

4. TARDBP/PGRN/VCP と TDP-43 : TDP-43 の発見から 5 年を経て

3) 神経病理の立場から—TDP-43 から眺めて

高橋 均

新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

2006 年、ALS および FTLD の細胞病理でもっとも重要な所見のひとつであるユビキチン陽性神経細胞胞体内封入体の構成蛋白質として核蛋白質のひとつである TDP-43 が同定された。今年でその発見から 5 年が過ぎたが、本稿では、TDP-43 の発見以後の 1)ALS とはどのような疾患か、2)家族性・孤発性 ALS における TDP-43 変異の発見、3)ALS と FTLD : ひとつの主要な TDP-43 プロテノパチー、4)TDP-43 異常を示す多くの変性疾患の存在、について神経病理学の展開を纏めてみた。

はじめに

2006 年、米国¹⁾および日本の研究グループ²⁾により ALS および FTLD の細胞病理でもっとも重要な所見のひとつであるユビキチン陽性（タウおよびシヌクレインは陰性）神経細胞胞体内封入体の構成蛋白質が同定された。それは核蛋白質のひとつである TDP-43 であった。今年でその発見から 5 年が過ぎた。本稿では、TDP-43 の発見後の神経病理学の展開について纏めてみたい。

1. ALS とはどのような疾患か

ALS とは真に運動ニューロン系のみを侵す疾患か、という疑問は古くからあったし、また、その答えを“No”する研究もこれまで数多くみられる。しかし、そのことを端的に示した研究は、ALS 患者では、下位運動ニューロンに加え、側頭葉（歯状回顆粒細胞）や線条体（小型神経細胞）にもユビキチン陽性の封入体が出現するというものであったろうと思われる³⁾。この封入体、認知症を伴う ALS (ALS with dementia: ALS-D) にみられる所見とされるが、ときに認知症の明らかでない症例にも認められる。TDP-43 の発見は、ALS では、

多くの部位の非運動ニューロンおよびグリア細胞も侵されているという病態、つまり、“ALS is a multisystem neuronal-glial proteinopathy of TDP-43” を明示した⁴⁾。また、ALS に特異的な Bunina 小体は TDP-43 陰性であることも示された⁴⁾。

何故このことがユビキチン免疫染色にて明らかにされてこなかったのか？その後、通常の免疫染色で、非運動ニューロンやグリア内の TDP-43 陽性封入体はユビキチン化されていないか、あるいはごく軽度しかユビキチン化されていないことが分かった⁵⁾。また、多数例で TDP-43 陽性の神経細胞胞体内封入体の分布を検討すると、人工呼吸器管理による延命の有無に関わらず、2 つのタイプに分類されることが示された⁵⁾。Type 2 と認知症の間には優位な相関がみられた⁵⁾。

2. 家族性・孤発性 ALS における TDP-43 遺伝子異常の発見

Bunina 小体は、ソ連（当時）の Bunina によって ALS 患者の下位運動ニューロン胞体内にはじめて記載された数ミクロン大の好酸性封入体（1962）であるが、それは優性遺伝を示す家族性 ALS（2 症例/2 家系）において観察されたもので

あった。われわれは、孤発性 ALS と全く同様の病理組織学的所見を示す家族性 ALS の 1 家系において、TDP-43 変異の存在を報告した⁶⁾。現在、多くの TDP-43 変異が報告されているが、そのほぼ全てが C 末に位置している⁷⁾。また、興味あることに、臨床的には孤発性とみられる症例にも見いだされている。この発見は、ALS の病態に TDP-43 が直接的に関わっていることを示すものである。さて、家族性 ALS といえば、その頻度としてもっとも高いのは SOD1 変異有するものである。SOD1 変異を有する家族性 ALS では、TDP-43 異常はないのか？当初、TDP-43 免疫染色で全く異常を認めないとする見解が一般的であったが^{4,8)}、その後、脊髄神経細胞(運動ニューロンとの記載はみられない)に陽性封入体を認めたとする少数の報告がなされた^{9,10)}。今後、多くの剖検例で改めて非リン酸化およびリン酸化 TDP-43 の双方からのさらなる検討が必要である (図 1A)。

3. ALS と FTL D : ひとつの主要な TDP-43 プロテノパチー

神経病理学的検索にタウ、シヌクレイン、ユビキチンの免疫染色が汎用されるようになると、認知症、とくに非アルツハイマー型変性認知症の前頭側頭葉皮質にタウ、シヌクレイン陰性、ユビキチン陽性の封入体を有する症例の存在が明らかになった。これらは Frontotemporal dementia (FTD) の一群を形成し、まもなく FTL D のなかの FTL D-U として纏められた。以後、それは ALS と臨床病理学的に連続性を有しているのではないかとされてきたが、TDP-43 の発見はそのことをより明確に示す結果となった。現在、両者は、ALS (MND)—ALS-D—FTL D-MND—FTL D (Dementia) のスペクトルを形成するひとつの主要な TDP-43 プロテノパチーとして確立され¹¹⁾、その皮質における TDP-43 病変の出現パターンにより 4 つのタイプに分類されている¹²⁾。全く運動ニューロン徴候のない FTL D の症例の脊髄前角細胞に TDP-43 陽性構造物を認める症例や長期の認知症の後に ALS

を発症する症例の存在が示されている¹³⁾。ちなみに、ALS-D (あるいは FTL D-MND) は Type B に分類される (図 1B)¹²⁾。

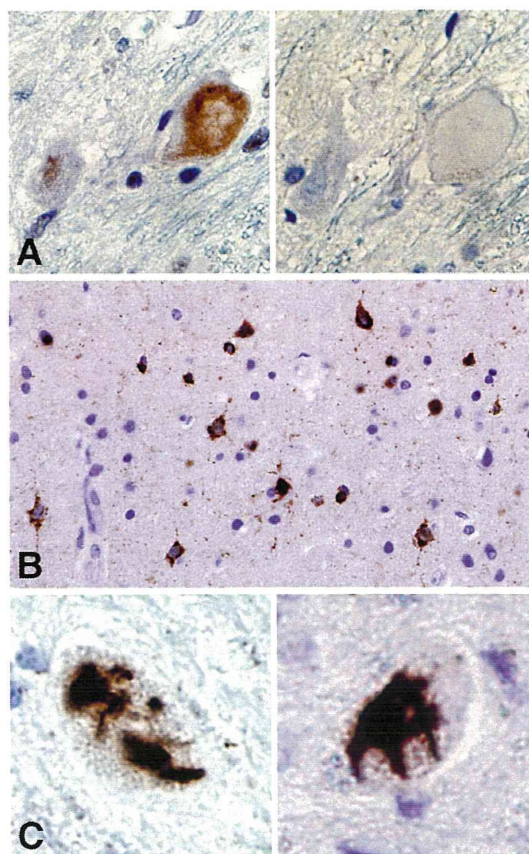


図 1. A: SOD1 変異(Ala4Thr)を認めた家族性 ALS 剖検例における TDP-43 免疫染色。腰髄の 1 個の前角細胞胞体内に非リン酸化抗体で陽性に染色される封入体様構造物を認めるが (左下の神経細胞では核が陽性に染色されている) (左)、連続切片のリン酸化抗体による染色では全く陰性である (右)。B: ALS-D の前頭葉皮質のリン酸化 TDP-43 免疫染色。II 層の小型神経細胞の多くに胞体内陽性封入体がみられるが、陽性の dystrophic neurites ははっきりしない(Type B)。C: CAG リピート病に認められたリン酸化 TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体。MJD の腰髄前角細胞 (左) と SCA2 の赤核神経細胞 (右)。

