

200833074A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症・認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症・

ユビキチン化封入体を伴う

前頭側頭型認知症死後脳脊髄資源の構築

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村山繁雄

平成21(2009)年 3月

目次

I.	総括研究報告書	
	筋萎縮性側索硬化症・認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症・ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭型認知症死後脳脊髄資源の構築	5
	村山繁雄 東京都老人総合研究所 高齢者ブレインバンク	
II.	分担研究報告書	
	1. 脊髄バンクの構築～今年度の実績～	17
	初田裕幸 ¹⁾ 、齊藤祐子 ¹⁾²⁾ 、足立正 ¹⁾ 、舟辺さやか ¹⁾ 、村山繁雄 ¹⁾	
	¹⁾ 東京都老人総合研究所 高齢者ブレインバンク (BBAR)	
	²⁾ 東京都老人医療センター 剖検病理科	
	2. 変性疾患脳における TDP-43 病変の出現と病型分類	20
	秋山治彦 ¹⁾ 、新井哲明 ¹⁾ 、長谷川成人 ¹⁾	
	¹⁾ 東京都精神医学総合研究所	
	3. 東京大学における ALS/ALSD/FTLDDU 資源の充実とその応用について	24
	清水 潤 ¹⁾ 、古和 久朋 ¹⁾ 、宮川 統爾 ¹⁾ 、辻 省次 ¹⁾	
	¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科神経内科	
	4. 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合におけるリン酸化 TDP-43 蛋白の免疫組織化学的検討	30
	小久保康昌 ¹⁾ 、遠藤真由美 ¹⁾ 、新井哲明 ²⁾ 、秋山治彦 ²⁾ 、村山繁雄 ³⁾ 、長谷川成人 ²⁾ 、葛原茂樹 ⁴⁾	
	¹⁾ 三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻神経感覚医学講座 神経病態内科学分野医学部神経内科学	
	²⁾ 東京都精神医学総合研究所	
	³⁾ 東京都老人総合研究所 高齢者ブレインバンク	
	⁴⁾ 国立精神・神経センター病院	

5.	筋萎縮性側索硬化症における Frontal Assessment Battery による 前頭葉機能の評価 -----	34
	寺田達弘 ¹⁾ 、小尾智一 ¹⁾ 、杉浦明 ¹⁾ 、山崎公也 ¹⁾ 、 <u>村山繁雄</u> ²⁾ 、溝口功一 ¹⁾ ¹⁾ NHO 静岡てんかん・神経医療センター 神経内科 ²⁾ 東京都老人総合研究所高齢者ブレインバンク	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	43
IV.	研究成果の刊行物・別刷 -----	47

I. 総括研究報告書

「筋萎縮性側索硬化症・認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症・ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭型認知症死後脳脊髄資源の構築」班 総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症・認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症・ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭型認知症死後脳脊髄資源の構築

研究代表者：村山繁雄 東京都老人総合研究所高齢者ブレインバンク

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症・認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症・ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭型認知症の蓄積剖検例を、抗 TAR DNA-binding protein (TDP) 43 抗体免疫染色で再評価し、TDP43 プロテオパチーの診断基準を確立することを試みた。さらに蓄積凍結資源をデータベース化することで研究資源として整備し、網羅的ゲノム解析を行うことで、病因・病態解明と治療法の開発を目指すことを試みた。

研究分担者

秋山治彦：東京都精神医学総合研究所・参事
研究員

清水潤：東京大学大学院医学系研究科神経内科・講師

齊藤祐子：センター剖検病理科・医員

研究協力者

小久保康昌：三重大学神経内科講師

小尾智一：独立行政法人国立病院機構（以下 NHO）静岡てんかん・神経医療センター 神経内科 医長

今福一郎：横浜労災病院・神経内科・部長

福武敏夫：亀田総合病院・神経内科・部長

栗崎博：NHO 東京病院・神経内科・医長

本吉慶史：NHO 下志津病院・神経内科・医長

竹内壮介：国立国際医療センター・神経内科・医長

加藤貴行：センター・リハビリテーション科 医長

小宮正、仁科裕史：センター神経内科 医長

椎名盟子、砂川昌子、広吉祐子、倉重毅志、

江口桂：同医員

初田弘幸：研究所固有常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

足立正、舟辺さやか：同非常勤研究員

クトラムでとらえることが現実的となった。しかし、ALS/ ALSD は神経内科、ALSD/ FTLDU は精神科で臨床的に扱われる傾向が世界的で、全体像の解明は遅れている。本疾患の死後脳研究資源も、運動ニューロン疾患バンクと、前頭側頭型認知症バンクに分裂しており、臨床・画像・病理での統合的アプローチが困難である。

高齢者ブレインバンク (BBAR) は、老化に伴う運動・認知機能障害の克服に総合的に取り組むプロジェクトであり、神経内科・精神科を含めた協力体制のもと、本疾患に取り組んできた伝統を持つ。これを基盤として、ALS/ ALSD を多数蓄積してきた東京大学大学院医学系研究科神経内科及び、BBAR が最終神経病理診断を引き受けてきた総合病院の剖検例、及び、FTLDU を多数蓄積してきた東京都精神医学総合研究所が協力することで、本疾患の全体像を解明することが、本研究の第一の目的である。

特に、本疾患と primary lateral sclerosis (PLS)、spinal muscular atrophy (SPMA) との関係は、特定疾患が両者ともに ALS とは認めないかたちをとっている点で大きな問題となっている。また、FTLDU は窒息による突然死をおこすことが知られている点は ALS 病変の関与が考えられるが、適切な臨床診断法の樹立による疾患概念の変更が、本疾患の生命予後改善に必須である。

また、ALS 罹患者は、疾患の克服のための献体の意識が一般的に高く、剖検率も極めて高いのが特徴であるのに、本邦で死後脳・脊髄バンクの構築が遅れていることについて、改善を試みる。また、本研究において、施設に個別に蓄積されている凍結組織の内容をデータベース化する援助をし、共同研究希望者の依頼を、班員並びに協力研究施設に伝達し、共同研究として協力可能であれば、直接施設情報のみを共同研究希望者に伝えるという、リサーチリソースネットワークと同じシステムを構築することで、研究基盤の構築を図ることを試みた。

B. 研究方法

1. TDP43 蓄積症の全貌の解明

1.1. TDP43 蓄積症の抽出

ALS/ALSD/FTLNU 病理診断例以外に、PLS、SPM、Pick 球を伴わない Pick 病等の診断例を各施設より抽出、中心前回・歯状回を含む海馬、舌下神経核を含む延髄のパラフィンブロックより 6 μ m 厚切片を作成、抗 TDP43、ubiquitin 抗体免疫染色でスクリーニングし、TDP43 蓄積症に属する症例を抽出した。

