

が不明である。そのため、NIの数値自体になんらかの意味づけをおこなうことはできない。NIの意義は、同一患者において、病状進行に伴う数値の減少としてのみ評価できるものであり、その利用には引き続き検討が必要と考えられた。

E.結論

MUNEとNIは相関があるが、握力との相関はMUNEが高く、その原理からもよりsurrogate markerとして適していると考えられた。

F.文献

- 1) de Carvalho M et al.: Neurology 64: 1783- 1785 , 2005
- 2) 内藤寛ら: 厚生労働省「神経変性疾患に関する研究」班 2007 年度報告書 (in press)
- 3) Brown WF et al.: J Neurol Neurosurg Psychiatry 39:249-257, 1976
- 4) 荒崎圭介ら: 厚生労働省「神経変性疾患に関する研究」班 2004 年度報告書 123-125, 2005
- 5) de Carvalho M et al. : Muscle Nerve 24:1391-1395, 2001
- 6) McComas AJ et al. : J Neurol Neurosurg Psychiatry 34:121-131, 1971
- 7) Bromberg MB : Clin Neurophysiol. 118:1-8, 2007

G.健康危険情報

なし

H.学会発表

第 48 回日本神経学会総会, 2007 年, 名古屋
第 37 回日本臨床神経生理学会学術大会, 2007 年, 宇都宮
18th International Symposium on ALS/MND, 2007, Toronto

I.知的所有権の取得状況

なし

ALS surrogate marker としての MUNE と Neurophysiological Index の比較 (2) 臨床指標との相関

内藤 寛¹, 朝日 理¹, 葛原茂樹^{1,2}

1)三重大学 神経内科 2)国立精神・神経センター武蔵病院

研究要旨: ALS 患者に対し、運動単位推定数(MUNE)と Neurophysiological Index (NI)を測定し、ALSFRS-R と Norris scale の 2 つの臨床スコアと比較することで、前角細胞脱落の surrogate marker としての有用性を検討した。小手筋の NI および MUNE は、ALSFRS-R と Norris Scale のうち、上肢機能に限定した sub score との間に有意な相関が見られ、これらは ALS の生理学的指標として適していると考えられた。とくに MUNE は disability との相関が高く、ALS の生理学的指標として優れていると考えられた。球麻痺や下肢発症例で上肢機能が温存されて、ALSFRS-R や Norris Scale に反映されない pre-clinical な状態であっても、既に MUNE が低下しており、これらの神経生理検査は ALS の surrogate marker として有用である。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(以下 ALS)の病態の中心は運動ニューロンの変性・脱落であり、運動ニューロンの数を知ることは、その病像を把握するのに有用である。ALS では、筋萎縮などの臨床症状が発現する前から運動単位数の減少が始まっている¹⁾。筋を支配する運動単位数を、理論的に正しく、かつ再現性良く調べることができれば、運動ニューロン疾患の進行を評価できることになる。この運動単位数を電気生理学的に推定する手法は運動単位数推定法(motor unit number estimation: 以下 MUNE)と呼ばれている。MUNE は ALS の早期診断や進行度の評価に有用な検査であるが^{2,3)}、手技が煩雑で、検者の技術に依存する面が多いことから、十分に普及してはいない。Carvalho ら⁴⁾は、より簡便に施行できる生理学的指標として、Neurophysiological Index (以下 NI)を提唱し、MUNE や他の臨床評価と相関することを報告している。本研究では、ALS 患者で MUNE と NI を計測し、治験などで現在もっとも利用されている臨床指標である ALSFRS-R や Norris scale との相関を求め、同一例での経時的変化を

調べ、これらの生理学的指標の有用性を検討した。

B. 研究方法

ALS 患者 21 名(男性 13 例, 女性 8 例, 年齢 50~77 歳, 罹病期間 5~77 ヶ月, 厚労省重症度 1~4)に対し、多点刺激法(multiple point stimulation: MPS 法)による MUNE と NI を測定し、ALSFRS-R と Norris scale の 2 つの臨床スコアと比較した。MUNE は、日本光電製筋電計 MEB-9104 を使用し、前腕部で尺骨神経をフェルト電極で刺激して、手の小指外転筋(ADM)から記録した。微弱な刺激を加えて、筋腹上に貼付した表面電極から all or none で出現する筋活動電位を、単一運動単位電位(SMUP)として記録した。同一閾値を有する複数の SMUP が同時に発火することによっておこる波形変化(alteration)が MUNE の誤差要因になるために、順次刺激部位を変えて 10 個の SMUP 波形を記録し、立ち上がり潜時をそろえた後にコンピュータで加算平均して合成したものを平均的な SMUP とした。手関節部で尺骨神経を最大上刺激して得られた最大 M 波の振幅を、平均的な SMUP の振幅で除して MUNE を算出した。2

名の検者が独立して施行し、その平均値をMUNE結果とした。

NIの測定は、Carvalhoら⁴⁾の方法に従い、記録電極をADMに、刺激電極を手首の尺骨神経上において最大上刺激を行い、 $NI = [CMAP \text{ 振幅(mV)} \div M \text{ 波終末潜時(ms)}] \times F \text{ 波出現率(\%)} \text{ の式で求めた。}$

臨床指標は、ALSFRS-Rの総得点(ALSFRS-T)とNorris scaleの総得点(Norris-T)、およびそれぞれの指標の中で、書字、摂食、着衣、身の回りの動作といった、手に関する下位スコア(ALSFRS-H, Norris-H)との相関について検討した。

統計処理には、Spearmanの順位相関係数を用いた。

C. 研究結果

MUNEとNIの計測値と、ALSFRS-RとNorris Scaleの得点との相関結果を表1に、回帰直線を図1~4に示した。MUNEもNIも、ALSFRS-R総点やNorris Scale総点との間に有意な相関は認められなかった。ALSFRS-Rのなかで上肢機能に限定した下位スコアALSFRS-Hは、MUNEやNIとの有意な相関が見られ、相関係数はそれぞれ0.720と0.714であった(図1,2)。Norris scaleのなかで上肢機能に限定した下位スコアNorris-Hは、MUNEやNIとの有意な相関が見られ、相関係数はそれぞれ0.844と0.842であった(図3,4)。

表1：MUNE・NIと臨床指標の相関

	MUNE	NI
ALSFRS 総点	$\rho=0.337$	$\rho=0.337$
ALSFRS 上肢	$\rho=0.720^*$	$\rho=0.714^*$
Norris 総点	$\rho=0.615$	$\rho=0.579$
Norris 上肢	$\rho=0.844^*$	$\rho=0.842^*$

*: $p<0.001$

初期のALS患者で臨床症状が比較的軽い方、上肢以外から発症したものの中には、ADMのMUNEが正常の約半数である100程度にまで減少していても、ALSFRS-RやNorris scaleではほぼ満点に近い点が見られるという「天井効果」がみられ、MUNEの低下は臨床症状に先行していた。MUNEが50近くまで低下して

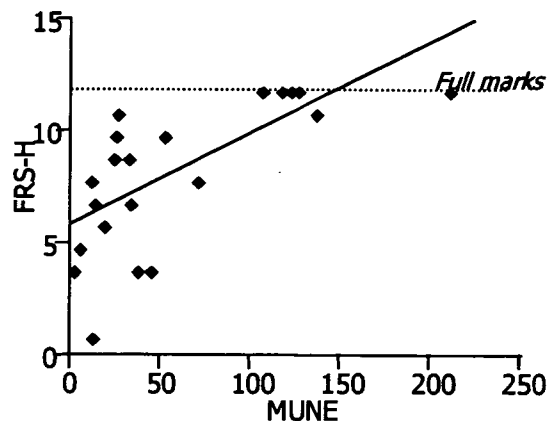


図1:ALSFRS 上肢とMUNE

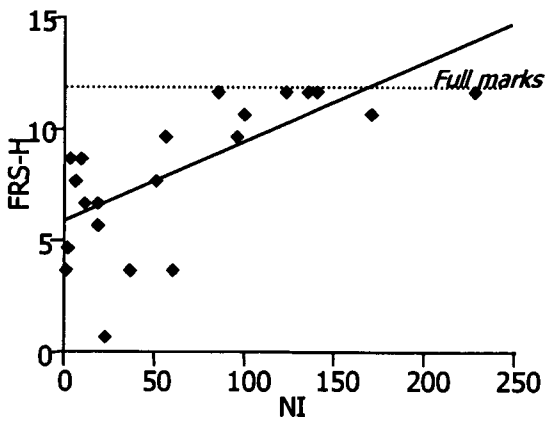


図2:ALSFRS 上肢とNI

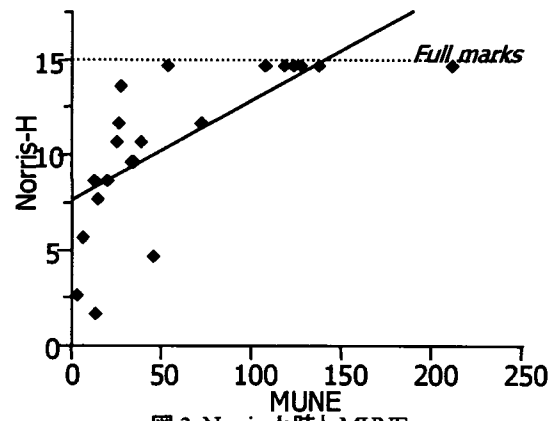


図3:Norris 上肢とMUNE

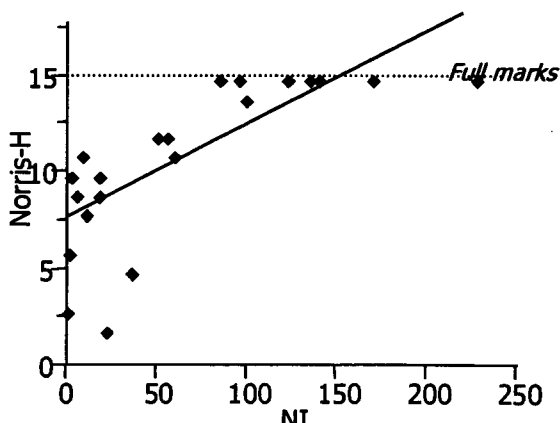


図4:Norris 上肢とNI

初めてこれらの臨床指標に変化がみられ、その後は急速に低下した。病初期においては、これらの臨床指標では臨床症状に先行する前角細胞脱落を捕捉しきれていない例がある。

上肢発症で急速に進行した 72 歳男性例においては、初回検査時にすでに ADM の MUNE は 6 まで低下していたが、ALSFRS-H は正常の 40% 程度残存していた。4 ヶ月後には MUNE は 3 まで低下し ALSFRS-H は正常の 20% 程度まで低下した。MUNE は臨床指標の低下にはるかに先行して低下していた。下肢発症の 61 歳男性例においては、初回検査時に ADM の MUNE は 200 以上あったものが、4 ヶ月後には 126 まで低下した。一方 ALSFRS-H と Norris-H の手の指標はほぼ不変のままであった。球麻痺で発症し四肢への進展がない 58 歳女性例では、1 年間の観察期間で ALSFRS と Norris scale に変化は見られなかったが、ADM の NI および MUNE は低下した。

