

前頭側頭葉変性症患者脳における 神経変性疾患関連タンパク質の重複蓄積

東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野・認知症プロジェクト

主席研究員 細川 雅人

(共同研究者)

筑波大学 医学医療系精神医学

教授 新井 哲明

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 長谷川 成人

はじめに

TAR DNA-binding protein of 43 kd (TDP-43) 蓄積を伴う家族性前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTL) においてグラニューリン (granulin: GRN) 遺伝子変異が同定された^{1, 2}。その際、GRN 遺伝子変異を持つ FTL 患者脳では神経細胞内に TDP-43 の凝集体が観察されるが、タウの蓄積がみられなかったことから、GRN 遺伝子変異 FTL は TDP-43 (+) / タウ (-) と定義された。その後、GRN 遺伝子変異はアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD)^{3, 4}、皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration: CBD)⁵ などのタウオパチー例にも多数報告されたことから、GRN 変異がタウに対して何らかの影響を及ぼしていると推察された。我々は、マウスを用いた動物実験により、GRN 遺伝子変異がタウのリン酸化や蓄積に関与することを報告した⁶。しかし、ヒトの GRN 変異 FTL 患者脳において、同様の病態が起こっているかについては全く調べられていなかった。そこで、ヒト GRN 変異 FTL 患者脳を用いて免疫組織化学染色をおこない、異常リン酸化タウの蓄積が起きているかを検討した。また、凍結脳から界面活性剤不溶性タンパク画分を抽出後、詳細な生化学的解析をおこない、AD や CBD など他のタウオパチーとのタウの蓄積パターンの相違を調べた。さらに GRN 遺伝子変異が他の神経変性疾患関連タンパクへどのような影響を及ぼすかについても検討をおこなった。

結 果

本研究に用いた GRN 変異 FTL 患者情報は表 1 の通りである。GRN 遺伝子変異を有する患者剖検脳についてリン酸化 TDP-43、リン酸化タウ、アミ

症例番号	1	2	3	4
死亡時年齢	54	56	72	55
性別	M	F	F	M
GRN 変異 (cDNA)	c.1252C>T	c.1477C.T	c.1A>C	c.1477C>T
GRN 変異 (protein)	p.Arg418X	p.Arg493X	p.0	p.Arg493X

表 1. 本研究に用いた GRN 変異 FTL 患者情報

ロイド β ($A\beta$)、リン酸化 α -シヌクレインなどに対する抗体で免疫組織染色し、解析をおこなった。その結果、①TDP-43の蓄積はGRN変異FTLDに特徴的なType A (細胞質内封入体+神経変性突起)であった(図1)。

②全例でリン酸化タウの陽性像が観察された(図2)。神経細胞へのタウ蓄積はプレタングル優位であり(図2A, H)、アストロサイトやオリゴデンドロサイトへの蓄積も見られた。特に症例番号#2において大脳皮質の神経細胞(図2A, B)・アストロサイトへの広範なリン酸化タウ蓄積が観察された(図2D)。大脳白質のオリゴデンドロサイトに蓄積するリン酸化タウ(coiled body)も多数観察された(図2E)。また、大脳皮質ではリン酸化タウ陽性の多数の微細顆粒状構造が検出された(図2C)。この微細顆粒は嗜銀顆粒性認知症で観察されるgrainより形態が小さく、異なる病理であると考えられた。

③全例でリン酸化 α -シヌクレインの陽性像が観察された(図3)。 α -シヌクレインの蓄積は神経細胞だけでなく、オリゴデンドロサイト中にもcoiled body様の形態で蓄積していることが確認された。

④ $A\beta$ の染色像は症例#2において、 $A\beta$ 蓄積が全く認められず、CERAD stage 0と判定された。症例#1と#4では $A\beta$ 蓄積が軽度でstage 1, #3は $A\beta$ 蓄積が高度であり、stage 3であった。(図4)。Fused in sarcoma (FUS) タンパクの異常蓄積はどの症例においても観察されなかった(data not shown)。