4. TDP-43 異常を示す多くの変性疾患の存在

TDP-43 変異で孤発性 ALS と同様の組織像を呈する家族性 ALS (ALS10) が惹起されるという事実は、この核内蛋白質の異常がその発症に直接的に関与していることを示している。しかし、原因が

結果かはともかく、免疫組織学的に確かめられる TDP-43 の異常（核内蛋白質である TDP-43 が胞体内でリン酸化をうけた凝集体を形成する）は、実に多くの変性疾患において認められることが分かった。これらは 2 次性 TDP-43 プロテオパチーとも呼ばれ、そこにはタウオパチーであるアルツハイマー病、シヌクレイノパチーであるパーキンソン病、さらに遺伝性神経変性疾患である CAG リピート病（ハンチントン病）などが含まれる¹⁴⁾。ALS とこれらの変性疾患との関わりはあるのか？ 実に興味深いところである。

MJD では、以前から脊髄前角細胞胞体内にまれながらユビキチン陽性のスケイン様封入体が発見することが知られていたが、TDP-43 免疫染色では、その数は少ないものの下位運動ニューロンに局限して陽性の胞体内封入体が発見されている（図 1C 左）¹⁵⁾。われわれは、その意義について形態学的な「運動ニューロンの特異性：巨大な胞体と極めて長い軸索」について考察したが、もちろん、その病態は不明である。一方、ごく最近、SCA2 の原因遺伝子である *ATXN2* における中等度の CAG リピートの伸長（Ataxin 2 における中等度のポリグルタミンの伸長）は ALS の発症に関与するとの報告がなされた¹⁶⁾。これは *ATXN2* を介して SCA2 と ALS が遺伝子的にリンクしていることを示唆する驚くべき報告で、われわれは早速、SCA2 の 1 剖検例の CNS を TDP-43 免疫染色にて検索してみた。すると、その数は少ないものの、かなり広い範囲に神経細胞胞体内陽性封入体を認めた（図 1C 右）。興味深いことは、下位運動ニューロンの軽度脱落はあるものの、MJD と異なり、その残存ニューロンには全く陽性封入体は確認できなかった¹⁷⁾。MJD、そして SCA2、何とも面白い所見であるが、ポリグルタミンの伸長と TDP-43 異常との関連、今のところ、皆目見当もつかない問題である。

おわりに

ALS は脳神経における代表的変性疾患である。また、加齢に伴い非アルツハイマー型変性認知症

も増加の一途を辿っており、FTLD-TDP もまたその代表的疾患といえる。この両者に共通した病的蛋白質として TDP-43 が同定された。以後、TDP-43 の異常は、同時に、多くの他の脳神経を侵す変性疾患にも観察されてきている。TDP-43 は、ALS の病態との直接的な関わりを示す分子と考えられるものの、その一方で、まさに多く脳神経変性疾患の病態形成経路が利用するハブ空港のような存在にみえてくる。TDP-43 の病態研究はまさにこれからである。近い将来、多くの神経難病を一網打尽にするような発見があるかもしれない。

文 献

- 1) Neumann M et al. *Science* 314: 130-133, 2006
- 2) Arai T et al. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 602-611, 2006
- 3) Piao Y-S et al. *Brain Pathol* 12: 10-22, 2003
- 4) Tan CF et al. *Acta Neuropathol* 113: 535-542, 2007
- 5) Nishihira Y et al. *Acta Neuropathol* 116: 169-182, 2008
- 6) Yokoseki A et al. *Ann Neurol* 63: 538-542, 2008
- 7) Mackenzie IR et al. *Lancet Neurol* 9: 995-1007, 2010
- 8) Mackenzie IR et al. *Ann Neurol* 61: 427-534, 2007
- 9) Sumi H et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 37-47, 2009
- 10) Maekawa S et al. *Neuropathology* 29: 672-683, 2009
- 11) Geser F et al. *Neuropathology* 30: 103-112, 2010
- 12) Mackenzie IR et al. *Acta Neuropathol* 122: 111-113, 2011
- 13) Tan CF et al. *Brain Nerve* 61: 1319-1327, 2009
- 14) Chen-Plotkin AS et al. *Nat Rev Neurol* 6: 211-220, 2010
- 15) Tan CF et al. *Acta Neuropathol* 118: 553-560, 2009
- 16) Elden AC et al. *Nature* 466: 1069-1075, 2010
- 17) Toyoshima Y et al. *Acta Neuropathol* (in press)

TDP-43 過剰発現による動物モデルの作製

横田 隆徳

東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学分野

研究要旨

Tar DNA-binding protein-43 (TDP-43) は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における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同定された。本研究では、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割を明らかにすることを目的として、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いてラットおよびカニクイザルの頸髄前角細胞にヒト野生型 TDP-43 を過剰発現させ、その結果、カニクイザルにおいて進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 の細胞質への異常局在と凝集体形成および核の染色性低下という孤発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。一方、ラットの脊髄前角細胞では同様の実験にて、過剰発現 TDP-43 は核内に限局しており、TDP-43 の病態には霊長類とげっ歯類で種差が存在することが明らかになった。

A. 研究目的

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (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同定された。ALS 症例の剖検脳において TDP-43 による細胞質内封入体が存在する神経細胞では、核蛋白である TDP-43 の核内染色性が著明に低下していることが報告されている。さらに、孤発性 ALS および家族性 ALS において、TDP-43 遺伝子の点変異が次々と報告され、変異 TDP-43 遺伝子が ALS の原因遺伝子であることが判明しつつある。しかし、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割は明らかになっていない。

今回、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割を明らかにするため、カニクイザルとフィッシャーラットの頸髄前角細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて野生型 TDP-43 を過剰発現させ、神経症状および神経病理学的所見を観察し、ALS モデルとなりうるかを検討した。

B. 研究方法

<TDP-43 shRNA 発現プラスミドの作製>

Short hairpin RNA (shRNA) はマウス TDP-43 に対する shRNA を設計し、pUC19 ベクターの human U6 promoter の下流に挿入した。shRNA は 5 種類作製し、その中で N2a 培養細胞で内陰性 TDP-43 の抑制効率の高かった shRNA 1 を使用した

<AAV プラスミドベクターの作製>

野生型 TDP-43 は CMV プロモーターを含む human TDP-43 発現ベクタープラスミド (Invitrogen) を用いた。この完全長 human TDP-43 cDNA の N 末端を flag (DYKDDDK) で標識したものを、AAV2 の ITR を持つプラスミド (pAAV-MCS; Stratagene) に組み込み、野生型 TDP-43 を発現するコンストラクトを作製した。

すべての DNA 組換え実験は東京医科歯科大学遺伝子組換え倫理委員会の承認 (承認番号 2008-27) を得て行った。

<AAV プラスミドベクター注入>

カニクイザル (6-7歳) 4頭、フィッシャーラット (10週齢) 10匹に対して抱水クロー

ル3.0 ml/kg、ケタミン0.5 ml/kgにて腹腔麻酔後、椎弓切除術を行って、第6頸髄の1側前角付近に 3.0×10^{12} vg/ml AAVベクター溶液を注入した。

すべての動物実験は医薬基盤研医学霊長類センター（承認番号(#DS20-45, #DS21-19,) 東京医科歯科大学動物実験倫理委員会の承認（承認番号81165）を得て行った。

<神経症状評価>

カニクイザルは行動解析とアップルテスト、フィッシャーラットは握力計(MK380CM/F MUROMACHI KIKAI)による筋力測定(週3回)を行った。

<神経生理評価>

末梢神経伝導検査は、両側の正中神経を手関節部及び肘部で電気刺激し、拇指球筋より複合筋活動電位を、針筋電図は前腕筋電屈筋よりMEB 2000 筋電計（日本光電）で記録した。

