

とが、疾患の病態解明および治療法開発につながる  
と考えられる。

FALS の原因遺伝子は、最近まで *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 *TARDBP* と  
*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。そこで、本邦の FALS および SALS 例にお  
ける *TARDBP* および *FUS* の遺伝子変異の頻度を算出  
するとともに、その病理学的特徴を検討した。

TDP-43 が蓄積する家族性疾患の原因遺伝子とし  
て、*TARDBP* のほかに、*granulin (GRN)*、  
*valosin-containing protein*、*chromosome 9 open  
reading frame 72* などが知られている。この中で、  
*GRN* の変異では、nonsense-mediated decay によ  
って変異 mRNA が分解され、progranulin 蛋白  
(PGRN) の発現量が減少することが変性につなが  
ると考えられている。そこで、本研究では、*GRN* ノ  
ックアウト(KO)マウスの脳を解析し、PGRN の発現  
低下と TDP-43 の蓄積および封入体形成との関連を  
検討した。

脳に蓄積した FUS の病理組織学的特徴は、市販抗  
体の染色性の不安定さや FTLD における頻度の低さ  
などからこれまで十分に検討されているとは言えな  
い。そこで本研究では、種々の抗 FUS 抗体につい  
て染色条件を詳細に検討し、安定な染色条件を確立  
した上で、ALS および FTLD 例について組織化学  
的解析を行い、その特徴を検討した。

## B. 研究方法

### FALS および SALS の遺伝子解析および病理生化学 的解析

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。

### GRN ノックアウトマウスの解析

野生型(WT)、ヘテロ接合体 (HZ)、KO の 12、24  
ヶ月齢の脳を固定後凍結浮遊あるいはパラフィン包  
埋切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。検索  
した分子は、TDP-43 のほかにこれまで ALS および  
FTLD の封入体に存在することが明らかになってい  
る p62 とユビキチンである。用いた抗体は、5 種類  
の抗 TDP-43 抗体(リン酸化非依存性および依存性)、  
抗ユビキチン抗体 (DAKO)、抗 p62 抗体 (Progen)  
である。

### FUS proteinopathy 例脳の病理生化学的解析

NIFID 1 例、BIBD 1 例、家系内の他のメンバー  
にすでに FUS 遺伝子変異が同定されている  
(Suzuki et al., J Hum Genet, 2010) FALS 1 例の計  
3 剖検例を対象とし、2 種類の抗 FUS 抗体 (Sigma,  
HPA008784; Bethyl A300-302A) を用いた免疫組織  
化学・生化学的解析を行った。

### (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。同倫理指針策定以前に剖検になった症例  
については、連結不可能匿名化による個人情報の保  
護を図った上で使用した。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。すべての  
動物実験は、研究報告者が所属する機関の定める「動  
物実験取扱規程」に則り動物実験計画書を作成し、  
動物実験 (倫理) 委員会で承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### FALS および SALS の遺伝子解析および病理生化学 的解析

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 (neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs) (図 1) およびグリア細胞内封入体 (glial cytoplasmic inclusions: GCIs) が、脊髄、海馬領域、内包、視床等に多数出現していた。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、スメアが検出され、SALS 例と同じパターンが認められた。

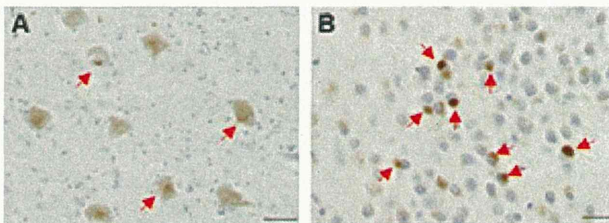


図 1. TARDBP 変異の FALS 例に認められたリン酸化 TDP-43 (pS409/410) 陽性構造. A: 脊髄前角の skein 様封入体 (矢印), B: 海馬歯状回の神経細胞質内封入体(矢印)

### GRN ノックアウトマウスの解析

WT、HZ、KO の 12、24 ヶ月齢において、大脳、脳幹、脊髄に、TDP-43 陽性構造は認められなかった。一方、p62 陽性の構造が HZ と KO の視床において認められた。構造は、ニューロピルに顆粒状に染色されるものが多いが、一部は円形の封入体様および突起様の構造もみられた (図 2)。陽性構造の密度は、HZ より KO に有意に多く、また 12 ヶ月齢より 24 ヶ月齢に有意に多かった。これらの p62 陽性構造の一部はユビキチンにも陽性であった。脊髄において、24 ヶ月齢の KO にのみ、神経細胞内に p62 陽性の skein 様構造が認められた。