次にGRN変異脳に蓄積するタウ、シヌクレインに関して生化学的解析をおこなった。GRN変異脳から界面活性剤不溶性画分を抽出し、タウ抗体(T46)でイムノブロットをおこなっ

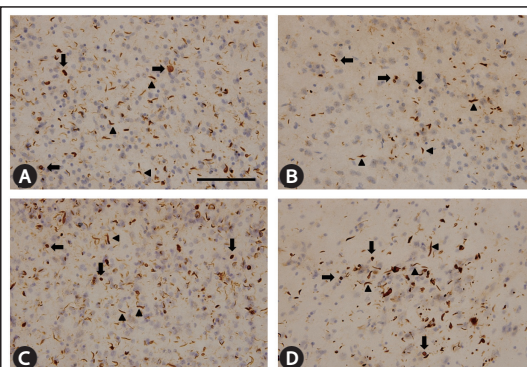


図1. グラニューリン変異脳に蓄積するリン酸化TDP-43。細胞質内凝集体(矢印)、神経変性突起(矢頭)。A:Case 1、B:Case 2、C:Case 3、D:Case 4。スケールバー A = 100 μ m

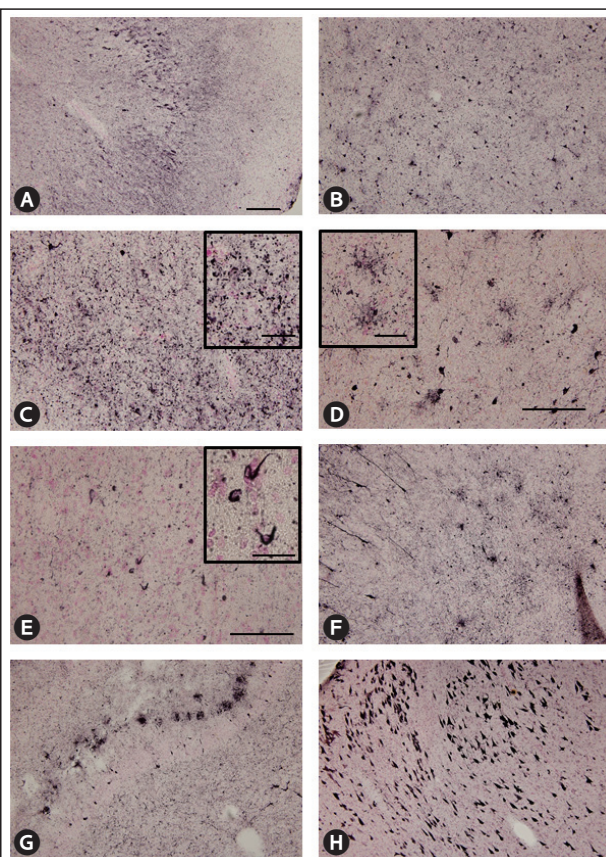


図2. グラニューリン変異脳に蓄積するリン酸化タウ。A-E:Case 2。A (海馬)、B (扁桃核)、C 下側頭回)、D (大脳皮質のアストロサイト)、E (大脳白質のオリゴデンドロサイト)、F:Case 1、G:Case 3、H:Case 4。スケールバー A and D = 200 μ m、E = 100 μ m、インサート中のスケールバー C and D = 50 μ m、E = 25 μ m。

たところ、60, 64, 68 kDaに3本のバンドが検出された。これらはADで観察される3本のバンドと同等のものであり、微小管結合部位が3つ繰り返しの3 repeat (3R) タウと4 repeat (4R) タウの両方が蓄積していることが明らかとなった(図5)。皮質基底核変性症(corticobasal dementia: CBD)や進行性核上性麻痺(progressive supranuclear palsy: PSP)では64, 68 kDaの2本のバンドしか観察されず、GRN変異脳に蓄積するタウはCBD, PSPとは異なることがわかった。GRN変異脳の不溶性画分を抽出し、リン酸化 α -シヌクレイン抗体でイムノブロットをおこなったところ、リン酸化 α -シヌクレイン陽性バンドが検出された(data not shown)。