<神経病理評価>

脊髄は10%緩衝ホルマリンまたはザンボーニ液（4% paraformaldehyde）固定後パラフィン包埋し、HE染色、ニッスル染色および免疫染色を行った。

一次抗体は抗TDP-43抗体（Protein Tech）（1:3000）、抗Flag抗体（Sigma）（1:500）、抗ユビキチン抗体(Dako)(1:3000)、抗リン酸化TDP抗体(Cosmo Bio)(1:1500)、二次抗体は抗rabbit IgGヤギ抗体、抗mouse IgGウマ抗体(VECTOR)（1:1000）を用いた。

前根は2%グルタルドで固定後エポン包埋し、トルイジンブルー染色を行った。

C. 研究結果

<TDP-43発現抑制効果>

shRNAによりNeuro-2aの内因性TDP-43の発現が抑制されたことを確認した後、細胞死判定法を行った結果、shRNAによりTDP-43を発現抑制された細胞はコントロールshRNAと比較し

てcaspase依存性のアポトーシスを示した。

また、shRNAによる発現抑制で誘導された細胞死が野生型TDP-43を共発現することで回復することができた。

<TDP-43過剰発現によるモデル動物の神経症状の出現>TDP-43を過剰発現させた個体(n=3)では、AAV注入後約2週から注入側前肢に進行性の麻痺を生じ始め、4週間には上腕は中等度の運動麻痺、手指は完全麻痺となった。アップルテストによる評価では、TDP-43 high dose 個体では術後1週、TDP-43 low dose 個体で術後2週から3週にかけ利き手の交代が見られ始め、最終的に使用する手がほぼ逆転した。

TDP-43を過剰発現させたラット(n=5)では、AAV注入後約2週から注入側前肢に進行性の麻痺を生じ始め、4週間には上腕は中等度の運動麻痺手指は完全麻痺となった。握力計においては術後第2週から右側に対する左側の有意な筋力低下が認められた。

<神経生理学的評価>

カニクイザル、ラットともに術後第4-6週に、前肢屈筋の針筋電図においてfibrillation、positive sharp waveの脱神経所見が記録され、複合筋活動電位は徐々に振幅が低下した。

<神経病理学的評価>

TDP-43を発現するAAVプラスミドベクターを注入したカニクイザルの脊髄において、前角細胞に野生型human TDP-43が発現していることを確かめた。抗flag抗体により免疫染色を行うと、注入部位付近のほぼ全ての脊髄前角細胞に対し染色性が認められ、野生型human TDP-43が過剰発現し多くの前角細胞においては、TDP-43は細胞質に異常分布していた。また、抗TDP-43抗体による免疫染色では、野生型human TDP-43が細胞質に過剰発現している前角細胞において、内因性サルTDP-43の発現低下が観察された。また、それらの細胞の中には、変性突起やTDP-43の細胞質凝集像が認められ

るものがあった。

ラットにおいても Flag-hTDP-43 術後注入群の脊髄 Flag 染色においてはほぼ注入側に限局する陽性像が見られたが、ほぼすべての前角細胞において、その発現は核に限局していた。

カニクイザル、ラットともに Flag-hTDP-43 術後の注入側の前根で、ミエリン球と大径線維の脱落が見られた。

D. 考察

本研究では、カニクイザル、ラットの頸髄前角細胞に野生型 hTDP-43 を過剰発現させることにより、ALS 症例類似の進行性の運動麻痺、筋力低下及び筋萎縮という神経症状および、筋電図における脱神経所見が再現された。

神経病理学的には、カニクイザルで TDP-43 の細胞質への異常局在、凝集体形成および核の染色性低下という弧発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。一方で、ラットでは神経症状は示したものの、神経病理学的に TDP-43 は核に局在しており、TDP-43 の病態生理に種差を認めた。

実際の ALS の剖検脊髄において TDP-43 の発現が上昇しているか否かは明らかではないが、タウ陰性のユビキチン陽性前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) や運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭葉変性症 (FTLD-MND) の剖検前頭葉において TDP-43 mRNA の発現が約 1.5 倍に上昇していたことが報告されている。

以上から野生型 hTDP-43 を過剰発現したカニクイザルはラットより弧発性 ALS のモデルとして有望であり、その分子機序の解明に有力なツールになると期待している。

今までの、野生型および変異 TDP-43 過剰発現によるマウス、ラット、ショウジョウバエ、線虫の既報告例についてオーバービューをして、TDP-43 過剰発現動物モデルの現状について考察した。その結果、SOD1 変異と比較して、

低いコピー数で発症して野生型 TDP-43 のみでも発症して野生型 TDP-43 と変異 TDP-43 過剰発現の表現型の差が少ない（またはない）特徴を示した。

E. 結論

カニクイザルの頸髄前角細胞に AAV ベクターで野生型 TDP-43 を過剰発現させることにより、進行性の前肢運動麻痺と、TDP-43 の細胞質への異常局在と凝集体形成および核の染色性低下という弧発性 ALS 類似の病理変化の再現に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T. Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice. FEBS Lett 583: 213-218, 2009
2. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Ono F, Sakaue F, Hirai T, Tajiri M, Kanai K, Ohkubo T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Ueno T, Sunaga F, Ikeda S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Kusano K, Enomoto M, Yokota S, Hirai Y, Yasutomi Y, Uchihara T, Kuwabara S, Mizusawa H and Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of wild-type TDP-43 (in submission)

2. 学会発表

1. 渡邊あずさ, 山本由紀, 吉田友教, 笹栗弘貴, 横田隆徳, 水澤英洋. TDP43 タンパクの shRNA 導入における神経細胞死への影響. 第 50 回日本神経学会総会, 2009. 5. 20-22, 仙台

2. 内田あずさ, 佐野達彦, 大久保卓哉, 金井
数明, 澁谷和幹, 笹栗弘貴, 久保寺隆行, 平
井高志, 草野和正, 榎本光宏, 内原俊記, 桑
原 聡, 水澤英洋, 横田隆徳. 孤発性筋萎縮
性側索硬化症のモデルラット作製. 第 51 回日
本神経学会総会, 2010. 5. 20-22, 東京

3. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Sakaue F,
Uchihara T, Kuwabara S, Mizusawa H and
Yokota T. Overexpression of wild type TDP-43 in
motoneuron of non-human primate recapitulates
ALS. International Conference of Alzheimer
Disease 2010.7.10, Honolulu, USA

