

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

高次脳機能障害の検討

研究分担者 小久保康昌¹⁾

研究協力者 新堂晃大¹⁾、葛原茂樹²⁾

1)三重大学神経内科、2)国立精神・神経センター病院

研究要旨

【目的】紀伊 ALS/PDC における認知機能障害の特徴を明らかにする。【方法】対象は紀伊 ALS/PDC 14 例(男性 7 例、平均年齢 70.0 歳。紀伊 ALS 4 例(うち 2 例に認知症合併)、紀伊 PDC 10 例)、アルツハイマー病 12 例、進行性核上性麻痺 10 例、前頭側頭型認知症 10 例、び慢性レヴィー小体病 10 例。方法は、MMSE、レーブン色彩マトリシス検査 (RCPM)、語想起を施行し、臨床症候として幻覚、失語、意欲低下や性格変化(易興奮性)の有無について比較検討した。【結果】認知症を伴う紀伊 ALS と紀伊 PDC では MMSE が低得点であり、特に紀伊 PDC では見当識障害が著明であった。RCPM では紀伊 PDC で施行時間の延長を認めた。語想起に関しては語頭音の項目で低下傾向であった。臨床症状では幻覚を紀伊 PDC で、意欲低下を認知症を伴う紀伊 ALS と紀伊 PDC で認めたが、失語や性格変化は認めなかった。【結論】紀伊 ALS の一部で MMSE の低得点を認める例が存在した。紀伊 PDC では見当識障害と思考時間の延長を認め、意欲低下が目立ち、前頭葉機能障害を主体とした皮質下性認知症を呈した。

A.研究目的

紀伊半島南部とグアム島は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)とパーキンソン認知症複合(PDC)の世界的な多発地域として知られている。ALS/PDC は、筋萎縮症、パーキンソニズム、認知症が様々な程度に混合する疾患であり、神経病理学的には前頭葉と側頭葉の萎縮と中枢神経系に多数の神経原線維変化が出現することを特徴とする。

今回、紀伊 ALS/PDC 症例に高次脳機能検査を施行し、認知機能障害の特徴を明らかにする。

B.研究方法

対象は、紀伊 ALS/PDC 14 例(男性 7 例、平均年齢 70.0 歳、平均罹病期間 4.8 年)で、内訳は紀伊 ALS 4 例(男性 2 例、年齢 69.5 歳、平均罹病期間 1.9 年、うち 2 例に認知症合併)、紀伊 PDC 10 例(男性 5 例、年齢 70.3 歳、平均罹病期間 6.9 年、うち ALS 合併は 2 例)であった。紀伊

ALS/PDC では認知症出現から検査施行時までの平均罹病期間は 2.5 年であった。対照としてアルツハイマー病(AD) 12 例(男性 4 例、年齢 67.3 歳、平均罹病期間 2.2 年)、進行性核上性麻痺(PSP) 10 例(男性 6 例、年齢 71.3 歳、平均罹病期間 2.0 年)、前頭側頭型認知症(FTD) 10 例(男性 4 例、年齢 66.3 歳、平均罹病期間 2.4 年)、レヴィ小体型認知症(DLB) 10 例(男性 4 例、年齢 68.9 歳、平均罹病期間 4.3 年)を用いた。方法は、高次脳機能検査として、Mini-Mental State Examination (MMSE)、レーブン色彩マトリシス検査 (RCPM)、語想起を施行した。また臨床的特徴に関しては、問診および入院中の言動から幻覚、失語、意欲低下や性格変化(易興奮性)の有無について検討した。高次脳機能検査の結果は Student t test を用いて統計学的に解析した。

また、紀伊 ALS/PDC 全例に頭部単純 MRI と脳血流シンチ (99mTc-ECD SPECT) を施行した。本研究は三重大学の倫理委員会の承認に基づき

施行した。

C. 研究結果

紀伊 ALS/PDC における高次脳機能検査の結果を Table 1 に、AD、PSP、FTD、DLB の高次脳機能検査の結果（各項目の平均および標準偏差）を Table 2 に示す。

Table 1

| No. | 年齢 | 性別 | 診断 | MMSE | | | | RCPM | | 語想起 | | FAB |
|-----|----|----|-------------|------|-----|----------|------|------|-------|-----|-----|-----|
| | | | | 得点 | 見当識 | serial 7 | 単語遅延 | 得点 | 時間(秒) | 動物 | 語頭音 | |
| 1 | 67 | M | Kii-ALS | 29 | 10 | 5 | 2 | 28 | 513 | 8 | 5 | 15 |
| 2 | 78 | F | Kii-ALS | 30 | 10 | 5 | 3 | 25 | 508 | 14 | 6 | 8 |
| 3 | 64 | M | Kii-ALS-D | 23 | 9 | 2 | 0 | 15 | 508 | 10 | 5 | 5 |
| 4 | 69 | F | Kii-ALS-D | 22 | 8 | 1 | 1 | 25 | 434 | 5 | 1 | 10 |
| 5 | 68 | M | Kii-PDC | 18 | 7 | 0 | 0 | 21 | 1037 | 6 | 2 | 5 |
| 6 | 64 | F | Kii-PDC/ALS | 12 | 2 | 0 | 0 | 20 | 988 | 10 | 4 | 4 |
| 7 | 66 | F | Kii-PDC | 25 | 10 | 2 | 1 | 28 | 1073 | 10 | 5 | 12 |
| 8 | 75 | F | Kii-PDC | 25 | 8 | 5 | 1 | 21 | 750 | 11 | 5 | 13 |
| 9 | 76 | F | Kii-PDC | 13 | 3 | 0 | 0 | 18 | 1024 | 3 | 2 | 3 |
| 10 | 72 | M | Kii-PDC | 13 | 1 | 1 | 0 | 13 | 386 | 6 | 2 | 2 |
| 11 | 73 | M | Kii-PDC | 12 | 4 | 0 | 0 | 5 | 697 | 7 | 2 | 2 |
| 12 | 76 | M | Kii-PDC/ALS | 14 | 2 | 1 | 1 | 10 | 2820 | 2 | 1 | 1 |
| 13 | 64 | M | Kii-PDC | 16 | 3 | 1 | 0 | 24 | 444 | 7 | 5 | 12 |
| 14 | 69 | F | Kii-PDC | 17 | 4 | 2 | 0 | 17 | 1100 | 8 | 6 | 0 |

Table 2

| 診断 | 得点 | MMSE | | | | RCPM | | 語想起 | |
|-----|----------|---------|----------|---------|----------|-------------|----------|---------|--|
| | | 見当識 | serial 7 | 単語遅延 | 得点 | 時間(秒) | 動物 | 語頭音 | |
| AD | 22.7±1.1 | 8.1±1.4 | 2.1±1.5 | 1.1±0.7 | 22.3±1.6 | 589.0±319.3 | 8.6±3.2 | 7.1±2.5 | |
| PSP | 23.2±1.2 | 8.0±1.8 | 1.6±0.8 | 2.1±1.0 | 21.2±1.7 | 776.7±578.4 | 5.0±0.8 | 4.6±2.7 | |
| FTD | 22.3±1.1 | 8.0±2.3 | 1.7±1.4 | 1.9±0.9 | 22.0±1.6 | 56237±231.0 | 7.6±3.2 | 4.0±2.1 | |
| DLB | 20.7±1.2 | 6.8±1.6 | 1.5±1.1 | 1.2±1.1 | 19.0±1.7 | 772.3±399.8 | 10.0±3.2 | 3.9±1.8 | |

MMSE では、認知症を伴わない紀伊 ALS 2 例では得点が 29.5 ± 2.6 であったのに対して、認知症を伴う紀伊 ALS(紀伊 ALS-D)では 22.5 ± 2.6、紀伊 PDC では 16.5 ± 1.2 点と低下を認めた。AD、PSP、FTD、DLB と比較し、特に紀伊 PDC は低得点の傾向があった。MMSE の項目別に検討したところ、紀伊 PDC では見当識障害の項目で特に低得点であった。三単語遅延再生は、紀伊 ALS-D、紀伊 PDC、AD、DLB で低下し、特に紀伊 ALS-D、紀伊 PDC では FTD、PSP と有意差をもって低下していた。

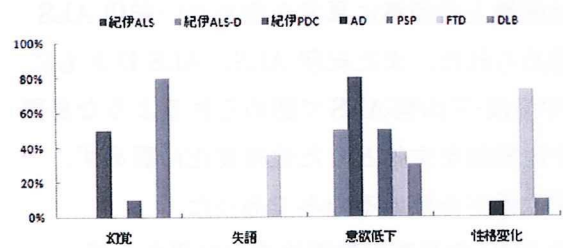
RCPM の得点に関しては、紀伊 ALS (平均 26.5 ± 3.9)、紀伊 ALS-D (20.0 ± 3.9)、紀伊 PDC (17.7 ± 1.7)であり、AD、PSP、FTD、DLB の各疾患と比較し有意差を認めなかった。施行時間は、紀伊 ALS が平均 510.5 ± 3.5 秒、紀伊 ALS-D 470.0 ± 50.9、紀伊 PDC 1032.7 ± 678.8 であり、AD、