D. 考 察

ALS では、疾患の進行に伴い脊髄前角細胞の脱落がおこるが、病初期においては、同時に脱神経筋の再支配が進み、運動単位の巨大化が観察され、それが運動単位数の減少を補完する。運動単位数が低下しても運動単位が大きくなることで筋力低下を相殺する。ALS ではある時期まではこのように運動単位が代償的に大きくなるため、運動単位推定数が正常の 10% 程度まで減少するまで一見 CMAP の大きさは保たれる⁵⁾。しかし、運動単位の巨大化にも限度があり、神経再支配の破綻がおこると、筋萎縮と脱力が顕在化して、臨床症状が急速に進行することになる。Dantes ら⁶⁾は、incremental 法 MUNE で ALS 患者の運動単位推定数を病初期から経時的に計測し、最初の 1 年で急速に運動単位数が減少することを示した。Arasaki ら⁷⁾は MPS 法 MUNE で、ALS の診断後の最初の 1 年で運動単位数が 70% 減少することを明らかにした。

ALS の経過観察において、MUNE は他のいかなる生理学的、臨床指標よりも早く変化が現れることが知られている⁸⁾。その理由から、MUNE は筋力や臨床評価スケール、肺活量等よりも鋭敏な予後判定因子になるといわれている⁹⁾。また、MUNE が急激に低下する患者においては、死亡リスクが高いことが知られている¹⁰⁾。したが

って、MUNE は ALS の実験動物モデルなどで臨床症状発現前の surrogate marker として利用されている。

運動単位推定数は ALS の初期に急速に減少するという知見から、症状のごく軽い時期や、無症状の患者における早期診断や、治療選択の判断に有用である。運動単位推定数の変化率は他の指標よりも大きいことから、進行の鋭敏な指標になり、治験への利用も期待されている¹¹⁾。3 ヶ月間、statistical 法 MUNE と握力、CMAP を観察した研究があるが、運動単位推定数は変化したもの、他の指標では変化がとらえられなかった¹²⁾。MPS 法 MUNE と CMAP、握力、筋力テスト、肺活量などが臨床指標として採用された治験がある¹³⁾。

MUNE にはいくつかの手法があるが、いずれの原理も、支配神経の最大刺激で得られた M 波(CMAP)などの筋活動量・電位を、単一運動単位が活動したときの筋活動量・電位の平均値で除して求めるというもので、生理学的に活動性のある運動単位数を反映している。今回の検討でも、MUNE は、上肢に限定した Norris Scale や ALSFRS-R スケールとの相関が見られた。これらの臨床指標がほぼ満点に近い得点であっても、MUNE が正常の約半数にまで減少している例があり、MUNE は ALS の surrogate marker として妥当であると考えられた。

運動単位推定数の減少の早さは、ALS 患者の予後を推測する手がかりになると言われ¹⁴⁾、健常者の運動単位推定数と比較することで、発症からの経過年数や予後の推定をしたり、MUNE の結果から急速進行群と緩徐進行群に分けて治験の層別解析に利用する試みがある¹⁵⁾。

一方、Neurophysiological Index (NI) は、ALS の進行に伴って変化する電気生理学的指標の中で、減少する指標である CMAP 振幅を増大する指標である M 波終末潜時で除したものに F 波出現率を乗じて得られ、ALS の進行とともに減少する。NI は特殊な技術や設備がなくとも MUNE より簡便に施行できる利点がある¹⁾。

NI は、ALS 患者の臨床経過を追うのに良い指標とされ、検査の再現性 test-retest reliability も高く、筋力と高い相関がある¹⁶⁾。また NI は急速進行するものや緩徐進行するものにも対応可能で¹⁷⁾、検者間誤差も少なく、ALS 患者の経過を追うのに適している¹⁸⁾。しかし、臨床的に筋力が残っていても F 波の導出ができない患者では、NI はいきなり“0”になってしまい、評価ができないのが欠点である。今回の検討では、上肢に限定した

Norris ScaleとALSFRS-R とNIの間に有意な相関がみられた。

今回、臨床評価に用いた ALSFRS-R と Norris Scale は、ALS 治療薬の開発治験などで広く用いられているもので、四肢・体幹機能、呼吸・嚥下機能を網羅した総合的な臨床評価スケールである。MUNE も NI も神経・筋機能障害(impairment)の指標であるが、これらと患者の能力障害(disability)を評価する臨床指標との高い相関が示されたことになる。

E. 結 論

小手筋の MUNE および NI は、上肢機能に限定した ALSFRS-R と Norris Scale との間に有意な相関が見られた。これらは ALS の生理学的指標として適していると考えられた。とくに MUNE は disability との相関が高く、ALS の生理学的指標として、NI より優れていると考えられた。ALSFRS-R や Norris Scale に反映されない pre-clinical な状態であっても MUNE が低下している事例があり、神経生理検査は surrogate marker として有用である。

F. 文 献

1. Aggarwal A, et al: J Neurol Neurosurg Psychiatry 73: 199-201, 2002.
2. Yuen EC, et al: Neurology 49: 573-578, 1997.
3. Bromberg MB, et al: J Neurological Sci 139(suppl.): 38-42, 1996.
4. Carvalho M, et al: Neurology 64: 1783-1785, 2005.
5. Carleton SA, et al: J Neurol Neurosurg Psychiatry 42: 42-51, 1979.
6. Dantes M, et al: Muscle Nerve 14: 416-421, 1991.
7. Arasaki K, et al: Neurology 51: 603-605, 1998.
8. Mitsumoto H, et al: Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 5 (suppl 2): 34-35, 2004.
9. Felice KJ: Muscle Nerve 20: 179-185, 1997.
10. Shefner J: Clin Neurophysiol 112: 955-64, 2001.
11. Olney R, et al: Neurology 52 (Suppl 2): A3, 1999.
12. Armon C, et al: Muscle Nerve 22: 1571-1575, 1999.
13. Carvalho M, et al: Muscle Nerve 23: 344-352, 2000.
14. Carvalho M, et al: Muscle Nerve 28: 630-633, 2003.
15. Carvalho M, et al: Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 5 (suppl 1): 108-110, 2004.

G 健康危険情報

なし

H. 学会発表

1.論文発表

Naito Y, Asahi M, Kuzuhara S: Comparison of Neurophysiological Index and MUNE in patients with ALS. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 8 (Suppl 1), 2007.

内藤 寛: ALS と運動単位数推定法(MUNE). BRAIN and NERVE 59(10): 1043-1052, 2007

2.学会発表

内藤 寛, 朝日 理, 葛原茂樹: ALS Surrogate MarkerとしてのMUNEとNeurophysiological Indexの比較. 第48回日本神経学会総会, 2007年5月, 名古屋

内藤 寛, 朝日 理, 葛原茂樹: ALS Surrogate MarkerとしてのMUNEとNeurophysiological Indexの比較. 第37回日本臨床神経生理学会学術大会, 2007年11月, 宇都宮

Naito Y, Asahi M, Kuzuhara S: Comparison of Neurophysiological Index and MUNE in patients with ALS. 18th International symposium on ALS/MND, Dec 2007, Toronto

I. 知的所有権の取得状況

- 1.特許取得: なし
- 2.実用新案登録: なし
- 3.その他: なし

ALS 脊髄前角細胞における TDP-43 の免疫染色性と

Golgi 装置との関係

藤田 行雄¹⁾、高玉 真光²⁾、岡本 幸市¹⁾

1) 群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学

2) 老年病研究所附属病院

研究要旨

[目的] TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)が、前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) や ALS に出現するユビキチン陽性タウ陰性封入体の主要な構成蛋白として同定され注目を集めている。一方、我々はこれまで ALS、家族性 ALS (FALS) の運動神経細胞において Golgi 装置の微細化が高頻度にみられることを報告しており、Golgi 装置の形態変化と神経細胞変性とに何らかの関係があるものと推測している。今回、抗 TDP-43 抗体による脊髄前角細胞の免疫染色性と Golgi 装置の形態変化との関連を免疫組織学的に検討した。[方法] ALS 10 例、対照 3 例の脊髄の 3 μ m 厚のミラー切片を作製し、抗 TDP-43 抗体と抗 TGN-46 抗体を用いて免疫染色を施行した。抗 TDP-43 抗体の染色性によって前角細胞を分類し、それぞれの Golgi 装置の形態異常の頻度を検討した。[結果] 対照例では抗 TDP-43 抗体で核が染色され、その Golgi 装置は糸くず状に染色された。ALS の脊髄前角細胞は抗 TDP-43 抗体で様々な染色性を示し、A: 正常パターン、B: 核及び細胞質ともに明らかな染色性(-)、C: 核の染色性(-)で細胞質に顆粒状一びまん性の染色性(+), D: 封入体形成(+)の 4 タイプに分類された。A の Golgi 装置は正常形態を示したが、B から D の TDP-43 の染色性に異常がある大半の前角細胞の Golgi 装置に微細化がみられた。[結論] TDP-43 に異常を来している ALS 前角細胞では Golgi 装置の微細化がみられており、何らかの蛋白合成系に異常が存在すると考えられた。

