読無、第 21 巻 第 12 号 1387-1398 (2010 年)
- ④ 認知症の発症にかかわる遺伝子 TDP-43  
細川雅人、新井哲明、秋山治彦、老年精神医学雑誌、査読無、第 21 巻 第 5 号 561-571 (2010 年)

[学会発表] (計 16 件)

Quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders.  
Masato Hosokawa, Tetsuaki Arai, Makiko Yamashita, Hiroshi Tsuji, Takashi Nonaka, Masato Hasegawa, Haruhiko Akiyama, International Conference on Alzheimer's Disease 2011, 演題番号 P1-088, Paris, France [2011/07/17]

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

細川 雅人 (HOSOKAWA MASATO)

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・主席研究員

研究者番号：00435116