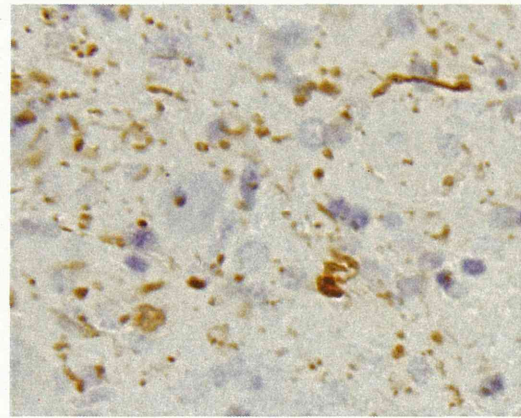


図 2. 24 ヶ月齢の KO マウスの視床に認められた p62 陽性構造

### FUS proteinopathy 例脳の病理生化学的解析

NIFID および BIBD 例では、前頭・側頭葉皮質、基底核、脳幹部に広汎に、FUS 陽性の神経細胞質内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs) が認められた。封入体を有する細胞の核の染色性は、低下するものから保たれるものまでさまざま、多様性が認められた。一方、FALS 例では、基底核、脳幹、脊髄を中心に、FUS 陽性の NCIs およびグリア細胞質内封入体 (glial cytoplasmic inclusions: GCIs) が多数認められたが (図 3)、大脳皮質の陽性構造は目立たなかった。NIFID 例では、 $\alpha$ -インターネキシン陽性 NCIs よりも FUS 陽性 NCIs の数が多く、BIBD および FALS 例では好塩基性封入体 (basophilic inclusions: BIs) よりも FUS 陽性 NCIs の数が多かった。唯一凍結脳が保存されていた NIFID 例について、サルコシル不溶性画分の Western blot 解析を施行した結果、リン酸化を示唆する明らかなバンドの移動度の変化や断片化を示す低分子量域のバンドは検出されなかった。

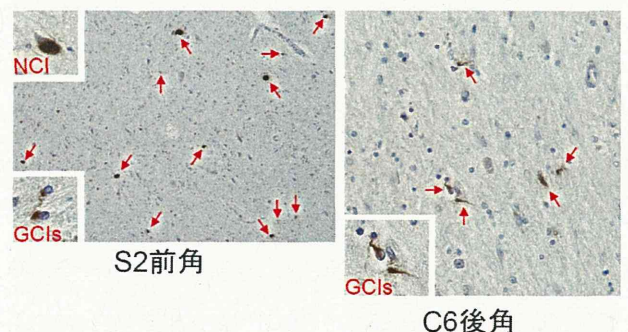


図 3. FALS 例の FUS 陽性神経細胞内封入体 (NCI) およびグリア細胞内封入体 (GCI)s

#### 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、欧米では 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ことから、本邦は欧米より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。

マウスでは、GRN の欠損のみでは TDP-43 の蓄積は生じなかったが、p62 とユビキチンの蓄積が生じ、量的には明らかに p62 陽性構造の方が多かった。以上の結果から、少なくともマウスでは、PGRN の発現量低下により初期に誘導される主要な分子は p62 であることが示唆された。p62 は、ユビキチン化蛋白質の凝集体形成を促進するが、それ自身でも凝集体を形成することが知られている。また、p62 はオートファジーによって分解され、オートファジー機能の減弱により p62 蓄積が生じる。以上から、PGRN の低下によりオートファジー系が異常を来し、その結

果 p62 が蓄積した可能性も考えられる。今後は、オートファジー系分子の異常について、本マウスおよび患者剖検脳を用いてさらに検討する必要がある。

核蛋白である FUS は、転写調節という TDP-43 と類似の機能を有する。さらに、1) その遺伝子変異により ALS を発症する、2) FTLD では神経細胞優位に、ALS では神経細胞およびグリア細胞内に蓄積する、3) 臨床表現型として、ALS、FTLD、両者の合併という 3 型が存在する、などの類似点が指摘できる。一方相違点としては、1) 正常の神経細胞では TDP-43 は核にのみ存在するが、FUS は核と細胞質に存在する、2) 封入体を形成した細胞において TDP-43 は核から失われるが、FUS は核の染色性が低下するものから保たれるものまでさまざまである、3) 不溶性画分に回収される TDP-43 に認められるリン酸化や断片化等の異常修飾を示唆する所見が、現時点では FUS には認められない、などが考えられる。FUS の病的意義を明らかにするために、今後さらに詳細な病理・生化学的解析が必要である。

#### 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、遺伝子変異による変性機序を明らかにすることの重要性が示された。

マウス脳では、*GRN* の発現低下により、ALS および FTLD 患者脳に出現する細胞内封入体の構成成分である p62 の蓄積が生じる。PGRN の低下と p62 の蓄積が、TDP-43 蓄積を介した神経変性にどのように関与するのかを明らかにすることが今後の課題である。

NIFID、BIBD、BIs を伴う ALS においては、FUS の細胞内蓄積が主要な病理変化であり、これらの疾患は共通の病理基盤を有する FUS proteinopathy の一群を形成する。各表現型の違いを生じる要因と

なる異常 FUS の生化学的特徴を明らかにすることは今後重要である。TDP-43 と FUS という類似の機能を有する蛋白質が、ALS および FTLD に関与していることから、両蛋白の機能や相互作用の異常と疾患の病態に関する研究も重要である。