PSP、FTD、DLB と比較して、紀伊 PDC、PSP、DLB で延長を認めた。特に紀伊 PDC では最も施行時間を要する傾向があった。

語想起に関しては、動物名においては各疾患群で有意差を認めなかった。語頭音では紀伊 PDC では AD と比較し低下していた。また紀伊 ALS では認知症がないにも関わらず、他疾患と差は認めず低下を示した。

臨床症状の比較表を Figure 1 に示す。

Figure 1 : 臨床症状の比較



各項目別に検討すると、幻覚を紀伊 PDC および DLB で高率に認めた。失語は FTD で認める症例はあるが、紀伊 ALS/PDC では認めなかった。意欲低下は紀伊 ALS、AD を除くすべての群で認め、特に紀伊 PDC では高率であった。性格変化(易興奮性)は FTD では高率に認めたのに比し、紀伊 ALS/PDC では認めなかった。

画像検査の結果を Table 3 にまとめる。

Table 3: 紀伊 ALS/PDC における画像検査の結果 (F: 前頭葉、T: 側頭葉、P: 頭頂葉、O: 後頭葉)

| No. | 年齢 | 性別 | 診断 | MRI 脳萎縮 | SPECT 集積低下 |
|-----|----|----|-------------|---------|------------|
| 1 | 67 | M | Kii-ALS | なし | なし |
| 2 | 78 | F | Kii-ALS | なし | 0 |
| 3 | 64 | M | Kii-ALS-D | F, T | F, T |
| 4 | 69 | F | Kii-ALS-D | T | T, P |
| 5 | 68 | M | Kii-PDC | T | T, P |
| 6 | 64 | F | Kii-PDC/ALS | F, T | F, T, P |
| 7 | 66 | F | Kii-PDC | 脳室拡大 | T, P |
| 8 | 75 | F | Kii-PDC | T | F, T |
| 9 | 76 | F | Kii-PDC | F, T | F, T |
| 10 | 72 | M | Kii-PDC | F, T | F, T |
| 11 | 73 | M | Kii-PDC | F, T | F, T, P |
| 12 | 76 | M | Kii-PDC/ALS | F, T | F, T |
| 13 | 64 | M | Kii-PDC | F, T, P | F, T, P |
| 14 | 69 | F | Kii-PDC | P | F, P |

紀伊 ALS では明らかな異常はなかったが、認知症を伴う紀伊 ALS-D と PDC では前頭葉と側頭葉

を中心に萎縮や SPECT の集積低下を認めた。

D. 考察

紀伊 ALS では認知症を伴う症例(紀伊 ALS-D)と伴わない症例(紀伊 ALS)が存在した。紀伊 ALS-D では、MMSE の低下を認め、特に三単語遅延再生で低下を認めた。紀伊 ALS、紀伊 ALS-D ともに見当識障害は認めなかった。RCPM は得点、施行時間とも明らかな異常はなかった。語想起に関しては、紀伊 ALS、紀伊 ALS-D の両者で低下傾向にあり、前頭葉機能の低下が疑われた。この所見は画像上前頭葉に異常を認めない紀伊 ALS にも認められた。また紀伊 ALS、ALS-D ともに FTD や湯浅・三山型 ALS で認められるような易興奮性や脱抑制を主体とした性格変化は認めず、一部で意欲低下を認めるのみであった。

紀伊 PDC の高次脳機能検査の結果からは、MMSE で低得点であり、特に見当識と三単語遅延再生の項目での不正解が目立った。また RCPM では施行時間の延長を認める例が多く、PSP や DLB と同様の傾向を示し、これらの中で最も時間を要した。また語想起も低下傾向を示した。多くの症例で意欲低下を認めた。失語や攻撃性を示すような性格変化は認めなかった。

紀伊 ALS、ALS-D、PDC の共通点としては MMSE における三単語遅延再生の低下と語想起の低下傾向があげられる。また相違点としては、紀伊 PDC では見当識障害を顕著に認めるのに比し、紀伊 ALS、紀伊 ALS-D では認めなかった。また RCPM の施行時間に関しても、紀伊 PDC で延長を認めるのに比し、紀伊 ALS、紀伊 ALS-D では認めなかった。これらの違いは、紀伊 ALS、紀伊 ALS-D と紀伊 PDC の病変部位の広がりや程度の違いなどが原因として考えられる。

一般に AD は記銘力障害が症状の中心であり、SPECT では頭頂側頭葉の集積低下を特徴とする。また FTD は病識の欠如や易興奮性、攻撃性、脱抑制といった性格変化や失語などの言語症状を示し、画像検査では前頭葉と側頭葉の萎縮と同部

位での脳血流低下を特徴とする。PSP はパーキンソニズムに加えて、思考の緩慢や人格変化を特徴とし、SPECT での前頭葉集積低下を認める。DLB は皮質、皮質下性認知症を特徴とし、SPECT では後頭葉の集積低下を認める。紀伊 PDC では前頭葉と側頭葉の萎縮や SPECT での集積低下を認め、AD とは異なる。画像所見上は FTD と類似するが、臨床症候および高次脳機能検査では大きく異なり、意欲低下と見当識障害、思考時間の延長を特徴とする前頭葉 - 皮質下性認知症を呈した。

紀伊 ALS、紀伊 ALS-D と紀伊 PDC に関しては類似点と相違点があり、今後の症例の蓄積が必要と考えられた。

E. 結論

紀伊 ALS の一部に MMSE と語想起で低得点を認める例が存在した。紀伊 PDC では見当識障害と思考時間の延長を認め、意欲低下が目立ち、前頭葉機能障害を主体とした皮質下性認知症を呈した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 Kokubo Y, et al. 20th International Symposium on ALS/MND. Berlin, Germany, 8-10 December.

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

紀伊半島の ALS/パーキンソン認知症複合における TRPM7 遺伝子変異 に関する検討

研究分担者 小久保康昌¹⁾

研究協力者 原 賢寿²⁾, 石浦浩之³⁾, 福田陽子³⁾, 宮下哲典⁴⁾, 桑野良三⁴⁾,
佐々木良元¹⁾, 後藤 順³⁾, 西澤正豊²⁾, 葛原茂樹⁵⁾, 辻 省次³⁾

1) 三重大学神経内科, 2) 新潟大学神経内科, 3) 東京大学神経内科,
4) 新潟大学脳研究所, 5) 国立精神・神経センター病院

研究要旨

近年、グアム島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (ALS/PDC) 患者の一部で *TRPM7* の T1482I 多型が報告された。紀伊 ALS/PDC 患者における *TRPM7* 遺伝子変異について検討した。1) 紀伊 ALS/PDC 大家系において染色体 15q21.1 の *TRPM7* locus に対する連鎖解析をおこなったが、連鎖は認めなかった。2) 発症者 25 名、健常者 27 名における *TRPM7* T1482I 多型頻度を検討したが、有意差を認めなかった。3) 発症者 1 名の *TRPM7* 領域の全 coding region の re-sequence を行った。*TRPM7* 領域の Introns に IVS3-26G>C [rs2063011] と IVS22-41T>A [rs675011] の二つの homozygous SNPs が見つかったが、これらは HapMap samples の大部分の症例で認められることから紀伊 ALS/PDC の原因に関連しているとは言えなかった。紀伊 ALS/PDC において、*TRPM7* 遺伝子の関与は否定的であった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-dementia complex :ALS/PDC) では、慢性的な Ca²⁺や Mg²⁺ 摂取不足が発症に関与しているとする説がある。*TRPM7* 蛋白は、細胞内の Ca²⁺, Mg²⁺, 微量金属の調節に関与している。近年、グアム島の ALS/PDC 患者の一部で、*TRPM7* 遺伝子の T1482I 多型が報告された。この多型があると、慢性的な Ca²⁺, Mg²⁺ 摂取不足によって、細胞内 Ca²⁺, Mg²⁺ のホメオスタシスが障害される可能性がある。本研究では、紀伊 ALS/PDC 患者における *TRPM7* 遺伝子変異について検討する。

