

Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y,
Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann
DMA, Tamaoka A. Molecular analysis and
biochemical classification of TDP-43
proteinopathy. Brain 2012;135:3380-91. doi:
10.1093/brain/aws230. Epub 2012 Oct 3.

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
- 2.実用新案登録
- 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）
筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新規治療法創出に関する研究班
（分担）研究報告書

家族性筋萎縮性側索硬化症 ALS-6 の病因蛋白質 FUS の蓄積により発病する前頭側頭型認知症の神経病理学的解析

研究分担者：秋山治彦¹⁾

研究協力者：小林 禅¹⁾，青木直哉¹⁾，河上緒¹⁾，東 晋二¹⁾

所 属：¹⁾東京医学総合研究所

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) から前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLT) にまたがる疾患の病因蛋白質として TDP-43 について、fused in sarcoma:FUS が同定された。FUS の遺伝子変異は好塩基性封入体を伴う家族性 ALS (ALS-6) の原因であり、同時に ALS-6 脳脊髄には FUS の異常蓄積が認められる。一方、非家族性に発病する FTLT のうち、タウ陰性・TDP-43 陰性の群の大半に FUS 異常蓄積～神経細胞内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusion: NCI) が見出され、FTLT-FUS と呼ばれるようになった。FUS 陽性 NCI を認める FTLT には、従来、それぞれ好塩基性封入体病 (basophilic inclusion body disease: BIBD)、神経細胞中間径フィラメント封入体病 (neuronal intermediate filament inclusion disease: NIFID)、ユビキチン封入体を伴う非定型的 FTLT (atypical FTLT with ubiquitin inclusions: aFTLT-U) と呼ばれていた 3 疾患が含まれ、現在これらは FTLT-FUS の亜型とされている。このうち BIBD と NIFID は運動ニューロン系の変性を伴うとされている。本研究では本邦における FTLT-FUS について、それぞれの病型の頻度、特徴などを臨床神経病理学的に解析し、西欧からの報告と比較した。FTLT については 1990 年代に Lund と Manchester のグループが旧ピック病の概念を整理した時から、本邦では、その病型に民族的な特異性があると指摘がなされてきたが、本研究の結果、FTLT-FUS においても、同様に、西欧諸国と本邦との間に違いがあることが明らかになった。

A. 研究目的

1990 年代に Lund と Manchester のグループが旧ピック病の概念を前頭側頭葉変性症

(frontotemporal lobar degeneration: FTLT) として整理、分類した時から、西欧諸国と本邦とで病型の違いがあるのではないかという指摘がなされてきた。従来、この相違は主として遺伝的な背景にもとづくとしてきたが（たとえば、本邦では家族性に発症する FTLT は西欧に比べて少ない。また西欧では家族性 FTLT のうち最も多いのはプログラニュリン (progranulin: GRN) 変異例とされるが、本邦では大半がタウ変異例であり、GRN 変異家系はきわめて稀である）、実際には遺伝性の発病様式をとらない孤発性 FTLT においても民族差が認められる。た

たとえば、本邦では TDP-43 が異常蓄積する FTLT (FTLT-TDP) の亜型うち、病理学的には type-1/C が多く、これは臨床病型として意味性認知症が多いことと一致する。本研究では、本邦における fused in sarcoma: FUS が蓄積する FTLT (FTLT-FUS) について臨床神経病理学的な解析を行い、西欧諸国から出されている報告との相違点を検討する。

B. 研究方法

まず、1973 年以降、当研究室に蓄積された 66 例の FTLT の脳病理組織標本について、tau, TDP-43, FUS の免疫組織化学染色を行い、異常蓄積蛋白質による分類を行った。その結果、66 例中 27 例が FTLT-tau, 29 例が FTLT-TDP で、残り 10 例のうち

9例がFTLD-FUSであった。最後の1例は非常に古い標本でもあり、現時点では異常蓄積蛋白質の同定ができていない。

FTLD-FUSの病理学的な病型分類はこれまでの文献にもとづいておこなった(Mackenzie et al. *Acta Neuropathol* 2010等)。すなわち、BIBDはHE染色で相当数の細胞体内封入体(neuronal cytoplasmic inclusions: NCI)が確認でき、FUS免疫組織化学染色においてNCIの形態は円形・楕円形のものから半月様～馬蹄形まで多様、また核内封入体(neuronal intranuclear inclusions: NII)は稀; NIFIDはNCIの形態はBIBDとは必ずしも明確に区別できないが、 α -internexin免疫染色に明らかに陽性、NIIが稀である点はBIBDと同様; aFTLD-Uにおいては、NCIをHE染色で見つけることが難しく、NCIの形態は小型・円形のもので大半を占める、ubiquitinやFUS染色で多数のNIIを認める。

(倫理面への配慮)

剖検脳の解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理基準に準拠することとし、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。すべての研究計画は東京都精神医学総合研究所(23年度に東京都医学総合研究所に改組)の倫理委員会の審査承認を受けた。

C. 研究結果

本研究では9例のFTLD-FUSを対象としたが、これらの症例のうち、6例は既に臨床病理学的な報告がなされている症例である(Yokota, et al., *Acta Neuropathol*, 2008)。9例の平均発症年齢は44歳で、発症から剖検までの平均罹病期間は8.5年、臨床像は9例中7例がbehavioral variant of FTDであった。

神経病理学的には5例がBIBD、2例がNIFIDと診断された。BIBDと判断された例のうち2例では α -internexinに弱陽性の封入体が散見された。9例中、残りの2例はHEでNCIが明瞭ではなく、ま

た、うち1例は文献的に言われているよりもはるかに少ないがNIIが認められたことからaFTLD-Uである可能性がある判断された。もう1例はFUS蓄積がほとんどdystrophic neuriteの形態をとる特異な病理像を示し、かつ病期の大半をbvFTDとして経過した後にALSを発症して、病理学的にもALS-TDPに合致するTDP-43病変を合併した例であった。本例は、従来のFTLD-FUSの3病型のいずれにも属さないと考えられた(業績#.)。

D. 考察

一般に剖検は特異な臨床像を呈した症例について行われる傾向があり、また本研究室は一般病院からそのような症例の病理学的解析を依頼されることがあることから、蓄積された症例全体の中の稀少疾患の割合は実態より高くなると考えられる。それを考慮に入れたとしても、FTLD-FUSはFTLD全体の14%、タウ陰性FTLDの23%を占め、40歳代前後の早期発症のFTLDの場合は常にその可能性を考慮すべき疾患であると思われる。このFTLD-FUS全体の頻度は文献で報告されている西欧諸国の剖検例の場合に比較的近い。

一方、FTLD-FUSの垂型の頻度については明らかな本邦の特徴が見出された。すなわち西欧諸国ではaFTLD-Uが最も多い垂型であるのに対して、我々の9例のうち7例がBIBDであり、aFTLD-Uは1例のみ、それも病理像はNIIの頻度が低いなど、典型的なaFTLD-Uとは言い難い面があった。

BIBDとNIFIDの鑑別点はNCIの α -internexin染色性が決め手になるとされるが、神経細胞の中間径フィラメントは、軸索輸送などの神経細胞の活動が障害されることにより非特異的に蓄積することがしばしばあり、今回の検討でも2例のBIBDにおいて少数の α -internexin陽性NCIが認められたほか、細胞質のびまん性 α -internexin蓄積はさらに多くの例で認められた。BIBDにおける好塩基性封入体の「好塩基性」が明瞭でないこととあわせ、両者の鑑別には慎重であることが求められる。

なお現時点でNIFIDと判断される症例について

は、必ずしも均一の群ではない可能性を考慮しておく必要があると思われる。

E. 結論

現時点では FTL-D-FUS の 3 病型の分類は、典型例においては明確であるものの、全ての症例においてその境界が明瞭であるとは言い難い面がある。また本邦では西欧諸国に比べて aFTLD-U が少なく、BIBD が症例の過半数以上を占めるといった特徴が見られた。FTLD-FUS が ALS-FUS と異なり孤発性の疾患であることを考えると、このような民族差は今後の FUS 異常蓄積機序の解明の鍵となる可能性がある

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M, Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 2012 7(12), e52389
2. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 2012, 135(Pat11): 3380-3391 doi:10.1093/brain/aws230
3. Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H, Atypical FTL-D-FUS associated with ALS-TDP: A case report. *Neuropathology* doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01325.x. [2012, Epub ahead of print]
4. Suzuki N, Kato S, Kato M, Warita H, Mizuno H, Kato M, Shimakura N, Akiyama H, Kobayashi Z, Konno H, Aoki M, FUS/TLS-immunoreactive neuronal and glial cell inclusions increase with disease duration in familial amyotrophic lateral sclerosis with an R521C FUS/TLS mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71:779-788.
5. Aoki N, Higashi S, Kawakami I, Kobayashi Z, Hosokawa M, Katsuse O, Togo T, Hirayasu Y, Akiyama H, Localization of fused in sarcoma (FUS) protein to the post-synaptic density in the brain. *Acta Neuropathol* 2012; 124:383-394.
6. Maesako M, Uemura K, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Ando K, Kubota M, Akiyama H, Takahashi R, Kihara T, Shimohama S, Kinoshita A, Gain of function by phosphorylation in Presenilin 1-mediated regulation of insulin signaling. *J Neurochem* 2012; 121:964-973. Lue LF, Walker DG, Adler CH, Shill H, Tran H, Akiyama H, Sue LI, Caviness J, Sabbagh MN, Beach TG,

Biochemical increase in phosphorylated alpha-synuclein precedes histopathology of lewy-type synucleinopathies. *Brain Pathol* 2012; 22:745-756.

7. Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A, Hasegawa M, Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417:116-121
8. Akiyama H, Hosokawa M, Kametani F, Kondo H, Chiba M, Fukushima M, Tabira T, Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in A β PP and A β PP/tau transgenic mice. *Neuropathology* 2012; 32:390-397.
9. Aoki N, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Arai T, Togo T, Miyazaki H, Kondo H, Ishizu H, Uchikado H, Katsuse O, Hirayasu Y, Akiyama H, Progressive nonfluent aphasia: a rare clinical subtype of FTL-D-TDP in Japan. *Neuropathology* 2012; 32:272-279.
10. Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Gerhard A, Allsop D, Mann DM, Postmortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 2012; 45:188-195.

2. 学会発表

1. 高橋晶, 新井哲明, 水上勝義, 近藤ひろみ, 大島健一, 新里和弘, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆. レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄の α シヌクレイン陽性構造の比較検討. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
2. 堀映, 秋山治彦. 稀な頭部外傷 その 1: 脳銃創一急死例. 亜急性例, 生存例計 7 例の分析. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
3. 河上緒, 東晋二, 青木直哉, 新里和弘, 大島健一, 安野みどり, 羽賀千恵, 下村洋子, 鈴木京子, 勝瀬大海, 都甲崇, 小林禅, 辻浩史, 玉岡晃, 長谷川成人, 新井哲明, 土谷邦秋, 平安良雄, 秋山治彦. 進行性失語が前景に立った運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症の二剖検例. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
4. 後藤潤, 後藤昇, 秋山治彦, 塩田清二. 被殻出血が被殻の外側部分に位置する理由. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
5. 望月葉子, 川田昭広, 新井誠, 本間琢, 渡部和彦, 秋山治彦, 川上秀史, 小森隆司, 水谷俊雄, 松原四郎. 橋核の神経細胞も脱落し, FUS 陽性構造物が広範囲な変性部位に出現したが, FUS/TLS 遺伝子変異が認められなかった家族性 ALS の 1 例. 第 53 回日本神経病理学会 (新潟, 6月28日~30日)
6. 河上緒, 新井哲明, 池田研二, 大島健一, 新里和弘, 東晋二, 青木直哉, 水上勝義, 平安良雄, 秋山治彦. 老年期発症の幻覚妄想を認め, 辺縁系に高度タウ病変を呈した 3 剖検例. 第 31 回日本認知症学会 (つくば, 10月26日~28日)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし.

TDP-43 proteinopathy 動物モデルの構築

研究分担者：細川雅人¹⁾

研究協力者：新井哲明^{1)・2)}，野中隆³⁾，増田一鈴掛雅美³⁾，長谷川成人³⁾，秋山治彦¹⁾

¹⁾ 財団法人東京都医学総合研究所 高次脳機能研究分野 認知症プロジェクト

²⁾ 筑波大学医学医療系臨床医学域精神医学

³⁾ 財団法人東京都医学総合研究所 病態細胞生物学

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症メカニズムを明らかにしていくとともに、病態モデルマウスを用いた薬物のスクリーニング及び薬物治療へつなげるために、TDP-43 proteinopathy モデルマウスの作製をおこなった。TDP-43 の病変加速を期待し、プログラニュリンの発現量が低下した神経変性疾患モデルマウスを作製した。各タンパク質の異常蓄積を同月齢の単独 Tg と比較して病変加速の有無を検討し、ALS の病理像が再現されることを確認した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)の病理マーカーの一つである脊髄のユビキチン陽性封入体の主要構成タンパクと、前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration: FTLD) で観察されるタウ陰性ユビキチン陽性封入体の主要構成タンパクが、2006年、TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)であることが判明した。この封入体を有する FTLD の一部には ALS と同様の運動ニューロン疾患が合併することがすでに知られていたが、TDP-43 の発見により、FTLD と ALS が同一の病理基盤を有することが明らかになった。

さらに2006年にTDP-43異常蓄積を伴う家族性FTLDの原因遺伝子の一つとしてグラニュリン(granulin: GRN)が同定された。GRN遺伝子の変異によりプログラニュリン(progranulin: PGRN)の機能低下がTDP-43異常を促進し、FTLDが発症すると考えられている。

これらの神経変性疾患関連タンパク質の異常が相互にどのような影響を与えるかを明らかにするため、TDP-43 Tg マウスと GRN ノックアウトマウス(KO)を交配し、PGRN の発現量が低下した神経変性疾患モデルマウスを作製した。タンパク質の異常蓄積を同

月齢の単独 Tg マウスと比較して病変加速の有無を検討し、TDP-43 蓄積と神経変性疾患の関連を調べた。これらにより ALS 発症のメカニズムを明らかにしていくとともに、TDP-43 proteinopathy モデルマウスを用いた薬物のスクリーニングへつなげる事を目的としている。

B. 研究方法

1) PGRN 機能低下 TDP-43 proteinopathy モデル動物の作製

理化学研究所より GRN hemizygote マウスを入手し、交配により GRN-KO マウスを作製した。このマウスと本研究所病態細胞生物学研究チームにより作製された TDP-43 (G298S), TDP-43 (M337V) マウスとの交配をおこない TDP-43 (G298S)/PGRN+/-, TDP-43 (M337V)/PGRN+/- を作製した。

2) 免疫組織化学的検討

トランスジェニックマウスを十分に加齢させた後、脳と脊髄を4%パラフォルムアルデヒドで固定後10-30 μ mの厚さで切片を作製し、ビオチン化抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410 モノクローナル抗体)により免疫組織化学染色を行った。

(倫理面への配慮)

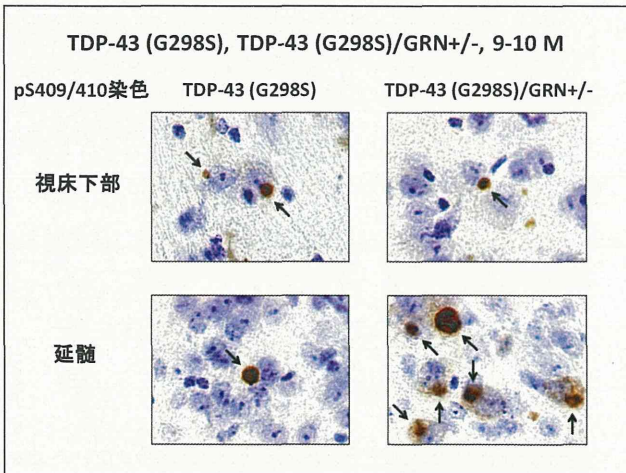
実験動物は実験動物の倫理基準に準じて実施した。具体的な実験計画は本報告者の所属研究所における動物実験倫理委員会において承認を受けた。

C. 研究結果

PGRN 機能低下 TDP-43 proteinopathy モデル動物の作製と免疫組織化学的検討

GRN hemizygote マウスの交配により GRN-KO マウスを作製した。このマウスと本研究所・病態細胞生物学チームにより作製された TDP-43 (G298S)、TDP-43 (M337V) マウスとの交配を行い、TDP-43 (G298S)/GRN+/-、TDP-43 (M337V)/GRN+/- マウスを作製後、解析可能な月齢になるまで十分に加齢させた。