GRN変異脳において、少なくともTDP-43、タウ、 α -シヌクレインの3種類のタンパクが異

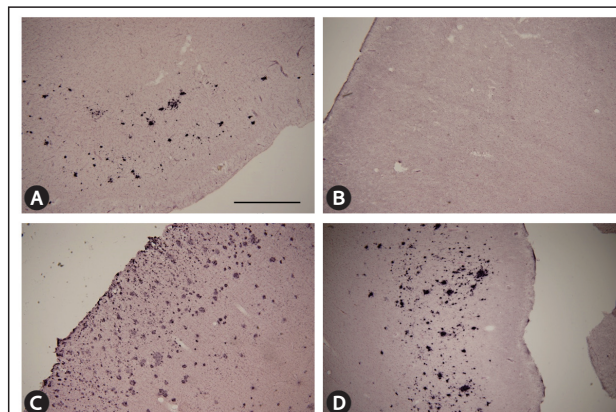


図4. グラニューリン変異脳に蓄積するA β 。A: Case 1、B: Case 2、C: Case 3、D: Case 4。スケールバー A = 1.0 mm

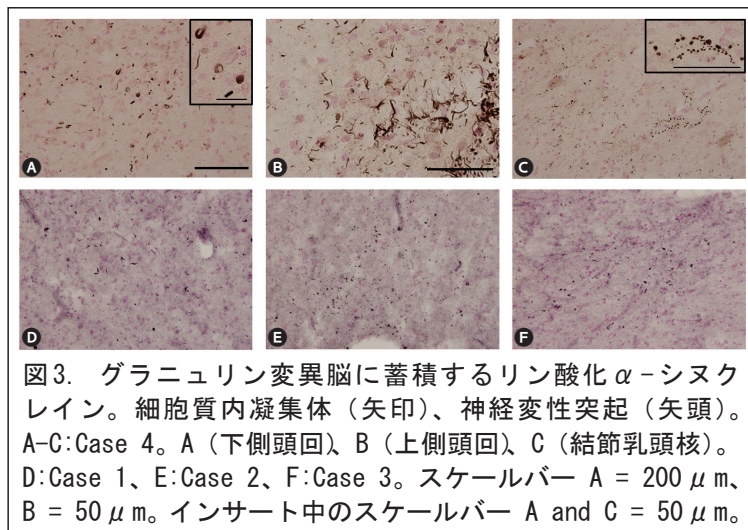


図3. グラニューリン変異脳に蓄積するリン酸化 α -シヌクレイン。細胞質内凝集体(矢印)、神経変性突起(矢頭)。A-C: Case 4。A(下側頭回) B(上側頭回) C(結節乳頭核)。D: Case 1、E: Case 2、F: Case 3。スケールバー A = 200 μ m、B = 50 μ m。インサート中のスケールバー A and C = 50 μ m。