B. 研究方法

1) 紀伊 ALS/PDC 大家系における染色体 15q21.1

の *TRPM7* locus に対する連鎖解析

A 家系の 23 人（うち 8 人が発症者）の白血球から Genomic DNA を抽出した。第 15 番染色体上の *TRPM7* を挟む 2 個のマイクロサテライトマーカーを用いて、parametric pair-wise linkage analyses および parametric/nonparametric multipoint linkage analyses を施行し、Superlink program を用いて解析した。Autosomal dominant (AD) および autosomal recessive (AR) models において、*TRPM7* locus の 1.6Mb upstream と 2.6Mb downstream にある D15S978 および D15S1016 で、pair-wise lod scores が得られた。疾患頻度は 0.01、浸透率は 0.9/1 と設定した。

2) 発症者および健常対照者における *TRPM7* 多型頻度の検討

発症者 25 名 (A 家系 9 人、他の家系の発症者 16 名)、健常対照者 27 名、合計 52 名において、*TRPM7* T1482I 多型頻度を検討した。Exon 28 の sequence analysis には、forward primer, 5'-TGGTGTCCAGGTAGAATAAAG-3'、reverse primer, 5'-TTCCTGCTCATGTGTTTAC-3'を用いた。

3) 発症者 1 名の *TRPM7* 領域の全 coding region の re-sequence

PDC 患者 1 名の *TRPM7* の coding regions を PCR で増幅した。PCR 産物を ExoSAP-IT (USB) で精製し、BigDye terminator Cycle Sequencing kit v3.1 と ABI3100 sequencer (Applied Biosystems) を用いて direct nucleotide sequence analysis を施行した。Sequence data は、Variant Reporter™ Software v1.0 (Applied Biosystems) を用いて解析をおこなった。

本研究は、三重大学および東京大学の倫理委員会の承認に基づき行った。

C. 研究結果

1) *TRPM7* を挟む 2 個のマイクロサテライトマーカー (D15S978, D15S1016) との連鎖を認めなかった。(Result 1)

Result 1

Pair-wise lod scores at D15S978 and D15S1016

| Mode of inheritance | AD model | | AR model | |
|---------------------|----------|------|----------|------|
| | 0.5 | 1 | 0.5 | 1 |
| D15S978 | 0.84 | -inf | 0.81 | -inf |
| D15S1016 | 0.92 | -inf | -1.05 | -inf |

2) 発症者、健常者、HapMap-JPT 間で *TRPM7* T1482I 多型の頻度に有意差を認めなかった。(Result 2)

Result 2

Comparison of allele frequencies of T1482I in patients with those in controls

| Genotype | Affected in A family | Affected in other families | Control in the region | HapMap-JPT |
|----------|----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| | # of alleles (Freq.) | # of alleles (Freq.) | # of alleles (Freq.) | # of alleles (Freq.) |
| T | 0 (0.0%) | 1 (2.0%) | 0 (0.0%) | 2 (4.0%) |
| CT | 2 (8.0%) | 4 (8.0%) | 11 (16.7%) | 13 (26.0%) |
| CC | 7 (27.8%) | 11 (22.0%) | 50 (73.3%) | 77 (78.0%) |
| Allele | # of alleles (Freq.) | # of alleles (Freq.) | # of alleles (Freq.) | # of alleles (Freq.) |
| T | 2 (11.1%) | 6 (11.8%) | 11 (22.4%) | 25 (22.2%) |
| C | 16 (88.9%) | 46 (88.2%) | 49 (77.6%) | 72 (77.8%) |
| p value | 0.39 (0.52)* | 0.86 (0.64)** | | |

*: p values of χ^2 tests obtained by comparison of allele frequencies of T1482I between affected individuals and the regional controls are shown.
 **: p values of χ^2 tests obtained by comparison of allele frequencies of T1482I between affected individuals and HapMap-JPT samples are shown in parentheses. There was no significant difference in the allele frequencies of T1482I between the regional controls and HapMap-JPT samples ($p = 0.79$).

3) *TRPM7* 領域の Introns に IVS3-26G>C [rs2063011] と IVS22-41T>A [rs675011] の二つの homozygous SNPs が見つかったが、これらは HapMap samples の大部分の症例で認められることから、紀伊 ALS/PDC の原因に関連しているとは言えなかった。

D. 考察

今回の検討から、紀伊 ALS/PDC では、① *TRPM7* locus に連鎖しなかった。② 発症者 25 名、三重県コントロール 27 名、HapMap-JPT において、T1482I variant の頻度に有意差を認めなかった。③ 発症者の *TRPM7* 全コーディング領域のリシーケンスで、原因となる変異を認めなかった。以上から、紀伊 ALS/PDC において、*TRPM7* 遺伝子の関与は、否定的と考えられた。以前、我々は、紀伊 ALS/PDC において、ALS/FTLD 関連遺伝子 (*SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *ALS2/alsin*, *SMN1*, *PGRN*, *ANG*, *VEGF*, *VCP*, *VAPB*, *DCTN1*, *CHMP2B*, and *TARDBP/TDP-43*), tauopathy 関連遺伝子 (tau, *GSK3 β*), and parkinsonism 関連遺伝子 (α -synuclein, *LRRK2*, *parkin*, *DJ-1*, *PINK1*, and *ATP13A2*) について検討したところ、全ての候補遺伝子で変異を認めなかったことを報告した。(Sasaki et al., Tomiyama et al.) 今年になって、グアムの ALS/PDC において、新たに 12 番染色体の 2 ヶ所と 17 番染色体のタウ遺伝子との連鎖が報告された。

ALS/PDC の発症には、複数の疾患感受性遺伝子が関与している可能性が高い。また、紀伊とグア

ムでは原因遺伝子が異なる可能性がある。さらなるゲノムワイドの連鎖解析や候補遺伝子解析による疾患感受性遺伝子検索が必要である。

E. 結論

紀伊 ALS/PDC において、*TRPM7* 遺伝子の関与は否定的であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kenju Hara, Yasumasa Kokubo, Hiroyuki Ishiura, Yuko Fukuda, Akinori Miyashita, Ryozo Kuwano, Ryogen Sasaki, Jun Goto, Masatoyo Nishizawa, Shigeki Kuzuhara, and Shoji Tsuji. *TRPM7* is not associated with amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan. *Am J Med Genet Part B*. 2009, in press.

2. 学会発表

Y, Kokubo, S. Kuzuhara. FDG-PET study in amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan. 20th International Symposium on ALS/MND. Berlin, Germany, 8-10 December.

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

それぞれ異なる angiogenin 遺伝子 (ANG) 変異を認めた孤発性 ALS2 症例

研究分担者 中野今治¹⁾

研究協力者 秋本千鶴¹⁾，森田光哉¹⁾，坂下英司²⁾，遠藤仁司²⁾

1) 自治医科大学 内科学講座神経内科部門 2) 自治医科大学 生化学講座機能生化学部門

研究要旨

Angiogenin (ANG) は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子の1つである。今回孤発性 ALS 患者において ANG 遺伝子解析を行ない、184 症例中 2 症例でそれぞれ異なる変異を認めた。コドン 105 の Val が Ala に変異 (386 T>C) した新しい点変異であり、他はシグナル配列部位コドン-4 の Pro が Gln への変異 (62 C>A) であった。シグナル配列部位変異の病態解明のため後者の変異蛋白を HeLa 細胞に過剰発現させた。変異型も野生型と同様 cleavage された蛋白質が合成されたが、初期分泌量が少なく、細胞内局在に違いを認め、シグナル配列部位の変異も疾患発症に何らかの関わりをもつ可能性が示された。

A 研究目的

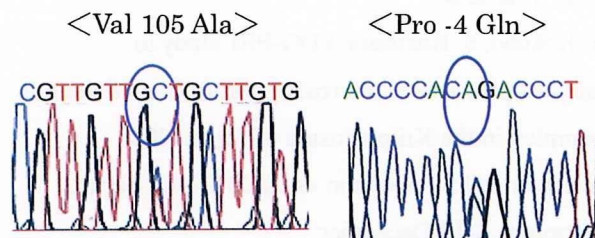
現在、成人発症 ALS の原因遺伝子として *SOD1* や *TDP-43*, *ANG*, *FUS/TLS*, *VAPB*, *FIG4* などが報告されている。今回我々は孤発性 ALS (SALS) 患者において ANG 遺伝子解析を行い、その臨床像および病態について解析を行なった。

あったが、構音・嚥下障害は認められなかった。全経過 7 年の下位運動神経候主体の緩徐進行型であった。Pro -4 Gln 変異症例は、67 歳時に嚥下障害で発症した男性例で 1 年後には夜間のみの人工呼吸器装着となり、3 年後には終日人工呼吸器装着、歩行不能となった急速進行型であった。

B 研究方法

明らかな家族歴を認めず、El Escorial modified criteria にて suspected ~ definite ALS に分類され、検査の同意が得られた 184 症例を対象とした。この中には *SOD1* 変異をもつ 3 症例が含まれていた。