A. 研究目的

TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) が、前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) や ALS に出現するユビキチン陽性タウ陰性封入体の主要な構成蛋白として同定され注目を集めている^{1, 2)}。これまで我々は ALS、家族性 ALS (FALS) の運動神経細胞において Golgi 装置の微細化が高頻度にみられることを報告してき

た。³⁻⁶⁾。さらに好塩基性封入体や Bunina 小体、SOD-positive aggregates と Golgi 装置の形態変化とに関連がみられ、Golgi 装置の形態変化と神経細胞変性、特に神経細胞内封入体形成とは関連性があると考えている。今回、TDP-43 の免疫染色性と Golgi 装置の微細化の頻度を検討し、TDP-43 の異常がいかに神経細胞変性と関連しているかを明らかにす

ることを目的とした。

B. 研究方法

臨床的、病理学的に確定診断されたALS（死亡時年齢：56歳から81歳，経過5ヶ月から84ヶ月）10例と対照剖検例3例の脊髄パラフィンブロックから3 μ m厚のミラー切片を作製した。脱パラフィン後，一方を抗TDP-43抗体（1:8,000, Protein Tech Group, USA），もう一方をhuman trans-Golgi network (TGN)の15-38アミノ酸残基に対するポリクロナール抗体（抗TGN46抗体，1:4,000）を用いて免疫染色を施行した。抗TDP-43抗体はDAB法，抗TGN-46抗体はVIP法を用いて発色を行った。TDP-43の免疫染色性によって，前角細胞を分類し，それぞれのGolgi装置の形態異常の頻度を検討した。

C. 研究結果

正常細胞は核がTDP-43に染色され，細胞質には免疫染色性は認められなかった。対照例ではすべてこのパターンの染色性を示した。これらをType Aとした（図1，A1，B1）。

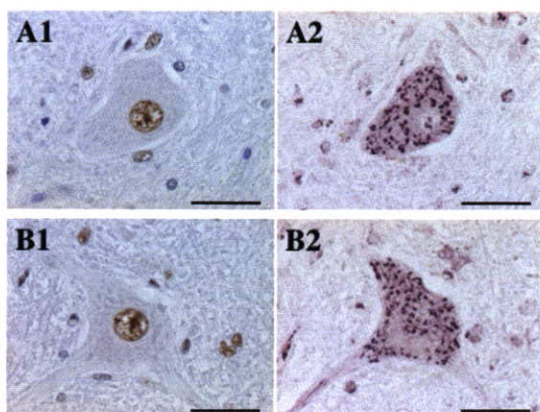


図1. Each mirror section of the spinal cord in control (A) and ALS (B). Immunostaining with anti-TDP-43 (A1, B1) and anti-TGN-46 antibodies (A2, B2). Neurons showing normal TDP-43 nuclear immunoreactivities (A1, B1) show normal Golgi apparatus profiles (A2, B2).

Bars: 50 μ m

一方，ALS例では，様々なTDP-43の免疫染色性がみられた。正常に比べ核の染色性が落ちているが，その細胞質には明らかな染色性がみられなかった細胞（図2，B1矢印）がみられ，これらをType Bとした。核の染色性が無くなり，その細胞質にびまん性や顆粒状にTDP-43陽性所見が認められる細胞（図2，A1）をType Cとした。skein-like inclusion（図2，B1矢頭）やround inclusionはTDP-43で陽性に染色され，これらの封入体を有する細胞では核の染色性はみられなくなっていた。これらの細胞をType Dとした。脊髄前角のグリア細胞にも封入体が認められた。

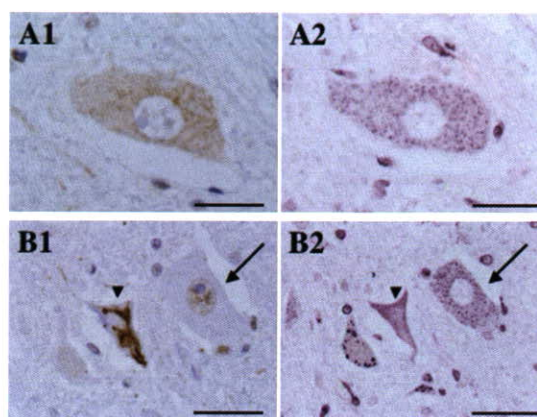


図2. Each mirror section of the spinal cord in ALS. Immunostaining with anti-TDP-43 (A1, B1) and anti-TGN-46 antibodies (A2, B2). A neuron showing the loss of normal nuclear staining and a few cytoplasmic TDP-43 immunoreactivities (B1, arrow), and a neuron with granular immunoreactivities for TDP-43 and no inclusions (A1) show fragmentation of the Golgi apparatus (A2, arrow in B2). A neuron with a skein-like inclusion (B1, arrowhead) also shows the disappearance of the Golgi apparatus (B2, arrowhead).

Bars: A 50 μ m, B 30 μ m

ミラー切片を用いた検討では，対照例，ALS例とも核がTDP-43で染色される細胞（Type A）のGolgi装置は正常形態を呈していた（図1，A2，B2）。これらの正常のTDP-43染色性を

示す神経細胞は48個あり、Golgi装置の微細化を起こしている細胞はみられなかった。核の染色性が低下しているが、細胞質内に明らかなTDP-43陽性所見を認めない細胞(Type B)のGolgi装置は微細化していた(図2, B2矢印)。これらType Bの細胞は8個認められ、その全てでGolgi装置の微細化が認められた。核の染色性が無くなり、その細胞質内にびまん性、顆粒状にTDP-43陽性所見がみられる神経細胞(Type C)は35個認められ、そのうち32個にGolgi装置の微細化が認められた。(図2, A2)。skein-like inclusionやround inclusionを有する神経細胞(Type D)のGolgi装置はTGN-46抗体による免疫染色で33個中33個、100%に微細化や染色性がみられなくなるなどの異常が認められた(図2, B2矢頭)。

D. 考察

Golgi装置の形態異常はALS、アルツハイマー病などの神経変性疾患において生じることが報告されているが、特にALSや変異SOD1トランスジェニックマウスにおいて高頻度に認められる^{4, 7, 8)}。我々はGolgi装置の微細化が神経細胞内において蛋白合成系の異常を来し、神経細胞変性に強く関わっているものと考えている。これまでに我々は、Bunina小体や好塩基性封入体、SOD1-positive aggregateなど神経細胞内封入体を有する神経細胞では、その大半でGolgi装置の微細化がみられており、封入体形成とGolgi装置の形態変化との間に関連があるものと考えてきた。今回の検討でも、TDP-43の染色性に異常を来した神経細胞では、その大半でGolgi装置の微細化がみられており、TDP-43の異常とGolgi装置の異常に関連があると考えられた。Golgi装置の微細化は、SOD1変異を有するFALSでも認められるが、最近、TanらによりSOD1変異を有するFALSでは、TDP-43に異常がみられないことが報告された⁹⁾。このことからTDP-43の異常が直接的にGolgi装置の形態変化を来しているのではな

く、Golgi装置の異常により蛋白合成系に何らかの異常が生じ、TDP-43の正常な核の染色性が失われ、その細胞質内にTDP-43陽性構造物が出現してくるものと推測された。

E. 結論

TDP-43の正常な核の染色性が失われたALSの脊髄前角細胞ではその大半でGolgi装置の微細化がみられており、何らかの蛋白合成系に異常が存在すると考えられた。

F. 文献

- 1) Arai A et al. Biochem Biophys Res Commun 351: 602-611, 2006
- 2) Neumann M et al. Science 314: 130-133, 2006
- 3) Fujita Y et al. Acta Neuropathol 103: 243-247, 2002
- 4) Fujita Y et al. Neuropathology 25: 388-394, 2005
- 5) Fujita Y et al. J Neurol Sci 174: 137-140, 2000
- 6) Fujita Y et al. J Neurol Sci 163: 81-85, 1999
- 7) Mourelatos et al. Proc Natl Acad Sci USA 87: 4393-4395, 1990
- 8) Mourelatos et al. Proc Natl Acad Sci USA 93: 5472-5477, 1996
- 9) Tan CF et al. Acta neuropathol 113: 535-542, 2007

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Fujita Y et al. J Neurol Sci (in press)

I. 知的所有権の取得情報

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

ALS と認知症を伴う ALS における TDP-43 の発現

（分担）橋詰良夫

研究協力者 吉田眞理、三室マヤ、市橋亮一
愛知医科大学加齢医科学研究所

研究要旨

われわれはユビキチン陽性封入体(UI)を指標とする孤発性筋萎縮性側索硬化症（SALS）と認知症を伴う ALS（ALS-D）、前頭側頭葉変性症（FTLD）、原発性側索硬化症の連続したスペクトラムを報告してきた。2006年に FTLD と SALS の UI の構成タンパクのひとつが TDP-43 であると同定されたので、認知症が臨床的に観察されない SALS と ALS-D の TDP-43 陽性神経細胞内、グリア細胞内封入体（NCIs、GCIs）を検討対比した。NCIs は SALS の側頭葉に 20%、黒質には 40%出現し SALS と ALS-D（100%）は連続した病態であることが示唆された。GCIs は上位、下位運動ニューロンの変性が強い部位に多く出現し、SALS の臨床経過や進展様式などの多様な病態に NCIs、GCIs の形成が強く関連していると考えられた。TDP-43 の障害の初期変化の病態機序解明が SALS の原因究明につながる重要性をもっている。

A.研究目的

孤発性筋萎縮性側索硬化症(SALS)、湯浅・三山型認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症(ALS-D)、原発性側索硬化症(PLS)および前頭側頭葉変性症(FTLD-U)では、ユビキチン陽性封入体(UI)が脊髄前角細胞内や大脳皮質神経細胞内に出現して、共通した病態があることが推測されてきたが、昨年そのタンパクが TDP-43 であると同定された(Neumann et al. Science 2006, Arai et al. BBRC 2006)。これまでの臨床病理像や UI での検討から、認知症の確認されていない SALS においても ALS-D と区別できない病理像や UI が認められることから SALS と ALS-D が連続した病態であることが推測されてきた。ALS-D では前頭側頭葉や黒質など運動系を越えた病変分布がみ