## F.健康危険情報

なし。

## G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### 1. 論文発表

1. 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-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
9. Ando K, Uemura K, Kuzuya A, Maesako M, Asada-Utsugi M, Kubota M, Aoyagi N, Yoshioka K, Okawa K, Inoue H, Kawamata J, Shimohama S, Arai T, Takahashi R, Kinoshita A: N-cadherin regulates p38MAPK signaling via association with JLP: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 286: 7619-28, 2011
10. Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Akiyama H, Shibayama H, Ozaki N: Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification—With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy—. *J Neurol Sci* 301: 77-85, 2011
11. Aoki N, Tsuchiya K, Togo T, Kobayashi Z, Uchikado H, Katsuse O, Suzuki K, Fujishiro H, Arai T, Iseki E, Anno M, Kosaka K, Akiyama H, Hirayasu Y: Gray matter lesions in Nasu-Hakola disease: A report on three autopsy cases. *Neuropathology* 31: 135-143, 2011
12. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Kubodera T, Shibata N, Arai T, Miura H, Ishikawa C, Kondo H, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H: FALS with Gly72Ser mutation in SOD1 gene: report of a family including the first autopsy case. *J Neurol Sci* 300: 9-13, 2011
13. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Komachi H, Miki K, Yokota O, Arai T, Hirotomo M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H: Fatal encephalitis in a case of hypereosinophilic syndrome: MRI and autopsy findings. *Intern Med* 50: 1219-1225, 2011

14. Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, Thompson JC, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Gerhard A, Allsop D, Mann DMA: Post mortem cerebrospinal fluid  $\alpha$ -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other  $\alpha$ -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 45: 188-195, 2012
15. Torii Y, Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Hagikura M, Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Ozaki N: Effects of aging on the morphologies of Heschl's gyrus and the superior temporal gyrus in schizophrenia: A postmortem study. *Schizophr Res* 134: 137-142, 2012
16. 小林禪, 新井哲明, 秋山治彦, 水澤英洋: FUS/TLS 遺伝子変異による家族性 ALS. *Clinical Neuroscience* 29: 734-735, 2011
17. 新井哲明, 細川雅人, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆: TDP-43 分子による新たな認知症群. *精神経誌* 113: 574-583, 2011
18. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H: Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. *J Mol Neurosci* 45: 480-485, 2011
19. 新井哲明: TDP-43. 認知症学(上). 日本臨床増刊号 69: 84-87, 2011
20. 岸本由紀, 横田修, 武田直也, 池田智香子, 新井哲明: TDP-43 陽性神経細胞内封入体を伴う前頭側頭葉変性症と認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症. 認知症学(下). 日本臨床増刊号 69: 384-388, 2011
21. 横田修, 根本清貴, 新井哲明: 認知症診療の実践テクニック—患者・家族にどう向き合うか. 非アルツハイマー型認知症とは. *精神科臨床エキスパートシリーズ*, 朝田隆編, 医学書院, 東京, pp82-122, 2011
22. 新井哲明, 小林禪, 細川雅人, 長谷川成人, 秋山治彦: ALS-FTLD-MND-FTLD-U. *Clinical Neuroscience* 29: 995-998, 2011
23. 小林禪, 新井哲明, 秋山治彦, 水澤英洋: FUS/TLS 遺伝子変異による家族性 ALS. *Clinical Neuroscience* 29: 734-735, 2011
24. 新井哲明, 山下万貴子, 細川雅人, 野中隆, 小林禪, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆: 前頭側頭葉変性症の分子病理. *Dementia Japan* 25: 120-128, 2011
25. Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H: TDP-43 M337V Mutation in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-334, 2010
26. Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I: Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: A pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010
27. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Akiyama H, Mizusawa H: Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 293: 6-11, 2010
28. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H: Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity. *Neuropathology* 30: 372-380, 2010
29. Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM: Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010
30. Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S,