まず high resolution melting (HRM) 解析を用いて ANG 変異をスクリーニングし、異常を認めた症例においてシーケンスで変異を確認した。



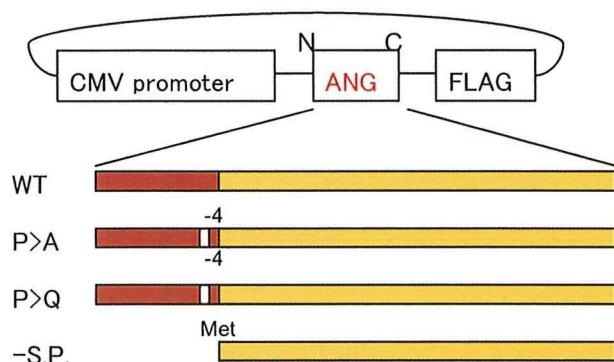
(図 1) ANG 変異 2 症例のシーケンス結果

C 研究結果

2 症例でそれぞれ異なった ANG 変異 (Val105Ala(386T>C), Pro-4Gln (62C>A)) を認めた(図 1)。いずれも *SOD1* 変異を認めない症例であった。Val 105 Ala は新しい変異であり、Pro -4 Gln はシグナル配列部位の変異であり同部位が Ser に変異した症例が既に報告されている。Val 105 Ala 変異症例は、65 歳時に易疲労感で発症した女性例で 69 歳時にはつかまり立ちのみ可能な状態で

Pro -4 Gln 変異は疾患との関わりが不明確であった為、今回培養細胞を用いた実験を行った。CMV promoter の後に angiogenin 遺伝子、その C 末端側に FLAG tag を組み込んだプラスミドベクターを作成した。Angiogenin 遺伝子として野生型 (WT) とコドン-4 を単純なアミノ酸構造である Ala に変異させた型 (P>A)、今回見つかった変異型 (P>Q)、シグナル配列を除き開始コドンである Met を付けた型 (-S.P.) の 4 種類を作成した (図 2)。これらのプラスミドベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、合成された angiogenin 蛋白質をウェスタンブロッティングで、また細胞内局在を免疫細胞化

学染色で確認した。

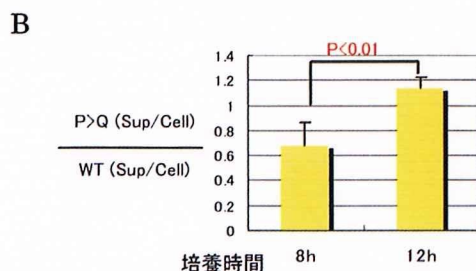
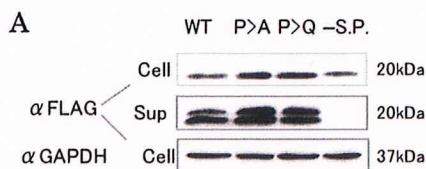


(図 2) プラスミドベクターの模式図。

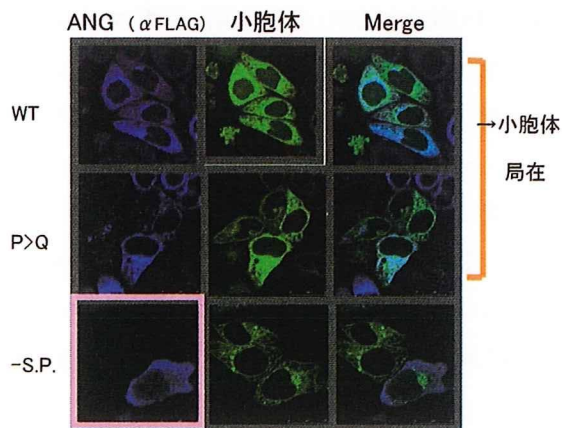
赤はシグナル配列部分, 黄色は成熟蛋白配列部分。

細胞成分 (cell) のウェスタンブロッティングでは WT, P>A, P>Q, -S.P.いずれもシグナル配列部分で cleavage された同じサイズのバンドを認めた。上清成分 (sup) のウェスタンブロッティングでは, WT および P>A, P>Q で同じ cleavage されたサイズのバンドを認めたが, -S.P. では分泌を認めなかった (図 3 A)。これらから変異型においても野生型と同様に cleavage された成熟蛋白質が合成, 分泌される事が確認された。また, 培養時間 8 時間と 12 時間における angiogenin の分泌量 (sup) / 合成量 (cell) を WT と P>Q において測定したところ, 培養時間 8 時間において 12 時間に比べて P>Q で分泌が有意に少ない事が確認された(図 3 B)。

細胞内局在を確認した免疫細胞化学染色では WT, P>Q 共に小胞体への局在を認めたが, -S.P.では細胞質全体に発現を認めた (図 4)。



(図 3) A. ウェスタンブロッティング結果。Cell は細胞成分, sup は上清成分。 B. 培養時間ごとの分泌量測定結果。



(図 4) HeLa 細胞における angiogenin の細胞内局在。

WT と P>Q では小胞体への局在を認めるが, -S.P.では細胞質全体に発現している (ピンク枠)。

D 考察

ALS の原因は未だ不明であるが, 遺伝性を示すものがあること, その原因遺伝子として明らかとなった *SOD1* はじめ, DNA/RNA binding protein である *TDP-43* と *FUS/TLS* の遺伝子異常が孤発症例でも報告されていることから, 孤発性 ALS の一部は遺伝子異常を有している可能性が考えられる。

我々は SALS における *SOD1* 変異の解析に引き続き, 今回 *ANG* 変異のスクリーニングを施行したが, 184 症例中 2 症例において *ANG* 変異を有する症例をみいだした。

症例はともに 60 歳台発症であり, 初発症状やその後の経過は異なっていたが, その特徴を考察するためには更なる症例の蓄積を必要とする。

ANG 変異はヨーロッパの国々を中心に幾つかの報告があるが, 変異と疾患の関係についてはまだ不明な点が多い。最近の研究では変異 angiogenin 正常機能を示さない loss of function が原因とされる説が多く, 事実剖検による神経組織への angiogenin の異常蓄積は報告されていない。既報の多くの変異は, angiogenin の成熟蛋白配列部分に見つかっているが, シグナル配列部分の変異であるコドン-4 変異は今までに報告があるものの病態との関係は解明されていない。

そこで我々はシグナル配列部分に変異を認めた Pro-4 Gln 変異を HeLa 細胞に過剰発現させる実験を行った。その結果, 変異型でも正常に cleavage された成熟

蛋白が分泌されるが、分泌初期の段階で分泌不全がある可能性が確認された。最近の研究で示された hypoxic な状態における angiogenin の神経保護作用説を元に ALS と angiogenin の関係を考察すると、hypoxic な状態で通常 angiogenin の分泌は増加し神経保護作用を示すが、変異型においてはその分泌増加が野生型に比べて少ない為に虚血による細胞障害を十分に阻止できず、結果的に ALS 発症に関与することが推定された。

E 結論

SALS 患者における *SOD1* 変異検索に引き続き、今回は *ANG* 変異検索を行い 184 症例中 2 症例に遺伝子変異を認めた。

シグナル配列部分に変異を有する Pro -4 Gln 変異では、蛋白の分泌不全が細胞障害に関与している可能性が示された。

今後さらに他の遺伝子においても解析を進め、ALS 発症における遺伝子変異の関与を検討する予定である。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. 学会発表

第 51 回 日本神経学会総会にて発表予定

H 知的所有権の取得状況

特になし。

若年発症・急速進行・好塩基性封入体を特徴とし FUS 遺伝子に変異を伴う

日本人家族性筋萎縮性側索硬化症の 5 家系

研究分担者 青木正志¹⁾

研究協力者 鈴木直輝¹⁾, 割田 仁¹⁾, 加藤昌昭¹⁾, 水野秀紀¹⁾, 島倉奈緒子¹⁾, 秋山徹也¹⁾,
古谷博和³⁾, 銚之原敏博^{4),5)}, 岩城明子⁴⁾, 服巻保幸⁴⁾, 富樫慎二⁶⁾,
今野秀彦²⁾, 糸山泰人¹⁾

- 1) 東北大学神経内科, 2) 国立西多賀病院神経内科, 3) 国立大牟田病院神経内科,
4) 九州大学生体防御医学研究所 遺伝情報実験センター ゲノム機能学分野,
5) 九州大学医学研究院脳神経研究施設神経内科, 6) 甲府市民病院神経内科