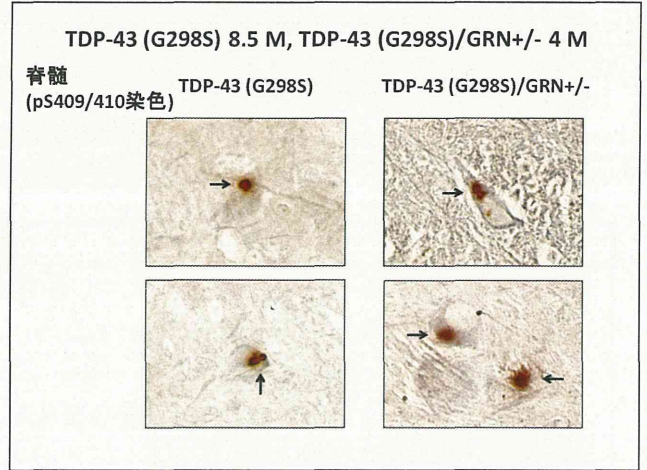
TDP-43 の異常蓄積が加速しているかどうかに関して TDP-43/GRN+/- マウスと TDP-43 単独 Tg マウスとの比較を行った。9-10 ヶ月齢の TDP-43 (G298S)/GRN+/-、TDP-43 (G298S) マウス脳を抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410) で染色したところ、どちらの系統においても視床下部と延髄の特定の神経核で、リン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体が観察された。その数は延髄において TDP-43 (G298S)/GRN+/- マウスの方が多傾向にあった (図 1)。



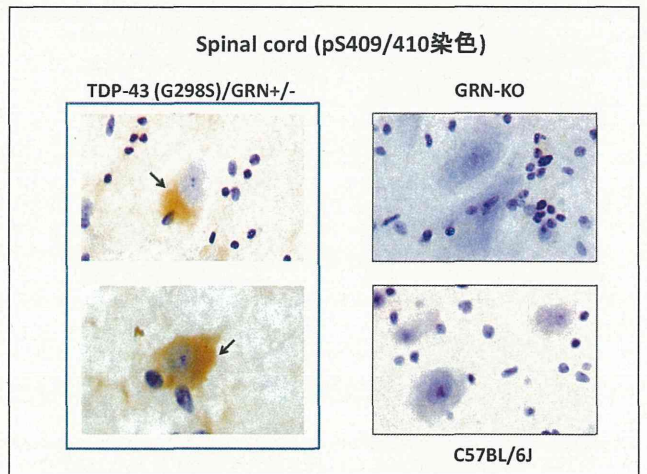
(図 1) TDP-43 (G298S), TDP-43 (G298S)/GRN+/- マウス脳の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色：神経細胞の細胞質内に TDP-43 陽性封入体が観察された (矢印)。

また、TDP-43 (G298S) と TDP-43 (G298S)/GRN+/- マウスの脊髄を抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410) で

染色したところ、どちらの系統においてもリン酸化 TDP-43 の封入体が観察された (図 2)。一部の脊髄神経細胞では、細胞質にびまん性に染色された。GRN-KO, C57BL/6J マウスの脊髄では pS409/410 抗体陽性染色は観察されなかった (図 3)。



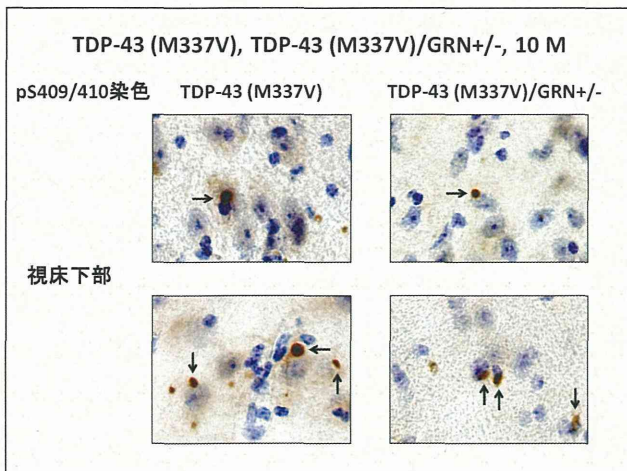
(図 2) TDP-43 (G298S), TDP-43 (G298S)/GRN+/- マウス脊髄の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色：神経細胞の細胞質内に TDP-43 陽性封入体が観察された (矢印)。



(図 3) TDP-43 (G298S)/GRN+/-, GRN-KO, C57BL/6J マウス脊髄の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色：神経細胞の細胞質内に TDP-43 陽性の染色像が観察された (矢印)。

さらに、TDP-43 の異常蓄積が加速しているかどうかに関して 10 ヶ月齢の TDP-43 (M337V)/GRN+/-、TDP-43 (M337V) マウス脳を抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410) で染色した。どちらの系統においても視床下部で、リン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体様構造が観察された。これまでのところ、視床下部でのみ

リン酸化 TDP-43 陽性封入体が観察されており、延髄においては観察されなかった (図 4)。



(図 4) TDP-43 (M337V), TDP-43 (M337V)/GRN+/-マウス脳の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色：神経細胞の細胞質内に TDP-43 陽性封入体が観察された (矢印)。

D. 考察

TDP-43 異常蓄積を伴う家族性 FTLD の原因遺伝子である GRN を欠損した TDP-43 (G298S)/GRN+/-、TDP-43 (M337V)/GRN+/-マウスを作製した。作製したマウスを加齢後、TDP-43 蓄積に関して免疫組織化学的検討を行った。

その結果、TDP-43 (G298S)マウス、TDP-43 (G298S)/GRN+/-マウスの脊髄神経細胞、脳の神経細胞において、細胞質内にリン酸化 TDP-43 抗体陽性の封入体が観察された (研究開始当初の観察から、TDP-43 (G298S) 単独 Tg マウスでは十分な ALS の病理像が得られなかったが、今回はどちらの系統でも TDP-43 の封入体が観察された)。今回の結果からは GRN 遺伝子欠損が ALS の病変加速をひきおこしたかどうかは明らかになっていないが、TDP-43 (G298S)/GRN+/-の延髄でリン酸化 TDP-43 抗体陽性封入体の数が多い傾向にあった。今後は検体数を増やし、GRN 欠損が病変加速を引き起こすか、また ALS モデルマウスとして使用できるかどうかを検討する必要がある。

TDP-43 (M337V)、TDP-43 (M337V)/GRN+/-マウス脳の抗リン酸化 TDP-43 抗体による染色では、両系統ともリン酸化 TDP-43 陽性封入体が視床下部でのみ観

察された。M337V 系統に関しては GRN 欠損における明らかな病変加速効果は観察されなかった。

E. 結論

ALS の発症機序解明とその治療法・治療薬開発のため、TDP-43 proteinopathy モデルマウスを確立することが急務である。今回解析したトランスジェニックマウスはその候補となる可能性がある。また、GRN 欠損 TDP-43 トランスジェニックマウスにおける病変加速の有無に関しては、さらなる詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- Akiyama H, Hosokawa M, Kametani F, Kondo H, Chiba M, Fukushima M, Tabira T. Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in A β PP and A β PP/tau transgenic mice. *Neuropathology* 32(4):390-397 (2012)
- Aoki N, Higashi S, Kawakami I, Kobayashi Z, Hosokawa M, Katsuse O, Togo T, Hirayasu Y, Akiyama H. Localization of fused in sarcoma (FUS) protein to the post-synaptic density in the brain. *Acta Neuropathologica* 124(3):383-394 (2012)
- Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H. Atypical FTLD-FUS associated with ALS-TDP: A case report. *Neuropathology* May 29. Doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01325.x. [Epub ahead of print] (2012)
- 新井哲明, 細川雅人, 野中隆, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆 前頭側頭葉変性症の分子医学 *Dementia Japan* 26(3):334-342 (2012)
- Mochizuki Y, Isozaki E, Takao M, Hashimoto T, Shibuya M, Arai M, Hosokawa M, Kawata A, Oyanagi K, Mihara B, Mizutani T. Familial ALS with FUS P525L mutation: two Japanese sisters with multiple systems involvement. *Journal of the Neurological Sciences* 323(1-2):85-92 (2012)
- Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A.

Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135(Pt 11):3380-91 (2012)

7. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M. Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS ONE* 7(12):e52389. doi: 10.1371/journal.pone.0052389 (2012)
 8. Sharmin T, Satho T, Irie K, Watanabe M, Hosokawa M, Hiramatsu Y, Talukder P, Okuno T, Tsuruda S, Uyeda S, Tamura Y, Nakashima Y, Eyanagi R, Toda A, Kashige N, Miake F. Pyriproxyfen enhances the immunoglobulin G immune response in mice. *Microbiology and Immunology*, in press
 9. Akitake Y, Nakatani Y, Kamei D, Hosokawa M, Akatsu H, Uematsu S, Akira S, Kudo I, Hara S, Takahashi M. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in Alzheimer's disease and its deletion mitigates Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. *Journal of Neuroscience Research*, in press
- ## 2. 学会発表
1. メチレンブルーによるリン酸化タウ蓄積抑制効果の検討. 細川雅人、新井哲明、野中隆、山下万貴子、鈴掛雅美、辻浩史、長谷川成人、秋山治彦 演題番号: 29P1-am081 第132回日本薬学会, 札幌 2012年3月29日
 2. Changes in progranulin expression following focal cerebral ischemia associated with microglial activation in mice. Furukawa A, Irie K, Akitake Y, Hosokawa M, Nakano T, Muroi C, Sakamoto Y, Hiramatsu Y, Uyeda S, Fukumitsu Y, Satho T, Kashige N, Miake F, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. 演題番号: 2PJ-152 第89回日本生理学会, 松本 2012年3月30日
 3. Screening of The SOD1, TARDBP and FUS mutations and the pathological studies in Japanese cases with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Arai T, Arai M, Itokawa M, Yoshida M, Tamaoka A, Kobayashi Z, Hosokawa M, Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamada M, Matsui M, Kaji R, Nakajima K, Kuwano R, Takahashi S, Asada T, Akiyama H. 演題番号: P1-200 Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, BC, Canada 2012年7月15日
 4. Intracellular seeded aggregation and cytotoxic model of TDP-43. Nonaka T, Suzukake M, Yamashita M, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M. 演題番号: P2-143 Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, BC, Canada 2012年7月16日
 5. Methylene blue reduced tau phosphorylation and aggregation in P301L transgenic mice. Hosokawa M, Arai T, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hasegawa M, Akiyama H. 演題番号: P3-331 Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, BC, Canada 2012年7月17日
 6. Inoculation of recombinant alpha-synuclein fibrils can induce alpha-synuclein pathology in wild-type mice. Masuda-Suzukake M, Oikawa T, Hosokawa M, Nonaka T, Hasegawa M. 演題番号: P8 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester, United Kingdom 2012年9月5日
 7. レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄の α -シヌクレイン陽性構造の比較検討. 高橋晶, 新井哲明, 水上勝義, 近藤ひろみ, 大島健一, 新里和弘, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆 演題番号: 039 第31回日本認知症学会, つくば 2012年10月26-27日
 8. α シヌクレイン線維の脳内接種は野生型マウス脳にレビー小体様病理を形成させる. 鈴掛(増田)雅美、笈川貴行、細川雅人、野中隆、秋山治彦、長谷川成人 演題番号: 092 第31回日本認知症学会, つくば 2012年10月26-27日
 9. Progranulin reduction affects tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H. 演題番号: A-459-0001-01234 The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Firenze, Italy 2013年3月8日
 10. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M. 演題番号: A-459-0002-00713, The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Firenze, Italy 2013年3月9日
- ## 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

家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子学的および病理学的研究

新井哲明^{1,2)}，新井誠³⁾，糸川昌成³⁾，吉田眞理⁴⁾，玉岡晃⁵⁾，小林禅⁶⁾，細川雅人²⁾，
野中隆⁷⁾，長谷川成人⁷⁾，辻浩史⁵⁾，川田明広⁸⁾，山田正仁⁹⁾，松井真¹⁰⁾，和泉唯信¹¹⁾，
梶龍兒¹¹⁾，中島健二¹²⁾，桑野良三¹³⁾，朝田隆¹⁾，秋山治彦²⁾，

筑波大学医学医療系臨床医学域精神医学¹⁾，東京都医学総合研究所
認知症・高次脳機能研究分野²⁾，統合失調症・うつ病プロジェクト³⁾，愛知医科大学加齢医科学研究所⁴⁾，
筑波大学医学医療系臨床医学域神経内科⁵⁾，JA とりで総合医療センター神経内科⁶⁾，
東京都医学総合研究所・病態細胞生物学研究室⁷⁾，東京都立神経病院脳神経内科⁸⁾，金沢大学大学院医学研究
科神経内科⁹⁾，金沢医科大学神経内科¹⁰⁾，徳島大学大学院臨床神経科科学分野¹¹⁾，鳥取大学医学部脳神経内科¹²⁾，
新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター・遺伝子機能解析学分野¹³⁾

研究要旨

本邦における32例の家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）および279例の孤発性ALS（SALS）例について、SOD1、TARDBP、FUSの遺伝子解析を行った。その結果、FALSにおける頻度は、SOD1変異が25%、TARDBP変異およびFUS変異が9.4%と欧米とほぼ同様であり、本邦におけるTARDBPおよびFUSの原因遺伝子としての重要性が確認された。TARDBP変異例に蓄積したTDP-43の病理生化学的特徴が、SALSのそれと共通していることから、FALSとSALSは共通の病理過程を示すことが示唆された。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）の約10%が家族性発症（familial ALS: FALS）とされる。最近まで、その原因遺伝子としてSOD1が最も頻度が高いとされ、FALSの20%、個発性ALS（sporadic ALS: SALS）の3%に変異が認められることが報告されていた。FALSにおけるTAR DNA-binding protein of 43 kD（遺伝子：TARDBP、蛋白：TDP-43）、とfused in sarcoma（FUS）の変異の頻度は約5%とされている。さらに、最近、C9ORF72の変異が、FALSおよびSALSにおいて最も頻度が高いことが明らかになった。しかしながら、本邦におけるFALSおよびSALSにおけるこれらの遺伝子変異の頻度については、未だ不明な点が多い。本研究の目的は、本邦のFALSおよびSALSにおけるTARDBPおよびFUSの遺伝子変異の頻度を明らかにするとともに、その病理学的特徴を抽出し、ALSの病態解明に寄与することである。

B.研究方法

本邦におけるFALS例32例、SALS例279例の血液からDNAを抽出し、SOD1、TARDBP、FUSの遺伝子解析を行った。また、TARDBPのG298S変異が同定された1例の剖検脳を用い、免疫組織化学的・生化学的解析を施行し、蓄積したTDP-43の病理生化学的特徴をSALSのそれと比較検討した。

（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にのみ剖検材料を研究に使用した。研究計画全体について当該施設における倫理委員会の承認を得た。

C.研究結果

FALS例32例中、SOD1変異が8例、TARDBP変異が3例、FUS変異が3例に同定された。以上か

ら、各々の変異の FALS における頻度は、SOD1 変異が 25%、TARDBP 変異および FUS 変異が 9.4% であった。SALS 例 279 例では、SOD1 変異が 2 例 (0.72%) に認められたのみであった。

TARDBP の G298S 変異が認められた FALS 例の病理学的解析では、TDP-43 陽性の神経細胞質内封入体およびグリア細胞内封入体が、脊髄、海馬領域、内包、視床等に多数出現していた (図 1)。リン酸化 TDP-43 特異抗体を用いた脳の不溶性画分のイムノブロットでは、45kDa のバンド、~25kDa のバンド、スミアが検出され、SALS 例と同じパターンが認められた。

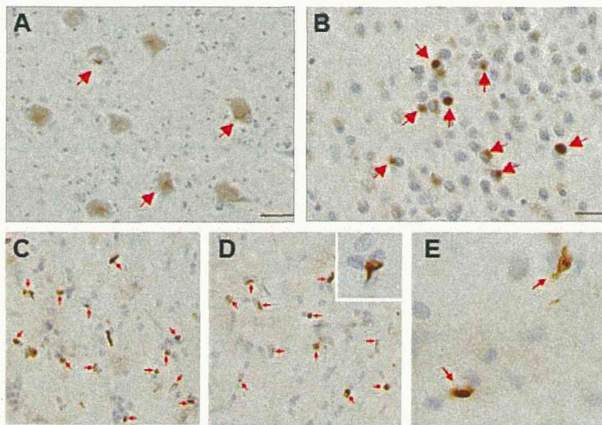


図 1. TARDBP 変異の FALS 例に認められたリン酸化 TDP-43 (pS409/410) 陽性構造. A: 脊髄前角の skein 様封入体 (矢印), B: 海馬歯状回の神経細胞質内封入体 (矢印), 支脚 (C)、内包 (D)、視床 (E)、のグリア細胞内封入体 (矢印)

D. 考察

本研究で得られた FALS 例における SOD1、TARDBP、FUS の遺伝子変異の頻度は、これまでの欧米諸国からの報告とほぼ一致していた。以上から、本邦においても、TARDBP と FUS の変異は、SOD1 に次いで FALS の重要な遺伝子変異であることが示唆された。SALS 例 279 例の解析では、SOD1 変異が 2 例に認められたのみで、TARDBP および FUS の変異は皆無であった。TARDBP に関しては、SALS 例の 1~5% に変異が認められることがこれまで報告されている。いずれにしても頻度は低いが、本邦ではさらに少ない可能性がある。FALS の原因