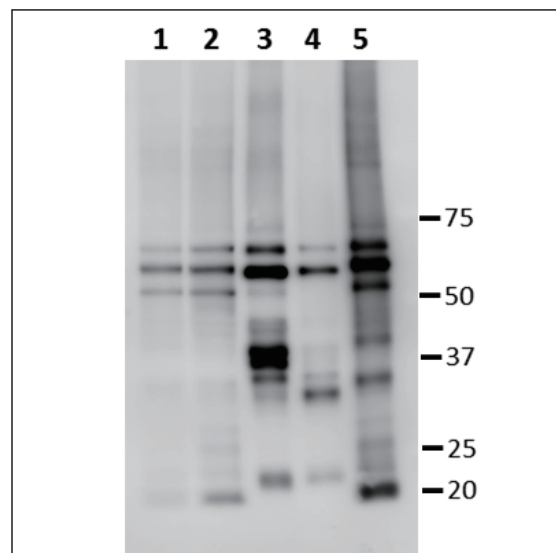
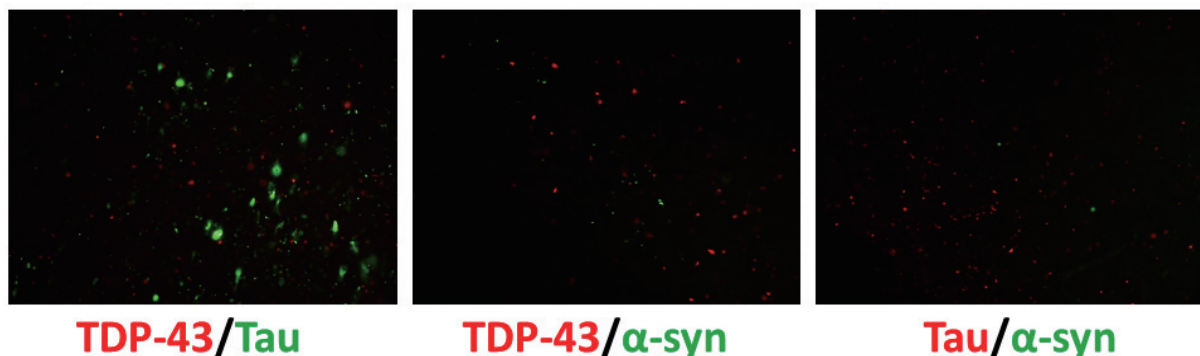


図5. グラニューリン変異脳の界面活性剤不溶性画分に存在するタウのイムノブロット。1: GRN#3、2: GRN#4、3: CBD、4: PSP、5: AD



TDP-43/Tau

TDP-43/ α -syn

Tau/ α -syn

図6. グラニューリン変異脳に蓄積するTDP-43, タウ, A β の蛍光二重染色。

常蓄積していることが判明したが、これらのタンパクが共局在するかに関して、蛍光二重染色をおこなって確認した。その結果これらの異常タンパクはごく一部を除き、共局在していないことがわかった(図6)。

考 察

本研究の結果から、*GRN*変異はこれまでに報告されていたTDP-43(図1)だけでなく、タウ(図2)および α -シヌクレイン(図3)の蓄積も促進する可能性が示された。グラニューリン変異によるプログラニューリンタンパクの減少は神経変性疾患関連タンパクの重複蓄積を引き起こす危険因子であることが示唆された。我々がおこなった超高感度免疫組織化学染色により、症例#2ではA β 蓄積がなく、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの広範なリン酸化タウ蓄積が起こっていることが明らかとなった(図2)。また、症例#4では新皮質へのびまん性 α -シヌクレインの蓄積が確認された(図3)。症例#3はA β (図4C)・リン酸化タウ蓄積がともに高度で、かつ年齢が70歳代ということから判断して、アルツハイマー病の併発の可能性が高いと考えられた。50歳代の正常老化脳で症例#2や#4のような病理を示すことは非常にまれである。*GRN*変異脳に蓄積するリン酸化タウで非常に特徴的な形態は、大脳皮質に蓄積している微細顆粒であった(図2C)。この微細顆粒は嗜銀顆粒性認知症で観察されるgrainより形態が小さいことがわかった。

生化学的解析により、*GRN*変異脳ではADと同様に3Rと4R両方のタウが蓄積していることが明らかとなった(図5)。しかし、リン酸化タウ陽性微細顆粒の分布や軽度のA β 蓄積という点で*GRN*変異脳の病理はADとは異なると考えられる。また、CBDやPSPに蓄積しているタウのアイソフォーム(4Rのみ)とは異なっていた。以上の結果より、*GRN*変異はAD、CBD、PSP、AGDとは異なるタウオパチーである可能性が示された。