研究要旨

〔目的〕筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位および下位運動ニューロンを侵す神経変性疾患であり、一部は superoxide dismutase 1 (SOD1) などの遺伝子変異による家族性 ALS であることが知られている。最近 Fused in sarcoma/translated in liposarcoma 遺伝子(*FUS/TLS*, 以下 *FUS*)の変異がアフリカ、ヨーロッパ、アメリカの各人種において家族性 ALS の原因として報告された。日本人における *FUS* 異常に伴う家族性 ALS の検討を行う。〔方法〕自験の大家系について各症例の臨床像を検査・画像所見を含めて詳細に調査し臨床経過を検討した。本家系での貴重な剖検例について形態学的・免疫組織化学的に検討した。〔結果および考察〕当科で収集した家族性 ALS 79 家系について遺伝子解析を行ったところ 14 家系に SOD1 異常、5 家系に *FUS* 異常(S513P, K510E, R521C, R514S, H517P) を認めた。5 世代にわたって臨床像の詳細を知ることができた *FUS* の R521C 変異に伴う大家系では 46 人のうち半分にあたる 23 人が家族性 ALS を発症しており浸透率は 100%と非常に高いと考えられた。35.3 歳で筋力低下を発症し、構音障害、嚥下障害、筋痙縮や筋萎縮を呈する。平均死亡年齢は 37.2 歳であり病期の進行も急速であった。典型例の剖検所見では運動ニューロンの変性のみならず脳幹被蓋部の著明な萎縮を認めた。さらに脳幹部の神経細胞内に好塩基性の封入体を認め、ユビキチン陽性、TDP-43 陰性であった。〔結論〕R521C 変異は世界で共通する重要な変異であることがわかった。運動ニューロン系以外にも広範な神経変性所見が見られること、神経細胞内の好塩基性封入体の存在は病態解析上、重要と考えられた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位および下位運動ニューロンを侵す神経変性疾患であり、10%前後が superoxide dismutase 1 (SOD1) など 10 以上の遺伝子変異による家族性 ALS であることが知られている。ALS の病態研究はこの SOD1 変異 ALS モデル動物を用いて大きく進んできたが、2006 年以降 TDP43 が孤発性および家族性 ALS の原因遺伝子として同定され、ALS 研究は新たな局面を迎えている。

最近 Fused in sarcoma/translated in liposarcoma 遺伝子(*FUS/TLS*, 以下 *FUS*)の変異がアフリカ、ヨーロッパ、アメリカの各人種において家族性 ALS の原因として報告された。*FUS* は TDP43 と同様 DNA/RNA 代謝に関与する蛋白であり、病態解明の点でブレークスルーになるものと期待されている。本研究では日本人における *FUS* 異常に伴う家族性 ALS の検討を行った。

B.研究方法

東北大学では 1991 年以来、79 の家族性 ALS が疑われる家系の遺伝子解析を行っている。この中で SOD1 変異が見つかった 14 家系を除き、常染色体優性遺伝の遺伝形式を持つ 54 家系について *FUS* の全エキソンのスクリーニングを行った。自験の大家系について各症例の臨床像を検査・画像所見を含めて詳細に調査し臨床経過を検討した。本家系での貴重な剖検例について形態学的・免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

個人を同定できない形で発表し、個人情報には鍵のかかる戸棚に保管、DNA は連結可能匿名化で保存している。東北大学倫理委員会の承認を受けている。

C.研究結果

遺伝子解析を行ったところ 14 家系に SOD1 異常、5 家系に *FUS* 異常(S513P, K510E, R521C, R514S, H517P) を認めた。5 世代にわたって臨床像の詳細を知ることができた *FUS* 遺伝子の R521C 変異に伴う大家系 (図 1) では 46 人のうち半分にあたる 23 人が ALS を発症しており浸透率は 100% と非常に高く見積られる。35.3 歳で筋力低下を発症し、構音障害、嚥下障害、筋痙縮や筋萎縮を呈する。平均死亡年齢は 37.2 歳であり人工呼吸器を必要とするまで平均 23 ヶ月と若年発症・急速進行性の経過を取ることがわかった。

index case: 症例は死亡時 40 歳の男性。31 歳の若さで右上肢遠位の筋力低下から発症。筋力低下・筋萎縮は半年で右肩まで広がり、球麻痺症状も出現。電気生理学的検査などから ALS の診断となった。その後、徐々に球麻痺症状が増悪し誤嚥性肺炎も併発し呼吸機能が悪化、発症から 1 年 4 カ月で人工呼吸器管理となった。肺炎で亡くなるまで、全経過は 9 年 2 か月。上位運動ニューロン障害の所見は目立たず。*FUS* のシークエンスにより exon15 に R521C のアミノ酸置換変異が見出された。精神症状・認知症などの合併は無かった。

index case の剖検所見: 剖検時 40 歳、全経過は 9 年 2 か月。脳重量は 1170g で、肉眼所見では脊髄・錐体路の萎縮は対称性に高度に見られた。中脳被蓋の萎縮も顕著であった。組織学的には、通常の ALS の所見に加え、中脳被蓋の萎縮、黒質、青斑核、視床下核、淡蒼球(特に内節)にも広範に変性脱落の所見が見られた。脊髄でも運動ニューロンの著明な減少に加え、後索は淡明化し、中でも middle root zone の脱落が高度であった。多系統にわたる神経変性が特徴であると考えられた。さらに脳幹部の神経細胞内に好塩基性の封入体を認め、ユビキチン陽性、TDP-43 陰性であった。*FUS* の染色性は細胞質により強く認められた (図 2)。

図 1

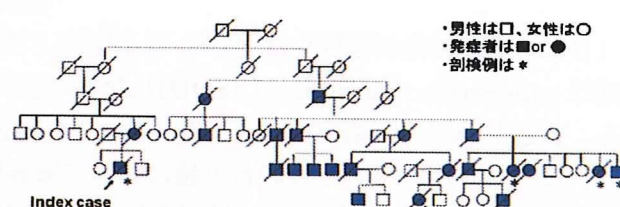
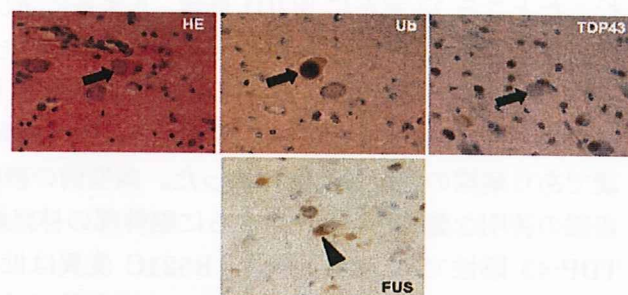


図 2



D.考察

FUS 変異を伴う ALS の発症様式は、球麻痺から来るもの四肢から来るものなど様々だが、共通して 30 から 40 代と若年発症であるという点が挙げられる。また、人工呼吸器が必要となるまでの **disease duration** は 2 年弱と病気の進行が非常に早いことも特徴である。変異部位は *FUS* の C 末端部分に集中しており、R521C は全世界で共通してみられる重要な変異である。また No.68 の家系に関しては 50 代後半の発症と遅く *FUS* 変異を持つ家族性 ALS の表

現型には幅がある。さらに下位運動ニューロン障害が主体である点も臨床上の重要な特徴である。

中脳被蓋で見られた basophilic inclusion は TDP43 陰性であり basophilic inclusion body disease (BIBD) という病理学的疾患概念に含めることができる。過去に報告された BIBD の剖検脳で高頻度に FUS 陽性の細胞質封入体が見られたという論文 (Munoz et al.) があり臨床診断は FTD with behavioral disturbance などとなっているが、7 例中 6 例は最終的に motor neuron disease の所見を呈していたとされる。本家系 1-10 の剖検所見は脳幹部の basophilic inclusion body の存在が特徴であるとして既に 2001 年に土屋先生がはじめての家族性 BIBD として報告している¹⁾。免疫組織化学ではユビキチン・タウ・ニューロフィラメントも陰性であったと記載しており、厳密な意味からも BIBD の範疇に含まれる家系であり、初めての FUS 遺伝子変異を伴った BIBD 症例であった。FUS 関連疾患と TDP43 関連疾患との関係性の解明も今後の重要な課題である。

FUS は中央部分に RRM: RNA recognition motif や NES: nuclear localization signal を持ち、DNA/RNA 代謝という FUS の機能上重要な部位と考えられるが、これまでの所 RNA 結合領域には家族性 ALS 症例での変異は確認されておらず、C 末端の高度に保存された領域に変異は集中しており、一部が glycine-rich region などに存在するという形になっている。C 末端の変化では FUS の RNA 結合能には影響が無いことも示されている。構造上 FUS と類似しているとされる TDP43 も変異部位は C 末端に集中しており、これらの hotspot の存在からは核内蛋白の分解能の低下が封入体形成に関わり motor neuron death を引き起こすという病態仮説が考えられる。