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

Ⅱ. 研 究 報 告

9:20		研究代表者挨拶	
9:25		厚生労働省疾病対策課御挨拶	
時 間	番号	演 題 名	演 者・研究分担者 研究協力者
	A1		座長：服部 信孝
9:30	1	DJ-1の細胞内局在に関する検討	宇佐見由希子・服部 信孝
9:45	2	若年発症パーキンソン病とミトコンドリア機能異常	佐藤 栄人・服部 信孝
10:00	3	パーキンのミトコンドリア膜電位に対する影響	三ツ井 貴夫・梶 龍 児
10:15	4	AADC欠損症の遺伝子治療	村松 慎一・村松 慎一
	A2		座長：長谷川一子
10:30	5	パーキンソン病患者脳脊髄液におけるビオプテリン量と発症年齢、症状との 関連について	瀬 宏・長谷川一子
10:45	6	血中尿酸値とパーキンソン病	岩城 寛尚・野元 正弘
11:00	7	パーキンソン病の初期進展様式：未治療患者における胃電図、嗅覚検査、 MIBG心筋シンチグラフィ	朝比奈 正人・桑 原 聡
		ブレイク (11:15~11:30)	
	A3		座長：村田 美穂
11:30	8	パーキンソン病患者における姿勢異常発現危険因子の検討	柏原 健一・柏原 健一
11:45	9	パーキンソン病の上腹部型腰痛がりに対するリドカイン療法の長期効果	古澤 嘉彦・村田 美穂
12:00	10	パーキンソン病患者を対象とした骨折に関する疫学研究	横江 勝・望月 秀樹
	A4		座長：佐々木秀直
13:15	11	パーキンソン病における排尿障害と転倒の関連について	佐久嶋 研・佐々木 秀直
13:30	12	パーキンソン病におけるサーカディアンリズム障害	丹羽 文俊・徳田 隆彦
13:45	13	パーキンソン病における疾病に対する自己意識性についての検討	梶本 賀義・三輪 英人
	A5		座長：藤本 健一
14:00	14	パーキンソン病における視床下核脳深部刺激術後に生じた言語障害の特徴	渡辺 宏久・祖父江 元
14:15	15	パーキンソン病手術治療説明会 ～10年の歩み～	藤本 健一・藤本 健一
14:30	16	パーキンソン病患者における四肢冷感の原因病態 -多系統萎縮症との比較-	新藤 和雅・瀧山 嘉久
14:45	17	多系統萎縮症(MSA)における交感神経節病変の検討	三室 マヤ・吉田 眞理
		コーヒーブレイク (15:00~15:15)	
	A6		座長：村山 繁雄
15:15	18	進行性核上性麻痺および大脳皮質基底核変性症剖検例におけるMRI・SPECT所 見の検討	饗場 郁子・饗場 郁子
15:30	19	Perry症候群の診断基準案作成と疫学調査について	富山 弘幸・服部 信孝
15:45	20	梨状葉皮質のレビー小体病理	舟辺 さやか・村山 繁雄
16:00	21	孤発性・家族性パーキンソン病のゲノム解析	佐竹 渉・戸田 達史
	A7		座長：中島 健二
16:15	22	ハンチントン病-新たな治療の開始-	長谷川一子・長谷川一子
16:30	23	有棘赤血球舞踏病における神経変性の分子機構	中村 雅之・佐野 輝
16:45	24	鳥取県における前頭側頭葉変性症の患者数調査	和田 健二・中島 健二
	A8		座長：梶 龍 児
17:00	25	脳幹および脊髄においてOptineurin陽性封入体を伴う運動神経変性を認めた HMSN-Pの1例	藤田 浩司・梶 龍 児
17:15	26	SCA2とMotor Neuronopathy	西川 典子・野元 正弘
17:30	27	当科において成人型脊髄性筋萎縮症の診断基準を満たした症例の臨床像と 遺伝学的背景の検討	益子 貴史・中野 今治
17:45	28	脊髄性筋萎縮症の分子遺伝学的検討	久保 祐二・斎藤 加代子

12月17日 (土)

時間	番号	演題名	演者・研究分担者 研究協力者
	B1		座長：阿部 康二
9:00	29	加齢が孤発性ALSの危険因子である分子病態の考察	日 出 山 拓 人・郭 伸
9:15	30	流れるALS ～MRIを用いたALS患者髄液流の検討～	佐 藤 恒 太・阿 部 康 二
9:30	31	光るALS ～ALSモデルマウスにおけるautophagy in vivoイメージング～	田 豊 豊・阿 部 康 二
	B2		座長：吉良 潤一
9:45	32	ALS-FUSモデルショウジョウバエの解析	徳 田 隆 彦・徳 田 隆 彦
10:00	33	脊髄運動神経特異的26Sプロテアソームサブユニット欠損マウスはALS的病理所見を伴う運動神経細胞死を呈する	田 代 善 崇・高 橋 良 輔
10:15	34	変異SOD1-Tgマウスの急性神経傷害時のミクログリアとT細胞の反応性低下は神経細胞脆弱性と相関する	河 村 真 実・吉 良 潤 一
10:30	35	SOD1 ^{G93A} ALSマウスに対する免疫治療 –プロテアーゼ耐性領域を抗原とした検討–	渡 辺 保 裕・中 島 健 二
コーヒーブレイク (10 : 45～11 : 00)			
	B3		座長：桑原 聡
11:00	36	ALSの予後規定因子：軸索持続性Na電流は生存期間と関連する	澁 谷 和 幹・桑 原 聡
11:15	37	筋萎縮性側索硬化症におけるfasciculation potentialsとAwaji基準の有用性	東 原 真 奈・園 生 雅 弘
11:30	38	筋萎縮性側索硬化症におけるfasciculation potential ; その出現様式および生命予後との関連	清 水 俊 夫・清 水 俊 夫
11:45	39	筋萎縮側索硬化症における横隔膜超音波検査の臨床的有用性	檜 皮 谷 泰 寛・三 輪 英 人
	B4		座長：葛原 茂樹
12:00	40	筋萎縮性側索硬化症および進行性核上性麻痺における注意機能についての検討	矢 部 一 郎・佐 々 木 秀 直
12:15	41	紀伊半島のALS-parkinsonism-dementia complexの概念についての考察	葛 原 茂 樹・葛 原 茂 樹
12:30	42	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バイオマーカーの検討 第2報- 脳脊髄液中タウ、リン酸化タウ、Aβの解析 -	小 久 保 康 昌・小 久 保 康 昌
事務連絡・昼食 (12 : 45～13 : 45)			
	B5		座長：小野寺 理
13:45	43	東北大学における家族性ALS遺伝子解析およびFUS/TLS遺伝子変異を伴う家系の検討	加 藤 昌 昭・青 木 正 志
14:00	44	新規senataxin遺伝子変異 (R2136C) によるALS4の臨床像の解析	立 石 貴 久・吉 良 潤 一
14:15	45	C9ORF72遺伝子のGGGGCCリピートの異常伸長を認めたFALS	今 野 卓 哉・小 野 寺 理
14:30	46	Optineurin遺伝子変異 (E478G優性、Q398X劣性) 例の臨床病理学的検討	伊 東 秀 文・高 橋 良 輔
	B6		座長：水澤 英洋
14:45	47	筋萎縮性側索硬化症の進展の初発部位からの連続性の検討	関 口 輝 彦・水 澤 英 洋
15:00	48	我が国のALS患者に対する換気補助療法の現状と予後：JaCALSの解析から	渡 辺 は づ き・祖 父 江 元
15:15	49	筋萎縮性側索硬化症における意思伝達能力障害 一病初期の進行速度との関連—	林 健 太 郎・清 水 俊 夫
ブレイク (15 : 30～15:45)			
	B7		座長：高橋 均
15:45	50	TDP-43関連ALSの脊髄前角細胞におけるCajal小体数の減少	横 関 明 男・小 野 寺 理
16:00	51	ALS及び非ALS患者の動眼神経核におけるpTDP-43の発現に関する検討	水 野 裕 司・岡 本 幸 市
16:15	52	ALS類似のTDP-43陽性封入体を広範に認めたSCA2の1例	豊 島 靖 子・高 橋 均
16:30	53	ALSにおける嗜銀顆粒性認知症の共存について	相 馬 健 一・高 橋 均
16:45		研究代表者挨拶	

1演題：発表10分＋討論5分（時間厳守でお願いします） * 両日も昼食をご用意しております

総括研究報告

研究代表者 中野 今治

自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門

研究分担者：36 名 研究協力者：8 名 班友：1 名

I. はじめに

「神経変性疾患に関する調査研究班」（変性班）は、難治性疾患克服研究事業（厚生労働省）の中で調査・研究活動を行っている。変性班は、運動ニューロン疾患の 4 疾患（筋萎縮性側索硬化症 ALS、球脊髄性筋萎縮症 SBMA、脊髄性筋萎縮症 SMA、原発性側索硬化症 PLS）、パーキンソニズムを呈する 3 疾患（パーキンソン病 PD、進行性核上性麻痺 PSP、大脳皮質基底核変性症 CBD）、舞踏運動を示す 2 疾患（ハンチントン病 HD、有棘赤血球舞踏病 ChA）および脊髄空洞症 SM の 10 疾患を研究対象としている。この中で、医療費が補助される特定疾患治療研究事業対象疾患（公費対象疾患）は、ALS、SBMA、SMA、PD、PSP、CBD、HD の 7 疾患である。

