

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240050

研究課題名(和文) 病因タンパク質伝播機構の解明と制御

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of pathological protein propagation and its regulation

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) 38,000,000円、(間接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：異常タンパク質病変を伴う進行性の神経変性は多くの神経変性疾患を定義づける特徴である。私達は線維化したリコンビナント シヌクレイン(aS)の脳への接種が野生型マウスにおいても効率よく異常aS病変を引き起こすこと、接種後3ヶ月で内在性マウスaSが異常型に変換されること、さらには患者脳由来の異常aSを接種しても同様のことが起こることを証明した。また、患者脳に蓄積する異常TDP-43も正常TDP-43を異常に変換する能力を有していることを証明した。これらの結果は変性疾患の進行が病因タンパク質の伝播によることを示唆する。この細胞、動物モデルは病気の進行メカニズムの解明、治療法の評価に有用と思われる。

研究成果の概要(英文)：Progressive neurodegeneration with accumulation of abnormal proteins is the defining neuropathological feature of many neurodegenerative diseases, including Lewy body disease (LBD) and ALS/FTLD. We revealed that injections of recombinant alpha-synuclein (aS) fibrils efficiently induced hyperphosphorylated aS pathology in wild-type mice. Biochemical analyses demonstrated that endogenous mouse aS started to accumulate 3 months after inoculation. Furthermore, injections of Sarkosyl-insoluble aS from LBD patients induced similar aS pathology, indicating that aS fibrils show prion-like infectivity. We also demonstrated that insoluble TDP-43 has prion-like properties. These results indicate that pathological proteins may play a role in the progression of neurodegenerative diseases with protein pathologies. These cellular and mouse models should be useful for elucidating progression mechanisms and evaluating disease-modifying therapy.

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：神経病理

キーワード：神経変性疾患 伝播 シヌクレイン TDP-43 タウ プリオン

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、その症状、病態が時間経過に伴って悪化する「進行性」であるがその意味についてはこれまでほとんど議論されてこなかった。治療を考える場合、病気が進行する原因を解明し、病状が進行しないように抑制することが重要である。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内で産生された異常タンパク分子が細胞間で伝播することにより神経変性疾患が進行するという全く新しい仮説を提唱し、病態の進行と密接に関わる病原分子(タウ、 α シヌクレイン、TDP-43)が関与するAD、PD、筋萎縮性側索硬化症などの治療、予防法の創出を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの脳の決まった場所にヒト α シヌクレインの重合核(線維化した α シヌクレイン)を接種し、一定期間の後、脳を固定し、 α シヌクレインの病変が認められるかどうかを免疫染色法で検討した。

また、TDP-43については、ヒトTDP-43を発現する培養細胞に患者脳由来の異常TDP-43を導入し、正常TDP-43が異常型に変換されるかどうか詳細に検討した。

4. 研究成果

線維化したリコンビナント α シヌクレインを野生型マウスの脳に接種したところ、患者脳にみられるものと区別できない異常リン酸化 α シヌクレインの病変が観察された。生化学的検討を行った結果、接種したヒト α シヌクレインが約一週間で消失し、接種後3ヶ月から、内在性マウス α シヌクレインが蓄積してくることを確認した。さらに、レビー小体型認知症患者の不溶性 α シヌクレインを接種した場合においても同様の異常病変が引き起こされることを確認した。これらの結果は、異常型 α シヌクレインが正常 α シヌクレインを異常型に変換し、それが細胞間を伝播して病変が広がることを強く示唆する。

また、培養細胞のヒトTDP-43を発現し、そこでALSや前頭側頭葉変性症(FILDL)患者脳に蓄積する不溶化TDP-43をリポフェクションで導入すると、細胞内の正常TDP-43が異常型に変換され、リン酸化を受けて細胞質内に蓄積することが観察された。患者脳に蓄積する異常型TDP-43はその病型により生化学的に異なるバンドパターンをとるが、培養細胞内に蓄積する場合においても、添加したTDP-43と同じバンドパターンをとって蓄積することが証明された。以上の結果は、変性疾患に蓄積する異常型 α シヌクレインや異常型TDP-43が正常分子を異常型に変換するプリオン様の性質を有しており、これが原因で異常分子が増殖し、細胞間を伝わって広がる可能性が示唆される。