- Pickering-Brown S, Mann DM: Effect of topographical distribution of  $\alpha$ -synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010
31. Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumiyama Y, Akiyama H, Arai T, Mizusawa H: Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease showing severe and circumscribed atrophy of anterior temporal lobes. *J Neurol Sci* 297: 92-96, 2010
32. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H: Clinicopathological characteristics of FTLT-DTP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss. *J Neurol Sci* 298: 70-77, 2010
33. Habuchi C, Iritani S, Sekiguchi H, Torii Y, Ishihara R, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Akiyama H, Shibayama H, Ozaki N: Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification—With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy—. *J Neurol Sci* 301: 77-85, 2011
34. 新井哲明: FTLT-U. 専門医のための精神科臨床リュミエール 12: 97-104, 2010
35. 亀谷富由樹, 新井哲明, 長谷川成人: TDP-43 リン酸化の意義. *Clinical Neuroscience* 28: 128-129, 2010
36. Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Niizato K, Tsuchiya K, Ikeda K, Yoshida M, Onaya M, Kobayashi Z, Akiyama H: Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLT and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology* 30: 170-181, 2010
37. 小林禪, 新井哲明: FTLT と ALS を再び結びつけた FUS : 第 4 の proteinopathy の可能性. *Dementia Japan* 24: 74-83, 2010
38. 小林禪, 新井哲明: TDP-43 封入体のスペクトラム. *Clinical Neuroscience* 28: 594-595, 2010
39. 羽淵知加子, 新井哲明, 入谷修司: 脳の老化の神経化学. *分子精神医学* 10: 105-112, 2010
40. 藤城弘樹, 長谷川成人, 新井哲明: 前頭側頭葉変性症の分子病理. *精神誌* 112: 313-324, 2010
41. 細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦: TDP-43. 老年精神医学雑誌 21: 561-571, 2010
42. 細川雅人, 新井哲明, 秋山治彦, 朝田隆: 前頭側頭葉変性症と遺伝要因. 老年精神医学雑誌, 21; 1387-98, 2010
43. 長谷川成人, 新井哲明: TDP-43 蓄積症の発見. *最新医学* 65: 1558-1565, 2010
44. 秋山治彦, 新井哲明, 長谷川成人: アルツハイマー病およびレビー小体型認知症におけるリン酸化 TDP-43. *最新医学* 65: 1625-1631
45. 小林禪, 新井哲明, 朝田隆: 認知症の新たな異常物質 TDP-43. *最新精神医学* 15: 475-480, 2010
46. 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆: 前頭側頭葉変性症の分子病理. *生物学的精神医学会誌* 21: 267-275, 2010

## 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 $\alpha$ 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 8<sup>th</sup> 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 8<sup>th</sup> 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 $\alpha$ 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
13. 新井哲明, 岩切雅彦, 水上勝義, 畑中公孝, 袖山紀子, 田中芳郎, 山形晃彦, 石井映美, 朝田隆: FTL-D-FUS の1剖検例. 第52回日本神経病理学会総会学術研究会, 京都, 2011年6月3日
14. 青木直哉, 東晋二, 小林禅, 細川雅人, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 泉山洋子, 都甲崇, 勝瀬大海, 内門大丈, 鈴木京子, 新井哲明, 長谷川成人, 平安良雄, 秋山治彦: ビューロピルに認められるFUS陽性微細顆粒について. 第52回日本神経病理学会総会学術研究会, 京都, 2011年6月4日
15. Arai T, Matsuwaki T, Hasegawa M, Akiyama H, Nonaka T, Hosokawa M, Takahashi S, Mizukami K, Asada T, Nishihara M: Histopathological analysis of progranulin knockout mice. Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris, France, July 18, 2011
16. 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: 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. 第30回日本認知症学会, 名古屋, 2011年11月11日

17. 辻浩史, 野中隆, 新井哲明, 山下万貴子, 亀谷富由樹, 細川雅人, 初田裕幸, 高尾昌樹, 村山繁雄, 齊藤祐子, 長谷川成人, 秋山治彦, Mann DMA, 詫間浩, 玉岡晃: FTLD-TDP および ALS に蓄積する TDP-43 蛋白の凝集体構造に関する解析. 第 30 回日本認知症学会, 名古屋, 2011 年 11 月 11 日
18. 新井哲明, 松脇貴志, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 細川雅人, 近藤ひろみ, 西原真杉: プログラニューリンノックアウトマウスの組織化学的解析. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 24 日
19. 羽賀千恵, 池田研二, 新井哲明, 石山宮子, 柳下三郎, 下村洋子, 近藤ひろみ, 細川雅人, 土谷邦秋, 秋山治彦: 内嗅領皮質野に出現するユビキチン陽性顆粒(UPG)の再検討. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 24 日
20. 後藤潤, 後藤昇, 柴田昌和, 土谷邦秋, 新井哲明, 秋山治彦, 塩田清二: ヒト神経細胞体の分類: 機能・形態計測の相関. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 23 日
21. 眞鍋雄太, 土谷邦秋, 新井哲明, 秋山治彦: パーキンソン病の病理所見を呈する Shy-Drager 症候群と臨床診断されていた 3 例. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 24 日
22. 小林禪, 土谷邦秋, 三木一徳, 横田修, 新井哲明, 秋山治彦, 水澤英洋: 致死的脳炎を呈した特発性好酸球増多症の 34 歳男性剖検例. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 2010 年 4 月 24 日
23. 新井哲明, 小林禪, 長谷川成人, 土谷邦秋, 青木正志, 横田修, 新里和弘, 大島健一, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 細川雅人, 秋山治彦, 朝田隆: FUS proteinopathy 例の組織化学的検討. 第 25 回日本老年精神医学会, 熊本, 2010 年 6 月 25 日
24. 新井哲明, 水上勝義, 里見介史, 野口雅之, 長