本年度は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療研究に特化した「病態に根ざした ALS の新規治療法開発」分科班（ALS 分科班：祖父江 元分科班研究代表者）を設け、連携して研究を行った。

II. 研究目標

【1】 治療法の開発：変性班活動の最終目標は当班が取り扱う神経変性疾患の根治療法を開発することである。そのためには、迂遠に見えても諸難病の病態解明に取り組み、病態に基づいて治療法開発を目指すことが正攻法と考えられる。しかし、現実には厳しく、原因遺伝子が見だされた疾患に於いてさえ、発病のメカニズムは不明であり、ゴールは遙か彼方である。このような環境下に於いては、地道ではあっても疾患を視界に捉えた基礎研究を積み上げて行くのが一つの大道である。その一方で、現実には難病で苦しむ患者に対しては、その苦痛を少しでも緩和できるような対症療法の改善・開発もまた重要である。複数の有効薬物が開発され、外科治療も保険適応になっている PD に於いても、進行自体は阻止できず、進行期には ADL が大きく損なわれる。PSP と CBD では奏効する薬物は唯一の一つも開発されていない。このような患者・介護者には ADL/QOL の視点からの支援が欠かせない。HD では、当班班員による評価基準日本語版のバリデーションが終了し、舞踏運動軽減を目指してテトラベナジンのオーファンドラッグとしての治験が行われている。現在、治療薬が限られている ALS に対しても治験が実施中、あるいは計画されている。

【2】 調査研究：疫学調査によって得られる種々のデータ（発症年齢、発症様式、進行状況、重症度、経過、予後規定因子）は、疾患の原因・病態の解明に有益であると共に、患者の実態把握、さらには治験薬の効果判定に必須であり、疫学研究は変性班研究の大きな柱である。これにより得られるデータは医療施策を支え、ひいては患者の福祉向上に役立つ資料を提供する。

その点に於いて当班班員を主要構成員とする Japanese Consortium of Amyotrophic Lateral Sclerosis (JaCALS) (事務局 名古屋大学医学部神経内科) により行われている、ALS の前向きかつ経時的臨床情報収集と遺伝子試料は、全ての研究者に開かれたデータバンクであり、ユニークな研究試料である。加えて独立行政法人 医薬基盤研究所と連携して、パーキンソニズム、中でも PSP と CBD に主眼を置いて、鳥取大学神経内科を中心にして生体試料収集の準備(両施設の倫理委員会承認)を終えた。今後、徐々に参加施設を増やしてゆく予定である。また、ALS と関連の深い前頭側頭葉変性症 (FTLD) の実態把握を行うべく、準備段階として鳥取県で疫学調査を実施した。

- 【3】 診断・認定基準、機能評価方法の改善：積年の基礎研究のアウトカムとして変性班の各疾患では複数の病態仮説が提案され、それに基づいて治験が実施されてきた。治療法としてまず目指すところは病態抑止療法であり、その効果判定にはバイオマーカーの改善のみでは不十分で、運動機能を基盤とした病態抑止の証明が必要である。そのためには、精緻な機能評価法の確立が求められる。日常生活動作において欧米と大きな差がある日本人に対しては、欧米の機能評価方法をそのまま持ち込むことはできず、我が国の生活習慣に適した評価法を確定することが望ましい。正確な効果判定の為には、可能な限り均一な対象症例の選択が必要で、特に進行の速い ALS では正確な早期診断法の開発が不可欠である。また、運動機能評価の他に客観的な判定に使えるサロゲートマーカーの発見も重要である。当班ではこの方面にも力を入れた。

III. 今年度の研究成果

【1】 パーキンソン病 (PD) と関連疾患

本年度の特筆すべき成果としては、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 欠損症の遺伝子治療臨床研究が挙げられる。これは、当班の村松 慎一研究協力者が国立台湾大学医師との国際共同研究として行った遺伝子治療で、台湾の AADC 欠損症患者 4 人に対して AADC 遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを両側の被殻に注入した。治療後、患児は体重が増加し発達スコアが明らかに改善した。PET では被殻の FDOPA 集積が増加し、髄液中のドパミン代謝産物が増加した。本邦では、PD 患者に対してこの手法が実施可能であるが、経費の関係で上記ベクターが入手できず、臨床研究が頓挫している。再開の目処を付けたいところである。

1. 基礎

1) ミトコンドリア

(1) PINK1 と Parkin はミトコンドリア内膜外と基質間の膜電位の低下した損傷ミトコンドリアを選択的に mitophagy に導くことが示されており、本年度は PINK1 がミトコンドリア機能にどのように関わるか報告された。PINK1 ノックアウト細胞ではミトコンドリア基質酸化能が低下しており、PINK1 は mitophagy のみならず、ミトコンドリア呼吸能維持に重要であることが示された。

(2) ミトコンドリアにパーキンが強く結合した細胞ではミトコンドリアの膜電位は著明に増大し、この現象は CCCP 処理を行った場合にも認められることが示された。Klokin 1 を導入

するとミトコンドリアにパーキンが強く結合した細胞が有意に増加し、逆に siRNA で Kloklin 1 発現を抑制するとパーキン結合は減弱した。ミトコンドリア内のパーキンはその膜電位を維持し、Kloklin 1 はパーキンのミトコンドリアへの移送を促進することが示唆された。

- 2) DJ-1 : 常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因蛋白の一つである DJ-1 は Rab3A および synaptophysin と同一のシナプス小胞に局在して膜輸送の機能を持ち、その破綻が発病と関連する可能性が報告された。DJ-1 の L166P 変異型は野生型と比較して膜への結合能が低い可能性が示された。

2. 臨床

- 1) 遺伝 : exon に存在する PD の rare variants を発見するため、(1) 候補遺伝子 exon の関連解析、(2) 多発家系について次世代 sequencer による exon sequencing がなされた。(1) では、脂質代謝カスケードの遺伝子、パーキンソニズムを部分症として示す疾患の遺伝子の有意な原因変異は見だされなかった。(2) では同胞例 2 検体について、同胞に共通する新規の多型・変異 321 個が検出された。

2) バイオマーカー :

- (1) ビオプテリン(BP) : CSF 中の BP は黒質線条体系の残存ニューロンの指標と考えられるため、PARK8 患者および PD 患者において症状や発症年齢との関連を検討した結果、PARK8 患者では PD 症状と CSF 中 BP 量の間には負の相関関係が認められたが、PD 患者では明瞭な相関関係は見だされなかった。
- (2) 酸化ストレス : PD と酸化ストレスの関連を血中で最大の抗酸化物質である尿酸を指標にして調べたところ、血清尿酸値のみがパーキンソン病のオッズと負の相関を認めた。PD では血清の尿酸値が最低の群と最高の群ではオッズ比は 0.23 と有意に低値であり、尿酸はパーキンソンに対して保護的に働いている可能性が示された。

3) 臨床像

- (1) 胃電図 : 未治療 PD 患者と多系統萎縮症 (MSA) 患者多数例で胃電図を行い、2 疾患の鑑別におけるその有用性を評価した結果、胃蠕動運動の主要周波数 (slow wave の周波数) は MSA と対照では保たれていたが、PD では不整であり、胃電図は PD と MSA の鑑別に使用できる可能性が示された。胃電図の指標と MIBG 所見あるいは嗅覚との相関はいずれも認められなかった。
- (2) PD の姿勢異常 : PD 患者の姿勢異常を多数例で検索した結果、前屈、側屈、首下がりとともに PD 患者で有意に高頻度であり、運動障害の重症化とともに発現頻度、程度が増すことが示された。その他の姿勢異常関連因子として加齢、罹病期間、抗 PD 薬投与量、認知機能低下、女性が抽出された。
- (3) 転倒助長因子 : 排尿障害が PD 患者転倒のリスクとなることから、過活動膀胱症状質問票を用いて、排尿障害の各要素と転倒の関連性について検討した結果、転倒は 45.3% (47 名) で認められ、尿意切迫感及び尿失禁で週に 1 回未満及び週 1 回程度の群で転倒者が多い傾向が認められた。日中尿回数あるいは夜間回数とは関連しなかった。