我々は、マウスを用いた動物実験により、*GRN*遺伝子変異がタウのリン酸化や蓄積に関与することを報告していたが⁶、本研究はこれを支持するものであると考えられた。また、プログラニューリンタンパクの減少がリソソームの異常を起こすことが報告されており⁷、脳内の細胞中のリソソームの機能異常により異常蓄積タンパクの分解が減少しているのではないかと推察された。

リン酸化されたタウ・ α -シヌクレイン・TDP-43の3種類のタンパクが異常蓄積する疾患として、グアム島や紀伊半島で多発する筋萎縮性側索硬化症-パーキンソン認知症複合(Guam/紀伊ALS-PDC)が知られている⁸。界面活性剤不溶性画分中のタウのバンドパターンが60, 64, 68 kDaと3本であることや、リン酸化タウの微細顆粒構造が観察されるなど、*GRN*変異脳と類似点が多い。しかし、これまでにGuam/紀伊ALS-PDCにおいて*GRN*遺伝子変異は報告されていない。Guam/紀伊ALS-PDCの発症原因は不明であるが、リソソーム系の異常など、共通の発症メカニズムが今後明らかとなることが期待される。

認知症性神経変性疾患患者脳において、細胞内に蓄積したタンパクは、リン酸化、断片化、

ユビキチン化を受けている点や、凝集し線維を形成している点など共通の性質を有しており、異常タンパク質の蓄積過程において、何らかの共通メカニズムが存在する可能性があると考えられる。従って、すべての疾患に共通した治療法を開発できる可能性があると考えられる。本研究では認知症疾患における異常蓄積タンパク質の重複蓄積という新たな観点を導入できたと考えている。さらに今後、認知症研究の方向性や着眼点の修正がおこなわれて、根本治療法開発の促進に結びつくことが期待される。

要 約

TDP-43 蓄積を伴う家族性前頭側頭葉変性症 (FTLD) においてグラニューリン (*GRN*) 遺伝子変異が同定された際に、*GRN* 変異脳では TDP-43 の凝集体は観察されるが、その他の神経変性疾患関連タンパクの蓄積は認めないと報告された。しかし、我々が *GRN* 変異脳を用いて詳細な組織化学的解析と生化学的解析をおこなったところ、TDP-43 以外にタウと α -シヌクレインが蓄積していることを明らかになった。*GRN* 遺伝子変異が複数の神経変性疾患関連タンパクの蓄積を促進したことが示唆された。本研究により *GRN* 変異脳ではタウおよび α -シヌクレインが蓄積しないという、これまでの定義を見直す発見につながったと考えられる。

謝 辞

本研究に助成頂きました公益財団法人大和証券ヘルス財団に心より感謝申し上げます。

文 献

1. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442 (7105) : 916-919, (2006)
2. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442 (7105) : 920-924, (2006)
3. Brouwers N, Nuytemans K, van der Zee J, Gijselinck I, Engelborghs S, Theuns J, et al. Alzheimer and Parkinson diagnoses in progranulin null mutation carriers in an extended founder family. *Arch Neurol* 64 (10) : 1436-1446, (2007)
4. Cortini F, Fenoglio C, Guidi I, Venturelli E, Pomati S, Marcone A, et al. Novel exon 1 progranulin gene variant in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 15 (10) : 1111-1117, 2008
5. Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, Boeve B, Baker M, Adamson J, et al. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet* 15 (20) :

- 2988-3001, (2006)
6. Hosokawa M et al., Progranulin reduction is associated with increased tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. *J Neuropath Exp Neurol* 74: 158-165, (2015)
 7. Tanaka Y, Chambers JK, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Possible involvement of lysosomal dysfunction in pathological changes of the brain in aged progranulin-deficient mice. *Acta neuropathologica* 2: 78 (2014)
 8. Forman MS, Schmidt ML, Kasturi S, Perl DP, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau and alpha-synuclein pathology in amygdala of Parkinsonism-dementia complex patients of Guam. *Am J Pathol* 160 (5) : 1725-1731, (2002)