谷川成人, 秋山治彦, 朝田隆: 海馬傍回皮質に限局性高密度タウ病変を認めた妄想性うつ病の 1 例. 第 29 回日本認知症学会, 名古屋, 2010 年 11 月 5 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<sup>1)</sup>，付 永娟<sup>1)</sup>，志賀 篤<sup>1)</sup>，小野寺理<sup>2)</sup>，西澤正豊<sup>3)</sup>，柿田明美<sup>1)</sup>，高橋均<sup>1)</sup>  
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 プロテオ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 との関係をはっきりとすることである。

### 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。

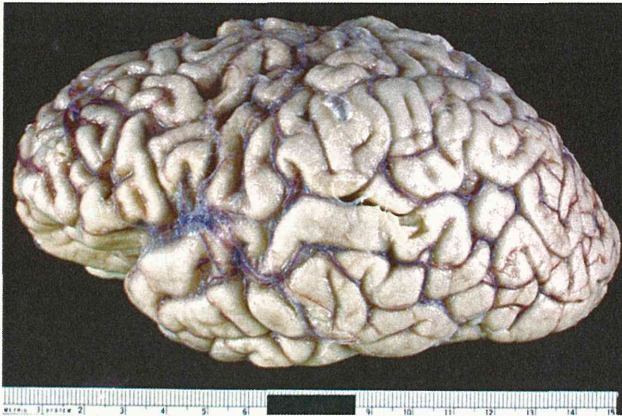
### （倫理面への配慮）

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。

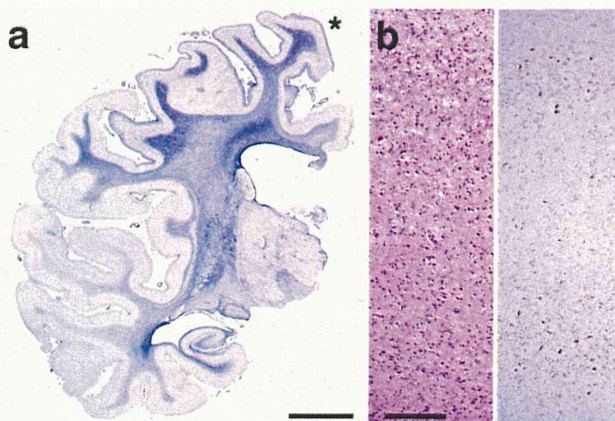
### C. 研究結果

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、線条体にも観察された。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 イムノブロットでは、その大脳皮質に ~25-kDa バンドを認めたが、脊髄では検出

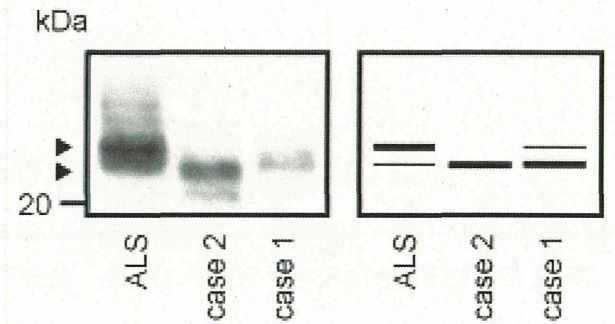
できなかった。両例において、その皮質の pTDP-43 のバンドパターンは FTLD で報告されてきたパターンに類似しており、ALS のそれとは明らかに異なっていた (Fig.3)。



**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 $\mu$ 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程度で、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<sup>1)</sup>

藤田 行雄<sup>1)</sup>，木谷 茉莉<sup>1)</sup>，高玉 真光<sup>2)</sup>

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部での共存には否定的な報告が多く，共存としたのは 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体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 3 $\mu$  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 $\mu$  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.

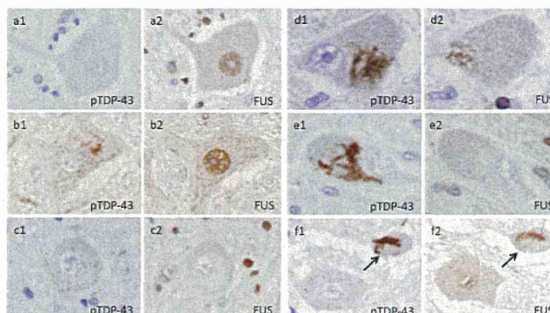


図 1 a1-f1 pTDP-43 抗体, a2-f2 FUS 抗体

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 decloaking 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<sup>1</sup>、高尾昌樹<sup>1,2</sup>、初田裕幸<sup>1</sup>、隅蔵大幸<sup>1</sup>、野上茜<sup>1</sup>、伊藤慎二<sup>1</sup>、内野彰子<sup>1</sup>、赤津博康<sup>3</sup>、齊藤祐子<sup>4</sup>

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、 $\alpha$ 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 $\mu$ m 厚連続切片を作成し、本研究に用いた。pSer409/410 (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 $\beta$ 、 $\alpha$ -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。