られることが相違点のひとつであった。認知症のない SALS の運動系と運動系以外の領域における TDP-43 蛋白の発現を ALS-D と対比し、ALS と ALS-D の近縁性を検討した。また SALS の臨床経過や進展様式などの多様な病態に TDP-43 の発現がどのように関連しているかについてニューロンとグリア細胞の発現に注目して検討した。

B.研究方法

愛知医科大学加齢医科学研究所の剖検例 3490 例中、認知症のない孤発性 ALS 20 例、死亡時平均年齢 63.4 (44-78) 歳、平均罹病期間 2 年 6 ヶ月 (10 ヶ月-7 年 6 ヶ月)、と ALS-D 19 例、死亡時平均年齢 60.6

(46-80) 歳、平均罹病期間 2 年 1 ヶ月 (8 ヶ月-5 年) を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋した脊髄、中心前回を含む前頭側頭葉皮質、扁桃核、被殻、尾状核、淡蒼球、視床、中脳、延髄の各切片に、通常の KB、HE 染色に加えてユビキチン免疫染色 (polyclonal, Dako)、TDP-43 (polyclonal, protein Tech、1:3000) を施行し、TDP-43 陽性封入体の形態、分布、出現量を検討した。剖検時には家族から承諾を得ている。

C. 研究結果

ALS-D では 19 例全例に海馬傍回、海馬歯状回顆粒細胞、扁桃核、側頭葉極、および黒質に TDP-43 陽性神経細胞内封入体 (NCIs) を認めた。臨床的に認知症のみられない SALS 20 例中 4 例に海馬傍回、海馬歯状回顆粒細胞、扁桃核、側頭葉極に NCIs を認めた。4 例中 2 例は、ユビキチン免疫染色と TDP-43 免疫染色の両者で NCIs を認めた。海馬傍回、側頭葉極 II、III 層に軽度の細胞脱落とグリオーシス、海馬支脚の変性を認めた。他の 2 例では側頭葉、扁桃核、海馬支脚などにほとんど変性がみられなかったが、海馬歯状回顆粒細胞層や扁桃核、側頭葉極などに少数の NCIs を認めた

(図 1)。この 2 例は TDP-43 免疫染色にのみ陽性を示した。全体的には NCIs の出現している SALS の側頭葉の変性と NCIs の出現量は ALS-D に比して軽い傾向を示した。

SALS の黒質には 20 例中 8 例 40% に NCIs や神経突起内に封入体を認めたが、神経細胞はかなりよく保たれ、少数のフリンメラニンの出現をみとめる程度の変化が大部分であった (図 2)。

SALS と ALS-D では全例に中心前回と脊髄前角細胞には TDP-43 陽性 NCIs とグリア細胞内封入体 (GCIs) を認めた。下

位運動ニューロンでは、正常な核の染色性が消失し胞体は陰性の細胞、核の染色性が消失し胞体が微細顆粒状の染色性を示すもの、胞体に線維性の構造がみられるものが、段階的にみられ、濃染する NCIs の形態は、線維状の skein-like inclusion, 類円形の round inclusion がみられた。TDP-43 陽性 GCIs の形成はオリゴデンドログリアが主体であるが、アストロサイトにもみられた。脊髄横断面でみると GCIs は変性の強い外側角柱に最もよく観察されるが、中間帯や後角にも観察され、前側索の変性の強い症例では前索にも観察された。一方、錐体側索路や前索路の変性が強い症例においても脊髄レベルでは GCIs はきわめて少数みられたにすぎない。SALS と ALS-D では前角細胞脱落の比較的軽い ALS-D の方が GCIs の出現がより少数であった。

Onuf 核を観察できた SALS の 11 例中 9 例に NCIs あるいは GCIs を認めた (図 3)。

中心前回では NCIs は Betz 巨細胞のみならず、中型・小型の錐体細胞にもみられた (図 4,5)。中心前回の変性の強い SALS 症例では中型・小型の錐体細胞の NCIs の出現と GCIs の出現が多くみられた。SALS と ALS-D では大型から小型の錐体細胞に出現する NCIs の形態自体には差異は乏しかった。GCIs の出現は SALS、ALS-D の両者に観察された。

D. 考察

認知症のみられない SALS の側頭葉には 20 例中 4 例に TDP-43 陽性 NCIs を認めたことは、SALS と ALS-D の連続性をより示唆する所見である。側頭葉皮質や海馬支脚の変性がみられる症例は臨床上認知障害が十分に評価されていない可能性も残るが、側頭葉皮質や海馬支脚の変性が乏しい症例は subclinical stage の症例あるいは SALS

と ALS-D の境界領域の症例を示していると考えられる。

SALS の 40% に黒質に NCIs がみられたことは、ALS-D との連続性を示すと同時に、SALS 自体でも軽度ではあるが黒質に変性が及んでいることが示唆される。

Onuf 核が保たれることは SALS の陰性兆候の病理学的根拠であるが、82% に NCIs がみられ、SALS の変性が潜在的に広範囲であることが伺われる。

脊髄前角では細胞脱落とグリオシスが強い SALS でより多数の NCIs と GCIs が観察され、TDP-43 陽性封入体の形成過程が神経細胞変性と並行していることが示された。

E. 結論

TDP-43 陽性封入体は認知症が臨床的に観察されない SALS にも出現し SALS と ALS-D は連続した病態であることが示唆された。GCIs は上位、下位運動ニューロンの変性が強いほど多く出現する傾向がみられ、SALS の臨床経過や進展様式などの多様な病態に TDP-43 陽性封入体の形成が強く関連していると考えられた。核内タンパクである TDP-43 の障害過程の初期変化を遡ることが SALS の病態機序解明につながる重要性をもっている。

F. 文献

- 1) 湯浅亮一：臨床神経 4：529-534、1963
- 2) Mitsuyama Y et al：Arch Neurol 36：592-593
- 3) Okamoto K et al：Neurosci Lett: 129:233-236, 1991
- 4) Neumann M et al: Science 314:130-133, 2006
- 5) Arai T et al: BBRC 351: 602-611, 2006
- 6) 吉田眞理 ほか：臨床神経 32：1193-1202、1992
- 7) Yoshida M: Neuropathology, 24:87-102,2004
- 8) Sampathu DM et al: Am J Pathol 169: 1343-1352, 2006