E. 結論

FUS 異常を伴う家族性 ALS では若年発症・急速進行性の経過が特徴で下位運動ニューロン障害が前景に立つ。病理では好塩基性封入体・多系統神経変性

が特徴であり、病理所見で BIBD とされていたものの中に FUS 遺伝子異常を持つ症例が含まれる可能性がある。RNA 代謝異常や蛋白分解異常の視点からの病態解明が課題である。

参考文献

1) Tsuchiya K, Matsunaga T, Aoki M, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column degeneration and basophilic inclusion bodies: a clinical, genetic and pathological study. Clin Neuropathol 20;53-59, 2001

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sasaki S, Aoki M, Nagai M, Kobayashi M, Itoyama Y. Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. J Neuropathol Exp Neurol. 68:365-73, 2009

2. 学会発表

鈴木直輝、青木正志ら：若年発症・急速進行・好塩基性封入体の特徴とし FUS/TLS に変異を持つ日本人家族性筋萎縮性側索硬化症の 3 家系。第 54 回日本人類遺伝学会（2009 年 9 月 24 日 於：東京）

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

運動ニューロン疾患の抗 FUS 抗体を用いた検討

研究分担者 岡本幸市¹⁾

研究協力者 藤田行雄¹⁾，高玉真光²⁾，相澤仁志³⁾，美原 盤⁴⁾，渡辺光法^{1),5)}

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，3) 旭川医科大学第一内科，
4) 脳血管研究所美原記念病院，5) 弘前大学大学院脳神経内科学

研究要旨

家族性 ALS type 6 の原因遺伝子として *fused in sarcoma (FUS)* が同定された。我々は、孤発性 ALS，好塩基性封入体 (BIs) を有する運動ニューロン疾患 (MND)，家族性 ALS 例について抗 FUS 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。孤発性 ALS：抗リン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体は抗 FUS 抗体で染色されなかった。MND with BIs：脊髄前角細胞の脱落，前角細胞内に多数の円形および不規則な形態の BIs を認めた。全ての BIs は抗 FUS 抗体で明瞭に染色された。一部の BIs を有する神経細胞の核の抗 FUS 抗体の染色性は保たれていた。また，グリア細胞内および神経細胞の核内にも少数の FUS 陽性の封入体が認められた。家族性 ALS：FUS 遺伝子変異を有する例で神経細胞内およびグリア細胞に FUS 陽性の構造物が認められた。以上のことから BIs の形成機序に核 RNA 代謝の異常が示唆される。一方，BIs を有する細胞の核の染色性は保たれている細胞もあり，FUS の封入体形成への関与には TDP-43 とは異なる機序が存在することが示唆された。さらに家族性 ALS の一部に FUS の関与する例が存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) type 6 の原因遺伝子として *fused in sarcoma (FUS)* が同定された(1, 2)。FUS は TDP-43 と同様に DNA/RNA binding protein であることから，運動ニューロン疾患 (MND) の神経細胞変性機序における核 RNA 代謝の異常が注目されている。FUS 遺伝子変異を有する家族性 ALS では神経細胞内に FUS 陽性の封入体が形成されることが報告されているが，今回孤発性 ALS，好塩基性封入体 (BIs) を有する MND(3)，家族性 ALS 例について抗 FUS 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。

B. 研究方法

20 例の孤発性 ALS，2 例の BIs を有する MND，3 例の家族性 ALS のホルマリン固定パラフィン包埋 5 μm 厚の脊髄切片を用いた。同切片に対して HE 染色に加え，2 つの抗 FUS 抗体 (Bethyl 1:250-1:1,000，

Sigma 1:500) および 当科で作製した抗リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) 抗体 (1:6,000) を用いて免疫組織染色を施行した。一部は 3 μm 厚のミラー切片を用いて同一神経細胞内の HE 染色と各抗体の免疫染色の結果とを対比した。

対 象

「孤発性 ALS：20 例」

臨床的・病理学的に確定診断。病理学的に全例で前角細胞内に Bunina 小体 (+)，skein-like/round inclusion (+) を有する。

「MND with BIs」

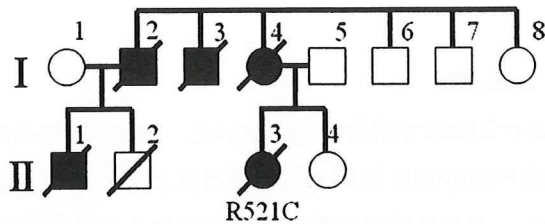
・Case 1：死亡時 24 歳女性。全経過 7 か月。
・Case 2：死亡時 75 歳女性。全経過 28 か月。
両例とも 2 次ニューロン徴候優位の神経症状を呈する。認知症なし，家族歴なし。
病理学的には前角神経細胞の脱落。錐体路の軽度の淡明化を認めた。Bunina 小体や skein-like/round

inclusion は認めない。運動神経細胞のみならず非運動ニューロンにも多数の BIs を認めた。

「家族性 ALS」

・ Case 1 (家系図 I-4) : 死亡時 34 歳, 女性, 左下肢の筋力低下で発症。全経過 15 ヶ月。家系内に *FUS* mutation (R521C) がみられた。

家系図



・ Case 2 : 死亡時 69 歳, 女性, 右下肢の筋力低下で発症。全経過 6 年。父: ALS, 妹: ALS. *SOD1*, *TDP-43*, *FUS* 遺伝子変異は未検査。

・ Case 3 : 死亡時 27 歳, 女性, 右上肢の筋力低下で発症。全経過 28 ヶ月。母: ALS, 姉: ALS. *SOD1* 遺伝子変異(-), *TDP-43*, *FUS* 遺伝子変異は未検査。

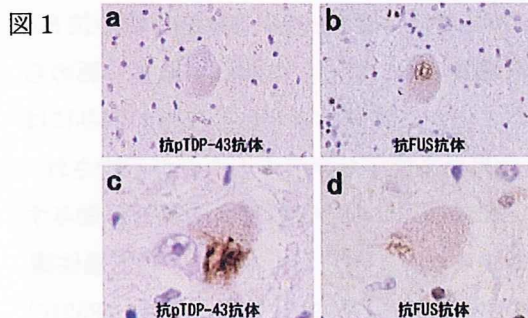
(倫理面への配慮)

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

孤発性 ALS 例

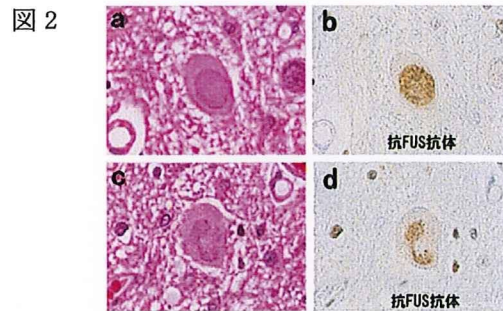
抗 *FUS* 抗体では切片によりその染色性にばらつきを認めたが, 神経細胞およびグリア細胞の核を染色した。抗 *pTDP-43* 抗体陽性の skein-like inclusion は抗 *FUS* 抗体で陰性であった (図 1)。



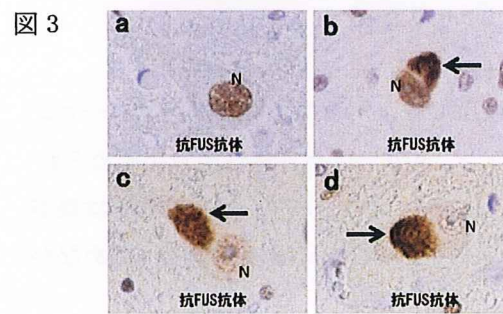
a, b と c, d はミラー切片

MND with BIs 例

Bunina 小体や skein-like/round inclusion は認められなかった。前角細胞には円形から不規則な形態を示す BIs が多数認められ (図 2a, c), 同封入体は抗 α -internexin 抗体, 抗 *pTDP-43* 抗体で陰性であったが, 抗 *FUS* 抗体で明瞭に染色された (図 2b, d)。また, BIs を有する神経細胞の核の抗 *FUS* 抗体に対する染色性は正常の染色性を示す細胞 (図 3a) と同程度に良く保たれているもの (図 3b) から染色性が低下しているものまで認められた (図 3c, d)。さらに封入体以外にも, 細胞質内に顆粒状の *FUS* 陽性構造物 (図 4a, 矢印) や中央部が淡染される封入体 (図 4b), さらに核内 (図 4c, 矢印) やグリア細胞内 (図 4d, 矢印) にも *FUS* 陽性構造物が認められた。



HE 染色 (a, c) 後に脱色し, 抗 *FUS* 抗体で染色 (b, d)