また、TDP43 蓄積症の概念の拡大を受け、BBAR 登録例については腰髄・延髄・前方海馬の網羅的スクリーニングを開始した。さらに、監察医務院剖検例中、認知症の記載があり、脳重量が 1,000g を切っている症例のスクリーニングに TDP43 抗体免疫染色を追加した。

1.2. 臨床・画像情報の抽出

病歴を検討し、抽出症例の臨床・画像所見より、以下の点を重点的に検討した。①神経学的所見：上位運動ニューロン徴候、下位運動ニューロン徴候、球麻痺、呼吸筋麻痺。②高次脳機能：前頭側頭葉型認知症の要素、失語、他の大脳巣症状。③神経生理検査：針筋電図、神経伝導速度、磁気刺激。④MRI：萎縮部位、テンソル画像。⑤SPECT/PET：ECD-SPECT、FDG-PET での検討。

1.3. 病理診断基準の作成

抗 TDP43 抗体免疫染色は通常細胞核が陽性となるが、ALS/ALSD/FTLNU では細胞体内、あるいは核内にネコの目様に限局し、陽性所見を呈する。現在 TDP43 遺伝子異常による ALS が多数報告されてきたが、今のところ、ALS/FTLNU の臨床型は報告されていない。

一方神経病理学的に、抗 TDP43 抗体免疫染色の結果からは、これらの症例の病変範囲はスペクトラムをなし、病変部位により表現型が規定されている傾向を示す。この群を一次

性 TDP43 蓄積症と総称する。

一方 TDP43 陽性構造は、Alzheimer 病 (AD)、Lewy 小体病 (LBD)、Corticobasal degeneration (CBD) 等、多くの他の疾患でも認められ、これらを二次性 TDP43 蓄積症として統括することとした。

また ALS/PDC は、TDP43 の沈着を常に伴うことより複合型 TDP43 蓄積症に分類することとした。

BBAR は、抗リン酸化タウ (AT8)、 β (11-28, IBL)、 α -synuclein (psyn#64)、ubiquitin 抗体免疫染色による、剖検例全例の網羅的スクリーニングを行っており、これに TDP43 抗体を加えることで、TDP43 蛋白蓄積症の老化における意義を明らかにすることを試みた。

2. ALS/ALSD/FTLNU 死後脳・脊髄リソースの構築

2.1. 凍結リソースの前方視的構築

一次性 TDP43 蓄積症については、横隔膜・横隔神経の凍結標本を作成する。脊髄に関しては、前方視的蓄積例には、頸膨大・腰膨大一髄節ずつ、施行可能な施設は胸髄は Th4, 8, 12 以外は凍結するかたちで、凍結資源を構築する。また大脳は、施行可能な施設（東京都老人医療センター・東京大学医学部附属病院神経内科・松沢病院）では、高齢者ブレインバンク (BBAR) プロトコルに従い、半脳凍結半脳固定の方式を続行する。協力研究施設は、右半球前頭極を極力凍結することとした。

2.2. 凍結リソースの後方視的構築

既に後方視的に蓄積されている症例群については、死後より採取までの時間、採取部位、凍結方法、保存方法の情報を含む、統一したフォーマットのファイルメーカーデータベースを供給することで、蓄積資源について、希望に応じ必要症例を抽出可能な体制を構築することを試みた。

2.3. 表現型を規定するゲノム背景の解明

高齢者ブレインバンク例、さらに分担班員施設例で、倫理委員会の承認が得られた検体について、東大神経内科で開発された、神経変性疾患スクリーニングチップ、認知症疾患スクリーニングチップで網羅的に検討し、ALS/ALSD/FTLNU の表現型を規定しているゲノム背景を明らかにすることを試みた。

2.4. リサーチリソースネットワークの構築

共同研究希望者に関して、希望組織の情報をあらかじめ班参加分担班員・協力研究者に e-mail で伝達し、対応可能組織と希

望者が直接交渉できるよう仲介を行う体制構築を開始した。

(倫理面への配慮)

剖検例に対し、新しい方法論で診断を再検討する行為は、倫理的に問題ない。また、それらを総合化することで、診断基準を提唱する試みも、剖検承諾書の範囲内である。凍結材料を施設内でデータベース化する援助をする点も問題はない。それらを用いゲノム研究を施行するにあたっては、ヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針に従い行う必要があり、それぞれの施設において、倫理委員会の承認を必要とする。高齢者ブレインバンク、東京大学大学院医学系研究科神経内科では、この倫理指針に従っての共同研究に関し、東京都老人医療センター・老人総合研究所、東京大学医学部附属病院倫理委員会の承認を既に得ている。

C. 研究結果

高齢者ブレインバンク登録例について、これまでの高位頸髄に加え、第6頸髄、第5胸髄、第4腰髄の迅速凍結採取を開始した。現在までに63例の半脳と脊髄が採取された。非開頭剖検例に関しては、全身組織バンク同意の下同一部位の採取を行い、30例の非開頭剖検例において脊髄を凍結できた。開頭剖検例については高齢者ブレインバンクプロトコール (www.mci.gr.jp/BrainBank/) に従い、老化性変化の網羅的検索を行った。非開頭剖検脊髄についても、準じた網羅的解析を行った。

スクリーニングに用いる抗体として、2008.8の本研究班サマールワークショップの討論を踏まえ、分担研究者の秋山博士らのグループが開発した、抗リン酸化TDP43 (pTDP43) 409/410抗体単クローン抗体を用い、海馬前方、延髄、腰髄の全例スクリーニングを開始した。陽性と非陽性の境界引きについて、非リン酸化TDP43抗体

の場合は核の染色性の低下が、異常細胞の同定の指標となる。しかし抗pTDP43抗体の場合、対象としている構造の超微形態より推察される光顕形態の推測は、歯状回顆粒細胞層ユビキチン陽性封入体と、skein, Lewy body-like inclusion 以外ない。しかし、連続剖検例での抗pTDP43抗体免疫染色によるスクリーニングで、陽性所見としては、neuropilに認められるthread, dotに加え、グリア内陽性所見が頻度的に高く、これらが超微形態的に何に対応するかは、免疫電顕的検討でも、現時点での解明はできなかった。

一方、欧米で認知症の主因のひとつとされ、本邦でほとんど診断されてこなかった海馬硬化(HS)に関して、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病等に伴う変性型HSはTDP43陽性、循環障害型HSは陰性であることが明らかとなった。

TDP43遺伝子異常については、当施設のDNA保存連続剖検筋萎縮性側索硬化症(ALS)43例は全て免疫組織学的にTDP43陽性であったが、孤発性で、TDP43病的遺伝子変異は認めなかった。現在横浜労災病院49連続剖検ALS例の抗pTDP43抗体によるスクリーニングを進行中である。

本年の研究でもっと注目されるのは、ALS/ALSD/FTLDUの臨床的記載のない認知症例で、一次性TDP43蓄積症が、BBAR登録例、監察医務院スクリーニング例にそれぞれ1例認められた点である。これらの症例の詳細は不明であるが、ともに認知症として在宅療養していた経過を持つ。このような症例が老年痴呆として診断されている中に、どの程度の頻度であるのか、さらに検討していく予定である。

髄液のバイオマーカーを測定し、剖検に付された症例群を示す(表1)。ALSが2例、FTLDUが1例含まれているが、特徴的所見は見いだし得なかった。

ALS/ ALSD/ FTLDU の範疇内での本年度の蓄積例は、全て亀田総合病院からの症例で、呼吸器接続 SOD1 変異例 1 例、ALSD 1 例、ALS 1 例の 3 例にとどまった。

D. 考察

TDP43 蓄積のメカニズムに関する検討結果を受け、本研究では最 C 末の 409/410 部のリン酸化抗体を用いることとした。スクリーニングは単クローン抗体で行い、陽性所見が得られた時は、多クローン抗体と市販の TDP43 抗体 (N 末を認識する) で確認した。さらに、C 末を認識する抗体 (405-410)、さらに別の部位のリン酸化を認識する抗体 (405/406) を加えた。問題症例については、凍結組織を用いた Western blot での確認を行った。また、BBAR 登録例での問題例については、TDP43 遺伝子異常の有無のスクリーニングを行った。

この結果、今年度 BBAR 登録例より 1 例、一次性 TDP43 蓄積症のかたちをとりながら、病歴からは Alzheimer 病 (AD) と診断されている症例が検出された。この例は他の老年性変化に乏しいが、抗 ubiquitin 抗体免疫染色でも陽性である。もう 1 例も同様であり、さらに詳細に検討していく予定であるが、一次性 TDP43 蓄積症の臨床型の広がりを示す可能性がある。

また、コントロール症例には、主にグリア内、あるいは neuropil thread ないし dot のかたちで陽性所見が、脊髄前角、延髄網様体に認められるが、細胞内陽性所見は海馬に好発し、神経原線維変化や Lewy 小体病理がある場合に、独立あるいは共存して出現する傾向を示す。合併例と非合併例で、臨床病型が異なるかいないかについて、現在検討中である。

E. 結論

TDP43 蓄積は、コントロールでも認められ、また老年期認知症の中に一定数存在す

る可能性が示された。今後さらに症例数を増やし、検討していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

紙上発表 (英文)

1. Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H: Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study. *Acta Neuropath* 2008; 115: 561- 575
2. Hashimoto M, Kawasaki K, Suzuki M, Mitani K, Murayama S, Mishina M, Oda K, Kimura Y, Ishiwata K, Ishii K, Inoue K: Presynaptic and postsynaptic nigrostriatal dopaminergic functions in multiple system atrophy. *Neuroreport* 2008; 19: 145- 150
3. Tokumaru AM, Kakamura K, Terada H, Kobayashi O, Kanemaru K, Kato T, Murayama S, Yamakawa M, Mizuo M: Asymptomatic self- limiting diffuse white matter lesions in subacute to chronic stage of herpes simplex encephalitis. *The Neurology Journal* 2008; 21: 316-322
4. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Ito G, Iwatsubo T, Fukayama M, Murayama S: Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropath Exp Neurol* 2008; 67: 945-953
5. Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, Mitsui J, Matsukawa T, Kishino A, Onodera O, Aoki M, Shimozawa N, Murayama S, Itoyama Y, Suzuki Y, Sobue G, Nishizawa M, Goto, J, Tsuji S: Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65: 1326-1332
6. Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Inoue K, Murayama S: The incidence and extent of Lewy- body related alpha- synucleinopathy in human aging olfactory bulb. *J Neuropath Exp Neurol* 2008; 67: 1072-1083

口頭発表（英文）

1. Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Inoue K, Murayama S: The incidence and extent of Lewy- body related alpha- synucleinopathy in human aging olfactory bulb. 2008 Annual Meeting of the American Association for Neuropathologists, 2008.4. 8, SanDiego, U.S.A, JNEN 2008; 67: 443
2. Hatsuta H, Saito Y, Adachi T, Arai T, Sawabe M, Kuwano R, Mori H, Murayama S: Staging for Amyloid Angiopathy in Human Aging. 2008 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008.11.15, Washington D.C., U.S.A.
3. Ishibashi K, Murayama S, Ishii K, Mizusawa H: Correlative study of MIBG cardiac scintigraphy and Dopamin pet scan in diagnosis of Parkinson disease. 2008 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008.11.17, Washington D.C., U.S.A.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

I. その他 なし

脊髄バンクの構築～今年度の実績～

初田裕幸¹⁾、齊藤祐子¹⁾²⁾、足立正¹⁾、舟辺さやか¹⁾、村山繁雄¹⁾

1) 東京都老人総合研究所 高齢者ブレインバンク (BBAR)、2) 東京都老人医療センター 剖検病理科

研究要旨

老化の研究資源として、死後脊髄バンクを構築する。2008年2月よりの当施設全連続剖検例を対象、脊髄を全例採取、L4・Th3・C5脊髄上端を凍結、後根神経節、馬尾、S2、L5・2、Th12・8・4・1、C8・7・6・5・4のパラフィン切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン、クリュヴァーパレラ染色に加え、腰仙髄を抗リン酸化 TDP-43 抗体(Pser409/410)、胸髄を抗リン酸化 α シヌクレイン抗体(p-syn)、下位頸髄を抗リン酸化タウ抗体(AT8)による免疫組織化学的検討によるスクリーニングを施行した。2009年1月18日現在、116例(男:女=57:59、平均82歳)蓄積、33例が検索済で、32例にAT8陽性構造物、5例にレビー小体関連病理、4例にリン酸化 TDP-43 陽性構造物を認めた。以上より脊髄も脳と同様に老化を考える必要があり、今後とも症例を蓄積することで脊髄の老化を明らかにする。

A.研究目的

脊髄の老化において、タウや α シヌクレインの異常蓄積が生じることは周知の事実であるが、TDP-43の知見は乏しく、老化性変化の研究資源として、死後脊髄バンクを構築する。

B.研究方法

2008年2月よりの当施設全連続剖検例を対象とし、脊髄を全例採取し、L4・Th3・C5脊髄上端を凍結、後根神経節、馬尾、S2、L5・2、Th12・8・4・1、C8・7・6・5・4のパラフィン切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン、クリュヴァーパレラ染色に加え、S2、L5・2を抗リン酸化 TDP-43 抗体(Pser409/410, monoclonal)、Th12・8・4を抗リン酸化 α シヌクレイン抗体(p-syn)、Th1、C8・7を抗リン酸化タウ抗体(AT8)によるスクリーニングを施行した。また開頭の許可が得られた症例はブレインバンクプロトコルを追加した。

C.研究結果

2009年1月18日現在、116例(男:女=57:59、平均年齢:82.0 \pm 8.2歳)蓄積し、77例(男:女=33:44;平均年齢82.4歳)は脳も採取した。そのうち、免疫染色による検討は33例(男:女=13:20、平均年齢:80.6 \pm 8.1歳)が検索済で、23例(男:女=9:14;平均80.9歳)は脳も採取した。33例中、32例の脊髄にAT8陽性構造物を、5例にレビー小体関連病理を認めた。リン酸化 TDP-43

陽性構造物を、33例中4例の脊髄に、23例中3例の延髄、4例の海馬・側頭葉に認めた。

D.考察

TDP-43 proteinopathyは、変性疾患に付随して、異常蓄積が亢進することは確かだが、加齢のみでも蓄積は起こりうる。タウオパチー、 α シヌクレイノパチー、 β アミロイドーシスと同様、高齢者連続剖検例における標準化が必要である。

E.結論

脊髄も脳と同様に老化を考える必要があり、今後とも症例を蓄積することで脊髄の老化を明らかにし、またさらなる研究資源として脊髄バンクを構築する。

F.健康危険情報：なし

G.研究発表(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1.論文発表：なし

2.学会発表：初田裕幸、齊藤祐子等. 高齢者筋萎縮性側索硬化症では TDP-43 よりもユビキチン化封入体の方が認知症と関係が強い. 第49回日本神経病理学会総会 2008, 東京.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

- 1.特許取得：なし 2.実用新案登録：なし
3.その他：なし

変性疾患脳における TDP-43 病変の出現と病型分類

秋山治彦¹⁾, 新井哲明¹⁾, 長谷川成人¹⁾

¹⁾東京都精神医学総合研究所

研究要旨

TDP-43 のリン酸化候補部位に対する抗体を多数作製して、異常蓄積した TDP-43 のリン酸化部位を同定した。S379, S393, S403, S404, S409, S410 のリン酸化が確認され、これらのリン酸化部位は筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症 (ALS-D)、ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭型変性症 (FTLD-U) に共通していた。作製した抗体を用いてタウ陰性 FTLD 病理組織標本の免疫染色を行ったところ、31 例中 29 例に TDP-43 の異常蓄積を認めた。またアルツハイマー病 (AD) 53 例中 19 例 (36%)、レヴィー小体型認知症 (DLB) 15 例中 8 例 (53%)、嗜銀顆粒病 (AGD) 15 例中 9 例 (60%) においても TDP-43 異常蓄積が認められた。AD/DLB における TDP-43 蓄積パターンは、組織病理学的にも生化学的にも FTLD-U タイプ 3 と類似していた。

A. 研究目的

ALS, ALS-D, FTLD-U に蓄積する TDP-43 の翻訳後修飾を解析し、変性疾患における TDP-43 病変出現の様式を明らかにする。

B. 研究方法

TDP-43 の合成ペプチド抗体を多数作製してリン酸化部位を同定し、得られた抗体を用いて剖検脳・脊髄の免疫組織学的・生化学的解析を行った。

C. 研究結果

異常蓄積した TDP-43 の C 末側に 6ヶ所のリン酸化セリンを同定した。リン酸化特異抗体による剖検脳標本の検索の結果、タウ陰性 FTLD の 95%、AD・DLB・AGD の半数近くに TDP-43 異常蓄積を認めた。これら疾患の脳・脊髄に異常蓄積した TDP-43 のかなりの部分が複数の C 末断片で占められており、C 末断片の種類・割合のパターンは組織病理学的な病型分類と対応していた。

D. 考察

TDP-43 異常蓄積の過程において、リン酸化と並んで、蛋白分解による C 末断片形成が重要である。また少数の FTLD-U が TDP-43 蓄積陰性であることから、TDP-43 蓄積を伴う FTLD-U を FTLD-TDP と呼ぶことが推奨される。

E. 結論

ALS, ALS-D, FTLD-U 脳脊髄資源構築のために、変性疾患・高齢者剖検例の全例において免疫組織化学的にタウ、 α シヌクレイン、TDP-43 蓄積の有無と広がり評価する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arai T, Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H. Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and

dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 117:125-136, 2009

2. Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 117: 151-158, 2009

3. Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 583:394-400, 2009

4. Mackenzie IRA, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJM, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DMA. Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 115:15-18, 2009

5. Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H. Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study. *Acta Neuropathol* 115:561-575, 2008

6. Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hisanaga SI, Hasegawa M. Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTLD-U and ALS. *FEBS Lett* 582:2899-2904, 2008

7. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64:60-70, 2008

2. 学会発表

Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Onaya M, Oda T, Beach TG, Buratti E, Baralle F. Production of antibodies to abnormally phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *FTD2008, Rotterdam, The Netherlands* [2008/09/03]

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

東京大学における ALS/ ALSD/ FTLDU 資源の充実とその応用について

清水 潤、古和 久朋、宮川 統爾、辻 省次

東京大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨

東京大学における ALS/ ALSD/ FTLDU 資源の現状を確認した。剖検症例数の確保が困難になってきており、登録システムの充実が必要である。認知障害を認めない ALS の中でも SPECT で前頭葉、側頭葉前方の血流低下を認める例が高頻度で含まれ前向き検討の必要性が明らかになった。蛍光ビーズサスペンションアレイシステムを用いることで資源の髄液バイオマーカーの網羅的解析が可能であることが示された。

A. 研究目的

当施設における ALS/ ALSD/ FTLDU 資源の現状と問題点を明らかにし、脊髄液バンク検体を用い、髄液バイオマーカーの測定をおこなった。

B. 研究方法

資源症例の過去 11 年間の剖検例、過去 5 年間の入院例に関してチャートを用い解析した。また、蛍光ビーズサスペンションアレイシステムにて、ALS10 例、PSP9 例、AD6 例、spastic paraparesis (SP)8 例、自己免疫性脳炎(AE)6 例の脊髄液中の tTau, A β 42, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 を測定した。

(倫理面への配慮)東京大学の倫理規定を遵守しプライバシーの保護には充分配慮した。

C. 研究結果

剖検数は ALS 7 例、ALSD 1 例、FTLD 0 例。入院数は増加傾向であるが、フォローからの脱落症例が多く、剖検数は少数で剖検率も低かった。ALSD、FTLD では臨床情報は充実、一方、ALS では高次機能評価施行例は約 1 割と不良。臨床的に認知症状がない ALS12 例中 10 例の脳血流シンチで前頭葉、側頭葉前方の血流低下し

ていた。髄液解析では A β 42, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , tTau の値には、5 群間での差はなかったが、SP に対して tTau は AD で有意に高値であった (Mann-Whitney)。

D. 考察

剖検症例数の確保が困難になってきている現状が明らかになった。解決策として症例の登録システムの充実、転院先の病院との連携が必要である。認知障害を認めない ALS の中でも脳血流低下を認める例が高頻度で含まれ、高次機能検査、核医学検査を用いた前向き検討が必要である。蛍光ビーズサスペンションアレイシステムはバンク脊髄液中のバイオマーカーの網羅的解析に有用である。

E. 結論

資源の充実のためには、剖検数の確保、前向き検討を含む臨床情報の充実が必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的所有権の取得状況 なし

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合におけるリン酸化 TDP-43 蛋白

の免疫組織化学的検討

小久保康昌¹⁾

遠藤真由美¹⁾、新井哲明²⁾、秋山治彦²⁾、村山繁雄³⁾、長谷川成人²⁾、葛原茂樹⁴⁾

- 1) 三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻神経感覚医学講座神経病態内科学分野医学部神経内科学、2) 東京都精神医学総合研究所、3) 東京都老人総合研究所高齢者ブレインバンク、4) 国立精神・神経センター病院

研究要旨

〔目的〕紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Kii ALS/PDC) の脳、脊髄におけるリン酸化 TDP-43 の分布について、免疫組織学的に検討する。

〔対象と方法〕対象は、紀伊 ALS 2 例、ALS with dementia 1 例、PDC 4 例。大脳、小脳、脳幹、脊髄について、TDP-43 の Ser409/410 に対するリン酸化部位を認識する抗体を用いて検討した。

〔結果および考察〕リン酸化 TDP-43 は、運動系にとどまらず広範に出現しており、NCI に比較して GCI の方が広範であった。リン酸化 TDP-43 は、臨床病型にかかわらず同様に出現し、出現パターンは、type-2 であった。

〔結論〕紀伊 ALS/PDC は、tauopathy, α -synucleinopathy, TDP-43 proteinopathy の 3 つの preteinopathy に包含される。

A. 研究目的

紀伊 ALS/PDC の中枢神経系におけるリン酸化 TDP-43 の分布について、免疫組織学的に検討する。

B. 研究方法

紀伊半島の ALS 2 例、ALS with dementia 1 例、PDC 4 例を対照に、TDP-43 の Ser409/410 に対するリン酸化部位を認識する抗体を用いて検討した。本研究は、三重大学の倫理委員会の承認に基づき行った。

C. 研究結果

リン酸化 TDP-43 は、運動系にとどまらず広範に出現しており、NCI に比較して GCI の方が広範であった。リン酸化 TDP-43 は、臨床病型にかかわらず同様に出現し、出現パターンは、type-2 であった。

D. 考察

紀伊 ALS/PDC の神経変性過程において、TDP-43 はタウ蛋白とともに主要な役割を果たしている

ことを示唆しているものと考えられた。

E. 結論

紀伊 ALS/PDC は、tauopathy, α -synucleinopathy, TDP-43 proteinopathy の 3 つの preteinopathy に包含される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Morimoto S et al. *Mov Disord*. 24;1:123-126, 2008.

2. 学会発表

Kokubo Y et al. 6th International Conference on FTD. Rotterdam, Netherlands. 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

筋萎縮性側索硬化症における Frontal Assessment Battery による前頭葉機能の評価

研究協力者氏名：寺田達弘，小尾智一，杉浦明，山崎公也，溝口功一

所属：NHO 静岡てんかん・神経医療センター

研究趣旨

Frontal Assessment Battery (FAB) を用いて湯浅・三山型ではない孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の前頭葉機能を評価する。ALS 症例では FAB の点数は健常群と比較して有意に低下していた。FAB の点数は ALSFRS, スパイロメトリー, 動脈血液ガス分析との間に有意な相関関係は認めなかった。孤発性 ALS には運動機能障害や呼吸機能障害では説明できない前頭葉機能障害が存在する。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では湯浅・三山型 ALS などの一部の病型を除いて、認知機能障害を合併しないと考えられてきた。しかし、ALS の病理に前頭側頭葉変性症と共通するユビキチン陽性封入体が検出され、一方では詳細な神経心理学的検討により ALS の 52% が FTD の診断基準を満たしたとの報告がある。今回私たちは Frontal Assessment Battery (FAB) を用いて ALS 症例の前頭葉機能を評価した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

対象は、ALS 重症度分類が 3 度以下の孤発性 ALS 症例 28 名 (男性 17 名, 女性 11 名, 平均年齢 64.0 ± 9.6 歳)。全例とも MMSE が 24 点以上かつ SDS が正常で、湯浅・三山型 ALS の診断基準に該当しない。ALS Functional Rating Scale (ALSFRS) を施行し、下位尺度の言語が 3 (繰り返し聞かなくても意味がわかる) 以上、摂食動作における食事用具の使い方の項目が 3 (幾分遅く、ごちないが、他人の助けを必要とせず、ハンシが使える) 以上、呼吸が 4 (呼吸困難、起座呼吸、呼吸不全を認めない) の症例に限定した。対象に FAB を施行し、年齢を合致させた健常群と比較した。また、ALSFRS, スパイロメトリー (肺活量, 対標準肺活量), 動脈血液ガス分析 (PCO₂, PO₂) を施行し、FAB の点数との相関を検討した。FAB の施行にあたり本人および家族に十分な説明の上同意を得た。

C. 研究結果

FAB の点数は対象の ALS 症例では 13.0 ± 2.0 点 (平均 ± S. D.) で、健常群の 14.7 ± 1.3 点と比較して有意に低下していた。FAB のサブテストでは類似性の理解と語の流暢性で点数の低下が明らかであった。FAB の点数と ALSFRS, スパイロメトリー, 動脈血液ガス分析との間には有意な相関関係を認めなかった。

D. 考察

MMSE が正常な、湯浅・三山型ではない、孤発性 ALS 症例でも FAB の点数が正常群と比較して低下していた。ALS の神経心理検査の点数の低下は運動障害や呼吸機能障害によるものであると考えられてきたが、ALS にはそれらでは説明できない前頭葉機能障害が存在することが示唆された。

E. 結論

湯浅・三山型ではない、MMSE が正常な孤発性 ALS でも FAB の点数が低下している。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表なし 2. 学会発表 第 27 回認知症学会総会前橋, 2008. 10. 10 ~ 10. 12

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得なし 2. 実用新案登録なし

Ⅱ. 分担研究報告書

脊髄バンクの構築～今年度の実績～

初田裕幸¹⁾、齊藤祐子¹⁾²⁾、足立正¹⁾、舟辺さやか¹⁾、村山繁雄¹⁾

1) 東京都老人総合研究所 高齢者ブレインバンク (BBAR)

2) 東京都老人医療センター 剖検病理科

研究要旨

脊髄の老化において、タウや α シヌクレインの異常蓄積が生じることは周知の事実であるが、TDP-43の知見は乏しく、老化性変化の研究資源として、死後脊髄バンクを構築する。2008年2月よりの当施設全連続剖検例を対象とし、脊髄を全例採取し、L4・Th3・C5・脊髄上端を凍結、後根神経節、馬尾、S2、L5・2、Th12・8・4・1、C8・7・6・5・4のパラフィン切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン、クリュヴァーパレラ染色に加え、S2、L5・2を抗リン酸化TDP-43抗体(Pser409/410, monoclonal)、Th12・8・4を抗リン酸化 α シヌクレイン抗体(p-syn)、Th1、C8・7を抗リン酸化タウ抗体(AT8)によるスクリーニングを施行した。また開頭の許可が得られた症例はブレインバンクプロトコルを追加した。2009年1月18日現在、116例(男:女=57:59、平均年齢:82.0 \pm 8.2歳)蓄積し、77例(男:女=33:44; 平均年齢82.4歳)は脳も採取した。そのうち、免疫染色による検討は33例(男:女=13:20、平均年齢:80.6 \pm 8.1歳)が検索済で、23例(男:女=9:14; 平均80.9歳)は脳も採取した。33例中、32例の脊髄にAT8陽性構造物を、5例にレビー小体関連病理を認めた。リン酸化TDP-43陽性構造物を、33例中4例の脊髄に、23例中3例の延髄、4例の海馬・側頭葉に認めた。以上より、脊髄も脳と同様に老化を考える必要があり、今後も症例を蓄積することで脊髄の老化を明らかにし、またさらなる研究資源として脊髄バンクを構築する。

A.研究目的

ブレインバンクにおいては、全世界的にそれなりの数が存在し、ヒト脳研究に極めて役立っている。高齢者脊髄においてタウや α シヌクレイン、異常蓄積が生じることは周知の事実で、脊髄は脳と同様に老化が存在すると考えられる。また、TDP-43の異常蓄積に対する知見も乏しく、超高齢社会の到来とともに今後の研究資源として脊髄バンクを構築することが必要に迫られている。

B.研究方法

2008年2月よりの当施設全連続剖検例を対象とした。脊髄全長を採取し、第4腰髄、第3胸髄、第6頸髄、背髄上端をtissue compoundに包埋し、凍結した。残りを7-13日間ホルマリン固定、後根

神経節、馬尾、第2仙髄(S2)、第5・2腰髄(L5・2)、第12・8・4・1胸髄(Th12・8・4・1)、第8・7・6・5・4頸髄(C8・7・6・5・4)をパラフィン包埋し、6 μ m厚切片を作成した。本切片に対し、ヘマトキシリン・エオジン、クリュヴァーパレラ染色を通常染色とし、免疫組織化学として、Ventana 20NX Autostainer (Ventana, Tucson, AZ)を使用し、S2、L5・2を抗リン酸化TDP-43抗体(Pser409/410, monoclonal)、Th12・8・4を抗リン酸化 α シヌクレイン抗体(p-syn)、Th1、C8・7を抗リン酸化タウ抗体(AT8)によるスクリーニングを施行した。また、開頭剖検例についてはブレインバンク(<http://www.mci.gr.jp/BrainBank/>)プロトコルに準拠し施行、さらに延髄、前方海馬を含む側頭葉を抗リン酸化TDP-43抗体(Pser409/410,

monoclonal)によるスクリーニングをした。Pser409/410 (monoclonal)抗体で陽性構造物を認めた場合は、抗 Pser409/410 (polyclonal)抗体、抗非リン酸化 TDP-43 抗体による免疫組織化学的検討を追加した。

(倫理面への配慮)

死体解剖保存法 (昭和 24 年法律 204 号) の規定に基づいて病理解剖し、別途倫理委員会の審査済である。

C. 研究結果

2009 年 1 月 18 日現在、116 例蓄積し、その内訳は、男性:女性=57:59 例、年齢幅:56-101 歳 平均:82.0±8.2 歳、死後時間平均:15 時間 23 分±12 時間 45 分で、そのうち脳も採取可能であったのは 77 例(男:女=33:44; 平均年齢 82.4 歳、平均死後時間 14 時間 19 分)であった。そのうち、免疫染色による検討は連続 33 例が検索済であり、その内訳は男性:女性=13:20、年齢幅:63-95 歳 平均年齢:80.6±8.1 歳で、そのうち脳の採取も可能であったのは 23 例(男:女=9:14; 平均 80.9 歳)で、老年期変性疾患としてアルツハイマー病 3 例、レビー小体病 3 例、嗜銀顆粒性疾患 2 例含み、筋萎縮性側索硬化症やユビキチン化封入体を伴う前頭側頭葉型変性症は認めなかった。

全 33 例中、Th1、C8-7 に 1 例を除いて 32 例に neuropil thread が出現し、残りの 1 例は脳にもごくわずかな pretangle、neuropil thread を認めるのみであった。13 例には pretangle を認め、うち 5 例は脳の検索が許可されていない。Th12-8-4 にレビー小体関連病理が出現していたのは 6 例で、うち 5 例は脳にも認めるが、1 例は脳の検索が許可されていない。

脳・脊髄ともに検索した 23 例中、Pser409/410(monoclonal)陽性 thread/dot 状構造物を、海馬・側頭葉に 4 例、延髄に 3 例、腰仙髄に 3 例認めた。海馬・側頭葉出現 4 例のうち、2 例は歯状回/CA1/海馬支脚/嗅内野/T4 とかなり

広い範囲に神経細胞質内封入体を認め、残り 2 例は迂回回に thread 様構造物を認めるのみであった。延髄では、下オリブ核に 3 例全例に認め、その他中心灰白質、内側毛帯に各 1 例認めた。腰仙髄では、それぞれ前角、側索、中間管に 1 例ずつ認めた。脊髄のみしか検索できなかった 10 例のうち、1 例の腰髄側索に thread 様構造物を認めた。海馬/側頭葉や延髄に認めた多くは抗 Pser409/410 (polyclonal)抗体や抗非 TDP-43 抗体でも確認できたが、腰仙髄に認めたものは、抗 Pser409/410 (polyclonal)抗体で確認できたものの、抗非リン酸化 TDP-43 抗体では確認できなかった。

D. 考察

1. TDP-43 proteinopathy は、変性疾患に付随して、異常蓄積が亢進することは確かだが、加齢のみでも蓄積は起こりうる。
2. タウオパチー、 α シヌクレイノパチー、 β アミロイドーシスと同様、高齢者連続剖検例における標準化が必要である。
3. TDP-43 変異の phenotype が ALS である以上、検索に脳だけでなく、脊髄を加えることは、必須である。

E. 結論

脊髄も脳と同様に老化を考える必要があり、今後も症例を蓄積することで脊髄の老化を明らかにし、またさらなる研究資源として脊髄バンクを構築する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

1) Hatsuta H, Saito Y, Ikemura M, Sengoku R, Sakiyama Y, Swabe M, Mori H, Murayama S. High

incidence of ubiquitinated inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis 2006; 7(1): 163.

2) Hatsuta H, Saito Y, Murayama S. TDP43 immunocytochemistry is sensitive but not specific method to detect motor neuron-disease type neuronal inclusions. The 83rd Annual Meeting of the American Association of Neuropathologists, April 2007, Washington D. C.

3) 池村雅子, 齊藤祐子, 村上喜生, 初田裕幸, 仙石鍊平, 崎山快夫, 新井富生, 沢辺元司, 村山繁雄. 臨床的に前頭葉型認知機能低下を伴う筋萎縮性側索硬化症(ALS)を示し、病理学的に嗜銀顆粒を合併したALSの病理像を呈した一例検例. 第83回関東臨床神経病理懇話会 2006, 東京.

4) 崎山快夫, 齊藤祐子, 池村雅子, 仙石鍊平, 初田裕幸, 金丸和富, 徳丸阿耶, 新井富生, 村山繁雄. 高位頸椎性脊髄症術後長期経過中、認知障害を来し、病理学的にユビキチン陽性神経細胞質内封入体を伴う前頭側頭葉型認知症が確認された剖検時63歳男性例. 第84回関東臨床神

経病理懇話会 2006, 東京.

5) 初田裕幸, 齊藤祐子, 久保田暁, 森啓, 村山繁雄. 高齢者の筋萎縮性側索硬化症ではユビキチン化神経細胞質内封入体を高率に認める. 第47回日本神経学会総会 2007, 名古屋.

6) 初田裕幸, 齊藤祐子, 仁科裕史, 平澤恵理, 小林高義, 足立正, 山寺みさき, 仙石鍊平, 崎山快夫, 新井富生, 村山繁雄. 湯浅三山型筋萎縮性側索硬化症 74歳男性剖検例での筋・末梢神経の検討. 第62回 Neuromuscular conference 2007, 東京.

7) 初田裕幸, 齊藤祐子, 久保田暁, 舟辺さやか, 足立正, 山寺みさき, 新井富生, 沢辺元司, 長谷川成人, 森啓, 村山繁雄. 高齢者筋萎縮性側索硬化症では TDP-43 よりもユビキチン化封入体の方が認知症と関係が強い. 第49回日本神経病理学会総会 2008, 東京.

H.知的所有権の取得状況(予定を含む)

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

表: Pser409/410(monoclonal)陽性構造物を認めた症例

年齢性	老年期変性疾患	海馬/側頭葉	延髄	腰仙髄	NFT	SP	LB	AG
90/女	アルツハイマー病	CA1/sub/ent/T4 (NCI,th,d)	-	-	V	C	0	I
84/女	-	amb (GCI,th/d)	-	-	II	A	0	I
67/男	-	-	ION (d)	IZ (d)	I	0	0	I
79/女	-	amb (th,d)	-	-	I	B	0	0.5
85/男	レビー小体型認知症	DG/CA1/sub/ent/T4 (NCI,GCI,th,d)	ION/内側毛帯 (d)	-	II	A	IV	I
78/女	N/A	N/A	N/A	LC (th,d)	N/A	N/A	N/A	N/A
87/女	嗜銀顆粒性疾患	-	-	AH (GCI)	III	A	I	III
94/女	嗜銀顆粒性疾患	-	中心灰白質/ION (th,d)	LC/AH (th)	II	A	0	II

sub: 海馬支脚, ent: 嗅内野, T4: 第四側頭回, amb: 迂回回, DG: 齒状回, ION: 下オリブ核, IZ: 中間帯, LC: 側索, AH: 前角, NCI: 神経細胞質内封入体, GCI: グリア細胞質内封入体, th: thread 様構造物, d: dot 様陽性構造物, NFT: Braak NFT stage, SP: Braak amyloid stage, LB: BBAR Lewy body stage, AG: BBAR argyrophilic grain stage

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

「筋萎縮性側索硬化症・認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症・ユビキチン化封入体を伴う

前頭側頭型認知症死後脳脊髄資源の構築」調査研究班 分担研究報告書

変性疾患脳における TDP-43 病変の出現と病型分類

秋山治彦¹⁾，新井哲明¹⁾，長谷川成人¹⁾

¹⁾東京都精神医学総合研究所

研究要旨

TDP-43 のリン酸化候補部位に対する抗体を多数作製して，異常蓄積した TDP-43 のリン酸化部位を同定した。S379, S393, S403, S404, S409, S410 のリン酸化が確認され，これらのリン酸化部位は筋萎縮性側索硬化症（ALS），認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症（ALS-D），ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭葉変性症（FTLD-U）に共通していた。作製した抗体を用いてタウ陰性 FTLD 病理組織標本の免疫染色を行ったところ，31 例中 29 例に TDP-43 の異常蓄積を認めた。またアルツハイマー病（AD）53 例中 19 例（36%），レヴィー小体型認知症（DLB）15 例中 8 例（53%），嗜銀顆粒病（AGD）15 例中 9 例（60%）においても TDP-43 異常蓄積が認められた。AD/DLB における TDP-43 蓄積パターンは，組織病理学的にも生化学的にも FTLD-U タイプ 3 と類似していた。

A. 研究目的

リン酸化 TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症（ALS），認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症（ALS-D），ユビキチン化封入体を伴う前頭側頭葉変性症（FTLD-U）におけるユビキチン陽性封入体の主要構成成分であり，現在これらの疾患は TDP-43 proteinopathy と総称されている。これまでの各種変性疾患脳におけるタウ， α シヌクレインの異常蓄積解析の経験から，我々は，TDP-43 においても異常リン酸化が病理プロセスの鍵であると推測している。本研究の目的は，ALS，ALS-D，FTLD-U の脳・脊髄に蓄積した TDP-43 の異常リン酸化部位を同定し，さらに異常リン酸化 TDP-43 のみを検出することができる抗体を用いて様々な変性疾患の剖検脳標本を病理組織学的・生化学的に検索し，TDP-43 蓄積の病態を解明することである。

B. 研究方法

TDP-43 分子には 50 ヶ所を超えるリン酸化候

補部位（セリン残基（S），スレオニン残基（T），チロシン残基）が存在する。これら多数のリン酸化候補部位について，それぞれを含む短いペプチドを合成し，それらに対する特異抗体を作製した。こうして得られた抗体の，剖検脳サンプルに対する反応性を免疫組織化学とイムノブロットにより調べ，陽性反応が得られた抗体が特異的に認識するリン酸化部位を，疾患の異常蓄積 TDP-43 におけるリン酸化部位として同定した。さらに，ここで得られたリン酸化 TDP-43 特異抗体から，ホルマリンで固定された剖検脳組織標本における異常 TDP-43 検出に優れているものを選別し，ALS，ALS-D，FTLD-U，さらにアルツハイマー病（AD），レヴィー小体型認知症（DLB），嗜銀顆粒病（AGD）における異常 TDP-43 蓄積の有無と広がり免疫組織化学染色により解析した。

【倫理面への配慮】剖検脳の解析にあたっては，ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理基準に準じることとし，剖検時に遺族の承諾を得た場合

のみ剖検材料を研究に使用した。同倫理指針策定以前に剖検になった症例については、連結不可能匿名化による個人情報の保護を図った上で使用した。なお詳細な研究計画について、東京都精神医学総合研究所における倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

これまでに TDP-43 のリン酸化候補部位のうち、S あるいは T 残基 36ヶ所について当該 S または T がリン酸化されたペプチドを合成して、それぞれのペプチドに対する抗体を作製した。ALS/FTLD-U 剖検脳固定標本の免疫組織化学染色および新鮮凍結脳不溶画分のイムノブロットにおいてリン酸化抗体の陽性反応が得られたのは、今回検索した部位の中では、pS379, pS393, pS403, pS404, pS409, pS410 であった。S403 と S404 は両部位がともにリン酸化されたペプチドに対する抗体のみが強く反応したが、S409, S410 はどちらか片方および両方がリン酸化されたペプチドのいずれに対する抗体でも反応が認められた。そこで pS409/410 に対するモノクローナル抗体を作製し、そのうちから S409, S410 単独のリン酸化ペプチドとは反応しないクローンを得た。このクローンは ALS/FTLD-U 剖検脳サンプルと強く反応し、疾患脳に蓄積した TDP-43 では 409/410 両方の S がリン酸化されていることが確認された。これらのリン酸化部位は、ALS, ALS-D, FTL-D-U の脳・脊髄に蓄積した TDP-43 に共通していた。リン酸化 TDP-43 特異抗体のうち、pS403/404 および pS409/410 に対するものは、剖検脳ホルマリン固定パラフィン標本における異常 TDP-43 の選択的検出に用いることができた。

以上の研究で同定されたリン酸化部位は、いずれも TDP-43 のカルボキシル (C) 末端側に存在する。リン酸化部位同定の過程で明らかになった点のひとつは、ALS, ALS-D, FTL-D-U の剖検脳不溶画分のイムノブロットを (当初、広く用い

られていたリン酸化非特異的な ProteinTech 社のポリクローナル抗体や Abnova 社のモノクローナル抗体ではなく) C 末端側に対する抗体を用いて行くと、リン酸化された全長 TDP-43 に加えて、分子量が 18kDa~26kDa の範囲に 4~6 本のリン酸化 C 末フラグメントが検出されると言うことである。C 末フラグメントは全長 TDP-43 よりも量が多く、また疾患のタイプにより出現バンドパターンが異なる。FTLD-U は 2007 年に Cairns らにより、出現する病変の種類 (細胞質封入体 NCI, 変性突起 DN, 核内封入体 NII) の組み合わせによりタイプ 1 からタイプ 4 まで分類されている。臨床的に意味性認知症を呈する FTL-D はタイプ 1 を、ALS-D (FTLD-MND) はタイプ 2 を、進行性非流暢性失語を呈する FTL-D や前頭側頭型認知症 (FTD), *progranulin* 変異による FTL-D はタイプ 3 を示す。C 末フラグメントはこれらの病理タイプごとに特異的なバンドパターンを示した。ALS の前頭葉および脊髄は、ALS-D と同じく、タイプ 2 のバンドパターンを示した。

つぎにリン酸化 TDP-43 特異抗体を用いて様々な神経変性疾患剖検脳における異常 TDP-43 蓄積出現について検討を行った。AD および DLB における TDP-43 蓄積出現については、既に文献上複数の報告があるが、我々の検討では従来言われていたよりも高頻度に認められることがわかった。今回検討し得た症例において、AD では 53 例中 19 例 (36%)、DLB では 15 例中 8 例 (53%)、AGD では 15 例中 9 例 (60%) にリン酸化 TDP-43 の蓄積が見られた。AD/DLB における TDP-43 異常蓄積は、扁桃核、海馬辺縁系皮質などに限局して少量出現する場合から、大脳新皮質にも広がって FTL-D-U に匹敵する蓄積が認められる場合まで様々であった。新皮質における広がり方としては、側頭葉→前頭葉→頭頂葉の順であると考えられた。AD/DLB における異常 TDP-43 のイムノブロットは、FTLD-U タイ