遺伝子として最も頻度が高いことが最近判明した C9ORF72 変異の頻度については、今後さらに検討する必要がある。

TARDBP の G298S 変異を有する FALS 例の TDP-43 に関する病理生化学的所見は、SALS のそれと特に違いは認められなかった。以上から、FALS 例においても SALS 例と同様の TDP-43 の異常を介した神経変性過程が生じていることが示唆された。このことは、TARDBP の遺伝子変異を導入した細胞モデルや動物モデルを作製し、遺伝子変異から蛋白質蓄積を経て神経変性に至る過程を明らかにすることが、FALS だけでなく SALS の病態解明と治療法の開発につながることを示唆しており、重要である。

E. 結論

本邦の FALS 例における TARDBP および FUS の遺伝子変異の頻度は欧米と同様であり、SOD1 変異よりは頻度は低いものの、FALS の原因遺伝子として極めて重要である。TARDBP 変異例に蓄積した TDP-43 の病理生化学的特徴が、SALS のそれと共通していることから、FALS と SALS は共通の病理過程を示すことが示唆され、遺伝子変異による生物学的効果を明らかにすることの重要性が示された。

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. Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H: Atypical FTLD-FUS associated with ALS-TDP: a case report. *Neuropathology* 33: 83-86, 2013
2. 河上緒, 新里和弘, 新井哲明, 大島健一, 安野みどり, 湯本洋介, 小幡奈々子, 新井誠, 糸川昌成, 後藤順, 市川弥生子, 平安良雄, 岡崎祐士, 秋山治彦: 32 歳で発症した舞踏病様不随意

運動を伴う前頭側頭型認知症の一例. 老年精神医学雑誌 23: 1121-1127, 2012

3. Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Yamashita M, Nonaka T, Akiyama H, Hasegawa M: Methylene blue reduced phosphorylated tau accumulation in P301L tau transgenic mice. PLoS ONE 7: e52389, 2012
4. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuda H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A: Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. Brain 135: 3380-3391, 2012
5. 新井哲明, 水上勝義: 早期診断と医療連携. 認知症医療における課題. Medicament News 2012年6月15日号(第2090号): 4-5, 2012
6. 新井哲明, 細川雅人, 野中隆, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆: 前頭側頭葉変性症の分子医学. Dementia Japan 26: 334-342, 2012
7. 新井哲明: 前頭側頭葉変性症の分子病理. 老年期認知症研究会誌 19: 60-62, 2012
8. 野中隆, 新井哲明, 水上勝義, 長谷川成人: レビー小体型認知症の神経変性機序・分子生物学. 老年精神医学雑誌 23: 353-358, 2012

2.学会発表

1. Arai T: Accumulation of phosphorylated and cleaved TDP-43 in neurodegenerative disorders. Seoul Neuropathology Forum, Seoul, Korea, Dec 8, 2012
2. 新井哲明: 前頭側頭葉変性症. 第31回日本認知症学会学術集会, つくば, 2012年10月27日
3. 田村昌士, 根本清貴, 川口淳, 角間辰之, 松田博史, 新井哲明, 朝田隆: 有酸素運動が健常高齢者の灰白質容積にもたらす影響—地域縦断コホート研究から. 第31回日本認知症学会学術集会, つくば, 2012年10月27日
4. 野中隆, 鈴掛(増田)雅美, 新井哲明, 吉田眞理, 村山繁雄, Mann David, 秋山治彦, 長谷川成人: シード依存的な細胞内 TDP-43 蓄積による細

胞死の誘導. 第31回日本認知症学会学術集会, つくば, 2012年10月26日

5. 高橋晶, 新井哲明, 水上勝義, 近藤ひろみ, 大島健一, 新里和弘, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆: レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄の α シヌクレイン陽性構造の比較検討. 第31回日本認知症学会学術集会, つくば, 2012年10月26日
6. 河上緒, 新井哲明, 池田研二, 大島健一, 新里和弘, 東晋二, 青木直哉, 水上勝義, 平安良雄, 秋山治彦: 老年期発症の幻覚妄想を認め、辺縁系に高度タウ病変を認めた3剖検例. 第31回日本認知症学会学術集会, つくば, 2012年10月26日
7. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Yoshida M, Murayama S, Man DMA, Akiyama H, Hasegawa M: Intracellular seeding model reproduces characteristic features of affected neurons in TDP-43 proteinopathy. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester, UK, September 15, 2012
8. Kawakami I, Higashi S, Aoki N, Niizto K, Ohshima K, Katsuse O, Togo T, Kobayashi Z, Hosokawa M, Tsuji H, Tamaoka A, Hasegawa M, Arai T, Tsuchiya K, Hirayasu Y, Akiyama H: Three autopsy cases of FTD-MND with progressive aphasia. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester, UK, September 15, 2012
9. Hosokawa M, Arai T, Suzukake M, Yamashita M, Nonaka T, Hasegawa M, Kiyama H: Methylene blue reduced tau phosphorylation and aggregation in P301L transgenic mice. Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, Canada, July 15, 2012
10. Arai T, Arai M, Itokawa M, Yoshida M, Tamaoka A, Kobayashi Z, Hosokawa M, Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamada M, Matsui M, Kaji R, Nakashima K, Kuwano R, Takahashi S, Asada T, Akiyama H: Screening of the SOD1, TARDBP and

FUS mutations and the pathological studies in Japanese cases with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, Canada, July 15, 2012

11. 河上緒, 東晋二, 青木直哉, 新里和弘, 大島健一, 安野みどり, 羽賀千恵, 下村洋子, 鈴木京子, 勝瀬大海, 都甲崇, 小林禅, 辻浩史, 玉岡晃, 長谷川成人, 新井哲明, 土谷邦秋, 平安良雄, 秋山治彦: 進行性失語が前景に立った運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症の二剖検例. 第53回日本神経病理学会総会学術集会, 新潟, 2012年6月29日
12. 高橋晶, 新井哲明, 水上勝義, 近藤ひろみ, 大島健一, 新里和弘, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆: レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄の α シヌクレイン陽性構造の比較検討. 第53回日本神経病理学会総会学術集会, 新潟, 2012年6月29日

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

原発性側索硬化症：その神経病理と生化学的所見について

小阪崇幸¹⁾，付 永娟¹⁾，志賀 篤¹⁾，小野寺理²⁾，西澤正豊³⁾，柿田明美¹⁾，高橋均¹⁾
新潟大学脳研究所病理学分野，2) 同 分子神経疾患資源解析学分野，3) 同 神経内科学分野

研究要旨

2006 年、神経細胞内ユビキチン封入体を示す前頭側頭葉変性症(FTLD)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)に共通の病的タンパクとして新たに TDP-43 が同定された。今回われわれは、臨床病理学的に原発性側索硬化症(PLS)の特徴を示した 2 剖検例について、病的 TDP-43 (pTDP-43)沈着の広がりとその程度、さらにその生化学的プロファイルについて解析した。その結果、PLS は上位運動ニューロン症状を初発・主症状とし、剖検時、下位運動ニューロンはほぼ保たれ、高度に上位運動ニューロンを侵す ALS の病態に、FTLD-TDP とそれに酷似する生化学的所見を伴うユニークな TDP-43 プロテインパチーである可能性が示された。

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(UMN and LMN)を侵すもっとも知られた運動ニューロン疾患である。一方、原発性側索硬化症(PLS)は臨床的に UMN のみを侵す運動ニューロン疾患として定義されているが、病理学的には、ユビキチン免染導入以来、UMN に加え LMN にも変性を認める例や大脳の萎縮（前頭側頭葉変性）が明らかかな例などの報告がみられ、純粋な病理型としての PLS の存在は否定的である。2006 年、神経細胞内ユビキチン封入体を示す前頭側頭葉変性症(FTLD)および ALS に共通の病的タンパクとして新たに TDP-43 が同定された。本研究の目的は、PLS と ALS あるいは FTLD との関係を明らかにすることである。

B.研究方法

臨床病理学的に PLS の特徴を示した 2 剖検例（死亡時 60 歳、女性、全経過 6 年 4 ヶ月；同 82 歳、女性、全経過 7 年 4 ヶ月）について、病的 TDP-43 (pTDP-43)沈着の広がりとその程度、さらにその生化学的プロファイルについて解析した。抗体は主にリン酸化 TDP-43 に対するマウスモノクローナル抗体 (pS409/410; Cosmo Bio Co. Ltd, Tokyo, Japan; 1:5000)