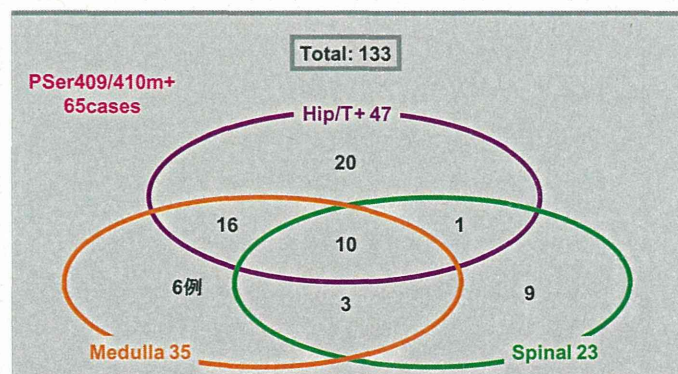
(倫理面への配慮)

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、いずれも突起ないシ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、凍結側での免疫ブロットの型別判定は困難だが、type A が疑われた。

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

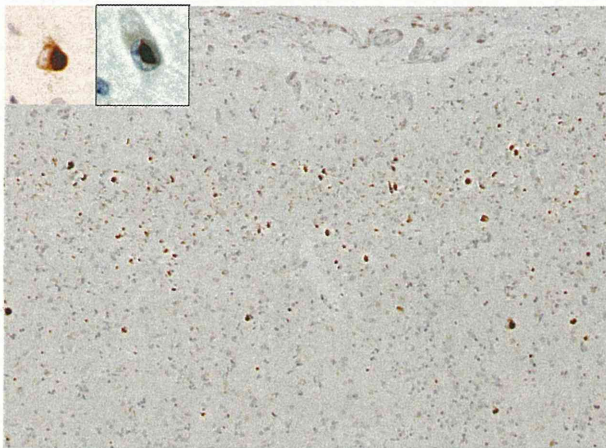


図 2. アルツハイマー病・レビー小体型認知症合併例の側頭葉抗リン酸化 C 末 TDP43 抗体 (pSer409/410 monoclonal) 免疫染色所見。多数の神経細胞内陽性所見 (左 inlet) に加え、核内封入体 (右 inlet) を認め、type A に該当する。

#### 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、 $\alpha$ 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

- 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
- 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
- Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraiishi 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
- Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T. Enhanced antigen retrieval of amyloid  $\beta$  immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid  $\beta$  pathology in Alzheimer disease and its mouse model. *J Histochem Cytochem.* 2012; 60 (10): 761-9.
- 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



proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet.* 2012; 91(2): 320-9

6. Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y and the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Altered  $\gamma$ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* 2012; 4 (4): 344-352

7. 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, David M. A. Mann, Tamaoka A: Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy *Brain* 2012; 135 (11): 3380- 91

8. Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima M, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama S, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H: Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology* 2012; 32 (6): 593- 603

9. Funabe S, Takao M, Saito Y, Hatsuta H, Sugiyama M, Ito S, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Hattori N, Murayama S: Neuropathologic analysis of Lewy- related alpha- synucleinopathy in olfactory mucosa. *Neuropathology* 2013; 33: 47-58

## 2.学会発表

1. Sabbagh M, Seibyl J, Akatsu H, Ouchi Y, Beach T, Charny A, Barthel H, Senda K, Murayama S, Ishii K, Leverenz J, Ghetti B, Ironside J, Roth K, Hoffmann A, Schulz- Schaeffer W, Reininger C, Sabri O: Results of a multicentre phase 3 trial on florbetaben for  $\beta$ -amyloid brain PET in Alzheimer disease. 2012 AAN, Florida, April, 2012.

2. Morimoto S, Kokubo Y, Kihira T, Saito Y, Takahashi H, Kuzuhara S, Murayama S: Immunochemical and immunocytochemical studies of tauopathy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ Parkinson dementia complex (PDC)- Kii. 2012 AANP Meeting, Chicago, June, 2012.

3. Schulz-Schaeffer W, Hoffmann A, Sabri O, Seibyl J, Akatsu H, Takao M, Beach TG, Murayama S, Ghetti B, Ironside J, Leverenz J, Roth K, Reininger C, Sabbagh M: Detection of  $\beta$ -amyloid by florbetaben PET: histopathological verification in a global phase 3 clinical trial.

4. Morimoto S, Kokubo Y, Saito Y, Hasegawa M, Kihira T, Yoshida S, Takahashi H, Yoshida M, Kuzuhara S, Murayama S: Establishment of pathology center for ALS/ PDC- Kii, Japan. 2012 AAIC, Vancouver, July 2012

5. Nakamoto FK, Takao M, Maeda D, Ikemura K, Hayashi T, Ito S, Takahashi Y, Fukayama M, Tsuji S, Murayama S: FUS-immunopositive

inclusions and compound Pick bodies in frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease (FTLD- MND- FUS). FTD 2012, Manchester, September 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  
なし。