9) Nakano I et al: Neuropathology 12:69-77, 1992

10) Iseki E et al: J Neurol Sci 159:194-201,1998

11) Ikeda K et al: Acta Neuropathol (Berl) 104:21-28,2002

12) Neary D et al: J Neurol Neurosurg Psychiatry 53:23-32, 1990

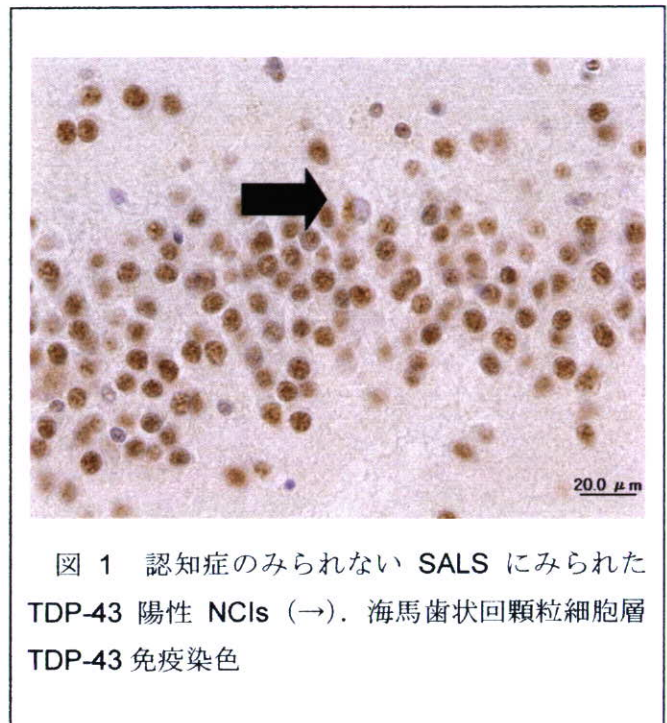


図 1 認知症のみられない SALS にみられた TDP-43 陽性 NCIs (→). 海馬歯状回顆粒細胞層 TDP-43 免疫染色

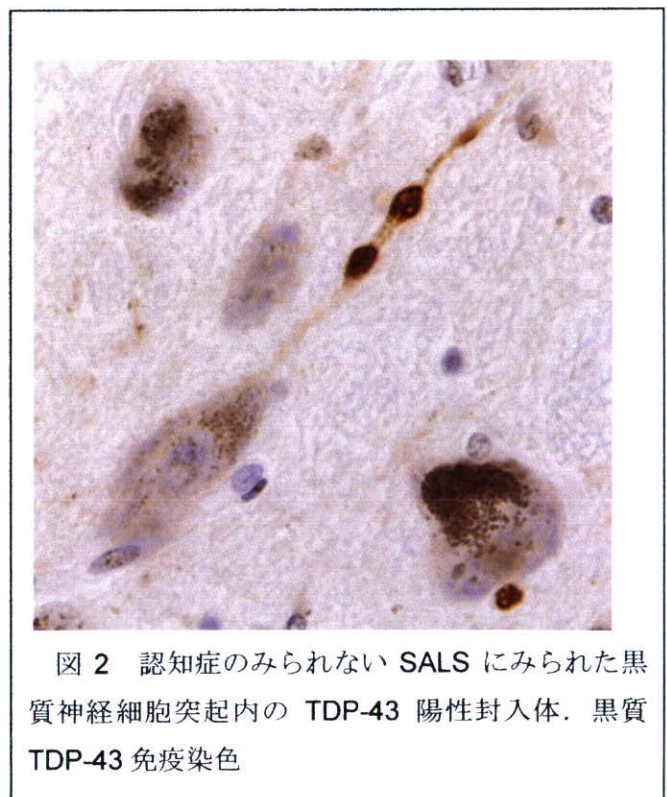


図 2 認知症のみられない SALS にみられた黒質神経細胞突起内の TDP-43 陽性封入体. 黒質 TDP-43 免疫染色

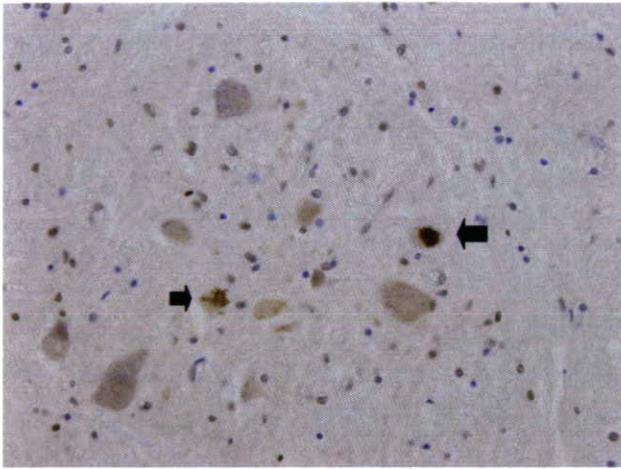


図 3 SALS にみられた第二仙髄 Onuf 核の TDP-43 陽性 NCIs (矢印). Onuf 核 TDP-43 免疫染色

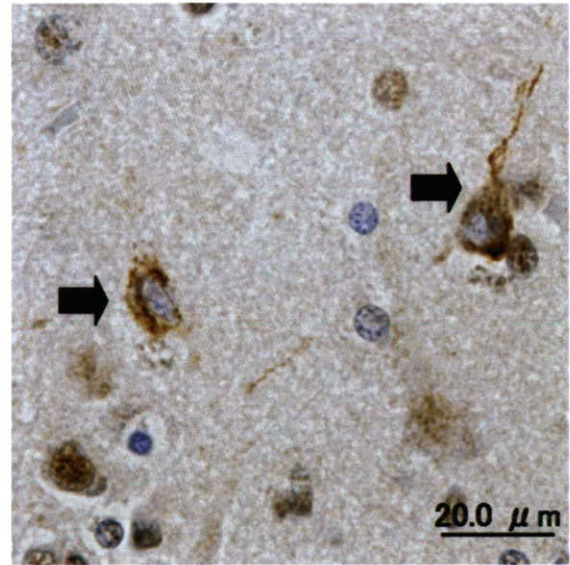


図 4 SALS の中心前回皮質表層の小型神経細胞の NCIs (矢印).

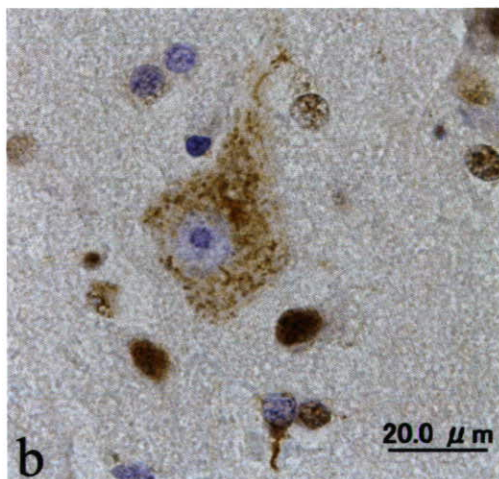
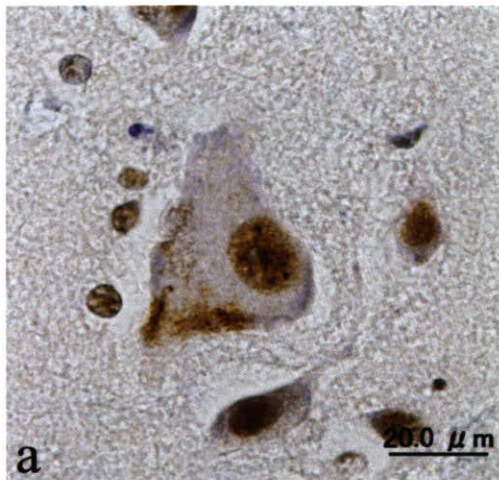


図 4 SALS の中心前回の Betz 巨細胞の NCIs. 核の染色性が残存している NCIs(a)、びまん性の NCIs と GCI(b).

H.研究発表

橋詰良夫、吉田眞理：脊髄の加齢性変化。脊椎脊髄ジャーナル 20:410-415,2007

Sawada M, Imamura K, Hashizume Y et al: Role for cytokines in inflammatory process in Parkinson' disease. CNS Drugs 21:3-10.2007

Iwasaki Y, Yoshida M, Hashizume Y et al: Pyramidal tract degeneration in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Neuropathology 27:434-441.2007

Sakakibara A, Aoki E, Hashizume Y et al: Distribution of nestin and other stem cell-related molecules in developing and diseased human spinal cord. Pathology International 57:358-368,2007

長期の臨床経過を示した筋萎縮性側索硬化症における 神経細胞内 TDP-43 異常発現とその分布に関する免疫組織化学的検討

西平 靖¹⁾、譚 春鳳¹⁾、柿田明美²⁾、高橋 均¹⁾

¹⁾新潟大学脳研究所病理学分野、²⁾同 生命科学リソースセンター

研究要旨 下位運動ニューロン症状のみを認め、長期間生存し得た孤発性筋萎縮性側索硬化症 5 例（ALS 4 例/ALS with temporal lesion 1 例）を対象に、抗 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。通常の孤発性 ALS/ALS with temporal lesion 群に比し、これらの症では TDP-43 陽性神経細胞内封入体（TDP-43-ir NCI）の数は明らかに少なく、その分布も限局性であった。また、アストロサイトと思われるグリア細胞内における異常 TDP-43 の蓄積は通常の ALS より目立ち、とくに変性の強い脊髄前角において著明であった。ALS with temporal lesion の 1 例では、TDP-43 陽性の微細顆粒状構造物がより広範に認められた。このような臨床型の ALS は、TDP-43 の動態から見ても通常の ALS とは異なっていた。

目的

最近、ユビキチン陽性、タウおよびシヌクレイン陰性の封入体の出現を特徴とする孤発性 ALS や前頭側頭葉変性 (FTLD-U) において、そのユビキチン陽性神経細胞封入体の構成タンパクとして TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定された^{1, 2)}。その後、我々は、孤発性 ALS では、TDP-43 の異常発現は運動ニューロン系に止まらず、中枢神経系の広範な部位に出現すること、また神経細胞胞体内だけではなく、グリア細胞胞体内にも出現することを報告した³⁾。

孤発性 ALS は臨床病理学的には広いスペクトラムを有する神経疾患と考えられるが、その中であって、上位運動ニューロン症状を認めず、下位運動ニューロン症状のみを認め、長期間生存し得る症例群の存在が知られている⁴⁾。このような症例においては、時にその的確な生前診断が困難なことがある。

今回、我々はこのような ALS の 5 剖検例を対象に、抗 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。

方法

過去に当教室にて剖検検索を行った、人工呼吸器未使用で長期生存した下位運動ニューロン優位の ALS 5 例を対象とした。その臨床所見を Table 1 にまとめた。TDP-43 に対するポリクローナル抗体 (1:4000; ProteinTech Group, Inc., Chicago, IL) を用い、免疫組織化学的に神経細胞およびグリア細胞胞体内 TDP-43 陽性封入体の発現とその分布を

中枢神経系（大脳、脳幹、小脳、脊髄）および末梢神経系（後根神経節、交感神経節）で検索した。併せて、その結果を通常の孤発性 ALS/ALS with temporal lesion の 27 例と比較検討した。

結果

まず、症例 5 を代表としてこの特殊群の病理組織所見を提示する (Fig. 1)。5 例では、運動ニューロン系において、その組織所見は同様であった。脊髄前角においては、神経細胞の脱落やグリオーシスが明らかであったが (Fig. 1A)、脳幹運動神経核では、それらは比較的軽度であった (Fig. 1B)。下位運動ニューロン内には Bunina 小体が認められた (Fig. 1B, inset)。一方、上位運動ニューロン系には著変を指摘できなかった。Betz 細胞はよく保たれており (Fig. 1C)、皮質脊髄路には、ミエリンの淡明化は認められなかった (Fig. 1D, E)。しかし、よく観察すると、中心前回皮質にマクロファージによる貪食像がごく少数ながら認められ (Fig. 1C, inset)、皮質脊髄路の sudann III 染色では陽性顆粒が少数認められた (Fig. 1F)。これらの所見から、上位運動ニューロン系にも、ごく軽度ではあるが変性が存在するものと解された。

症例 5 の側頭葉に明らかな異常所見が観察された。CA1-subiculum の移行部や側頭葉極背側内側部に著明な神経細胞の脱落が認められた (Fig. 1G)。ユビキチン免疫では、海馬歯状回顆粒神経細胞内に陽性封入体が観察された (Fig. 1H)。このような側頭葉病変は、この特殊な臨床型において、今回はじめて確認されたものである。

長期生存 ALS (人工呼吸器未使用)	1	2	3	4	5
Sex	M	M	F	M	M
Age of onset (years)	60	58	64	67	63
Duration of illness (years)	20	17	10	11	10
Clinical diagnosis	SPMA	SPMA	SPMA	MND	BAD
Site of symptoms (after onset)	上肢	下肢 上肢(5y) 嚥下障害(12y)	下肢 上肢(4y)	下肢 上肢(9y) 嚥下障害(10y)	上肢 下肢(6y) 嚥下障害(10y)
Tongue atrophy	+	+	+	-	-
Dyspnea (after onset)	20y	17y	8.5y	11y	5y
Dementia	-	-	-	-	-
DTR (+ : exaggerated, - : absence)	上肢-	-	-	+(ATR以外)	-
Pathologic reflex	-	-	-	-	-
Pathology diagnosis	ALS	ALS	ALS	ALS	ALS with temporal lesion

Table. 1 長期生存した下位運動ニューロン優位の孤発性 ALS 5 症例の臨床所見
性 (M=男性,F=女性), 臨床診断 (SPMA = spinal progressive muscular atrophy; MND = motor neuron
disease; BAD = brachial amyotrophic diplegia),