を用いた。なお、両例に TDP-43 遺伝子異常は認められなかった。

(倫理面への配慮)

なお、剖検組織標本の研究への使用については、個々の症例において、書面によるご遺族の同意が得られている。

C.研究結果

両例において、もっとも強い変性を示した中心前回 (Fig.1) を含む前頭側頭葉皮質の II-III および V-VI 層に多数の pTDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体 (NCIs)と大小の陽性突起(DNs/NTs)が認められた (Fig.2)。同様の所見は皮質下灰白質の扁桃核、線条核にも観察された。一方、そのような pTDP-43 病変はほんの 1-2 個の LMN に認められるのみであった。変性の程度や陽性構造物の出現頻度を半定量的に評価したところ、前頭側頭葉、特に motor、premotor に最も高度の変性を認め、陽性構造物も相関して多かった。脊髄前角には、ほとんど変性を認めず、封入体も根気よく探してわずかに認められた程度だった。pTDP43 イムノプロットでは、その大脳皮質に~25-kDa バンドを認めたが、脊髄では検出

できなかった。両例において、その皮質の pTDP-43 のバンドパターンは FTLD で報告されてきたパターンに類似しており、ALS のそれとは明らかに異なっていた (Fig.3)。

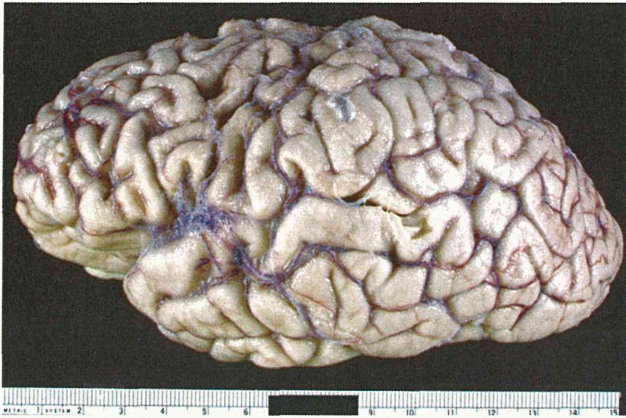


Fig. 1 症例 1 の左大脳半球外側面
前頭側頭葉、特に中心前回に強調される著明な萎縮を認めた。

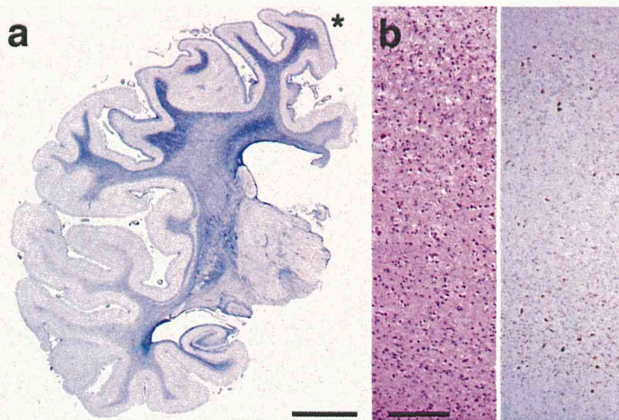


Fig. 2 a: 中心前回 (*) を含む前頭葉の萎縮が明らか。前頭葉皮質下白質のグリオシスも高度。
b: 中心前回では、高度の神経細胞の脱落およびグリオシスを認め、Betz 細胞はほぼ完全に脱落。二層には多数の microvacuolation。リン酸化 TDP-43 染色では、主に第 2-3 層、第 5-6 層に陽性構造物を認める。(a) Holzer; (b) HE (left), pTDP-43 immunostaining (right). Bars: 10mm for (a); 200 μ m for (b).

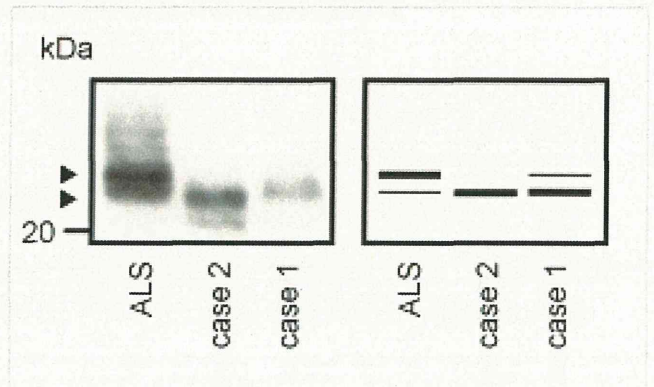


Fig. 3 ALS および PLS の運動野のサルコシル不溶性、ウレア溶性分画の抗 pTDP-43 抗体を用いたイムノブロット (左)。pTDP-43 のバンドパターンの図示 (右)。

D. 考察

2003 年、当教室では臨床的に PLS と診断された 1 剖検例について報告した (Tan et al. *Acta Neuropathol* 105: 615-620, 2003)。非常に強い上位運動ニューロンの変性に加え、ごく少数ではあえうが、ALS の細胞病理学的指標とされるブニナ小体やユビキチン陽性、タウ、シヌクレイン陰性の封入体を認め、さらには FTLD-U の所見を併せ持った非常に興味深い症例だった。3 年後の 2006 年、この FTLD-U と ALS に共通して認められる、ユビキチン陽性、タウ、シヌクレイン陰性の封入体の主要構成蛋白として、TDP-43 が同定された。その結果、FTLD と ALS は TDP-43 proteinopathy というスペクトラムの中で、議論されるようになった。しかし、我々の知る限り、PLS における TDP-43 を用いた詳細な検討はいまだなされていない。

今回の我々の 2 剖検例 (その 1 例は、上記 Tan et al. によって報告された例である) における病理組織学的な検討では、変性の程度や陽性構造物の出現頻度は、前頭側頭葉、とくに motor、premotor に最も高度の変性を認め、陽性構造物も相関して多数認められた。一方、脊髄前角には、ほとんど変性を認めず、封入体も根気よく探してわずかに認めただけで、通常の ALS で認められるような LMN の変性は認められなかった。しかし、少数ながらも LMN に ALS の細胞病理学的指標とされる Bunina 小体や pTDP-43

陽性封入体が認められた点は興味深い所見と考えられた。

FTLD の側面から 2011 年に統一された FTLD-TDP の病理組織学的分 (Mackenzie et al. *Acta Neuropathol* 122: 111-113, 2011) を用いて検討すると、今回の 2 例はいずれも Type A に近く、少なくとも通常の ALS にて認められる Type B とは異なっていた。

加えて、生化学的プロファイルについての検討においても、皮質の TDP-43 のバンドパターンは、sFTLD-TDP で報告されてきたパターンに類似しており、ALS のそれとは明らかに異なっていた。

E. 結論

PLS は UMN 症状を初発・主症状とし、剖検時、LMN はほぼ保たれ、高度に UMN を侵す ALS の病態に FTLD-TDP を伴う臨床病理学的にユニークな TDP-43 プロテノパチーではないかと考えられた。

なお、本研究成果は、論文として既に発表 (Kosaka et al. *Neuropathology* 32: 373-384, 2012) されているので、ご参照いただきたい。

今後、他施設との共同によって、より多くの症例における臨床病理学的、生化学的検索を予定している。

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. Soma K, Fu Y-J, Wakabayashi K, Onodera O, *et al.* Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 54-60, 2012
2. Kosaka T, Fu Y-J, Shiga A, *et al.* Primary lateral sclerosis: upper-motor-predominant amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobar degeneration - immunohistochemical and biochemical analyses of TDP-43. *Neuropathology*

32: 373-384, 2012

3. Tada M, Coon EA, Osmand AP, *et al.* Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. *Acta Neuropathol* 124: 749-760, 2012

2. 学会発表

1. 森 文秋, 柿田明美, 高橋 均, 若林孝一. 筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 と Bunina 小体の関わり. 第 53 回日本神経病理学会, シンポジウム 2. 「筋萎縮性側索硬化症: TDP-43 の発見とその後」, 2012, 6, 30, 新潟
2. 清水 宏, 豊島靖子, 荒川恵子, ほか. 下位運動神経細胞に p62 陽性/TDP-43 陰性の胞体内封入体を認めた ALS の一例. 第 53 回日本神経病理学会, 2012, 6, 30, 新潟
3. Kosaka T, Fu YJ, Shiga A, *et al.* Primary lateral sclerosis: an immunohistochemical and biochemical study of pathological TDP-43 in two cases : The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, 5-7 September 2012, Manchester, UK
4. Takahashi H. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis - Discovery of TDP-43 and after that -. Seoul Neuropathology Forum - The Neuropathology Study Group of the Korean Society of Pathologists, 8 December 2012, Seoul, Korea