(4) 非運動症状

① PD の非運動症状である睡眠障害や自律神経障害は、サーカディアンリズム障害と関連する可能性が考えられることから、身体活動量と心拍変動のパターンやリズムを比較した結果、睡眠覚醒や自律神経系のサーカディアンリズムが PD の進行に連れて障害されることが明らかにされた。

② 四肢冷感症状のある PD 患者と MSA 患者の下肢の皮膚交感神経活動 (SSNA) と皮膚血流量を計測した結果、皮膚血流が基礎血流まで回復する時間が PD 患者で有意に延長する傾向が認められた ($p < 0.05$)。四肢末梢の冷感、PD では末梢性の、MSA では中枢性の自律神経障害によるものと考えられた。

③ 自己意識：PD 患者の疾病に対する自己意識性の評価を種々の手法で行った結果、患者と介護者間で Patient Competency Rating Scale (PCRS) 総点に解離が認められた。次に患者を左側優位群 (LPD) と右側優位群 (RPD) で比較したところ、LPD は疾病に対する障害を重く、RPD では軽く認識する傾向が示された。PD 患者の疾病意識性は優位に障害される脳半球と関連している可能性が示唆された。

(5) Perry 症候群：Perry 症候群は *DCTN1* を原因遺伝子とし、パーキンソニズム、うつ、体重減少、低換気をきたす稀な遺伝性疾患である。複数の既知変異が報告されている *DCTN1* exon 2 について、日本人パーキンソニズム 924 例で直接塩基配列決定法により解析を行い、臨床的検討を行った結果、Perry 症候群家系を 3 家系でヘテロのミスセンス変異が、1 家系で新規変異が同定された。

(6) PSP、CBD と脳画像：いずれも剖検診断した PSP12 例と CBD6 例の生前の MRI と IMP-SPECT 所見の特異度と感度を算出した。PSP では、MRI における脳幹・小脳の萎縮、CBD では側脳室拡大の左右差、頭頂葉萎縮、中心溝拡大および SPECT における頭頂葉を含む大脳広範の高度集積低下が各々の疾患に特異度の高い所見であり、両者の鑑別に寄与する所見と考えられたが、感度は高くなかった。

4) 病理

(1) PD の梨状葉皮質：連続剖検例において梨状葉皮質、脳の他部位および末梢神経系をリン酸化 α -synuclein 抗体免疫染色で検討した結果、梨状葉皮質はレビー小体病理に早期に侵され、脳幹上行系ではなく嗅球からの進展経路と密接に関連することが明らかにされた。

(2) MSA の交感神経節：病理診断された MSA65 例の交感神経節を組織検索した結果、40 例 (61.5%) で synuclein 陽性構造物が認められた。うち中枢に Lewy 小体を認めたのは 2 例 (5%、PD+MSA 合併 1 例を除く) のみであり、MSA の末梢神経組織の synuclein 病理は PD と一部共通することが示された。

5) 治療研究

(1) AADC 欠損症の遺伝子治療：芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の先天的欠損症の 4 人を対象として、AADC 遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを両側の被殻に注入する遺伝子治療を国立台湾大学で共同研究として実施した。治療後、体重が増加し発達スコアが改善した。PET では被殻の FDOPA 集積が増加し、髄液中のドパミン代謝産物が増加した。術

後数か月の間、orofacial dyskinesia が認められた。

(2) 体幹屈曲に対するリドカイン治療：PD に合併する腰曲がり〔前屈〕を変曲点の違いから上腹部型と腰部型に分類し、上腹部型例の外腹斜筋にリドカイン連続投与を行い、多くの患者で3か月以上効果が持続することが示され、上腹部腰曲がりの治療として有用であることが判明した。

(3) STN-DBS

① 言語障害：STN-DBS を受けた PD70 例の言語機能を評価した結果、発話・音声機能障害は、STN-DBS 群は非 DBS 群に比べて有意に不良で、両側 STN-DBS 刺激群で最も高頻度かつ高度で、左側刺激群がこれに続くことが示された。言語障害のタイプとして運動低下性構音障害、失調性構音障害、痙性構音障害がみられた。

② 説明会：PD の患者・介護者に対して神経内科医と脳外科医が共同で、毎月1回のペースで10年間に渡り、計92回の STN-DBS の説明会を行い、その効果が調査された。説明内容の理解度は比較的高く、説明内容は妥当と考えられた。手術治療説明会は、手術治療を理解し、選択を決断する上で有効な手段であることが確認された。

【2】筋萎縮性側索硬化症と関連疾患

注目すべき成果は、ALS 病変はスキップして進展拡大することを明解な手法で示した臨床研究である(水澤英洋班員)。 ほぼ全ての神経変性疾患では異常タンパク質が細胞内に蓄積することが分かってきた。近年、この蛋白が細胞間を伝播することで病変が順々に拡大するとの説 (prionoid 説) が、根拠の曖昧なまま提唱されている。当該研究では、頸髄以上に症候を有する ALS 患者で、運動ニューロンの脆弱性に影響する軸索長や筋線維タイプの組成がほぼ同一で、支配髄節のみ異なる一側2筋 (内側広筋と大腿二頭筋、T10 と L5 傍脊柱筋) をペアとし、これらペア内の2筋間で安静時自発電位 (線維自発電位、陽性鋭波、および線維束電位) の有無を比較した結果、相当例でペア内のより尾側の髄節支配筋にのみ安静時自発電位を認められた。発症早期の ALS 症例において非連続的に下位運動ニューロン病変が広がることを示している。

1) 基礎

(1) モデル動物

① *FUS* 変異の *Drosophila* モデル：*Caz* は *FUS* の *Drosophila* homologue である。神経特異的に *Caz* を KD した *Drosophila* では、3 齢幼虫の中枢神経系で *Caz* の発現が減少し、climbing assay では運動機能が低下しており、運動ニューロンの synaptic branch の短縮が認められた。

② Autophagy：autophagy marker である LC3 遺伝子を用いた GFP-LC3 Tg マウスと ALS モデルである G93ASOD1 Tg マウスを掛け合わせた double Tg マウスを作製し、autophagy を *in vivo* で観察した。*In vivo* イメージングでの GFP 発光シグナルの発現傾向と組織学的変化の結果は一致しており、ALS モデルマウス脊髄での autophagy を *in vivo* で観察できたと考えられた。

- ③ UPS ノックアウトマウス：運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスを作製したところ、振戦様症状と共に運動機能及び握力の低下が認められた。また、神経病理学には運動ニューロンに ALS 関連分子の蓄積等の異常が認められたことから、今後 ALS マウスモデルとしての病態解明への応用が期待される。

(2) 病態

- ① microglia: mSOD1-Tg マウスと野生マウスにおいて成熟に伴う microglia と T 細胞の急性神経傷害への反応性の変化を調べたところ、野生マウスでは成熟に伴いミクログリアと T 細胞の神経保護機能が増加していたが、mSOD1-Tg マウスでは神経細胞脆弱性に一致して microglia と T 細胞の数が減少しており、mSOD1 は microglia と T 細胞の神経細胞保護機能を低下させることが示唆された。
- ② 孤発性 ALS では adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の発現低下が運動ニューロン死を惹起すると推測されている。加齢は ALS の危険因子であるが、ADAR2 発現の加齢による変化は知られていない。野生型マウス脊髄の経時的検討から ADAR2 発現が、脊髄運動ニューロン、特に前角外側に位置する fast fatigable motor neuron に属する大径運動ニューロンで加齢とともに低下することが示された。このことは、孤発性 ALS の加齢による発症頻度増加、発症後の進行速度の加速化に関与している可能性がある。