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 23 件)

1. Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DMA, Saito Y and Murayama S. (2014) 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 127(2): 303-5. (査読有)
2. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep.* 4(1): 124-34. (査読有)
3. Mann DMA, Rollinson S, Robinson AC, Callister J, Snowden JS, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson YS and Pickering-Brown S. (2013) Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol. Commun.* 1 (1): 68. (査読有)
4. Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M. (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol. Commun.* 1 (1): 54. (査読有)
5. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M., Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of

- pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136 (Pt 4): 1128-38. (査読有)
6. Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Ishobe T, Hasegawa M, Hisanaga SI. (2013) Pin1 stimulates dephosphorylation of tau at Cdk5- dependent Alzheimer phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 288 (11): 7968 -77. (査読有)
 7. Foulds PG, Diggle P, Mitchell D, Parker A, Hasegawa M, Masuda-Suzukake M, Mann DMA, Allsop D. (2013) A longitudinal study on alpha-synuclein in blood plasma as a biomarker for Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 3: 2540. (査読有)
 8. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama M, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135; 3380–3391. (査読有)
 9. Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A and Hasegawa M. (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 116–121. (査読有)
 10. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H. (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 45:480-485. (査読有), 他

[学会発表] (計 63 件)

1. Hasegawa M, Dan A, Watanabe S, Kondo

- H, Akiyama H, Mann DM, Saito Y, Murayama S; 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014"; Tokyo, Japan, 2014. 3. 17.
2. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H and Hasegawa M; Insoluble TDP-43 prepared from diseased brains has prion-like properties. Alzheimer's Association International Conference (AAIC2013); Boston, USA, 2013. 7. 18.
3. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H and Hasegawa M; Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases; Florence, Italy, 2013. 3. 9.
4. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Yoshida M, Murayama S, Mann D, Akiyama H and Hasegawa M; Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates in diseased brains. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases; Florence, Italy, 2013. 3. 7. 他

[図書] (計 21 件)

1. 長谷川成人, 「細胞内異常タンパク質の伝播の可能性」, *Dementia Japan*, 2013, 27, 45-53
2. 野中隆, 長谷川成人 「脳内に蓄積した TDP-43 凝集体のプリオン様性質」, *細胞工学*, 2013, 32, 1076-1078
3. 長谷川成人, 「Braak 仮説を α シヌクレインの細胞間伝播で説明できるか?」, *Frontiers in Parkinson's Disease*, 2013, 6, 13-16
4. 野中隆, 長谷川成人 「細胞内異常タンパク質凝集体の細胞間伝播: 神経変性疾患の病態進行に関する新たなメカニズム」, *基礎老化研究*, 2013, 37, 7-10, 他

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：神経変性疾患関連タンパク質の不溶性凝集体の増幅方法

発明者：野中隆、増田雅美、山下万喜子、秋山治彦、長谷川成人

権利者：東京都医学総合研究所

番号：2011-252522

出願年月日：2011 年 11 月 18 日

国内外の別： 国内及び国際

名称：新規タウオパチーモ デルマウスの作製方法

発明者：鈴掛雅美、長谷川成人

権利者：東京都医学総合研究所

番号：2013-268257

出願年月日：2013 年 12 月 26 日

国内外の別： 国内及び国際

○取得状況（計 1 件）

名称：タンパク質重合体の重合核となりうるタンパク質又はその重合体が導入された細胞及びその製造法

発明者：野中隆、渡辺小百合、増田雅美、長谷川成人

権利者：東京都医学総合研究所

番号：EP 出願番号：06834541.2

取得年月日：2011/10/05

国内外の別： フランス、ドイツ、英国

〔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