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

ALS の神経細胞封入体で TDP-43 と FUS は共存するか？

岡本 幸市¹⁾

藤田 行雄¹⁾，木谷 茉莉¹⁾，高玉 真光²⁾

1) 群馬大学神経内科，2) 老年病研究所附属病院

研究要旨

TDP-43 陽性封入体を有する通常の孤発性 ALS (ALS-TDP) と FUS 陽性封入体を有する ALS (ALS-FUS) を用いて、封入体形成における TDP-43 および FUS の関与とそれぞれの局在について免疫組織学的に検討した。ALS-TDP では封入体において TDP-43 と FUS が共存していたのは 1 つの封入体のみであり、封入体形成に FUS が関与しているとは言いがたい。しかし、細胞質内に TDP-43 の異常集積がある神経細胞では FUS の核への局在が低下している神経細胞も多く、TDP-43 の凝集は FUS に何らかの影響を与えていることが示唆された。一方、ALS-FUS では FUS 陽性封入体を有している神経細胞の全てで TDP-43 はコントロールと同様に核に染色性がみられ、ALS-FUS は ALS-TDP とは独立した疾患の可能性があると考えた。

A. 研究目的

ALS の病因蛋白として TDP-43 と FUS が同定された。両者は構造的・機能的に類似点が多く、ALS 神経細胞内での局在の異常やストレス顆粒の構成要素であることなどの共通点がみられることから、ALS の発症過程に TDP-43 と FUS が協同的に関与することが考えられている。しかし、ヒト剖検組織を用いた TDP-43 と FUS の病理学的検討では両蛋白の封入体内での共存には否定的な報告が多く、共存するとしたのは Deng らの報告 (Ann Neurol 67:739-748, 2010)のみである。

今回我々は ALS の神経細胞内で TDP-43 と FUS が共存しているのか否かを神経病理学的に検討し、両者の ALS の神経細胞内での封入対形成に関する役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. ALS-TDP での FUS の局在

TDP-43 陽性封入体を有する孤発性 ALS 12 例 (ALS-TDP) (表 1) のホルマリン固定パラフィン包埋 3μ 厚の脊髓ミラー切片を用いた。一方を抗リン酸化 TDP-43 (pTDP-43)ポリクロナール抗体で、もう一方

を抗 FUS ポリクロナール抗体 (Sigma)を用いて免疫染色を施行した。神経細胞を pTDP-43 の染色性によって、A) 異常集積を認めないもの、B) 細胞質内に顆粒状に染色性がみられるもの、C) skein-like inclusion を有するもの、D) round inclusion を有するものの 4 つに分類し、それぞれの神経細胞における FUS の局在を検討した。

表 1 ALS-TDP 12 例

	年齢	性	発症様式	経過	呼吸器
1	44	F	下肢	2y	24d
2	54	M	下肢	2y6m	
3	56	F	下肢	2y	
4	60	M	球	1y	
5	60	M	下肢	3y	1y7m
6	61	M	上肢	2y6m	
7	62	M	上肢	1y10m	
8	64	F	上肢	7y	
9	66	M	下肢	15y10m	12y8m
10	69	M	上肢	12y2m	10y
11	75	M	球	7m	
12	75	M	球	6m	

y;年, m;月, d;日

2. ALS-FUS での TDP-43 の局在

FUS 陽性封入体を有する高齢発症の孤発性 ALS1 例および家族性 ALS (FALS) 3 例 (*FUS* P525L 変異 1 例, *FUS* R521C 変異 2 例) の計 4 例のホルマリン固定パラフィン包埋 5 μ 厚の脊髓切片を用いた

(ALS-FUS). これらに対して非リン酸化 TDP-43 モノクロナール抗体 (Proteintech) と抗 FUS ポリクロナール抗体 (Sigma) を用いて 2 重免疫染色を施行した. 発色には TDP-43 を DAB, FUS には VIP を用いて同一神経細胞におけるそれぞれの局在を検討した.

[ALS-FUS 4 例]

症例 1: 75 歳女性, 臨床診断は 2 次ニューロン徴候優位の ALS. 右上肢の筋力低下で発症し全経過 2 年 4 ヶ月で死亡. *FUS* 遺伝子変異なし.

症例 2: 24 歳発症 14 ヶ月後に人工呼吸器装着. 27 歳時に全経過 28 ヶ月で死亡. 姉, 母に同症. *FUS* 遺伝子検査では P525L 変異 (+)

症例 3: 29 歳発症, 31 歳呼吸不全で死亡. 全経過 15 ヶ月. *FUS* 遺伝子検査では R521C 変異 (+)

症例 4: 症例 3 の娘. 38 歳発症, 26 ヶ月後に人工呼吸器. 47 歳で死亡. 全経過 9 年. *FUS* 遺伝子検査では R521C 変異 (+)

(倫理面への配慮)

剖検検索に関しては, 剖検時に家族より同意を得ている. 剖検番号などから患者が特定されることはない.

C. 研究結果

1. ALS-TDP での FUS の局在

A) pTDP-43 陽性所見が認められない 42 個の神経細胞全てで FUS の染色性は核に認められた (図 1, a1, a2).

B) 微細顆粒状の pTDP-43 陽性封入体を有する神経細胞では FUS の核の染色性が保たれたもの (図 1, b1, b2) の他に, 40 個中 6 個の神経細胞で FUS の核に対する染色性が失われていた (図 1, c1, c2).

C) skein-like inclusion を有する神経細胞では FUS

の核に対する染色性が保たれたものが 4 個 (図 1, d1, d2), 染色性が失われていたものが 9 個認められた (図 1, e1, e2). skein-like inclusion のうち 1 個でのみ FUS との共存が認められた (図 1, f1, f2 矢印).

D) round inclusion を有する神経細胞 9 個中 4 個で核の染色性が失われていた. 表 2 に結果をまとめる.

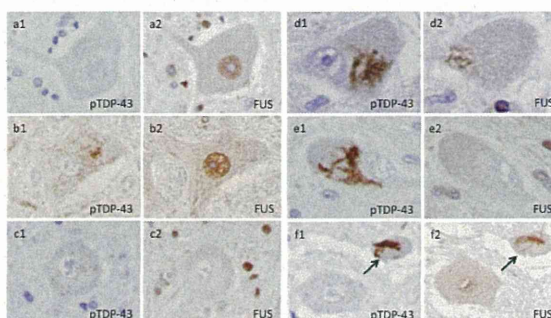


図 1 a1-f1 pTDP-43 抗体, a2-f2 FUS 抗体

表 2 ALS-TDP における FUS の局在

pTDP-43 IR	FUS nuclear IR	神経細胞数	FUS の異常
(-)	(+)	42	
	(-)	0	0%
granular	(+)	34	
	(-)	6	15%
skein-like inclusion	(+)	4	
	(-)	9*	69%
Round inclusion	(+)	5	
	(-)	4	44%

*pTDP と FUS の共存は 1 個, IR; immunoreactivity

2. ALS-FUS での TDP-43 の局在

一方, ALS-FUS 例で細胞質内に TDP-43 抗体および pTDP-43 抗体での異常所見は見られず, さらに FUS 陽性封入体を有していても, その核はすべて TDP-43 抗体で明瞭に染色された (図 2).

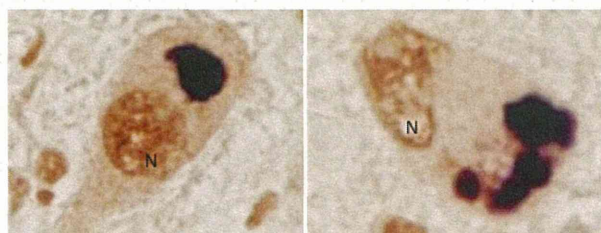


図 2 紫:FUS polyclonal 抗体, 茶:TDP-43 monoclonal 抗体

D. 考察

Deng らの報告では High pressure declocking chamber による抗原賦活が重要であり、煮沸やマイクロウェーブでは TDP-43 陽性封入体は FUS で染色されないとされる。今回、我々が用いた autoclave による抗原賦活では切片は、高温・高圧で前処理され、彼らの方法と同様のものと考えられるが、TDP-43 と FUS が共存していたのは1個の封入体のみであった。このことから TDP-43 と FUS が封入体内で共存すると結論するには慎重であるべきである。しかし、pTDP-43 の染色で異常を認める神経細胞では正常の FUS の核への染色性が失われている細胞も認められた。このことは TDP-43 の異常が FUS の局在に影響を及ぼしていることを示唆している。

一方、ALS-FUS では細胞質内に FUS 陽性封入体が存在していても、TDP-43 の染色性は核に認められた。FUS 陽性封入体の形成に TDP-43 の関与はないものと考えられた。

E. 結論

神経細胞内の異常な TDP-43 の凝集は FUS にも何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。ALS-FUS 例では、FUS 陽性封入体自体には TDP-43 の共存は認めず、ALS-FUS において TDP-43 の局在の異常はなかった。ALS-FUS は ALS-TDP からは独立した疾患であると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mizuno Y, et al. Comparison of phosphorylated TDP-43-positive inclusions in oculomotor neurons in patients with non-ALS and ALS disorders. J Neurol Sci 315:20-25, 2012

2. 学会発表

1) Fujita Y et al. TDP-43 and FUS pathology in amyotrophic lateral sclerosis. 16th congress of the European Federation of Neurological Societies.