## 三重県北勢部の病院の筋萎縮性側索硬化症剖検例の再評価

報告者：吉田眞理<sup>1)</sup>、岩崎靖<sup>1)</sup>、三室マヤ<sup>1)</sup>、辰己新水<sup>1)</sup>、酒井素子<sup>2)</sup>、久留聡<sup>2)</sup>、小長谷  
正明<sup>2)</sup>、家田俊明<sup>3)</sup>、伊藤益美<sup>4)</sup>、森恵子<sup>4)</sup>

所属：1) 愛知医科大学加齢医科学研究所、2) 国立鈴鹿病院神経内科、  
3) 四日市市民病院神経内科 4) 小山田記念温泉病院神経内科

### 研究要旨

*C9ORF72* 遺伝子異常を呈した三重県の ALS/FTD 家系が報告されたので、*C9ORF72* 遺伝子異常の有無の可能性を三重県北勢部の ALS 剖検 7 例について、抗リン酸化 TDP-43 抗体、抗 p62 抗体、抗 UBQLIN2 抗体で免疫組織学的に検討した。7 例の死亡時年齢は平均 61 歳、罹病期間は平均 5 年 8 ヶ月、三重県内出身 5 名、千葉県と不明が各 1 名、家族歴は 2 例に記載されていた。5 例は ALS-TDP（紀伊 ALS-PDC1 例を含む）を示したが、小脳顆粒細胞の ubiquilin、p62 染色はすべて陰性であった。2 例は ALS-SOD1 であった。

### A. 研究目的

2006 年に筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）のユビキチン陽性封入体の構成成分が TDP-43 であることが同定され、孤発性 ALS の大部分の症例が TDP-43 陽性封入体を形成することが確認された。また TDP-43 遺伝子変異を示す家族性 ALS も同定され、TDP-43 は孤発性・家族性 ALS の病態形成に密接に関与することが確認された。一方、2011 年に第 9 染色体短腕 21 領域に連鎖する家族性 FTD-ALS において原因遺伝子 *C9ORF72* が同定された。*C9FTD/ALS* は TDP-43 proteinopathy を呈し、小脳の顆粒細胞、海馬顆粒細胞に ubiquilin 陽性、p62 陽性かつリン酸化 TDP-43 陰性封入体を認めることが特徴とされる。*C9ORF72* 陽性 FTD/ALS の疾患頻度は本邦では低いとされたが、*C9ORF72* 遺伝子異常を呈した三重県の ALS/FTD 家系が報告された。そこで、地域集積性がある可能性も推測し、三重県北勢部の ALS 剖検例の再検討が必要と考え、免疫組織学的に *C9ORF72* 遺伝子異常の特徴的病理像の有無を探索した。

### B. 研究方法

三重県北勢部 3 病院の ALS 剖検 15 例中 7 例の

ホルマリン固定、パラフィン包埋切片の小脳、海馬、脊髄を免疫組織学的に検討した。抗リン酸化非依存性 TDP-43 抗体（rabbit polyclonal、Proein Tech、熱湯 20 分、98%ギ酸 20 分、3000 倍）抗リン酸化 TDP-43 抗体（PSer409/410 rabbit polyclonal、熱湯 20 分、98%ギ酸 20 分、3000 倍）、抗 ubiquitin 抗体（rabbit polyclonal、Dako、熱湯 20 分、98%ギ酸 20 分、2500 倍）、抗 p62 抗体（polyclonal、Progen、熱湯 20 分、400 倍）抗 UBQLIN2 抗体（mouse monoclonal、5F5、Abnova、10000 倍）および（rabbit polyclonal、Acris、熱湯 20 分、98%ギ酸 20 分、150 倍）で染色した。

### C. 研究結果

7 例の死亡時年齢は平均 61 歳（42～84 歳）、男女比は 3：4、罹病期間は平均 5 年 8 ヶ月（1 年 5 ヶ月～8 年）、出身は 5 名が三重県内（桑名、亀山、鈴鹿など）、1 名は千葉県、不明が 1 名、家族歴は 2 例に記載されていた。臨床像は下位運動ニューロン障害が優位なものが 2 例、上位および下位運動ニューロン障害ともに認めた例が 4 例、上位運動ニューロン障害が優位であったものが 1 例であった。紀伊半島の ALS/PDC

に合致する病理像を示す1例に認知症を認めたが、パーキンソニズムは全例みられなかった。病理学的に5例のLMNにTDP-43 proteinopathyを認めたが(紀伊半島のALS/PDCを含む)、小脳顆粒細胞のubiquilin、p62染色はすべて陰性、海馬歯状回顆粒細胞はリン酸化TDP-43抗体陽性NCIを認める1例に陽性像を認めた以外は4例で陰性だった。また2例(家族歴なし)はLewy body-like hyaline inclusion、後索中間根帯・Clarke柱・脊髄小脳路変性を認めubiquilin、p62は陰性だった(遺伝子は未検)。