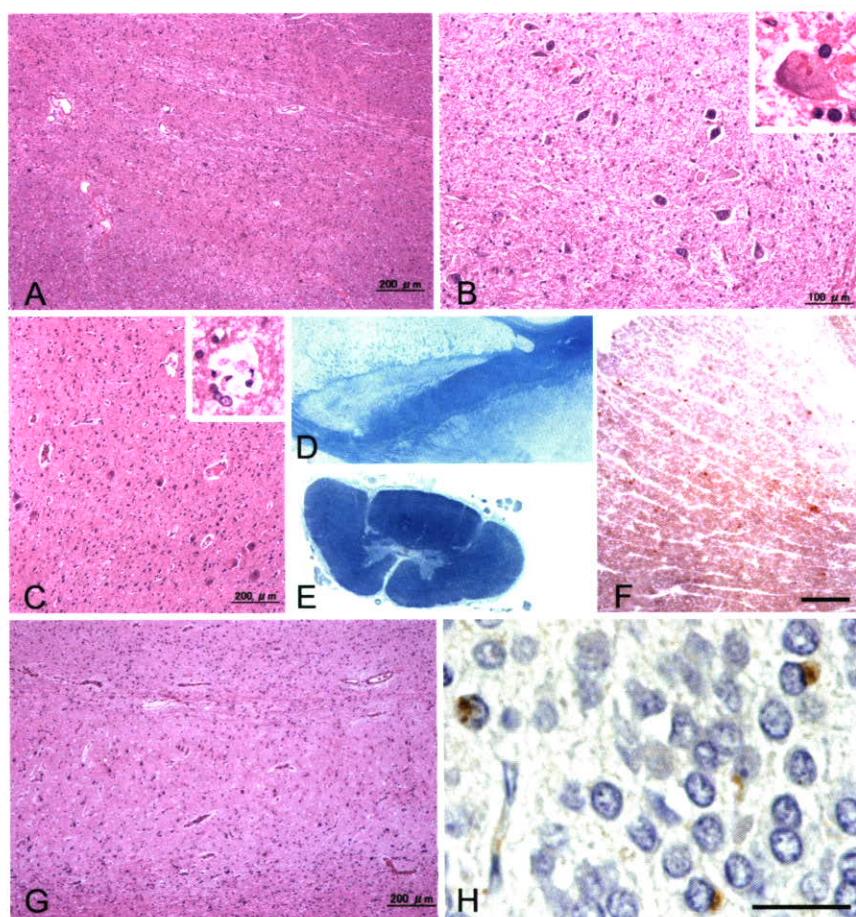


Fig. 1 長期生存した下位運動ニューロン優位の孤発性 ALS の病理組織所見
(症例 5)

A 脊髄前角: 高度の神経細胞の脱落。
B 舌下神経核: 中等度の神経細胞の脱落、右上枠: Bunina 小体。C 中心前回皮質: よく保たれている Betz 細胞、右上枠: マクロファージによる Betz 細胞の貪食像。D, E 内包、胸髄: よく保たれている皮質脊髄路。F 胸髄側索: 皮質脊髄路に少数の Sudan III 陽性顆粒。G CA1-subiculum 移行部: 明らかな神経細胞の脱落。H 海馬歯状回: ユビキチン陽性神経細胞内封入体

A, B, C, G hematoxylin-eosin staining;
D, E Klüver-barrera staining; F Sudan III staining; H ubiquitin immunostaining.
Bar F 200µm, H 20 µm

TDP-43 免染では、下位運動ニューロン胞体内に円形あるいはスケイン状の封入体、また微細顆粒状構造物が認められた(Fig. 2A)。たまに、微細顆粒状構造物は円形あるいはスケイン状の封入体と

同一細胞内に共存する像も観察された(Fig. 2B)。また、数はごく少ないが、後根神経節(Fig. 2C)や脳幹網様体(Fig. 2D)にも TDP-43 の異常発現が認められた。

症例 5 では、脊髄・脳幹に加え、海馬歯状回(Fig. 2E)、扁桃核、前頭側頭葉皮質第 II 層、被殻、視床などテント上にも TDP-43-ir NCI が観察された。この例では、ほかの 4 例と異なり、TDP-43 の異常蓄積の多くは微細顆粒状として存在しており (Fig. 2F)、それらはユビキチン免疫では確認されなかった。グリア細胞に関しては、オリゴデンドロサイトと思われる細胞の胞体内にタウオパチー

に見られる coiled body やシヌクレイノパチーに見られる GCI によく類似する構造物が認められ (Fig. 2G)、その分布は TDP-43-ir NCI よりやや広範であった。また、アストロサイトと思われるグリア細胞胞体内に tuft 状の構造物が認められ (Fig. 2H)、それは通常の ALS/ALS with temporal lesion 例より目立ち、とくに変性が高度である脊髄前角に比較的多数認められた。

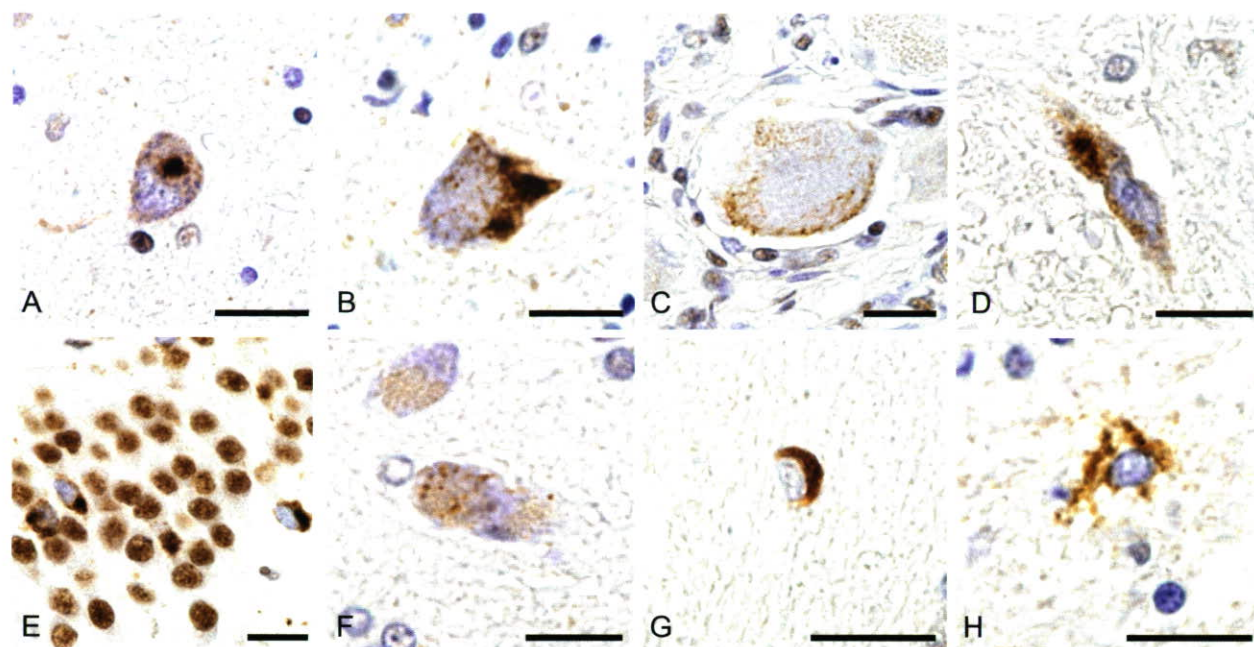


Fig. 2 長期生存した下位運動ニューロン優位の孤発性 ALS の神経系における TDP-43 の異常発現。
A-F TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体 (A, E round inclusion, B round and diffuse granular inclusions, C, D skein-like inclusions, F diffuse granular structures). A, B 脊髄前角, C 後根神経節, D 脳幹網様体, E 海馬歯状回, F 視床)。G, H TDP-43 陽性グリア細胞胞体内封入体 (G coiled body like inclusion, F tuft like inclusion. G 小脳白質, F 脊髄前角)。Bars = 20 μ m

長期の臨床経過を示した ALS/ALS with temporal lesion 例に認められた TDP-43-ir NCI の数は通常の孤発性 ALS/ALS with temporal lesion 例 (論文投稿準備中) より明らかに少なく、その分布も限局性であった。

考察

長期生存した下位運動ニューロン優位の孤発性 ALS における TDP-43 の異常発現を免疫組織化学的に検討した。

通常の ALS 群に比し、長期生存し得た下位運動ニューロン優位の孤発性 ALS においては、TDP-43-ir NCI の数は少数であり、その分布も限局性であった。TDP-43 の異常発現と、さらには神経細胞死との関わりなど、未だ不明な点が多いが、今回の症例群における TDP-43 の異常とその広がりや軽度さはこの亜型の本質と考えられる。長期の臨床経過を示す孤発性 ALS は TDP-43 の

動態から見ても通常の孤発性 ALS と異なっていた。

結論

下位運動ニューロン優位、長期の臨床経過を示した ALS では、神経系における TDP-43 陽性神経細胞内封入体の数は通常の ALS に比し明らかに少なく、その広がりも限局性であった。このような ALS において、今回はじめて temporal lesion を伴った 1 例を経験した。その例では、TDP-43 陽性神経細胞内封入体として微細顆粒状構造物 (pre-inclusions) を広範囲に認めた。

文献

- 1) Neumann M *et al.* Science 314: 130-133, 2006
- 2) Arai A *et al.* Biochem Biophys Res Commun 351: 602-611, 2006
- 3) Tan C-F *et al.* Acta Neuropathol 113: 535-42, 2007
- 4) Iwanaga K *et al.* J Neurol Sci 146: 139-43, 1997