2) 臨床

(1) 遺伝子変異

- ① *Optineurin (OPTN)*: *Optineurin (OPTN)* 変異を伴う筋萎縮性側索硬化症 (OPTN-ALS) の臨床病理像が報告された。中年発症、進行性の上位・下位運動ニューロン症候に加えて手指変形が認められ、病理では運動神経細胞脱落の他に劣性変異例では黒質・被殻・淡蒼球の変性が見られた。残存運動神経細胞の Golgi 装置は断片化し、神経細胞およびグリア細胞の細胞質内に TDP-43 陽性封入体が観察された。OPTN-ALS は孤発性 ALS と共通の機序で発症している可能性が示唆された。
- ② *C9ORF72*: 本邦家族性 ALS の発端者 58 例中 2 例 (3.4%) で *C9ORF72* 遺伝子イントロン 1 内の GGGGCC リピートに異常伸長が認められた。2 例とも欧米人の c9FTD/ALS に関連するリスクアレルを 43 kb にわたり共有していたことから、非欧米人種においても欧米人と同様のリスクハプロタイプを有し、そこから新規に異常伸長が生じる可能性が考えられた。神経病理は典型的な孤発性 ALS と類似するが、海馬と小脳に p62 陽性、TDP-43 陰性の細胞質内封入体を認め、欧米人の c9FTD/ALS と同様の特徴を有することが明らかにされた。

(2) 電気生理、病態

- ① ALS における正中運動神経軸索の持続性 Na 電流増大と予後の関連について検討した結果、持続性 Na 電流増大は生存期間と有意に逆相関しており、年齢、発症部位など既知の因子とは独立した強力な予後不良因子であることが示された。持続性 Na 電流増大に由来する軸索の過剰興奮性は、軸索内への過剰な Na 電流の流入を介して、運動ニューロン死を加速させることが示唆され、持続性 Na チャネル阻害薬は新規治療法になる可能性が示された。
- ② Awaji アルゴリズム (Awaji-Ar) と改訂版 El Escorial 基準 (R-EEC) の診断感度について多

数の ALS 例で比較・検討した結果、Confirmed ALS の割合は R-EEC で 43%、Awaji-Ar で 37% と報告された。その差異は、上位運動ニューロン徴候が 1 領域のみの例は R-EEC では probable laboratory supported であるが、Awaji-Ar では possible ALS に分類されることによると考えられた。今後の診断感度向上に寄与する所見である。

- ③ ALS 患者の fasciculation potential (FP) を検出し、その出現頻度と生命予後との相関を検討した結果、4 相以上を示す complex FP (CFP) は、下肢筋よりも上肢筋で高率に出現することが報告された。また、CFP(+)群は有意に予後不良であり、CFP は ALS の予後規定因子の一つであることが示唆された。
- ④ 神経変性疾患で蓄積するタンパク質は細胞間伝播能を有するとされ、一まとめにして prionoid と呼ばれ、ALS でも同様の機序が作用すると推測されている。その検証のために、頸髄以上で初発した ALS 例で、離れた髄節で支配される下部胸腰髄の 2 筋ペアで針筋電図を行ったところ、ペア筋のより尾側の髄節支配筋にのみ安静時自発電位を認めたことが報告された。このことは病変が跳躍して拡大することを示しており、prionoid 仮説とは相容れない所見である。
- ⑤ ALS 患者の横隔膜の厚みをエコーにて測定し呼吸機能との関連性を調べた結果、横隔膜厚変化率 (TR) は呼吸機能と相関を認め、pCO₂ の上昇が認められる前に呼吸機能の悪化を捕捉できる可能性が示された。
- ⑥ 注意能力は PSP において障害が顕著であったが、ALS では保持されていることが示された。また、PSP 患者の書字では脱字や文字ミスは軽度であり、ALS の書字障害は注意機能障害に起因している可能性は低いと考えられた。
- ⑦ TPPV を導入後、剖検にて ALS と診断された 29 例について、後方視的に意思伝達能力を調査し、その程度を stage I-V に分類、各 stage の臨床特徴を調べたところ、TPPV 装着を早期に要した例は、意思伝達能力も早期に失われる傾向が示された。

(3) 疫学

- ① JaCALS : JaCALS 登録例での NPPV、TPPV の導入率、導入患者の臨床的背景、導入後の転帰と ADL が報告された。死亡または TPPV 導入を endpoint とし、TPPV 導入後も 1 年間の予後と ADL が調査された。NPPV 導入率は 27.8% で若年発症例と下肢型で高く、TPPV 導入率は 21.2% で若年発症例と NPPV を経ている患者で高かった。TPPV 導入後の 1 年生存率は 83.3% であった。TPPV 導入 1 年後でも経口摂取機能は 18% の、上肢機能は 23% の患者で残存していた。我が国の ALS に対する換気補助療法の現状、NPPV および TPPV 導入後の生存、ADL などの予後を明らかにされ、ALS 患者呼吸管理方針決定の際に患者や介護者へ提示できる情報として重要と考えられる。
- ② 紀伊 ALS/PDC : 臨床病理学的検索と過去の登録症例 105 例の疫学的検討がなされた結果、古典的 ALS (cALS) 群と dementia plus ALS/parkinsonism 症候群に区別され、cALS 群が激減して 1980 年代から dementia plus 症候群が増加したこと、ALS/PDC は 1957 年以降の出生者には発生していないことが明らかになった。紀伊 ALS/PDC は、ALS 病理と tauopathy の両面を有し、遺伝・環境要因が発症に絡んでいることが示唆された。

(4) 病理

- ① Cajal 小体：核内蛋白である TAR DNA binding protein of 43 kDa(TDP-43)と核内小体の一つである Cajal 小体の関連に着目し、ALS 脊髄と培養細胞で検索した結果、培養細胞中の内在性 TDP-43 の発現抑制による Cajal 小体の減少が示された。また弧発性 ALS の脊髄前角細胞中の Cajal 小体数が減少していることも明らかにされた。
- ② 動眼神経核の TDP-43：リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) 抗体を用いて、ALS と対照例の動眼神経核細胞での陽性構造を検索した結果、対照 112 例中高齢者優位に 18 例で糸状の pTDP-43 陽性構造物を細胞質内に認めたことが報告され、加齢との関係が示唆された。一方、27 例の ALS 群のうち 13 例 (48.1%) に、動眼神経核内の神経細胞胞体内に pTDP-43 陽性構造物が観察された。
- ③ ataxin 2 (ATX2)：ATX2 の polyQ 鎖軽度伸長は ALS の危険因子であるとの知見に基づき、SCA2 患者の中樞神経系を検索した結果、pTDP-43 陽性構造物が広く出現していることが報告された。その分布は、ALS の type1 (Nishihira ら)型であったが、2 次運動ニューロンには認められなかった。pTDP-43 陽性封入体が polyQ 抗体で認識されないことから、protein-protein interaction の可能性は低いと考えられた。
- ④ ALS と AGD の共存：ALS 37 連続剖検例で AGD 共存の有無を検討した結果、14 例 (38%) で大脳辺縁系を中心に AGD 病変が認められたことが報告された。この出現頻度は、対照例より高く、ALS では AGD を合併し易い可能性が示された。
- ⑤ 滋賀型 HMSN-P：proximal-dominant hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN-P) の 1 剖検例を神経病理学的に検索した結果、脳幹・脊髄の運動および感覚神経において Optineurin、TDP-43 陽性封入体を伴う変性を認めたことから、HMSN-P は sensory neuronopathy を伴う家族性運動ニューロン病と捉えることができた。