矢印; BIs, N; 核

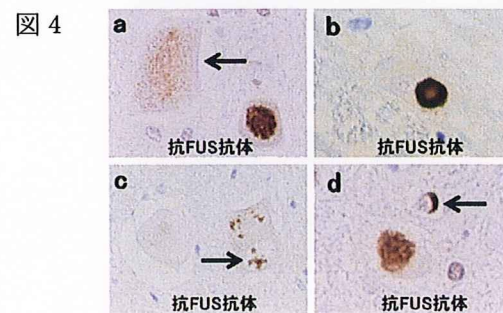
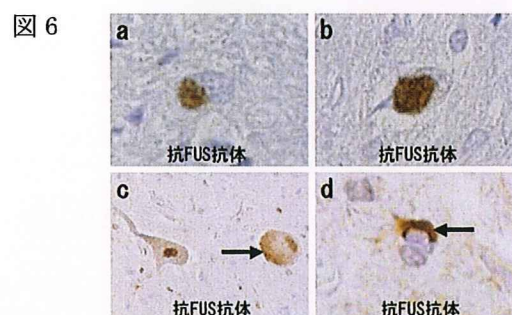
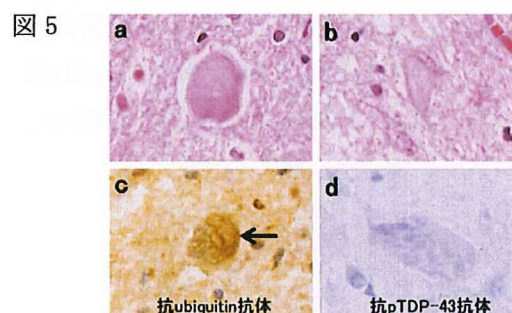


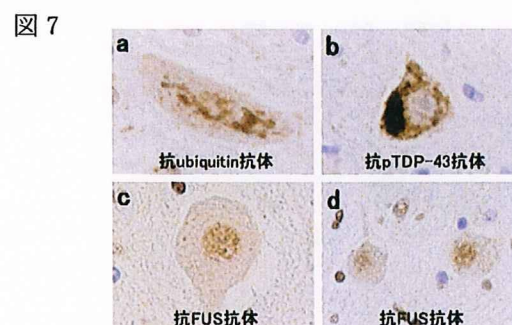
図 4

家族性 ALS 例

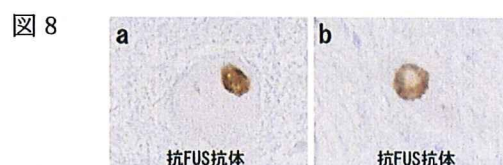
Case1 (家系内に FUS mutation, R521C) : HE 染色では細胞質内に BIs が認められた(図 5 a, b). Bunina 小体は認められなかったが, 細胞質内に抗ユビキチン抗体陽性の封入体を認めた(図 5c, 矢印). 抗 pTDP-43 抗体陽性構造物は認められなかった(図 5 d). 抗 FUS 抗体による染色では神経細胞内に陽性に染色される封入体を認めた(図 6 a, b). 一部の神経細胞では細胞質が顆粒状に染色され(図 6 c), グリア細胞にも FUS 陽性封入体が認められた(図 6 d).



Case2: 神経細胞の脱落が著明であり残存ニューロンにはユビキチン、pTDP-43 抗体陽性所見が認められた(図 7 a, b). BIs はみられず, FUS 抗体では核が染色されるのみで細胞質内に陽性構造物は認めなかった(図 7 c, d).



Case3 : BIs を前角細胞内に認め, 同封入体は抗 FUS 抗体で陽性であった(図 8 a, b).



「結果の小括」

Sporadic ALS :

FUS 抗体陽性の封入体は認めない.

skein-like/round inclusion は FUS 抗体で陰性であった.

MND with BIs :

BIs は FUS 抗体で明瞭に染色された. BIs を有する神経細胞の核の FUS 抗体の染色性は保たれるものも存在した. グリア細胞の核内と胞体内にも FUS 陽性所見が認められた.

Familial ALS :

Case 1 : (家系内に FUS mutation; R521C)

pTDP43 陽性封入体は認められなかった. 神経細胞およびグリア細胞に FUS 陽性構造物を認めた.

Case 2 : pTDP43 陽性の封入体を神経細胞, グリア細胞に認めたが, FUS 抗体陽性構造物は認めなかった.

Case 3: pTDP43 陽性封入体は認められなかった. 前角細胞内に多数の BIs を認め, 同封入体は抗 FUS 抗体に陽性であった.

D. 考 察

BIs は抗 FUS 抗体で陽性所見を示した. FUS は通常核内に存在し, TDP-43 と同じく DNA/RNA binding protein であることから, BIs の形成機序に核 RNA 代謝の関与が示唆された. 一方, TDP-43 陽性構造物を有する神経細胞の核の染色性は失われることが知られているのに対し, BIs を有する細胞で核の抗 FUS 抗体への染色性は保たれている細胞も数多く認められた. このことから FUS の BIs 形成への関与には TDP-43 とは異なる機序が存在することが示唆された. また, 家族性 ALS の一部に FUS の異常が関与する例が存在することが明らかとなった. FUS 陽性構造物を認めた Case1(家系内に FUS mutation (R521C) を有する例がみられる) と Case3 では前角細胞内に

BIs が認められており、MND with BIs と診断されている例と合わせて、FUS の異常と BIs との関連性が強く示唆された。今回の検討では、pTDP-43 の異常と FUS の異常が共存した例は認められず、両者は互いに独立して、神経細胞変性の原因となることが示唆された。現在、孤発性であり、MND with BIs と診断されている症例の FUS 遺伝子変異について検討をすすめている。

E. 結 論

BIs の形成への FUS の関与が強く示唆された。FUS の封入体形成への関与には TDP-43 とは異なる機序が存在すると考えられる。さらに家族性 ALS の一部に FUS の関与する例が存在することが明らかとなった。

文 献

- (1) Kwiatkowski TJ Jr et al. Science 2009; 323: 1205-8.
- (2) Vance C et al. Science 2009; 323: 1208-11.
- (3) Fujita Y et al. Acta Neuropathol 2002; 103: 243-7.

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 なし

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 運動ニューロンにおける TDP-43 病理と RNA 編集酵素 ADAR2 の活性低下との分子連関

研究分担者 郭 伸¹⁾

研究協力者 相澤仁志²⁾，日出山拓人¹⁾，山下雄也¹⁾

1) 東京大学神経内科，2) 旭川医科大学神経内科

研究要旨

RNA 編集酵素 ADAR2 の活性低下による AMPA 受容体サブユニット GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下、および TDP-43 陽性の細胞質封入体形成は孤発性 ALS 運動ニューロンに見られる疾患特異的分子変化である。本研究では、両者の分子連関の有無を免疫組織化学的に検討し、病因的意義を探ることを目的として、孤発性 ALS 患者脊髄運動ニューロンにおける ADAR2 活性の低下と TDP-43 陽性封入体の出現を同一運動ニューロンの検索により免疫組織化学的に検討した。その結果、封入体の出現しない正常例運動ニューロンでは全ての運動ニューロンに ADAR2 免疫活性が検出されたのに対し、ALS 例運動ニューロンでは半数以上の残存運動ニューロンで ADAR2 免疫活性を欠いており、これらの運動ニューロンの全てで TDP-43 陽性封入体が検出された。このことは、ADAR2 活性低下と TDP-43 陽性封入体の出現との間には密接な分子連関があり、運動ニューロン死を引き起こす分子メカニズムと関連することを示している。

A. 研究目的

RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の活性低下による AMPA 受容体サブユニット GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下は孤発性 ALS 運動ニューロンに生じている疾患特異的な分子変化である^{1,2}。他方、孤発性 ALS の運動ニューロンには TDP-43 陽性の細胞質封入体が形成されることも疾患特異性が高いことが病理学的に明らかにされている^{3,4}。ADAR2 のノックアウトマウスがけいれん重積で死亡し⁵、コンディショナルノックアウトマウスでは運動ニューロンの変性が生ずること⁶、TDP-43 遺伝子変異が ALS 発症の責任遺伝子異常の一つであること^{7,8}が明らかにされていることから、これらの分子変化が ALS に病因的意義を持つものと想定されている。GluR2 の RNA 編集異常、TDP-43 蛋白のプロセッシング異常は、ともにこれまでに孤発性 ALS に見出された分子変化の中でも最も疾患特異性が高い分子変化であり、SOD1 関連家族性 ALS の運動ニューロンには見出されていない^{9,10}。従って、これらの疾患特異的分子異常が独立して生じているのか、

互いに関連を持つ分子変化であるのかを明らかにすることは、ALS の病因を解明する上で避けて通ることのできない課題である。本研究では、両者の分子連関の有無を免疫組織化学的に検討し、病因的意義を探ることを目的とする。

B. 研究方法

SOD1 遺伝子変異のない孤発性 ALS 7 例 (59-75 歳)、神経疾患を有さない対照例 6 例 (58-78 歳) の剖検脊髄のパラフィン包埋ブロックより連続切片を作成し、定法に従い、抗 TDP-43 抗体 (Protein-Tech Group, Inc.)、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410; Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo)、抗 ADAR2 抗体 (RED1, Exalpha Biologicals, Watertown, MA) を用いて、免疫組織化学を行った。隣接切片で、同一運動ニューロンにおける抗 TDP-43 抗体陽性封入体の出現と ADAR2 の免疫活性を比較検討し、それぞれの免疫活性の有無により前角細胞を分類して算定した。ADAR2 免疫活性の特異性及び局在についてはヒト凍結脳脊髄、ラット脊髄を用いて Western blotting および免疫組織化学

により確認した。

(倫理面への配慮)

研究の方法について、研究倫理委員会、動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

ALS 例では前角細胞数が対照群の 50% 以下に減少していた。抗 ADAR2 抗体は、検索した対照例脊髄前角細胞の全て (n=360) で、細胞質を瀰漫性に染色した。ALS 例では、170 個の運動ニューロンにつき検討した。ADAR2 免疫活性のある運動ニューロンと ADAR2 免疫活性のない運動ニューロンが見られ、半数以上 (58%) が ADAR2 免疫活性を欠いていた。また、全ての ALS 例で ADAR2 活性のない運動ニューロンが存在した。全ての ADAR2 陽性細胞は核の TDP-43 免疫活性を有していたが、ADAR2 活性を欠く前角細胞の全ては核の TDP-43 免疫活性を欠き、且つ抗リン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体を細胞質内に有していた。ADAR2 活性と TDP-43 陽性封入体を共に有する運動ニューロンが 1 個 (0.2%) 存在したが、ADAR2 活性がなく TDP-43 陽性封入体もない運動ニューロンは観察されなかった。

正常ヒト凍結脳を用いた ADAR2 の Western blotting では、リコンビナント ADAR2a および ADAR2b に相当するバンドが核分画のみにみられた。正常ヒト及びラットの凍結脊髄を用いた免疫組織化学では、神経核に強い免疫活性が観察されたが、パラフィン包埋した切片では、核の染色性は落ち、細胞質が瀰漫性に染色された。死後変化、パラフィン包埋の影響を調べるために、同一サンプルを凍結及び、パラフィン包埋した切片での免疫組織化学、ラット脊髄を死後 0, 6, 24 時間室温放置した後に作製した凍結切片、パラフィン包埋切片での免疫組織化学を行い、死後時間の経過と共に核染色が薄れ細胞質染色が強くなること、パラフィン包埋により、凍結切片では核が強染するサンプルでも、核の染色性が薄れ細胞質が瀰漫性に染色されるようになることを確認した。

さらに、パラフィン包埋切片での ADAR2 免疫染色の特異性を検討するために、リコンビナント ADAR2

により吸収した抗体、RED1 以外の抗 ADAR2 抗体 2 種 (C15, E-20 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いた免疫組織化学を正常例脊髄のパラフィン切片で行った。吸収抗体により細胞質の瀰漫性の染色性は消失し、C15, E20 による免疫染色像は RED1 のものと同じく瀰漫性の細胞質の染色であった。

D. 考察

ADAR2 は核内蛋白であり、pre-mRNA におけるアデノシンをイノシンに変換する RNA 編集 (A-to-I 変換) を触媒している。この活性が低下すると AMPA 受容体サブユニットである GluR2 の Q/R 部位における A-to-I 変換が行われなくなり、未編集型の GluR2 が増加する。未編集型 GluR2 をサブユニットに持つ AMPA 受容体はカルシウム透過性が高く、神経細胞死に直結する分子変化であると考えられている。孤発性 ALS 運動ニューロンでは、ADAR2 活性が低下し、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が不十分であることが明らかにされ、運動ニューロン死に密接に関連した分子変化であると考えられている²。

本報告で、パラフィン包埋切片を用いた ADAR2 の免疫組織化学では核ではなく細胞質が瀰漫性に染色されていた。これは、Western blotting や凍結切片を用いた免疫組織化学で得られた核への局在とは全く異なるものであるため、免疫組織学の特異性が問題になる。ヒト及びラット脊髄を用いた、吸収抗体、複数の特異抗体、同一サンプルの凍結切片とパラフィン包埋切片での免疫組織化学の比較、の何れにおいても、抗体の特異性が証明され、死後変化、特にパラフィン包埋の過程で、核内に局在している ADAR2 蛋白が細胞質へ移動することに依ることが明らかになった。したがって、正常対照例の運動ニューロンは全てが ADAR2 免疫活性を有し、ALS 例では ADAR2 免疫活性のあるものもないものが混在した結果は、正常運動ニューロンでは ADAR2 の発現量が高いが、ALS 運動ニューロンでは半数強が免疫組織化学で検出できる程度に ADAR2 の発現量が低下していることを反映すると考えられる。これは、孤発性 ALS では GluR2 Q/R 部

位の RNA 編集率が 100%の運動ニューロンと、0%を含む 100%未満のものと同症例で混在していたという結果¹と符号する。

隣接切片での検討では、全ての ADAR2 陰性運動ニューロンには TDP-43 陽性封入体が検出でき、逆に 1例を除き全ての ADAR2 陽性運動ニューロンには TDP-43 陽性封入体が観察されなかった。このことは、孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性低下、TDP-43 陽性封入体形成は独立に生じているのではなく、両者の間には密接な分子連関が存在することを示している。とくに、封入体には ADAR2 免疫活性がなかったことは、ADAR2 蛋白が非特異的に封入体に巻き込まれる変化は生じていないことを意味し、タンパクレベルでの分子連関はないことを意味する。これは、孤発性 ALS 前角組織では ADAR2 mRNA の発現量が正常対照に比べ著減していることから¹¹、ADAR2 の活性低下が転写調節によるものであることが示唆されることと矛盾しない。ADAR2 陽性でありながら TDP-43 陽性封入体が形成されていた 1 個の運動ニューロンについては、免疫組織化学的には検出されても、ADAR2 量が正常な活性を発揮するには不十分であったためである可能性がある。

ADAR2 活性低下と TDP-43 蛋白のプロセッシング異常とは、孤発性 ALS 運動ニューロンに特異的に生じている現象であり、今後は、ADAR2 活性がどの様にして TDP-43 陽性封入体を形成するのか、または TDP-43 プロセッシング異常がどの様にして ADAR2 活性低下を引き起こすのか、の分子メカニズムを解明していくことで、孤発性 ALS の病因解明に近づけるものと考えられる。

E. 結論

孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性低下、TDP-43 陽性封入体形成は独立に生じているのではなく、分子相関があることを免疫組織化学的検討により明らかにした。

F.健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sawada J, et al. (2009) *Neurosci Res* 64:251-258, 2009.

2. Kwak S, et al. *Neuropathology*, in press.

2. 学会発表

1. 郭 伸：「興奮性神経細胞死から見た ALS」ALS シンポジウム。第 50 回日本神経病理学会，高松，June 4-6, 2009.

2. 郭 伸：シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」第 52 回日本神経化学会，伊香保，June 22-24, 2009.

3. 郭 伸，他：「生体機能と創薬シンポジウム」。日本薬学会，東京，August 26-27, 2009.

4. 郭 伸：シンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」第 32 回日本神経科学大会，名古屋，September 13-18, 2009.

5. Hideyama T, et al. *The 20th International Symposium on MND/ALS. 2009*, Berlin, 8-10 Dec, 2009.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）：なし

1.特許取得

2.実用新案登録

3.その他

I.引用文献

1. Kawahara, Y., et al. *Nature* **427**, 801 (2004).

2. Kwak, S. & Kawahara, Y. *J Mol Med* **83**, 110-120 (2005).

3. Arai, T., et al. *Biochem Biophys Res Com* **351**, 602-611 (2006).

4. Neumann, M., et al. *Science* **314**, 130-133 (2006).

5. Higuchi, M., et al. *Nature* **406**, 78-81 (2000).

6. Hideyama, T., et al. *Abstr. Soc Neurosci* **745**, 17 (2008).

7. Sreedharan, J., et al. *Science* **319**, 1668-1672 (2008).

8. Yokoseki, A., et al. *Ann Neurol* **63**, 538-542 (2008).

9. Mackenzie, I.R., *et al. Ann Neurol* **61**, 427-434 (2007).
10. Tan, C.F., *et al. Acta Neuropathol (Berl)* **113**, 535-542 (2007).
11. Kawahara, Y. & Kwak, S. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **6**, 131-144 (2005).