頸椎症性脊髄症におけるグリア及び神経細胞内タウ陽性構造物

清水 宏¹⁾、柿田明美²⁾、高橋 均¹⁾

¹⁾新潟大学脳研究所病理学分野、²⁾同 生命科学リソースセンター

研究要旨 頸椎症性脊髄症 (Cervical spondylotic myelopathy; CSM) 患者 11 名および年齢・性の一致した正常対照 11 名において、免疫組織学的検討に加え電子顕微鏡下観察を行った。CSM 8 例でタウ陽性の糸屑状構造物 (Neuropil thread-like structures; NTSs) およびグリア胞体内のタウ陽性構造物を認め、前者の一部は血管周囲や脳表へ向うアストロサイトの終足に一致し、後者は数本の短く太い突起を有し、Thorn-shaped astrocytes (TSAs) の形態を呈していた。また CSM 全例で神経細胞内に Pretangles/tangles を認めた。正常対照ではこれらはいずれも認められなかった。NTSs および TSAs では主として 4 リピートタウの蓄積を認めたのに対し、神経細胞内 Pretangles/tangles は 3 リピート・4 リピートタウ双方から構成されていた。電顕下観察ではアストロサイト突起内に直径約 20nm の Paired helical filaments を認めた。CSM 患者脊髄ではアストロサイトと神経細胞内にタウ陽性構造物が出現し得、CSM の疾患過程において反応性に蓄積し凝集したと考えられた。

はじめに

頸椎症性脊髄症 (Cervical spondylotic myelopathy; CSM) は、椎間板の退行変性・脊柱管への突出、骨棘形成などに伴い、脊髄に対する機械的な圧迫や血流障害が生じ、脊髄の変性をきたしたものである。他方でタウ蛋白は微小管結合蛋白のひとつであり、細胞内輸送や細胞形態維持に関わる。一見 CSM の病態とタウ蛋白との間には特別な関連はないように思われるが、我々は CSM 脊髄に異常リン酸化タウの蓄積を見出し、その由来、分布、アイソフォーム、超微形態などを含めた病理学的検討を行った。

対象・方法

対象は CSM 患者 11 例 (男性 8 例、女性 3 例、年齢 59-83 歳、平均 70 歳) および年齢・性の一致した正常対照 11 例 (年齢 60-83 歳、平均 70 歳) である。CSM 患者では変性レベルを含んだ複数レベルを、正常対照では第 7 頸髄を検索した。HE、KB 染色に加え、AT8 抗体、RD3 および RD4 抗体を用いた免疫染色を行った。さらに抗 GFAP 抗体・AT8 抗体による蛍光二重免疫染色、電子顕微鏡下観察を行った。

結果

CSM 患者脊髄では、3 種類の AT8 陽性構造物を認めた (Fig. 1)。即ち、糸屑状構造物 (Neuropil thread-like structures; NTSs)、アストロサイト胞体内タウ陽性構造物、神経細胞内 Pretangles/tangles である。正常対照では、これらの構造物はいずれ

も認められなかった。

CSM 患者 11 例中 8 例 (73%) において、変性レベルに限局し、灰白質優位に NTSs を認め、その一部は血管周囲や脳表に向うアストロサイトの終足に一致していた。同じ 8 例ではグリア胞体内のタウ陽性構造物も認め、これらは偏在した核と数本の太く短い突起を有し、Thorn-shaped astrocytes (TSAs) の形態を呈していた。また CSM 全例で前角運動神経細胞などに神経細胞胞体内 pretangles/tangles を認め、3 例では変性を認めないレベルにもこれらが出現していた。RD3 および RD4 抗体による免疫染色 (Fig. 1f-i) では、アストロサイト由来タウ (NTSs および TSAs) は主として 4 リピートタウであるのに対し、神経細胞内タウは 3 リピートタウ・4 リピートタウ双方から構成されていることが明らかにされた。

抗 GFAP 抗体・AT8 抗体による蛍光二重免疫染色 (Fig. 2) により、NTSs および TSAs においては、GFAP とタウが共存していることが示された。

電顕下観察 (Fig. 3) では、直径 10nm 程度のグリア線維と共存して、直径約 20nm で 50-80nm 周期のくびれを有し、半月状の横断面を呈する異常線維性構造物を認め、Paired helical filaments (PHFs) と考えられた。

考察

多数例の CSM 患者において、アストロサイトおよび神経細胞内にタウ陽性構造物を認めた。このタウの病理は正常対照では認められず、またアルツハイマー病、進行性核上性麻痺、大脳皮質基

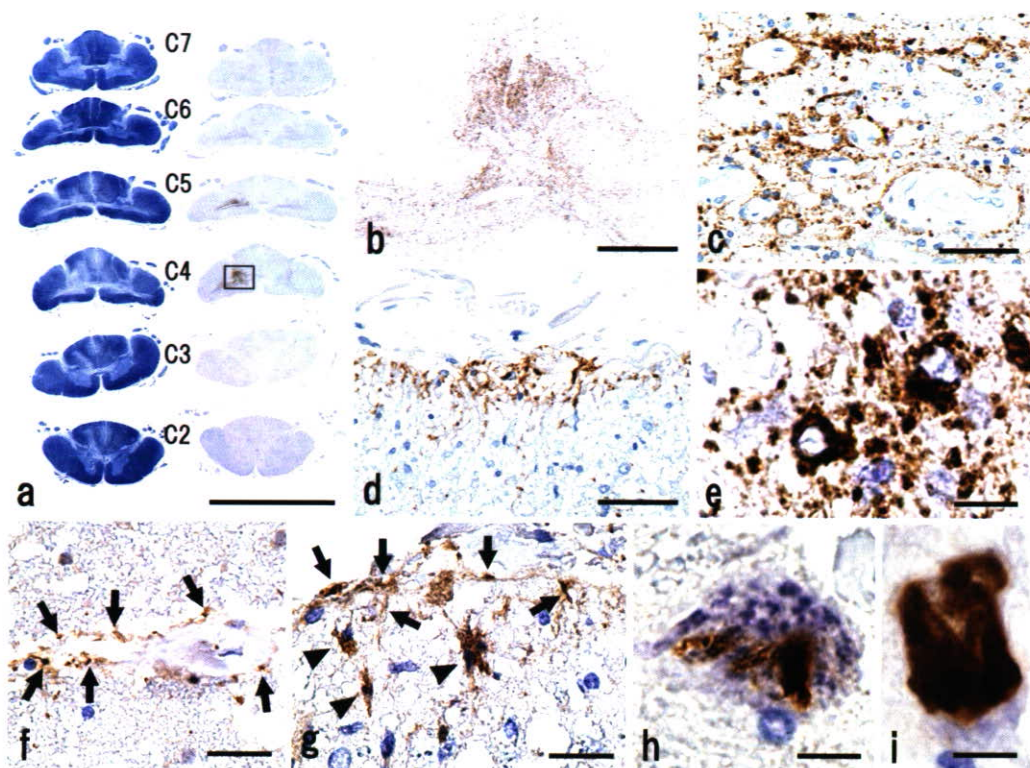


Fig. 1 Histological and immunohistochemical observations. **a** Transverse sections of a cervical cord stained by KB (*left*) and AT8 antibody (*right*). Concavity of the anterior part of the cord and atrophy of the gray matter are evident in segments C4-C6 (*left*). In these segments, the gray matter is shown to contain AT8-positive structures (*right*). **b** In the area indicated by the *open square*, diffusely distributed AT8-positive structures are evident in the neuropil. **c** AT8-positive neuropil thread-like structures (NTSs) in the intermediate gray matter, demonstrating an astrocytic foot-like perivascular arrangement. **d** Similar AT8-positive structures in the lateral column, demonstrating an astrocytic subpial foot-like arrangement. **e** AT8-positive astrocytes, designated as thorn-shaped astrocytes (TSAs), in the posterior horn. **f** RD-4-positive perivascular NTSs (*arrows*) in the posterior column. **g** RD-4-positive NTSs (*arrows*) and TSAs (*arrowheads*) in the lateral column. **h** RD-3-positive neuronal cytoplasmic pretangles/tangles in the anterior horn. **i** RD-4-positive neuronal cytoplasmic pretangles/tangles in the anterior horn. **a, b, e** case 4; **c, d, g** case 8; **f, i** case 11; **h** case 3; **a** Klüver-Barrera and AT8; **b-e** AT8; **f, g, i** RD4; **h** RD3. *Bars* **a** 1cm; **b** 500 μ m; **c, d** 50 μ m; **f, g** 20 μ m; **e, h, i** 10 μ m

底核変性症を含めたタウオパチーにおける脊髄のタウ病理とは異なっており、CSM の疾患過程で反応性に生じたと考えられた。

TSAs はピック病などを含めた様々な疾患¹⁾の他、正常高齢者の内側側頭葉²⁾にも出現することが知られている。その出現機序は不明であるが、ボクサー脳症においては、機械的刺激が繰り返されたことにより生じたグリオーシスの重要性が示唆されている¹⁾。CSM においても、脊髄に対する機械的刺激の反復が誘因となり TSAs が出現した可能性が考えられる。神経細胞内へのタウ蓄積も同様の機序による可能性があった。

亜急性硬化性全脳炎³⁾やアルツハイマー病⁴⁾の長期生存例においては、神経原線維変化のみならずグリアへのタウの蓄積を認めることがある。CSM においても、アストロサイトにタウが蓄積

するまでには、ある程度の時間を要する可能性がある。我々が検討した症例の中で罹病期間が最長(10年)の例ではタウの蓄積を認めなかったことから、一旦脊髄に貯留したタウが最終的には荒廃した脊髄から消失していく可能性も考えられた。

CSM という共通の疾患ストレス下にありながら、蓄積したタウのアイソフォームがアストロサイト(主として4リポートタウ)と神経細胞(3リポート・4リポートタウ)で異なることも興味深い。これは本来各々の細胞が恒常的に発現しているタウが、CSM の疾患過程で異常リン酸化されそのまま蓄積したことを示唆しているのかも知れない。