3) 治療に向けての基礎研究

- (1) 免疫療法：SOD1 変異 ALS モデルマウスにおいて SOD1 蛋白を抗原とする免疫療法の有効性が報告されているが、SOD1 蛋白凝集のコアとなるプロテアーゼ耐性ペプチド領域 3 ヶ所 {12-23AA (SOD1^{G12-K23})、93-115AA (SOD1^{G93-R115})、137-153AA (SOD1^{T137-Q153})} に対する抗体で免疫治療実験では治療効果を示せなかった。

4) 脊髄性筋萎縮症 SMA

- (1) *SMN* 正常例の遺伝子探索：*SMN* 変異を欠く SMA IV 型症例に対し、次世代 sequencer による全 exome 解析を行った結果、共通するアミノ酸置換を伴うヘテロ新規遺伝子変異 54 個の同定が報告された。この中には *SMN* タンパク質と関連するタンパク質の遺伝子や脊髄で発現する新規 SNP が含まれていた。ALS の原因遺伝子である *SETX* の新規 SNP も同定された。
- (2) 成人発症 SMA の臨床・遺伝：発症後 5 年以上、ごく緩徐な進行で下位運動ニューロン症候のみで推移した成人症例を成人型脊髄性筋萎縮症 (SMA) と定義すると、運動ニューロン疾患 302 例中 11 例が該当した。平均年齢は 52.9 歳 (M4、F7) で、2 家系 2 例で家族歴があり、大多数の初発症状は一側上肢または一側下肢の遠位筋優位の筋力低下であった。*SMN*

及び NAIP 変異の変異は見られなかった。SMN 変異(+) SMA 成人発症報告例は下肢近位筋対称性の発症であり、自験例症例群は遺伝学的にも、症候学的にも heterogenous である可能性が考えられた。

- 5) 前頭側頭葉変性症 (FTLD) : FTLD の多くは分子遺伝学的・蛋白化学的に ALS と密接な関係を有する。そこで、本邦の FTLD の実態を把握すべく、手始めとして鳥取県からその調査を開始した。同県内の FTLD 患者数を把握するため神経内科および精神科に対してアンケート調査を行った結果、66 例が FTLD と診断された。サブタイプは前頭側頭型認知症 (FTD) が 62 例、進行性非流暢性失語症 (PNFA) 3 例および意味性認知症 (SD) 1 例であった。FTD のうち、運動ニューロン疾患を伴う FTD が 5 例で FTDP-17 が 1 例であった。2011 年 10 月の鳥取県人口を基に 10 万人あたりの粗有病率は、全人口では 11.2/10 万人 (95%信頼区間=8.8~13.6) であった。我が国の人口を基準とした訂正有病率は 9.5/10 万人であり、我が国の FTLD 患者数は 1 万 2000 人と推計された。今後、診断基準の策定、バイオマーカーの探索等を進め、診断の精度を高めたい。

【3】舞踏運動関連疾患

- 1) テトラベナジン治験:我が国でも HD に対してテトラベナジン TBZ の臨床試験が開始された。3 症例についてプロトコールに従い TBZ の投与を行った結果、運動症状の軽快が得られたことが報告された。一例でアカシジアが発現したが、他に有害事象は無かった。薬物効果の発現は 50mg を超えた頃から認められ、一例はこれに到達する以前に精神症状のために脱落した。直接比較は無いものの、従来の抗精神病薬よりも運動症状の抑制効果がより明らかであった。現在、長期薬物効果を検討するために継続投与中である。
- 2) chorea-acanthocytosis (ChAc) : 本症の分子病態は不明であり、原因遺伝子 VPS13A 遺伝子の産物 chorein の機能も未解明である。脱共役剤 (CCCP) 添加でミトコンドリアを傷害すると chorein はミトコンドリアに集積し、chorein 強制発現細胞では細胞死が抑制されることが報告された。これらの結果から、chorein はミトコンドリアの品質管理に関わっている可能性があり、その機構が破綻することが ChAc の分子病態のひとつであることが示唆された。

IV. ALS 分科班:変性班本体とは別個にワークショップと班会議を実施した。班会議では多数の優れた業績が発表された。詳細は分科班の実績報告書を参照されたい。

DJ-1 の細胞内局在に関する検討

研究分担者 服部信孝¹⁾

研究協力者 宇佐見由希子¹⁾，波田野琢¹⁾，久保紳一郎¹⁾，佐藤栄人¹⁾，
斉木臣二¹⁾，大場雄介²⁾，有賀寛芳³⁾

1)順天堂大学脳神経内科，2)北海道大学病理学病態医科学分野，3)北海道大学薬学部分子生物学分野

研究要旨

DJ-1 は常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因蛋白の一つであり，その細胞内局在を解明することでパーキンソン病の病態解明につながると考え検討した。DJ-1 は Rab3A および synaptophysin と同一のシナプス小胞に局在していることが判明した。また，DJ-1 は他の蛋白を介さず細胞膜に直接結合する。また，L166P 変異型は野生型と比較して膜への結合能が低い可能性を示した。DJ-1 はシナプス小胞に局在し膜輸送の機能を持ち，その破綻が病気の原因となる可能性が示された。

A. 研究目的

DJ-1 は常染色体劣性遺伝性パーキンソン病 (PARK7) の原因蛋白であり，抗酸化作用，転写調節，シャペロン機能など多機能をもつ蛋白として報告されている。局在については酸化ストレスに関与しミトコンドリアに局在するとされているが，内因性 DJ-1 の正確な局在についてはほとんど検討されていない。一方で，*DJ-1* ノックアウトマウスではドパミン放出異常やドパミントランスポーターの発現に異常を認めており，DJ-1 はシナプス終末において膜輸送に関与していることが予想される。そこで，我々は内因性 DJ-1 の局在を詳細に検討した。

B. 研究方法

野生型マウス脳より単離したシナプトソームについて western-blot 法を用いて，DJ-1 の局在を検討し，小胞輸送に関わる Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質と比較検討した。また，シナプトソームのシナプス小胞を含む画分を用いて immunoprecipitation 法および immunoisolation 法を行い，DJ-1 と共局在する蛋白質について検討を行った。培養細胞を用いて免疫学的染色法にて細胞内局在を検討し，DJ-1 とシナプス小胞マーカ一との Förster resonance energy transfer

(FRET) assay を施行した。さらに，

DJ-1 リコンビナント蛋白を用いて membrane binding assay を検討した。すべての動物実験は『順天堂大学医学部実験動物に関する指針』に則って行った。

C. 研究結果

神経終末部の DJ-1 の局在を検討するために，マウス脳のシナプトソーム分画法を施行した。DJ-1 は synaptosomes(P2') に局在しており，synaptic plasma membranes(LP1) 及び synaptic vesicles(LP2) にも局在していることを確認した。さらにマウス脳 LS1 画分を，シヨ糖密度勾配法を用いてさらに詳細に分画したところ，DJ-1 は cytosol fraction だけではなく vesicle fraction に免疫活性を呈しており，vesicle fraction の peak (13 ~14 fractions) は synaptophysin 及び Rab3A の peak に近く，それら蛋白が関連する小胞に局在する可能性が考えられた (Figure 1A, B)。この結果をふまえて，マウス神経初代培養細胞を DJ-1, synaptophysin 及び Rab3A について免疫染色したところ共局在していることを明らかにした (Figure 1C)。

DJ-1 が synaptophysin のあるシナプス小胞上に局在する可能性があるため LS1 画分を用いて