#### D. 考察

*C9ORF72* 遺伝子変異を伴うFTD/ALSでは小脳顆粒細胞、海馬歯状回顆粒細胞にリン酸化TDP-43陰性、ubiquitin、p62、ubiquilin陽性封入体が出現することが特徴である。三重県北勢部のALS剖検例のスクリーニングでは、このパターンに合致する病理像は確認されなかった。一方、病歴上は孤発性であるものの、病理学的にALS-SOD1が2例確認され、家族性ALSが孤発性ALSの中に潜在していることが再確認された。今後は臨床、病理、遺伝子を含む多様な解析をすすめることが重要である。

#### E. 結論

抗p62抗体、抗ubiquilin抗体免疫染色による三重県北勢部の病院のALS7例の予備的検討では、*C9ORF72*陽性例に特徴的な所見として報告された小脳顆粒細胞、海馬歯状回顆粒細胞のubiquilin陽性封入体は陰性だった。さらに症例を追加して検討する予定である。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Mori F, Tanji K, Kon T, et al. FUS immunoreactivity of neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2012;

38: 322-328.

2. Mori F, Tanji K, Odagiri S, et al. Ubiquitin-related proteins in neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease. *Pathol Int.* 2012; 62: 407-411.
3. Mori F, Tanji K, Odagiri S, et al. Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. *Acta Neuropathol* 2012;124: 149-151.
4. Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, et al. Optineurin immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions of polyglutamine diseases (Huntington's, DRPLA, SCA2, SCA3) and intranuclear inclusion body disease. *Acta Neuropathol* 2012; 123: 747-749
5. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, et al. The TRK-Fused Gene Is Mutated in Hereditary Motor and Sensory Neuropathy with Proximal Dominant Involvement. *Am J Hum Genet* 2012; 91, 320-329

##### 学会発表

1. 田村拓也 他. 明らか家族歴を確認できないSOD1遺伝子Gly93Ser変異が同定された筋萎縮性側索硬化症の1剖検例. 第53回日本神経病理学会総会学術研究会 新潟市2012年6月30日

#### H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

なし

## TDP-43 の C 末端領域の凝集に関わる配列の同定

研究分担者：久永 眞市<sup>1)</sup>

研究協力者：下中 翔太郎<sup>1,2)</sup>、野中 隆<sup>2)</sup>、長谷川 成人<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 首都大学東京 理工学研究科生命科学専攻 神経分子機能研究室

<sup>2)</sup> 東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能分野 病態細胞生物研究室

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及び前頭側頭葉変性症 (FTLD) のユビキチン陽性封入体 (UbIs) の主成分として核蛋白の TDP-43 が同定され TDP-43 の蓄積機構が注目されている。本研究では、患者脳の病態を再現する細胞モデルを用いて TDP-43 の凝集に関わる配列の同定を試みた。TDP-43 の C 末端側の配列を 20 残基ごとに欠損させた変異体構築して細胞に発現させ、蛍光顕微鏡観察とイムノブロットによる解析を行った。その結果、274-293、294-313、354-373 を欠損させた 3 種の欠損体において、欠損のない C 末断片に比べ、凝集体形成能の劇的な低下が観察された。このことは、これらの配列が、TDP-43 の凝集体形成に必要な配列であるということを示している。凝集体が形成されるプロセスを考える際に、これらの配列の関与を考慮することで、ALS、FTLD の根治療法確立に向けた TDP-43 の凝集メカニズムの解明に役立てることができると考えられる。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭葉変性症 (FTLD) などの神経変性疾患において、TDP-43 が主要成分であるユビキチン陽性封入体 (ubIs) が変性部位に認められ、細胞脱落との関わりが示唆されている。本研究では TDP-43 の凝集、蓄積に必要な配列を同定することを目的とした。この配列が明らかになれば、TDP-43 の蓄積メカニズムの解明だけでなく、治療や予防法の構築につながることを期待される。

### B. 研究方法

TDP-43 の C 末端側の 214 番目の残基から 414 番目の残基までについて 20 残基ずつを順に欠損させた C 末端断片 162-414 を、GFP との融合蛋白として発現するコンストラクト 9 種類を作製した。これらの欠損変異体と、欠損なしの断片をヒト神経芽細胞 SH-SY5Y にトランスフェクションし、

37°C にて 2 日間培養した。

欠損なしの断片と欠損変異体を一過性に発現させた SY5Y 細胞を、共焦点蛍光顕微鏡にて 488nm の波長で GFP タンパク質の発現、凝集を観察した。凝集体を形成した場合に、凝集体を形成しないものよりも強い蛍光を発することから、凝集体だけを検出するように閾値を設定して輝度抽出を行い、得られた輝度を積算して凝集体形成を定量化した。

また、界面活性剤である Sarkosyl (Sar) を 1% 含むバッファーで細胞を回収、超音波処理した後、超遠心を行った細胞の上清を Sar 可溶性 (sup)、沈殿を Sar 不溶性 (ppt) として分画した。それぞれの画分に対して、抗 GFP 抗体、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409/410: 疾患中に見られる異常リン酸化部位に対する抗体) を用いてイムノブロットを行って、不溶化 TDP-43 を検出、定量した。

### C. 研究結果