アストロサイト内の PHFs はこれまでアルツハイマー病の長期生存例で報告されてきた⁵⁾。我々の結果は、タウオパチーではない、機械的刺激の

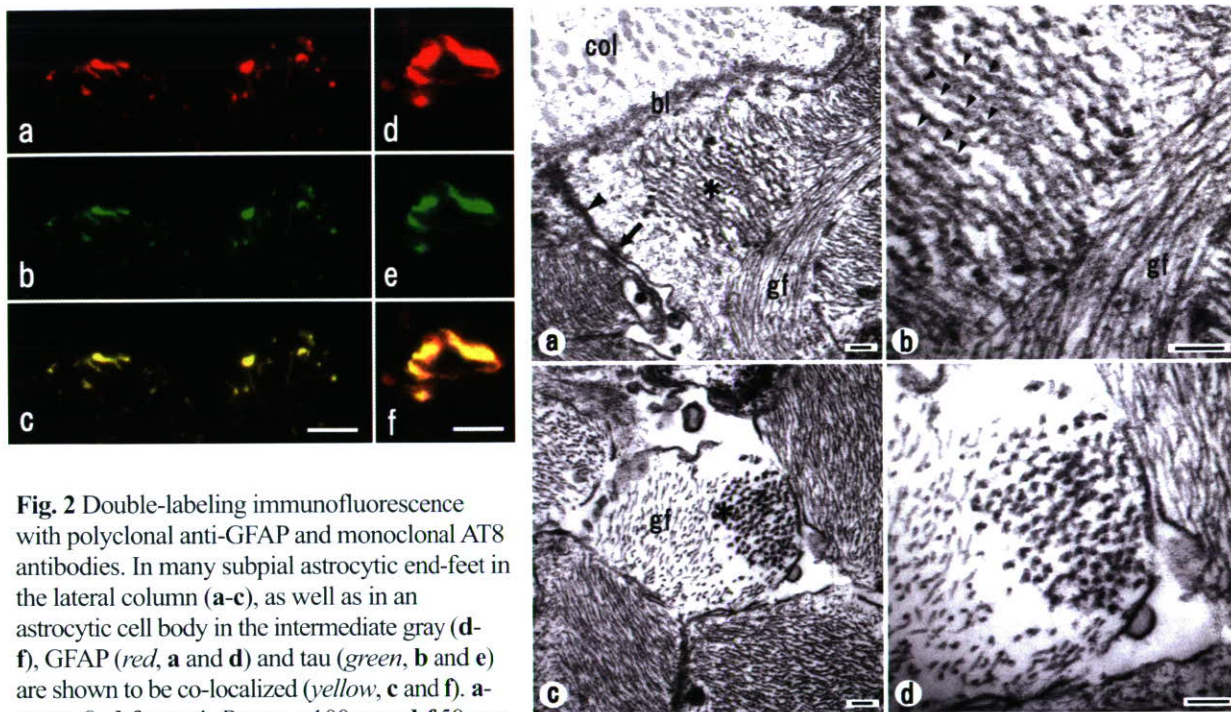


Fig. 2 Double-labeling immunofluorescence with polyclonal anti-GFAP and monoclonal AT8 antibodies. In many subpial astrocytic end-feet in the lateral column (**a-c**), as well as in an astrocytic cell body in the intermediate gray (**d-f**), GFAP (red, **a** and **d**) and tau (green, **b** and **e**) are shown to be co-localized (yellow, **c** and **f**). **a-c** case 8, **d-f** case 4. Bars **a-c** 100 μ m; **d-f** 50 μ m

Fig. 3 Ultrastructural observations. **a** An astrocytic process, containing longitudinally sectioned abnormal filamentous structures (asterisk) and glial filaments (gf). The process is partially covered by basal lamina (bl). A gap junction (arrowhead) and a punctate adhesion (arrow) between the neighboring astrocytic processes, as well as collagen fibers (col) in the perivascular space, are also evident. **b** High-magnification view of the area indicated by the asterisk in **a**, showing abnormal filamentous structures about 20 nm wide and glial filaments about 10 nm wide (gf). Periodic constrictions at intervals of 50-80 nm (arrowheads) are evident in the former. **c** Another astrocytic process, containing cross-sectioned abnormal filamentous structures (asterisk) and glial filaments (gf). **d** High-magnification view of the area indicated by the asterisk in **c**, showing the characteristic crescent-shaped appearance of the former. Bars **a-d** 100 nm

反復による局所の組織破壊および再生過程において、PHFs が反応性にも出現し得ることを示唆し、PHFs の出現機序を考えるうえで興味深い。

結論

CSM 患者脊髄ではアストロサイトおよび神経細胞内にタウ陽性構造物が出現し得る。タウの蓄積と CSM の臨床(症状, 罹病期間など)の関係は興味深いが、これを解明するためには多数例の症候性 CSM 患者を対象とした検討が必要である。

文献

- 1) Ikeda K *et al.* Acta Neuropathol, 620-625, 1995
- 2) Schultz C *et al.* Neurobiol Aging, 397-405, 2004
- 3) Ikeda K *et al.* Neurosci Lett, 133-135, 1995
- 4) Arima K *et al.* Acta Neuropathol, 28-39, 1998
- 5) Nakano I *et al.* Acta Neuropathol, 228-232, 1992

筋萎縮性側索硬化症 2 型原因遺伝子産物 ALS2 の機能解析

國田竜太¹⁾、大友麻子²⁾、鈴木-宇都宮恭子²⁾、秦野伸二³⁾、池田穰衛³⁾

- 1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
- 2) 東海大学大学院医学研究科先端医科学専攻
- 3) 東海大学大学院医学研究科 脳・神経疾患研究センター

研究要旨

本研究では、筋萎縮性側索硬化症 2 型原因遺伝子産物 (ALS2/alsin) の機能解析を、主に細胞生物学的手法で行った。その結果、低分子量 G 蛋白質 Rac1 が ALS2 と結合するとともに、ALS2 の上流の活性化因子であることが明らかになった。Rac1 はエンドサイトーシスの一機構であるマクロピノサイトーシスの必須因子として知られる分子であるが、細胞質に局在する ALS2 は Rac1 が直接結合することによりマクロピノサイトーシス経路を経てエンドゾーム局在し、エンドゾームの成熟ならびに融合に関わることが明らかとなった。これらのことから、マクロピノサイトーシスとその後のマクロピノソームの輸送や融合過程が、特定の運動ニューロンの機能維持や生存に必須であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究は、筋萎縮性側索硬化症 2 型原因遺伝子産物 (ALS2/alsin) の生理的機能を解明することで運動神経の選択的変性機構ならびに ALS2 の有する神経細胞保護作用の実体を解明し、将来の治療法開発の発想を得ることを目的としている。今回は、主に ALS2 の細胞生物学的な機能の解明を目指して研究を行った。

B. 研究方法

我々は、ALS2 が多様な膜輸送系を制御する重要低分子量 G 蛋白質 Rab5 の特異的な活性化因子 (Rab5GEF) であることを既に明らかにしている。しかし、Rab5 はエンドサイトーシス機構、エンドソームの輸送、融合の過程をそれぞれ制御する必須分子であるので、ALS2 がこれら何れの膜輸送過程において Rab5 を活性化しているかは不明であった。ALS2 は通常多くの細胞種で不活化された状態で細胞質に局在することか

ら、本研究では ALS2 の膜局在を促す上流因子の存在を仮定し、その同定を試みた。また、併せて ALS2 の制御する膜輸送過程についても解析した。具体的には、主に HeLa 細胞を用いて、ALS2 の細胞質局在を膜局在に変化させるタンパク質、または増殖因子等を検索した。

C. 研究結果

本研究により、低分子量 G 蛋白質 Rac1 の活性化型が ALS2 と直接結合するとともに、ALS2 の上流の活性化因子であることを突き止めた。細胞質局在の ALS2 は、活性化型 Rac1 または、下流で Rac1 を活性化する刺激により見事に大型のエンドソームに局在を変えた。Rac1 はエンドサイトーシスの一機構であるマクロピノサイトーシスの必須因子として知られている。マーカー分子との共存を調べた結果、細胞質に局在する ALS2 は Rac1 が直接結合することによりマクロピノ

サイトーシスと呼ばれるエンドサイトーシス経路を経てエンドゾーム局在し、エンドゾームの成熟ならびに融合に関わることが明らかとなった。さらに、*ALS2* 遺伝子破壊マウス由来の初代培養細胞を用いて解析した結果、*ALS2* は、マクロピノサイトーシスの取り込み過程自体を、細胞種特異的に亢進していることが明らかになった。これらの結果から、*ALS2* は新規の *Rac1* エフェクターであり、マクロピノサイトーシス過程で機能することが明らかになった。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した全ての遺伝子改変実験、動物実験、及び実験材料の採取については、東海大学における倫理委員会、組替え DNA 実験安全委員会、ならびに動物実験委員会の承認を得た上で、動物に与える苦痛を最小限にするように実施した。

D. 考察

今回の研究により、現在あまり研究されていないマクロピノサイトーシスとその後のマクロピノソームの輸送や融合過程が、特定の運動ニューロンの機能維持や生存に必須であることが示唆された。この発見は、全く新規で類似の研究も公表されておらず、大変に興味深い。さらに我々は、*ALS2* の機能 (マクロピノサイトーシスとマクロピノソームの融合) は、他の *Rab5* 活性化因子にも重複して担われていることを明らかにしている。このことは、*ALS2* 以外の *Rab5* 活性化因子が、運動ニューロン以外の多くの細胞種で *ALS2* と重複した機能を有し、ある程度 *ALS2* の機能を相補している可能性を示唆する。このことは、今後、運動ニューロンの選択的細胞死機構を考える上でも極めて興味深い。

E. 結論

Rab5 活性化因子である *ALS2* は、*Rac1* の新規のエフェクターであり、かつマクロピノサイトーシスに関与する分子であることが判明した。従って、マクロピノサイトーシスを介した膜輸送系は、運動ニューロンの機能維持や生存に必須であると考えられる。今後、*ALS2* の機能解析を進めることで、新規の運動ニュー

ロン生存に必須な細胞内膜輸送系が明らかになると考えられる。

F. 文献

1) Kunita R, et al. : J Biol Chem 282, 16599-16611, 2007

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

1) Kunita R, et al. : J Biol Chem 282, 16599-16611, 2007

2. 学会発表

1) Kunita R, et al. : HGM2007 Human Genome Meeting, 87 (POSTER NO: 157), Montreal/Canada, 2007.

2) Otomo A, et al. : HGM2007 Human Genome Meeting, 88 (POSTER NO: 160), Montreal/Canada, 2007.

3) Suzuki-Utsunomiya, et al. : HGM2007 Human Genome Meeting, 90 (POSTER NO: 167), Montreal/Canada, 2007.

4) Kunita R, et al. : Neuro2007, The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 102 (01P-J03), Yokohama/Japan, 2007.

I. 知的財産権の登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし