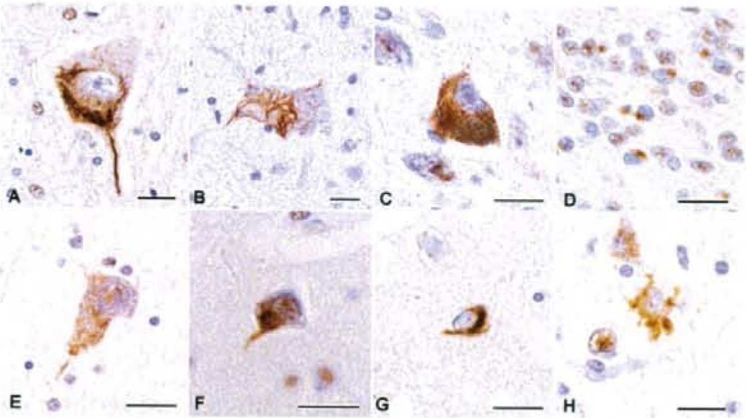


Fig. 1 孤発性 ALS の神経系における TDP-43 の異常発現
A-F TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体 (A-C, E skein-like inclusions, D, F dense round inclusions, A 脊髄前角 (L4)、B 顔面神経核, C 黒質、D 海馬歯状回, E 視床, F 前頭葉皮質)。G, H TDP-43 陽性グリア細胞胞体内封入体 (G 中心前回皮質 coiled body-like inclusion, H 脊髄前角 (L4) tuft- like inclusion)。 20μm (A-H)

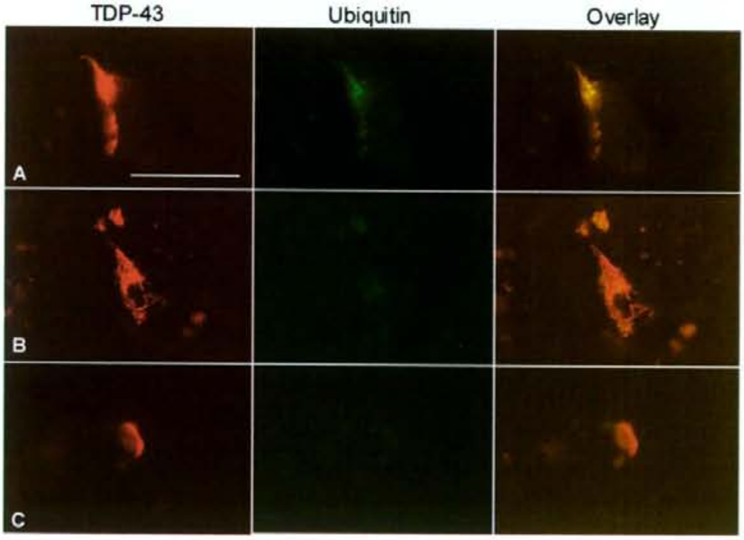


Fig. 2 神経細胞およびグリア細胞胞体内における TDP-43 と ubiquitin の二重免疫蛍光。
A, B TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体 (skein-like inclusion)、A ubiquitin 陽性、B ubiquitin 弱陽性神経細胞胞体内封入体。C TDP-43 陽性グリア細胞胞体内封入体 (coiled body like inclusion)、ubiquitin 陰性。
A 脊髄前角、B 淡蒼球、C 中心前回皮質。*Bar* 20μm (A-C)

は skein-like、dense round あるいは granular 状、また TDP-43-ir GCIs は coiled あるいは tuft 様を呈した (Fig. 1)。電顕上、これらの構造物は顆粒線維状構造から成っていた。TDP-43 の異常蓄積とユビキチンとの関連性については、下位運動神経細胞、海馬歯状回顆粒細胞および線条体小型神経細胞では TDP-43 とユビキチンとは共存して認められたが、淡蒼球、視床、皮質運動野の TDP-43-ir NCIs および皮質・白質の TDP-43-ir GCIs はユビキチン抗体では陰性あるいは弱陽性であった (Fig.2)。統計学上、TDP-43-ir NCIs の分布型は 2 つの type に分けられた (Fig.3)。Type 1 は脳幹・脊髄中心型、type 2 は脳幹・脊髄に加え、大脳にも広汎に分布する型であった。ARS⁻ および ARS⁺ のいずれの症例も同じ type 1, 2 に分類された。ほぼ全ての UDG⁻ 例 (20/21) は type 1, UDG⁺ 例 (13/14) は type 2 に属した。Type 1 の症

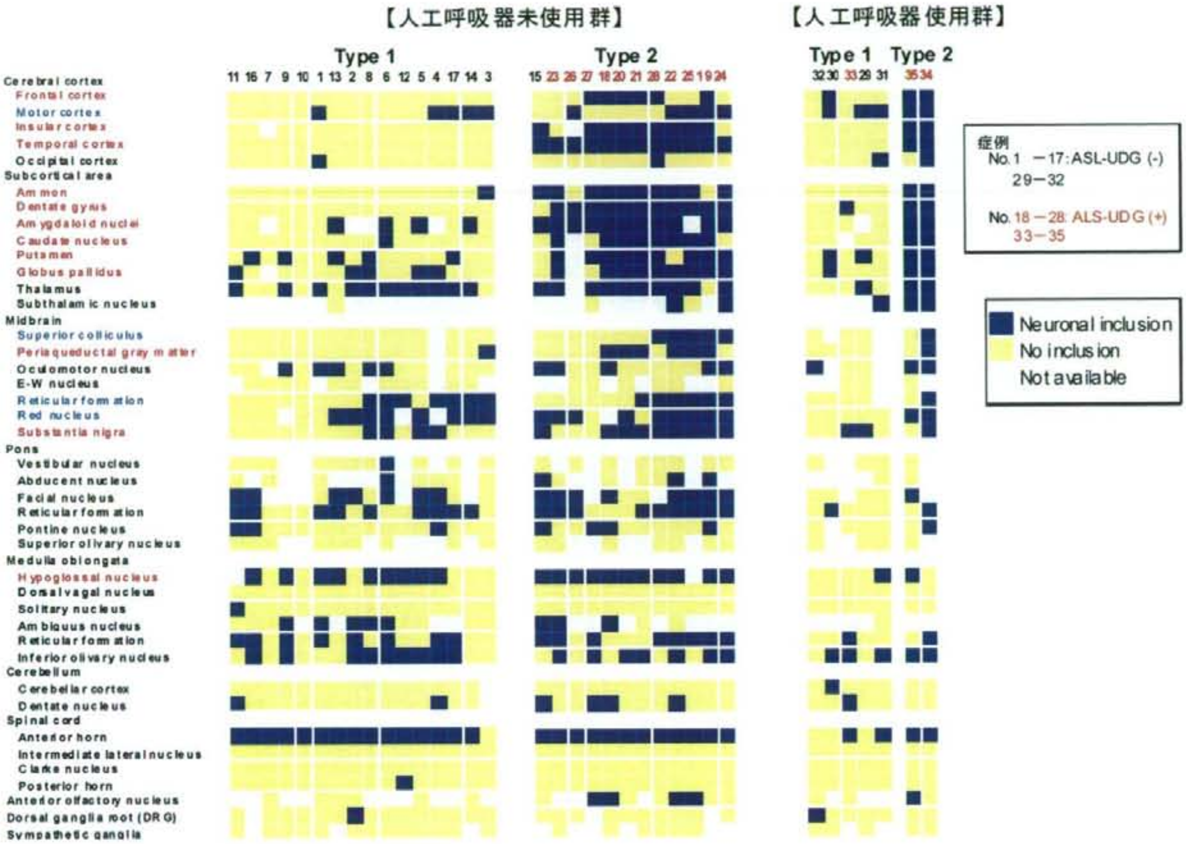


Fig. 3 孤発性 ALS（左；人工呼吸器未使用群 28 例、右；使用群 7 例）における TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体の分布。Cluster 解析に用いた因子は、赤字（factor 1: frontotemporal cortex-hippocampal formation-neostriatum-substantia nigra）と青字（factor 2: motor cortex-midbrain non-motor neuron nuclei）で示している。赤字の数字は海馬歯状回顆粒細胞にユビキチン陽性封入体を有した症例番号。

例では、運動神経系以外に神経細胞の脱落が殆ど認められないが、type 2 の症例では、神経細胞の脱落は TDP-43-ir NCIs を示す非運動神経系にも観察された。ARS⁺で type 2 に属した症例は神経細胞脱落の程度及び広がりはさらに増した。Type 1 および type 2 との間には、発症年齢、罹病期間、上下位運動ニューロン徴候・球症状の有無に有意差を認めないが、type 2 と認知症の間に有意な相関が認められた。

D. 考察

今回の免疫組織化学的結果は、SALS はより広汎な部位の神経細胞及びグリア細胞の双方を侵す TDP-43 プロテイノパチーであることを示していた。また、TDP-43-ir NCIs の分布パターンから、SALS には、本来 2 つの異なる病理型（Type 1 と type 2）が存在し、それら 2 つの病理型は人工呼吸器による長期生存の影響を受けないことが示唆された。UDG⁺の所見を有するほぼ全ての症例は、Type 2 に属するものであった。Type 1 でより明らかであったが、TDP-43-ir NCIs の出現をみた多くの非運神経核では、神経細胞の変性・脱落は必ずしも明らかではなかった。SALS における TDP-43 と細胞死の問題については、今後のさらなる分子生物学的検討が必要である。

E. 結論

(1) TDP-43 の異常発現からみた場合、SALS は神経細胞とグリア細胞を侵す多系統変性疾患である。

(2) TDP-43-ir NCIs の分布様式から SALS は 2 つの病理型（病態型）に分類することが可能である。

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

1. Hang HX, Tan CF, Mori F, et al. TDP-43-immunoreactive neuronal and glial inclusions in the neostriatum in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. Acta Neuropathol 115: 115-122, 2008
2. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, et al. Axonal α-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. Brain 131: 642-650, 2008
3. Mori F, Tanji K, Zhang HX, et al. α-Synuclein pathology in the neostriatum in Parkinson's disease. Acta Neuropathol 115: 453-459, 2008
4. Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, et al. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 63: 538-542, 2008
5. Nishihira Y, Tan CF, Onodera O, et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. Acta Neuropathol 116: 169-182, 2008
6. Mori F, Tanji K, Zhang HX, et al. aturation process of TDP-43-positive neuronal cytoplasmic inclusions in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. Acta Neuropathol 116: 193-203, 2008
7. Orimo S, Uchihara T, Nakamuta A, et al. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease linked to *SNCA* dyplication. Acta Neuropathol 116: 575-577, 2008
8. Oyanagi K, Yamazaki M, Takahashi H, et al. Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. Neuropathol Appl Neurobiol 34: 650-658, 2008

2.学会発表

（以下のすべてについて、その発表は第 49 回日本神経病理学会、東京、2008, 5, 20-22）

1. 西平 靖，譚 春鳳，小野寺 理，ほか．孤発性筋委縮性側索硬化症における TDP-43 異常発現とその分布に関する免疫組織化学的検討.
2. 西平 靖，譚 春鳳，柿田明美，ほか．長期の臨床経過を示した筋委縮性側索硬化症における TDP-43 異常発現とその分布に関する免疫組織化学的検討.
3. 森 文秋，丹治邦和，張 海心，ほか．筋委縮性側索硬化症における TDO-43 陽性神経細胞内封入体の免疫電顕による検討.
4. 丹治邦和，森 文秋，譚 春鳳，ほか．シヌクレイノパチー剖検脳における synphilin-1 結合タンパク質(NUB1)の定量解析.
5. 森 文秋，丹治邦和，張 海心，ほか．パーキンソン病の線条体におけるαシヌクレインの蓄積.

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

孤発性 ALS：人工呼吸器装着により長期生存しえた 1 剖検例の神経病理学的検討

西平　靖[1]、譚　春鳳[1]、豊島靖子[1]、米持洋介[2]、近藤　浩[3]、
中島　孝[2]、高橋　均[1]

[1]新潟大学脳研究所　病理学分野、[2]新潟病院　神経内科、[3]阿賀野病院　神経内科

研究要旨
人工呼吸器を使用し、長期生存しえた孤発性筋萎縮性側索硬化症の組織学的並びに免疫組織化学的検討を行った。上位・下位運動ニューロン系の変性は高度で、多くの部位の非運動ニューロン系でも高度であった。本例では、運動ニューロン系を含む多くに部位にレビー小体様ヒアリン封入体（LBHIs）やユビキチン陽性、TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体（TDP-43-ir NCIs）を認めた。個々の部位で、ユビキチン陽性、TDP-43-ir NCIs は LBHIs より多数出現しており、LBHIs は HE 染色で同定可能なユビキチン化された TDP-43 凝集体の 1 成熟型と考えられた。また、それら個々の部位の変性の程度は強いが、TDP-43-ir NCIs と神経細胞脱落の分布は SALS の type 2 に相当した。つまり、本来 type 2 の TDP-43-ir NCIs の分布を示す症例は人工呼吸器の導入後に本例のような totally locked-in state へ移行しえるものと考えられた。

A. 研究目的

今回、我々は人工呼吸器の管理下に長期生存しえた孤発性 ALS（sporadic ALS: SALS）の 1 剖検例を経験したので、通常の組織学的検討に加え、TDP-43 及びユビキチンに関する免疫組織学的評価を行った。

B. 症例

死亡時 71 歳、女性。家族歴に特記事項無し。62 歳時、左下肢筋力低下出現。発症数ヶ月にて、筋力低下は四肢に進行し独歩不能となった。発症 1 年後、嚥下困難、呼吸困難が出現し、胃ろう造設と人工呼吸器を導入した。眼球運動やパソコン使用による意思疎通は可能。2 年後、四肢筋力や深部腱反射消失、病的反射無し。眼球運動制限が出現し意思疎通困難。3 年後、totally locked-in state。4 年後、眼球運動消失。その後、肺炎や尿路感染症を繰り返し、発症後 8 年 8 ヶ月、誤嚥性肺炎にて死亡。呼吸器使用は 7 年 8 ヶ月であった。

C. 剖検所見

脳重 610g。肉眼的に前頭葉、脳幹被蓋部の萎縮が著明。黒質と青斑核の脱色素は高度。末期の全身性血圧低下に伴ったと考えられる壊死（貧血性梗塞）を広く認めるも、以下の組織学的評価を妨げるものではなかった。(1) 上位及び下位運動ニューロン系の変性は高度。非運動ニューロン系でも高度の変性を認めた（Fig. 1）。(2) 残存下位運動ニューロン胞体内に Bunina 小体（Fig. 1）およびユビキチン陽性封入体の出現。(3) 残存下位運動ニューロンを含め、多くの神経核における神経細胞の胞体内にレビー小体様ヒアリン封入体（LBHIs）を認めた（Fig. 1, 2）。(4) ユビキチン陽性、TDP-43 陽性神経細胞胞体内封

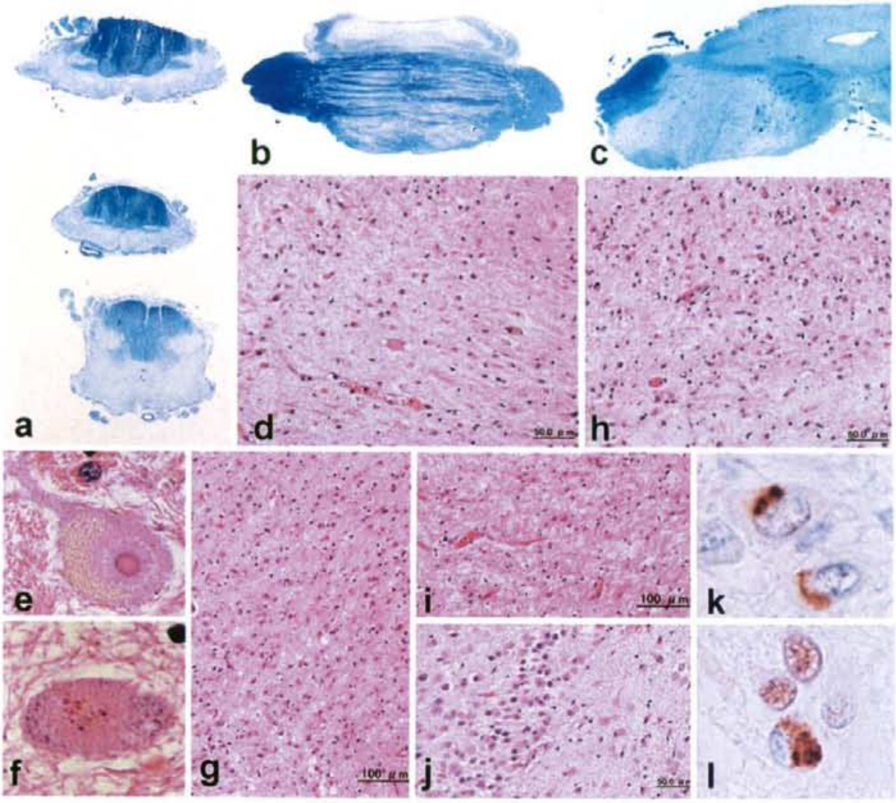


Fig. 1 病理組織所見

a 萎縮した脊髄（C7, Th8, L4） 前・側索にて髄鞘の淡明化高度、後索 middle root zone では軽度。 b，c 橋・中脳の被蓋部の萎縮が著明。b 皮質脊髄路、上小脳脚、中心被蓋路、内側毛帯、内側縦束の淡明化が明らか。 c 大脳脚では皮質脊髄路・延髄路、前頭橋路の淡明化が明らか。d 頚髄前角：神経細胞脱落及びグリオーシス高度。e 腰髄前角細胞内 Lewy body-like hyaline inclusion(LBHI)。f 動眼神経核運動ニューロン内 Bunina 小体。g 中心前回：神経細胞脱落及びグリオーシス高度。h 胸髄 Clarke 柱：神経細胞消失。 i 中脳黒質：神経細胞消失。 j-l 海馬歯状回：j 顆粒細胞の脱落が明らか、k ユビキチン陽性神経細胞胞体内封入体、l TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体。a-c KB; d-j H-E; k ubiquitin 免染; l TDP-43 免染

入体（TDP-43-ir NCIs）も同様に広汎に認められ、個々の部位で、それらは LBHIs よりも多数認められた（Fig. 1, 2）。(5)多くの非運動ニューロン核においても TDP-43-ir NCIs はユビキチン化されていた(Fig. 3)。

D. 考察

本例では、個々の部位で、LBHIs より多数のユビキチン陽性 NCIs 、TDP-43-ir NCIs を認めた。したがって、LBHIs は HE 染色で同定可能なユビキチン化された TDP-43 凝集体の 1 成熟型と考えられた。本例では、個々の部位の変性の程度は強いが、TDP-43-ir NCIs と神経細胞脱落の分布は SALS の type 2 に相当すると考えられた（Nishihira Y et al., Acta Neuropathol 2008;116:169-182)。つまり、本来 type 2 の TDP-43-ir NCIs の分布型を示す症例は人工呼吸器の導入後に本例のような totally locked-in state へ移行しえるものと考えられた。

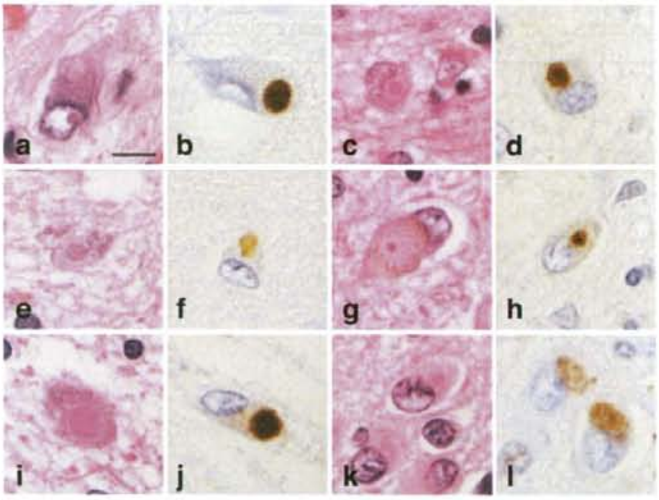


Fig. 2 中枢神経系における Lewy body-like hyaline inclusions (a, c, e, g, i, k)と TDP-43 陽性神経細胞内封入体(b, d, f, h, j, i)の広汎な分布。a, b 迷走神経背側核、c, d 橋核、e, f 中脳被蓋、g, h 小脳歯状核、i, j 視床下核、k , l 帯状回。a, c, e, g, i, k H-E; b, d, f, h, j, l TDP-43 免染。*Bar* 10μm (a-l)

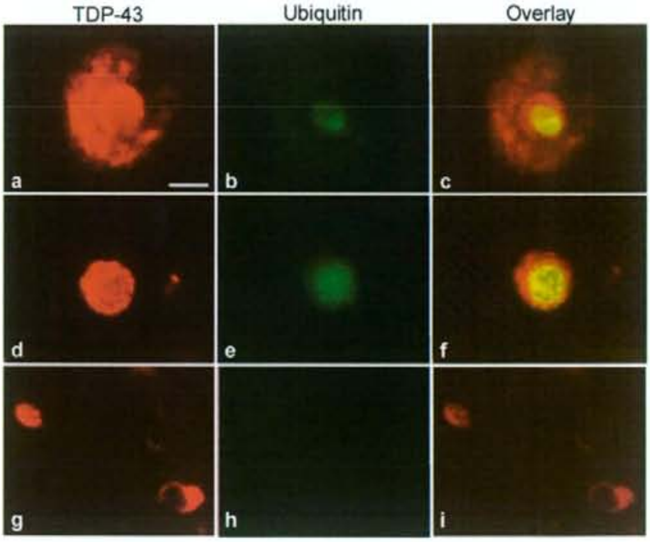


Fig. 3 二重免疫蛍光による TDP-43 と ubiquitin の関係。小脳歯状核 (a-c) と島皮質 (d-f) の神経細胞胞体内封入体にて TDP-43 とユビキチンが共存している。それらの中心部においてユビキチン化はより強く認められる。小脳白質の oligodendrocyte 胞体内封入体 (g, h, i) では、ユビキチン化は認められかった。a, d, g: polyclonal anti-TDP-43 antibody; b, e, h: monoclonal anti-ubiquitin antibody; c, f, i: merged. *Bar* 10μm (a-i)

また、本例では、これまでの通常の SALS の報告とは異なり、非運動ニューロン系にみられた多くの TDP-43-ir NCIs (その分布様式は type 2 に相当) もユビキチン化されていた。これらの TDP-43-ir NCIs は人工呼吸器の導入後、時間の経過とともにユビキチン化されていったものと解された。

E. 結論

(1) SALS では、本来 type 2 の TDP-43-ir NCIs の分布型を示す症例は人工呼吸器の導入後に totally locked-in state へ移行しえるのと考えられた。

(2) SALS において、TDP-43 異常は神経細胞死に密接に関連していることが強く示唆された。

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

1. Zhang HX, Tan CF, Mori F, et al. TDP-43-immunoreactive neuronal and glial inclusions in the neostriatum in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. Acta Neuropathol 115: 115-122, 2008
2. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, et al. Axonal α-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. Brain 131: 642-650, 2008
3. Mori F, Tanji K, Zhang HX, et al. α-Synuclein pathology in the neostriatum in Parkinson's disease. Acta Neuropathol 115: 453-459, 2008
4. Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, et al. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 63: 538-542, 2008
5. Nishihira Y, Tan CF, Onodera O, et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. Acta Neuropathol 116: 169-182, 2008
6. Mori F, Tanji K, Zhang HX, et al. aturation process of TDP-43-positive neuronal cytoplasmic inclusions in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. Acta Neuropathol 116: 193-203, 2008
7. Orimo S, Uchihara T, Nakamuta A, et al. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease linked to *SNCA* dyplication. Acta Neuropathol 116: 575-577, 2008
8. Oyanagi K, Yamazaki M, Takahashi H, et al. Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. Neuropathol Appl Neurobiol 34: 650-658, 2008

2.学会発表

(以下のすべてについて、その発表は第 49 回日本神経病理学会、東京、2008, 5, 20-22)

1. 西平　靖, 譚　春鳳, 小野寺　理, ほか. 孤発性筋委縮性側索硬化症における TDP-43 異常発現とその分布に関する免疫組織化学的検討.
2. 西平　靖, 譚　春鳳, 柿田明美, ほか. 長期の臨床経過を示した筋委縮性側索硬化症における TDP-43 異常発現とその分布に関する免疫組織化学的検討.
3. 森　文秋, 丹治邦和, 張　海心, ほか. 筋委縮性側索硬化症における TDO-43 陽性神経細胞内封入体の免疫電顕による検討.
4. 丹治邦和, 森　文秋, 譚　春鳳, ほか. シヌクレイノパチー剖検脳における synphilin-1 結合タンパク質(NUB1)の定量解析.
5. 森　文秋, 丹治邦和, 張　海心, ほか. パーキンソン病の線条体におけるαシヌクレインの蓄積.

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

新たに作製したリン酸化TDP-43抗体を用いたALS剖検例の検討

藤田　行雄[1]，高玉　真光[2]，岡本　幸市[1]
1)群馬大学大学院脳神経内科学，2)老年病研究所附属病院

研究要旨

ALSとFTLD-Uで認められるユビキチン陽性タウ陰性神経細胞内封入体の主要構成蛋白として2006年にTAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43)が同定され，これらの疾患はTDP-43 proteinopathyとして認識されるようになっている．神経細胞内のTDP-43の働きは十分に解明されていないが，リン酸化されたTDP-43が神経細胞死と関連していることが示唆されている．今回，我々は2種類のリン酸化TDP-43抗体を作製し，ALS剖検例を免疫組織学的に検討した．本抗体は正常の核を認識せず，ALSの異常構造物のみを認識し，TDP-43 proteinopathyの病態解明に寄与する抗体であると考えられる．ALSでは，運動ニューロン以外に大脳皮質，海馬歯状回，扁桃体，基底核，視床，脳幹，小脳歯状核などの神経細胞，グリア細胞およびneuropilに広く異常構造物が蓄積している症例が認められ，ALSの病変は従来考えられていたよりも中枢神経内に広く存在することが確認された．

A.研究目的

ALSとFTLD-Uで認められるユビキチン陽性タウ陰性神経細胞内封入体の主要構成蛋白として2006年にTAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43)が同定され，これらの疾患はTDP-43 proteinopathyとして認識されるようになっている (1, 2)．神経細胞内のTDP-43の働きは十分に解明されていないが，リン酸化されたTDP-43が神経細胞死と関連していることが示唆されている(3)．今回，我々は2種類のリン酸化TDP-43(pTDP-43)抗体を作製し，ALS剖検例のpTDP-43の異常を検討することを目的とした．

B.研究方法

TDP-43のSer409およびSer409/410をリン酸化したC末12アミノ酸残基に対する2つのポリクローナル抗体 (p409抗体およびp409/410抗体)を作製する．ALS剖検例の脊髄前角および側頭葉を用いたwestern blotで作製した抗体の反応性を確認する．その後，病理学的に確定されたALS剖検例に対して今回作製したpTDP-43抗体を用いて免疫組織染色を施行する．対象として当科および関連病院において剖検された17ALS剖検例を用いた．そのうちの2例は10年以上の長期間人工呼吸器管理された例であり，その2例を含む8例(表1)に対しては大脳，脳幹，脊髄を詳細に検討した．一部，GFAPとの蛍光2重免疫染色も施行した．

表1

年齢	性	経過	人工呼吸器	認知症
69	M	12年2ヶ月	10年	(-)
66	M	15年10ヶ月	12年8ヶ月	(-)
62	M	1年10ヶ月	(-)	(-)
60	M	1年	(-)	(-)
56	F	2年	(-)	(-)
75	M	7ヶ月	(-)	(-)
61	M	2年6ヶ月	(-)	(-)
44	F	2年	24日	(-)

(倫理面への配慮)

ALS剖検例には，剖検時に家族より研究発表に関する同意を得ている．剖検番号等から患者が特定されることはない．

C.研究結果

western blot

p409 抗体および p409/410 抗体はほぼ同様の染色性を呈した．以下は p409/410 抗体の結果を示す．ALS および対照例の脊髄前角を用いた western blot では，ALS 例において Protein tech の非リン酸化 TDP43 抗体と比べ，本抗体では 45kDa のバンド，約 25kDa の C 末断片と思われるバンドおよびレーン全体にスメア状に染まる反応がみられた（図 1）．これらはλ phosphatase 処理によりバンドの軽減が認められた．

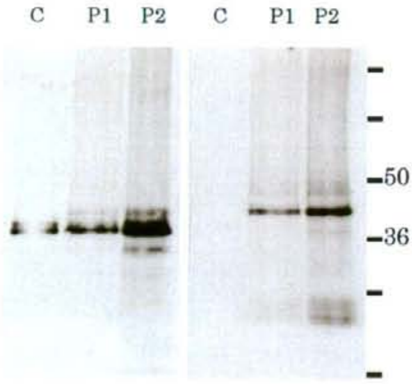


図1　脊髄前角領域のwestern blot
Sarcosyl-insoluble, urea-soluble fraction
C:control, P:ALS case

ALS 例の側頭葉内側を用いた western blot では，Cosmo Bio 社のリン酸化 TDP43 抗体と比較すると，一部の例では当科で作製の抗体の方が，45kDa のバンドが強く認められていたが，組織学的に大脳に広範な陽性構造を認めた症例ではほぼ同様の結果を示した．

免疫組織染色

Protein tech 社の非リン酸化 TDP43 抗体では，ALS 脊髄前角細胞の異常構造物に加えて，神経細胞および周囲のグリアの正常な核が染色されるが，今回作製した pTDP-43 抗体では正常な神経細胞では核を含めて染色されず，異常構造物の検出が非常に容易であった．pTDP43 抗体とユビキチン抗体の染色性の違いをみると，pTDP43 抗体の方で陽性構造物がより多く認められた（図 2）．

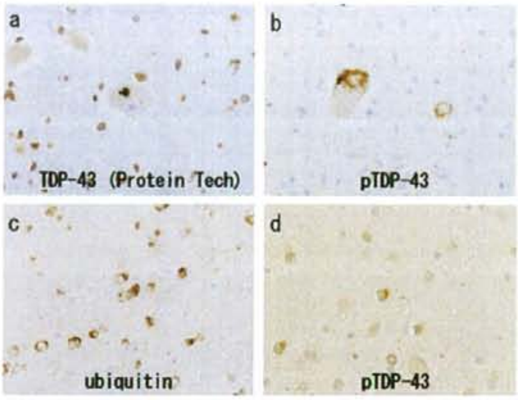


図 2 脊髄前角の免疫染色
a）非リン酸化 TDP-43 ポリクローナル抗体（Protein Tech），b）pTDP-43 ポリクローナル抗体，c）抗ユビキチンポリクローナル抗体（Dako），d）pTDP-43 ポリクローナル抗体

pTDP-43 抗体を用いた ALS 剖検例の検討

脊髄前角細胞では skein-like inclusion と round inclusion が pTDP-43 抗体で陽性であり，さらに神経細胞胞体内と突起内にも微細顆粒状の陽性構造物がみられた．検討した 17ALS 剖検例全てで程度の差こそあれ陽性所見が得られた．前角細胞以外の運動神経系では，Betz 細胞では明らかな陽性所見は認められなかったが，運動野の小型神経細胞およびグリア細胞，また顔面神経核および舌下神経核の神経細胞およびグリア細胞に陽性所見が認められた．Onuf 核では 17 例中の 1 例にのみ顆粒状の陽性所見がみられた．Clarke 柱には陽性所見は認めなかった．8 例の大脳の検討では，一部の例で側頭葉，前頭葉の神経細胞およびグリア細胞に陽性所見がみられた．海馬歯状回は 8 例中 2 例，扁桃体は 8 例中 3 例に神経細胞およびグリア細胞に陽性所見がみられた．被殻は 8 例中 5 例，淡蒼球は 7 例中 4 例，尾状核は 5 例中 2 例，および視床は 7 例中 4 例に陽性所見がみられた．neuropil にもドット状の陽性所見がみられた．

脳幹部では黒質は7例中4例，赤核7例中3例，下オリーブ核8例中4例，橋核神経細胞8例中1例に陽性所見がみられた．小脳では6例中4例で歯状核に陽性所見がみられたが，Purkinje 細胞には1例も陽性所見は認める例はなかった（図3）．

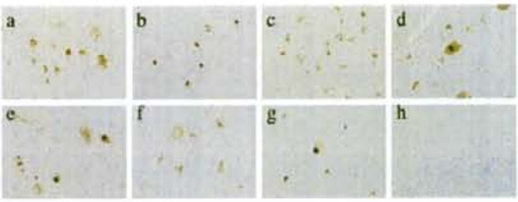


図3　pTDP-43 ポリクローナル抗体による免疫染色
a)側頭葉，b)海馬歯状回顆粒細胞層，c)前頭葉，d)黒質，e)赤核，f)下オリーブ核，g)小脳歯状核，h)Purkinje 細胞

今回の検討では，脊髄ではグリア細胞内に cap 状の陽性構造がみられたが，一方で大脳，脳幹ではドット状や桿状の陽性所見が多数みられた．GFAP に対するモノクローナル抗体と pTDP-43 抗体による蛍光2重免疫染色では，両者の明らかな共存は確認できなかった．

10年以上の長期人工呼吸器管理された2例の ALS では，1例では運動ニューロン以外に大脳皮質，海馬歯状回，扁桃体，基底核，視床，脳幹，小脳歯状核などの神経細胞およびグリア細胞内に多数の pTDP-43 陽性構造物がみられたが，もう1例では黒質，赤核には陽性所見がみられたが，海馬歯状回には陽性所見なく，基底核，視床にグリア細胞内陽性構造物が稀にみられたのみで，長期人工呼吸器管理例のなかでも大きな差がみられた．

D. 考察

ALS では運動神経細胞のみでなく，大脳，脳幹，小脳，脊髄の神経細胞，グリア細胞に広く pTDP-43 の異常がみられることが再確認された．さらに長期人工呼吸器装着された ALS2 例の病変の拡がりには大きな差が認められ，病変の拡がりは罹病期間とは独立した要因があることが示唆された．pTDP43 のグリア細胞内の異常はオリゴデンドログリアにみられると考えられているが，pTDP-43 抗体による大脳，脳幹の検討では，アストロサイトの異常が疑われた．しかし，GFAP に対するモノクローナル抗体と pTDP-43 抗体による蛍光2重免疫染色では，両者の明らかな共存は確認できず，今後この由来について検討の予定である．

E. 結論

1. 新たに Ser409/410 をリン酸化した C 末 12 アミノ酸残基に対する2つのポリクローナル抗体を作製した．

2. p409/410 抗体を用いた ALS 脊髄前角の western blot では 45kDa のバンド，約 25kDa の C 末断片と思われるバンドおよびレーン全体にスメア状に染まる反応がみられた．

3. 本抗体は正常の核を認識せず，ALS の異常構造物のみを認識した．

4. ALS では，運動ニューロン以外に大脳皮質，海馬歯状回，扁桃体，基底核，視床，脳幹，小脳歯状核などに広く異常構造物が蓄積している症例があることが確認された．

5. 長期人工呼吸器管理の2例では，中枢神経内に広く異常構造物がみられたが，その分布，程度には大きな差がみられた．

文献

(1) Arai A, et al. Biochem Biophys Res Commun 2006; 351: 602-11.

(2) Neumann M, et al. Science 2006; 314: 130-3.

(3) Hasegawa M, et al. Ann Neurol 2008; 64: 60-70.

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　岡本幸市．第27回日本認知症学会シンポジウム，2008

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
神経変性疾患に関する調査研究班 (分担)研究報告書

ＴＤＰ-43遺伝子変異を示す認知症を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症

吉田眞理[1)]
櫻井信夫[2)]、三室マヤ[1)]、橋詰良夫[1)]、新井哲明[3)]、長谷川成人[3)]、新井誠[3)]、糸川昌成[3)]、秋山治彦[3)]
1）愛知医科大学加齢医科学研究所、2）一宮市民病院神経内科、3）東京都精神医学総合研究所

研究要旨　筋萎縮性側索硬化症（ALS）とユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症（FTLD-U）のユビキチン化封入体の構成蛋白としてTAR DNA-binding protein 43kDa（TDP-43)が同定され,さらにTDP-43点変異を示す家族性ALSの報告からALSにおけるTDP-43凝集蓄積が細胞死と密接に関連した現象であることが示唆されている。われわれは認知症を伴うALSを含む家族性ALSにTDP-43点変異（G298S）を見いだした。症例は54歳女性、認知症を伴うALSの臨床像を示し多幸的、多弁、頑固、幼児的などの精神症状を認めた。病理学的には下位運動ニューロンと側頭葉前頭皮質に多数の神経細胞内封入体NCIを認めFTLD-U type 2の病理像を示しTDP-43点変異による凝集亢進が示唆された。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）とユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症（FTLD-U）[1,2)]のユビキチン化封入体の構成蛋白としてTAR DNA-binding protein 43kDa（TDP-43)[3,4)]が同定され,TDP-43点変異を示す家族性ALSの報告[5,6)]が続き、TDP-43の凝集蓄積が細胞死と密接に関連した現象である可能性が示唆されている。我々はALS-D（剖検例）を含む家族性ALSにTDP-43点変異（G298S）を見いだしたので、その臨床病理像、遺伝子変異が及ぼすTDP-43の凝集蓄積像の特徴を報告する。

B.研究方法

症例は死亡時54歳女性で、兄がALS（認知症の記載はない）、叔父が筋萎縮症とされるが詳細は不明である。病理学的、遺伝子学的な検索に関して家族の同意を得ている。免疫染色はTDP-43（polyclonal、Protein Tec Group, Chicago, 1:3000）とリン酸化TDP-43(polyclonal, pS409/410, 1:3000)で検討した[7,8)]。

C.研究結果

［臨床経過］

52歳時に両手の脱力で発症し、その後四肢の筋力低下、筋萎縮、呼吸困難が出現し、発症1年後にA病院神経内科を受診した。神経学的には言語は軽度鼻性で舌の萎縮と線維束性収縮、四肢体幹筋の中等度から高度の筋萎縮と筋力低下、線維束性収縮を認め反射は正常、病的反射はなかった。筋電図では広範な脱神経電位、肺機能%VC 52.8%であった。表情は明るくやや多幸的、多弁であった。3ヶ月後には転倒傾向、構音障害、呼吸困難増強し、階段から転落して右前腕橈骨骨折のため入院したが、呼吸困難を訴えながら多弁で話続け、精神的にも頑固で幼児的となり、車椅子や保護帽、経管栄養の拒否などが目立った。呼吸不全のため全経過1年3ヶ月で亡くなった。

［病理学的所見］

脳重は1210g、脊髄前根の萎縮と錐体路変性を認めた（図1）。下位運動ニューロンの脱落とグリオーシスは舌下神経核と頸髄に強く腰髄では比較的軽く、残存する細胞にはBunina小体、ユビキチン陽性、TDP-43、リン酸化TDP-43陽性skein-like inclusion、round inclusionとびまん性微細顆粒状TDP-43陽性構造を多数認めた（図2,3）。中心前回Betz巨細胞は軽度に減少しmacrophageの集族像、脊髄錐体路変性を認めた。Betz巨細胞、中・小型の神経細胞に少数のTDP-43

陽性所見を認めた。前頭側頭葉の萎縮は軽いが、側頭葉極、迂回回、内嗅野、扁桃核、海馬支脚、島葉などの辺縁系の軽度の変性、黒質の軽度の神経細胞脱落とグリオーシスを認めた。TDP-43陽性神経細胞胞体内封入体（NCI）は側頭葉を中心とする辺縁系に多数出現し変性突起はきわめて少数、核内封入体（-）でFTLD-U type 2[9]に相当した（図4,5）。黒質にも多数の微細顆粒状NCIを認めた(図6). 被殻、尾状核、淡蒼球、視床下核など他の領域には少数のNCIを認めた。

病理学的には下位運動ニューロンに多数の微細顆粒状TDP-43、リン酸化TDP-43陽性封入体が出現していることが特徴であった。同一前角内の残存する細胞に多数の微細顆粒状のTDP-43陽性細胞がみられ、通常の孤発性ALS早期例に比してもTDP-43陽性細胞の出現が顕著であった。Skein-like inclusionやround inclusionの観察される細胞では微細顆粒状構造は乏しい傾向を示した。TDP-43微細顆粒状構造周囲に集簇するCystatinC, tranferrin陽性のBuina小体もみられたが、Buina小体自体のTDP-43陽性所見は確認できなかった。前角内には多数のspheroidの出現を認め、内部に少数のTDP-43陽性構造を示すものも存在した。

NFTはBraak stage 0/1、argyrophilic grain, 老人斑, Lewy小体はみられなかった。

［遺伝子検索］

凍結脳から抽出したgenomic DNAを解析した結果TDP-43遺伝子298番目のGからAへの塩基置換を同定した。この塩基置換はGlyをSerに置換するミスセンス変異（G298S）である。

D.考察

本例は臨床的には下位運動ニューロン優位のALSと比較的軽度な精神症状を示した全経過1年3ヶ月のALS-Dである。臨床経過が早く、呼吸不全の早期出現のために十分な認知機能検査は施行されていないが、多幸的で、呼吸不全の状態でも多弁で話続け、精神的にも頑固で幼児的となり、転倒防止の車椅子や保護帽、嚥下障害のため経管栄養を勧めても拒否をして、自己の病状に対する理解不足を認めたが、見当識障害や記銘力障害はなかった。これらの精神症状はALS-Dの中で比較的軽い認知障害を示す例に共通してみられ、激しい行動異常や言語障害を示すFTLD-Uに比して程度が軽いために認知障害として評価されず、単にALSとだけ診断されたり軽度の情動障害を伴うALSと位置づけられる場合も多い。ALSにみられる軽度な認知機能異常も十分に注目して検討する必要がある。同一家系内の他の症例に関しての情報は少ないが認知症の記載はなく、本家系はALSが主体の家系であると推測される。

病理学的には下位運動ニューロンに多数の微細顆粒状TDP-43、リン酸化TDP-43陽性封入体が出現していることが特徴であり、遺伝子変異と病理像との関連が示唆された。

大脳皮質では海馬支脚、側頭前頭葉皮質、扁桃核などの辺縁系と黒質に軽度の変性を認め、海馬歯状回顆粒細胞、側頭前頭葉皮質表層、扁桃核などの小型神経胞体内に多数のNCIを認めた。NCIは、側頭葉、扁桃核、帯状回、島葉など辺縁系に多く、前頭葉には少数であった。変性神経突起は少数で、核内封入体はみられずFTLD-U type2に相当した。黒質の神経細胞脱落は軽度であったが、残存する細胞には微細顆粒状TDP-43陽性細胞を多数認めた。大脳皮質のNCIの出現は主として辺縁系にみられ、通常の孤発性ALSにみられる辺縁系のNCIの散発的出現を凌駕しているが、認知症が前景となるFTLD-Uに比してその程度は軽度である。すなわち孤発性ALSと認知症が前景となるALS-DないしFTLD-Uの中間に位置する程度である[10]。同時に前頭側頭葉の軽度の変性像は、臨床像とよく合致する病理所見であった。

TDP-43点変異を示す家族性ALSの変異は17箇所が報告されている。病理像が確認されているのは、本邦のQ343R変異家系[6]とVan Deerlinによって報告された本家系と同じG298S変異家系である[5]。Van Deerlinらの報告したQBB家系で病理

像が確認された3例の発症年齢は48歳、52歳、41歳で、罹病期間は1〜4年と孤発性ALSの平均発症年齢より若く、罹病期間も短い傾向を示す。認知症は確認されていない。病理学的にはBunina小体を伴う下位運動ニューロンの変性と錐体路障害を認め、脊髄前角のTDP-43免疫染色ではskein-like inclusionやround inclusionに加えて、胞体の微細顆粒状陽性所見が2例でみられている。大脳は2例で病理学的に検討され、海馬歯状回顆粒細胞、前頭側頭葉、扁桃核、帯状回、黒質などにTDP-43陽性NCIを認めている。QBB家系でも、われわれの報告例と同じくTDP-43陽性NCIが大脳辺縁系へも出現し、おそらくALS-Dと同等の出現を示していることが推測されるが、彼らの報告では認知症との関連性は議論されていない。

われわれの症例とQBB家系の病理像を総合すると、G298S変異例では脊髄前角のTDP-43凝集が亢進し、さらに大脳辺縁系にもNCIを形成する病態が存在する可能性がある。脊髄前角の多数のTDP-43凝集所見に比して、大脳皮質は辺縁系にほぼ限局していることを考えると、G298S変異は下位運動ニューロンの細胞死により影響を与える分子生物学的は基盤を持っている可能性が示唆される。今後さらに動物モデルの作成を含めた検討が必要である。

Skein-like inclusion、round inclusionはこれまでユビキチン化封入体としてBunina小体とともにALSの病理診断の指標であったが、ユビキチン化は微細顆粒状TDP-43凝集がより線維構造を形成したのちに起こると考えられる。微細顆粒状TDP-43凝集は下位運動ニューロン変性の早期変化であり、skein-like inclusionやround inclusion形成過程を経ずに、細胞が障害されて直接死にいたる過程が推測され、逆にユビキチン化封入体が形成された細胞は障害物を処理して安定化し生き残っている可能性が示唆される。TDP-43の核内移行障害がどのような機序で起こるかの解明は、ALS治療薬開発の手がかりになる可能性がある。

E.結論

ALS-Dの臨床病理像を呈したTDP-43 Gly298Ser変異を示す家族性ALSを報告し、本例のTDP-43蓄積の特徴を示した. TDP-43 Gly298Ser変異は下位運動ニューロンに多数の微細顆粒状TDP-43陽性構造を形成し、辺縁系や黒質にも多数のNCIを形成してALS-D/FTLD-U type 2の臨床病理像を示す可能性が示唆された。

文献

1) 吉田眞理、他. 臨床神経 1992; 32 : 1193
2) Yoshida M. Neuropathology 2004; 24: 87.
3) Neumann M, et al. Science 2006; 314: 130.
4) Arai T, et al. Biochem Biophys Res Commun 2006; 351: 602.
5) Van Deerlin VM et al. Lancet Neurol. 2008 ;7:409-16.
6) Yokoseki A et al. Ann Neurol. 2008 ;63:538-42.
7) Inukai Y, et al. FEBS Lett. 2008;582:2899-904.
8) Hasegawa M, et al. Ann Neurol. 2008;64:60-70.
9) Cairns NJ, et al. Acta Neuropathol 2007; 114: 5-22.
10) 吉田眞理. 神経内科 2008 68; 548-557

G.研究発表

1.論文発表

1. Inukai Y, Nonaka T, Arai T, et al. Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTLD-U and ALS. FEBS Lett. 2008;582:2899-904.
2. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. 2008;64:60-70.
3. 吉田眞理. ALS/FTLDのTDP-43による再評価. 神経内科 2008 68; 548-557

2.学会発表

1. 吉田眞理　他. ALSとFTLD-UにおけるTDP-43

の免疫組織学的検討．第 49 回日本神経学会総会　2008 年 5 月 15-17 日　横浜

2. 吉田眞理　他．孤発性 ALS における TDP-43 陽性封入体の出現．第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会　2008 年 5 月 20-22 日　東京

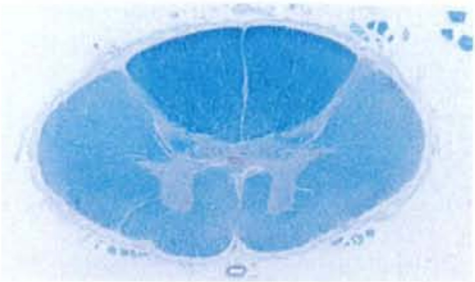


図 1　胸髄横断面、前側索の淡明化、錐体路変性を認め、後索中間根帯の変性はみられない

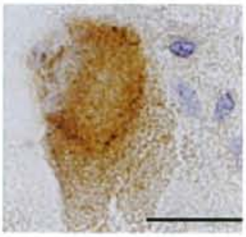


図 2　腰髄前角核周囲の微細顆粒状 pTDP-43 陽性像　　pTDP-43 免疫染色

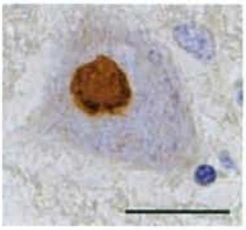


図 3　pTDP-43 陽性 round inclusions、胞体内も微細顆粒状構造（-）　pTDP-43 免疫染色

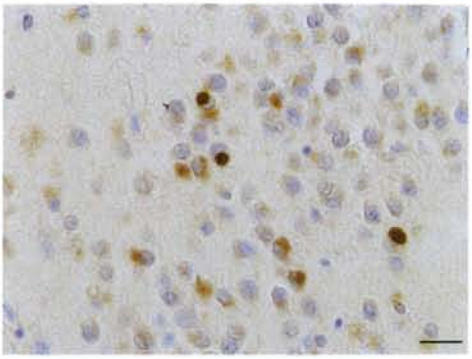


図 4　海馬歯状回顆粒細胞の NCI
p TDP-43 免疫染色

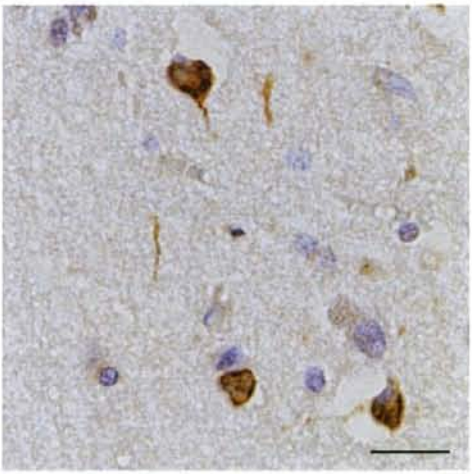


図 5　側頭葉表層小型神経細胞の NCI と DN
p TDP-43 免疫染色

図 6　黒質神経細胞の微細顆粒状 NCI
p TDP-43 免疫染色

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
神経変性疾患に関する調査研究班　(分担)研究報告書

家族性および孤発性 ALS における TARDBP 遺伝子変異の頻度検索

報告者　梶　龍兒[1] 鎌田正紀[1)2)]，和泉唯信[1]，野寺裕之[1]，丸山博文[2]，
川上秀史[2]，伊東秀文[3]，日下博文[3]

1)徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部感覚情報医学講座神経情報医学分野
2)広島大学原爆放射線医科学研究所放射線分子疫学研究分野
3)関西医科大学　神経内科

研究要旨
家族性および孤発性 ALS における TARDBP 遺伝子の変異およびその頻度を検討する。家族性 ALS（30 例）の全コード領域、孤発性 ALS（200 例）、球脊髄性筋萎縮症（1 例）、正常コントロール（105 例）のエクソン 6 のコード領域を PCR で増幅させた後、シーケンスを行った。家族性 ALS の 1 例において N352S のミスセンス変異を認めた。臨床的には右上肢筋力低下より発症し、四肢筋力低下の進行、球症状を認め、約 3 年半で呼吸症状が出現した。認知機能障害は認めなかった。両親は ALS を発症していないが、姉が ALS で 42 歳にて死亡している。また、孤発性 ALS の 15 例において A366A のサイレント変異を認めたが、正常コントロールの 7 例および球脊髄性筋萎縮症 1 例においても同様の変異を認めたため、一塩基多型と判断した。我々の検討では、家族性 ALS における TARDBP 遺伝子変異の頻度は 3.3%であった。孤発性 ALS に関しては病的変異を見いだせなかった。今回、我々が同定した変異は TDP-43 のリン酸化に影響を及ぼしており、それによって ALS 発症に関与している可能性があると考えた。

A. 研究目的

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 および FTLD-U において、そのユビキチン陽性の封入体の構成タンパクとして TDP-43 が同定された。TDP-43 は染色体 1p.36.2 にある TARDBP 遺伝子によってコードされており、機能的には遺伝子発現やスプライシングの調節に関与しているのではないかと考えられている。最近、家族性および孤発性 ALS における TARDBP 遺伝子の異常が相次いで報告されている。現在、家族性 ALS では G290A、G298S、A315T、M337V、Q343R、N345K、N352S、A382T、I383V、孤発性 ALS では D169G、G287S、G294A、Q331K、G348C、R361S、N390D、N390S が報告されている。

今回、家族性および孤発性 ALS において TARDBP 遺伝子変異の有無を確認し、その頻度を検討した。

B. 研究方法

家族性 ALS 30 例、孤発性 ALS 200 例、球脊髄性筋萎縮症 1 例、正常コントロール 105 例を対象とした。ゲノム DNA は末梢血または剖検で得られた凍結脳より抽出した。家族性 ALS はエクソン 2 からエクソン 6 の全コード

領域、孤発性ALS、球脊髄性筋萎縮症、正常コントロールに関してはエクソン6のコード領域をPCRで増幅させた後、シーケンスを行い変異の有無を検索した。

末梢血に関しては対象者、凍結脳に関してはその家族に対しインフォームドコンセントを行い、文書での同意を得た上でDNAを採取した。また、得られたゲノムDNAはそれぞれに番号をつけ匿名化された状態で解析した。

C.研究結果

家族性ALS 30例中1例においてc.1055A>G、p.N352Sのミスセンス変異を認めた。

この症例は55歳時に右上肢の筋力低下より発症し、その後、左上下肢筋力低下が進行した。初診時の神経学的所見では球症状、下位運動ニューロン徴候（四肢・体幹)、上位運動ニューロン徴候（下顎・四肢深部反射亢進)を認め、約3年半で呼吸症状が出現した。経過中、認知機能障害は認めなかった。筋電図では上下肢、脳神経領域において急性および慢性の脱神経所見を認めALSと診断した。家族歴に関しては、父親は事故、母親は脳血管障害で死亡しておりALSを発症していないが、姉がALSと診断され42歳の死亡時は寝たきり状態で気管切開が行われていた。

また、孤発性ALSの15例においてc.1098C>G、p.A366Aのサイレント変異を認めた。しかし、このサイレント変異は正常コントロールの7例および球脊髄性筋萎縮症1例においても認められたため病的意義のない一塩基多型と判断した。

D.考察

我々の検討では、家族性ALSにおけるTARDBP遺伝子変異の頻度は3.3% (1/30)であった。これまでは0.6%から6.5%と報告されており、ほぼ同様な頻度であった。

孤発性ALSに関してはこれまで8つの異なる変異が報告されているが、変異を認めなかったという2つの報告と同様に、我々も病的変異を見いだせなかった。

我々が同定した変異はすでにKuhnieinらが解析したドイツの家族性ALSで同定されている。その家系は常染色体優性遺伝形式が考えられ、臨床像は上肢遠位の筋力低下より発症、その後、四肢筋力低下に進行し、数年後には呼吸障害を認めている。彼らはソフトウエアを使いこの変異が起こることによる機能障害とリン酸化の程度を予測している。それによると、機能的な障害はないが、コドン352のセリンだけでなく347、350のセリンのリン酸化も亢進し、その結果、細胞質輸送やタンパク質の相互作用に障害がおよびTDP-43の蓄積へと導かれるのではないかと考察している。

また、臨床像に関して、これまでの報告ではTARDBP遺伝子の変異を認めるALSは認知機能障害を伴うことが少ないとされるが、本例でも経過中に認知機能障害は認めなかった。

E.結論

われわれの検討では家族性ALSおけるTARDBP遺伝子変異の頻度は3.3%であった。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Sako W et al. Bilateral deep brain stimulation of the globus pallidus internus in tardive dystonia. Mov Disord 23:1929-31, 2008

Hosono Y et al. Comparison of monophasic versus biphasic stimulation in rTMS over premotor cortex: SEP and SPECT studies. Clin Neurophysiol 119:2538-45, 2008

Kaji R. Diagnosis and treatment of multifocal motor neuropathy. Curr Treat Options Neurol 10:103-7, 2008

Sato K et al. Differential involvement of striosome and matrix dopamine systems in a transgenic model of dopa-responsive dystonia. Proc Natl Acad Sci U S A. 105:12551-6, 2008

Fujita K et al. Diffusion tensor imaging in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 79:1304-6, 2008

de Carvalho M et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. Clin Neurophysiol 119:497-503, 2008

Goto S et al. Thalamic Vo-complex vs pallidal deep brain stimulation for focal hand dystonia. Neurology 70: 1500-1, 2008

2. 学会発表

1. 前田耕司ほか：滋賀県で発見された遺伝性MND または HMSN-P と考えられる家系群について．第 49 回日本神経学会総会， 2008 年 5 月

2. 藤田浩司ほか：筋萎縮性側索硬化症における拡散テンソル画像解析（第 2 報）．第 49 回日本神経学会総会， 2008 年 5 月

3. 鎌田正紀ほか：徳島県における筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者に対する支援体制構築に向けて．第 49 回日本神経学会総会，2008 年 5 月

H. 知的所有権取得状況

1．特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし

TDP-43による神経変性機序

井口洋平[1]、勝野雅央[1]、丹羽淳一[2]、熱田直樹[1]、田中章景[1]、貝淵弘三[3]、祖父江元[1]
1．名古屋大学大学院　医学系研究科　神経内科学
2．愛知医科大学　脳卒中センター
3．名古屋大学大学院　医学系研究科　神経情報薬理学

研究要旨

[目的]TDP-43はALSやFTLD-Uの神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として報告されている。ALSやFTLD-Uにおいて、封入体が存在する神経細胞では核に存在するはずのTDP-43が染色されないことからTDP-43のloss of function (LOF) の検討が重要と考えられる。今回我々は、TDP-43のLOFを検討した。[方法]Neuro-2a細胞に対してsiRNAによりTDP-43をノックダウンし、その後分化させ、細胞形態や細胞死を観察した。[結果]TDP-43をノックダウンすることにより神経突起の伸張阻害と細胞死が誘導された。神経突起の伸張阻害と細胞死をきたす原因としてRhoA, Rac1, Cdc42に注目し検討すると、RhoA, Rac1, Cdc42の活性が一様に低下していた。[結論]TDP-43のLOFにより神経変性を起す可能性が示唆され、その病態機序としてRho familyの活性低下が一因と考えられた。

A.研究目的

TDP-43はALSやFTLD-Uの神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として報告されているが、それが神経変性にどのように関わっているのかよく解っていない。ALSやFTLD-Uにおいて、封入体が存在する神経細胞では核に存在するはずのTDP-43が染色されないことからTDP-43のloss of functionの検討がgain of functionと同様に重要と考えられる。今回我々は、TDP-43のloss of functionを検討した。

B.研究方法

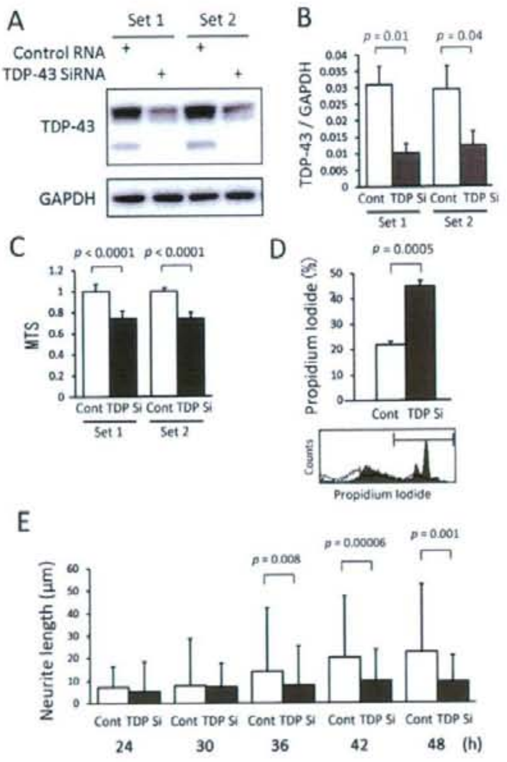
neuroblastoma cell-line (Neuro-2a細胞)に対してsiRNAによりTDP-43のノックダウンを行った。マウスのTDP-43に対して19塩基相同性をもつ2本鎖ＲＮＡオリゴを2種類作成しそのスクランブルをコントロールとした。Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) でtransfectionを行い、24時間後に分化mediumに交換しさらに24時間後にviabilityをMTS assay、細胞死をPropidium iodide (PI)染色にて評価した。神経突起については24時間後から6時間おきに100個以上の突起の長さをImage Gauge software (Fujifilm)計測し、平均値を算出した。細胞形態などに重要な役割をもつRho family (RhoA, Rac1, Cdc42) の活性はPull-down法にて評価した。geranylgeranyl化については、^{14}Cで標識したメバロン酸をmedium中に混合した後に蛋白を回収、抗RhoA抗体(Santa Cruz)、抗Rac1抗体(Upstate)を用いて免疫沈降し、SDSpage後autoradiographyで可視化して評価した。

C.研究結果

Western blotting、定量的RT-PCRの結果により蛋白、mRNAレベルでTDP-43 siRNAの有効なノックダウン効果が確認された (Fig.1A, B)。TDP-43をノックダウンすると細胞のviabilityは有意に低下し、死細胞も有意に増加した(Fig.1C, D)。神経突起についてはコントロールに比しTDP-43ノックダウンで有意に伸張が阻害された(Fig.1E)。Rho familyであるRhoA, Rac1, Cdc42に注目し検討すると、RhoA, Rac1, Cdc42の活性

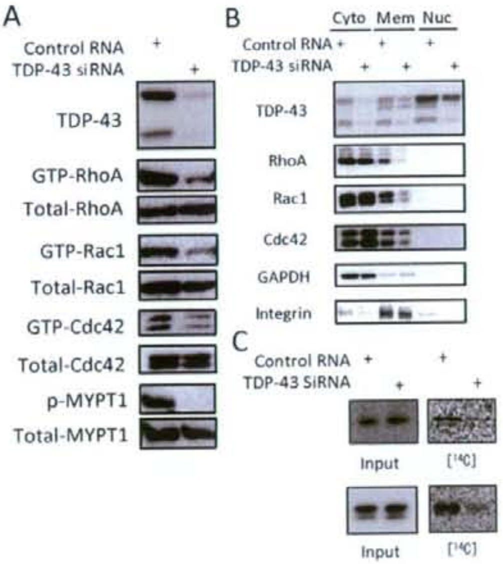
が一様に低下していることが判明した(Fig. 2A)。Neuro-2a 細胞の蛋白分画では膜分画の RhoA, Rac1, Cdc42 は TDP-43 ノックダウンで減少し、RhoA, Rac1 の geranylgeranyl 化も著明に抑制していた(Fig. 3C, D)。これらの TDP-43 ノックダウンによる細胞障害は geranylgeranyl 化の基質である GGPP を加えることによって改善し (Fig. 3A, B)、さらに GGTI を用いて geranylgeranyl 化を抑制すると、TDP-43 ノックダウンと同様に viability の低下と神経突起の伸張阻害が確認された(Fig. 2A, B)。

Fig 1



(A) Anti-TDP-43 Western blot of Neuro-2a cells transfected with siRNAs. *(B)* The mRNA expression levels of TDP-43 measured by real-time RT-PCR. Data is shown as the ratio of the mRNA level of TDP-43 to that of GAPDH. *(C)* The viability of Neuro-2a cells quantified by MTS assay. TDP-43 depletion significantly reduced cell viability. *(D)* The number of the cells positive for propidium iodide (PI) staining. We counted 10,000 cells using flow cytometry. Knock-down of TDP-43 significantly increased the number of cells stained with PI. *(E)* Time course analysis of neurite outgrowth in Neuro-2a cells transfected with TDP-43 siRNA or control RNA. Averages of the longest neurite lengths of over 100 transfected cells were analyzed 24 h after the transfection of siRNA. Neurites of control cells extend over the course of 48 h, but in TDP-43-depleted cells, neurite outgrowth is inhibited. Error bars indicate SD.

Fig.2



(A) Pull-down assays of RhoA, Rac1, and Cdc42 and Western blot using anti-phospho-MYPT1 in Neuro-2a cells transfected with TDP-43 siRNA or control RNA. TDP-43 knock-down significantly reduced Rho family GTPase activity. *(B)* Western blots of subcellular fractions (cytosol, membrane and nucleus) of Neuro-2a cells transfected with TDP-43 siRNA or control RNA. The amount of Rho family members in the membrane fraction was significantly reduced