(Stockholm, Sweden), 2012

2) 藤田行雄ら. ALS における TDP-43 と FUS の病理学的検討. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 (新潟), 2012

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

高齢者連続剖検例での TDP43 の網羅的免疫組織学的検索

村山繁雄¹、高尾昌樹^{1,2}、初田裕幸¹、隅蔵大幸¹、野上茜¹、伊藤慎二¹、内野彰子¹、赤津博康³、齊藤祐子⁴

1. 東京都健康長寿医療センターバイオリソースセンター高齢者ブレインバンク、2. 美原記念病院ブレインバンク、3. 福祉村ブレインバンク、4. 国立精神・神経医療研究センター臨床検査部

研究要旨

TDP43 蓄積は、高齢者に高頻度認められるが、神経細胞質内蓄積は、脊髄には認められない。海馬・側頭回には、タウ、 α シヌクレイン蓄積に伴い、二次的に蓄積すると考えられるものが大部分だが、まれだが原発性蓄積と考えられる例もあり、一部は認知症の原因となりうる。

A.研究目的

高齢者ブレインバンク連続登録例を網羅的にリン酸化 (p) TDP43 C 末 (PSer409/410) 単クローン抗体 (m) で検索することで、老化における TDP43 の細胞質内蓄積の頻度を明らかにすると同時に、TDP43 蓄積がないコントロール脳・脊髄の抽出を試みた。

B.研究方法

高齢者ブレインバンク連続登録例の、海馬・第三側頭回、延髄、腰髄のパラフィンブロックより、6 μ m 厚連続切片を作成し、本研究に用いた。pSer 409/410 (m)免疫染色は Ventana NX20 を用いて行った。他の変性疾患関連蛋白として、抗 tau、A β 、 α -synuclein, ubiquitin を、高齢者ブレインバンクプロトコールに従い

(www.mci.gr.jp/BrainBank) やはり網羅的に検討した。TDP43 免疫染色を、半定量化して評価するにあたり、DLB Consensus Guideline の陽性の程度の基準を当てはめて用いた。

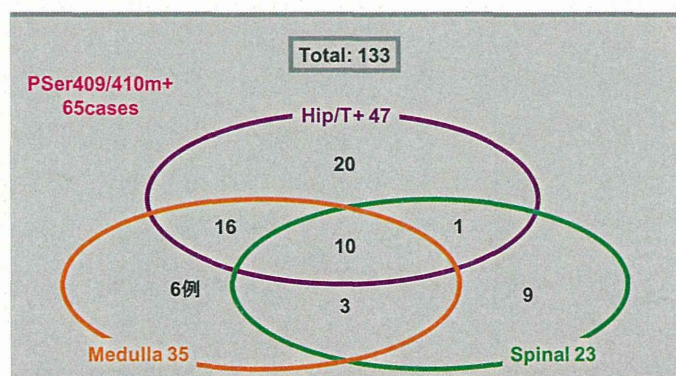
(倫理面への配慮)

高齢者ブレインバンクプロジェクトは、剖検承諾ご遺族包括研究同意に基づいており、施設倫理委員会承認を得ている。本研究自体は個別に施設

倫理委員会承認を得ている。

C.研究結果

半脳・脊髄凍結蓄積 133 例中、脊髄に関しては 42 例が陽性であったが、いずれも突起なしグリア細胞内陽性所見のみで、神経細胞内に陽性所見は認められなかった。延髄陽性例 35 例、海馬側頭葉陽性例 47 例であった。いずれかの部位に陽性所見を認めるものは 65 例で、全体のほぼ半数であった (図 1)。



海馬・側頭葉陽性例で、神経細胞質内陽性所見を認めたのは 19 例であり、アルツハイマー病 (AD) 8 例、レビー小体型認知症 (DLB) 1 例、AD+DLB 4

例 (図 2)、AD+嗜銀顆粒性認知症 2 例、神経原線維変化優位型老年期認知症 2 例 (図 2)、他の老年性変化を伴わない症例 2 例で、うち 1 例は老年期認知症と診断され、TDP43 蓄積以外に認知症の原因を認めない 96 歳女性例であった。しかし左右差が著しく、凍結側での免疫プロットの型別判定は困難だが、type A が疑われた。

選択例で免疫プロットを行ったが、全て type A であり、神経病理学的所見と一致した。

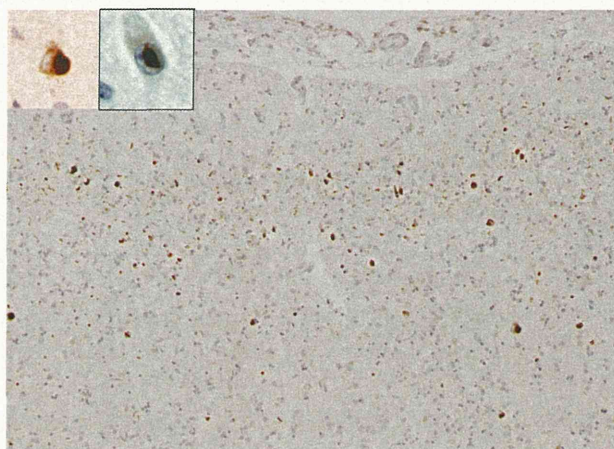


図 2. アルツハイマー病・レビー小体型認知症合併例の側頭葉抗リン酸化 C 末 TDP43 抗体 (pSer409/410 monoclonal) 免疫染色所見。多数の神経細胞内陽性所見 (左 inlet) に加え、核内封入体 (右 inlet) を認め、type A に該当する。

D. 考察

TDP43 蓄積は、高齢者に高頻度認められるが、神経細胞質内蓄積は、脊髄には認められない。海馬・側頭回には、タウ、 α シヌクレイン蓄積に伴い、二次的に蓄積すると考えられるものが大部分だが、まれだが原発性蓄積と考えられる例もあり、一部は認知症の原因となりうると考えられた。

E. 結論

高齢者連続剖検例において、神経細胞質内蓄積は、側頭葉にのみ認められ、type A 型蓄積である。

捕捉：高齢者ブレインバンクでは、日本神経科学ブレインバンクネットワーク (JBBNNR) と、それ

を含む高齢者ブレインバンクネットワーク (BBARN) を通じ、ALS/FTLD リソース構築への努力を行っている。前者はオープンリソースであるが、それ以外の後者の構成施設は施設蓄積を基本とする。JBBNNR 内 TDP43 関連リソースで半脳凍結例の内訳として、FTLD-TDP43 は、高齢者ブレインバンク 3 例、福祉村 3 例であり、極めて少ない。一方 ALS-TDP43 は、高齢者ブレインバンク 16 例 (他 DNA 9 例、パラフィンブロック 36 例)、美原記念病院 15 例、国立精神神経医療研究センター 6 例、福祉村ブレインバンク 1 例であり、リソースとしては対応可能な数と判断される。

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. Saito Y, Inoue T, Zhu G, Kimura N, Okada M, Nishimura M, Kimura N, Murayama S, Kaneko S, Shigemoto R, Imoto K, Suzuki T. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and Abeta generation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2012; 7: 50
2. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J: Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. *Amyotroph Laterl Scler* 2012; 13 (6) 562-6
3. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S: alpha-synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/ Parkinsonism demntia complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropath Exp Neurol* 2012; 71 (7): 625-30
4. Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T. Enhanced antigen retrieval of amyloid β immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid β pathology in Alzheimer disease and its mouse model. *J Histochem Cytochem.* 2012; 60 (10): 761-9.
5. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with