

4. 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
 5. Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, *et al.* Alteration of *POLDIP3* splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. *PLoS One* 7: e43120, 2012
 6. Tanaka H, Shimazawa M, Kimura M, *et al.* The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 2: 573, 2012
 7. Tanji K, Zhang H-X, Mori F, *et al.* p62/sequestosome 1 binds to TDP-43 in brains with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *J Neurosci Res* 90: 2034-2042, 2012
 8. 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
5. 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
 6. 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

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. 他田真理, 柿田明美, 志賀 篤, ほか. 上位運動ニューロンの組織変性が下位のそれに比し高度であった ALS 剖検例の検討. 第 53 回日本神経病理学会, 2012, 6, 30, 新潟
3. 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
4. 竹内亮子, 豊島靖子, 田中 一, ほか. 比較的長期に経過した ALS-FUS の一剖検例. 第 53 回日

ALS における BTBD10 蛋白発現についての病理学的検討

研究分担者 岡本幸市¹⁾

研究協力者 古田夏海¹⁾, 牧岡幸樹¹⁾, 藤田行雄¹⁾,
池田将樹¹⁾, 高玉真光²⁾, 松岡正明³⁾

1) 群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学, 2) 老年病研究所附属病院,
3) 東京医科大学薬理学

研究要旨

最近の研究で、孤発性 ALS 患者の脊髄前角細胞における BTBD10 蛋白 (BTB/POZ domain containing protein10) 発現減少が報告されているが、ヒトの ALS において BTBD10 蛋白の発現減少が神経細胞変性と関連するか否かは依然として不明である。我々は、ALS の脊髄前角細胞 (ALS13 例, 非 ALS10 例, および ALS5 例のミラー切片) において BTBD10 蛋白, Golgi 装置, リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) に対する免疫染色を行い、病理学的に検討した。ALS の脊髄前角細胞では対照例と比較して、BTBD10 蛋白発現の低下が有意にみられた。ミラー切片を用いた検討では、BTBD10 蛋白の発現が低下している運動神経細胞では、Golgi 装置の微細化や pTDP-43 の異常集積が高頻度に出現したことより、BTBD10 蛋白の発現低下は、ALS における運動ニューロン変性過程に関与しているものと考えられた。

A. 研究目的

最近の研究で、孤発性 ALS 患者の脊髄前角細胞における BTBD10 蛋白 (BTB/POZ domain containing protein10) 発現減少が報告されている (Nawa et al, 2012)。セリン/スレオニンキナーゼである Akt は、標的となる蛋白をリン酸化することで、細胞の生存に必要なシグナルを伝達する。BTBD10 蛋白は Akt を不活化させる protein phosphatase 2A (PP2A) を阻害することで、Akt を活性化する (Nawa et al, 2008)。ALS2 遺伝子がコードする alsin 蛋白は、Rac1/PI3K/Akt3 経路を活性化することで、SOD1 変異体の誘導する神経細胞毒性を抑制することが知られており、BTBD10 蛋白を高発現させた G93A-SOD1 変異マウスで運動ニューロン死が減少したとの報告もある (Nawa et al, 2008)。

BTBD10 蛋白発現と運動ニューロン変性は密接な関係があると考えられる。しかしながら、ヒトの ALS において BTBD10 蛋白の発現減少が神経細胞の変性と関連するか否かは依然として不明である。

我々は、ALS の脊髄前角細胞において BTBD10 蛋白, Golgi 装置, リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) に対する免疫染色を行い、病理学的に検討した。

B. 研究方法

ALS13 例と非 ALS 10 例の腰髄前角細胞におけるホルマリン固定パラフィン包埋切片を、免疫組織学的方法を用いて検討した。一次抗体として当教室で作成した BTBD10 蛋白に対するウサギポリクローナル抗体を用いた。BTBD10 蛋白の免疫染色性は固定状態によって影響を受けたので、染色性のよい症例を用いた。

次に、ALS5 例の 3 ミクロン厚ミラー切片を用いて、BTBD10 蛋白発現低下と Golgi 装置の微細化および pTDP-43 の異常蓄積との関係を調べるため、一次抗体として抗 BTBD10 蛋白抗体に加え、human trans-Golgi network 内側の蛋白質を認識する抗 TGN46 抗体, p-TDP43 抗体を用いて検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で用いたすべての病理標本は、所定の手続きを経て、研究への同意を得ている。

C. 研究結果

抗原の特異性として、ウエスタンブロッティングで抗 BTBD10 蛋白抗体は 54kDa 付近に特異的なバンドがみられた。抗原ペプチドによる抗体吸収試験でも、抗 BTBD10 蛋白抗体の特異性が示された。

非 ALS 例の脊髄前角細胞では、微細顆粒状に細胞質が抗 BTBD10 蛋白抗体によって染色された。一方、ALS 症例では、抗 BTBD10 蛋白抗体陽性となる神経細胞数が減少しており、特に大型の神経細胞において減少が明らかであった (Fig.1)。

ALS13 例と非 ALS10 例で病理学的に脊髄前角細胞における BTBD10 蛋白発現減少を検討した。結果は、非 ALS 例では平均 5.0% (4.4~5.8%) のみで BTBD10 蛋白発現減少がみられたのに対し、ALS 例では BTBD10 蛋白発現減少が平均 51.9% (42.1~59.5%) と優位に発現が減少していた ($p < 0.001$)。

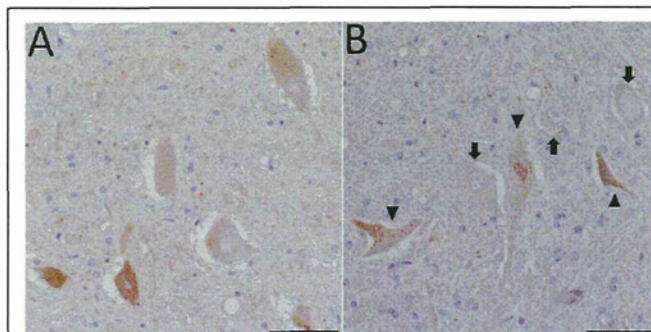


Fig.1 抗 BTBD10 蛋白抗体による脊髄前角細胞の免疫染色。

非 ALS 例 (A) では、びまん性、微細顆粒状に細胞質が抗 BTBD10 蛋白抗体によって染色された。ALS 例 (B) では、BTBD10 蛋白陽性細胞 (矢頭) は有意に減少がみられた。BTBD10 蛋白発現が減少している神経細胞 (矢印) は、特に大型の神経細胞において減少が明らかであった。

ALS 例でのミラー切片を用いた検討では、BTBD10 蛋白発現が正常である神経細胞の多くは、Golgi

装置は正常で pTDP-43 の異常凝集はみられなかった。一方、BTBD10 蛋白発現が低下している神経細胞の多くは、Golgi 装置の微細化や pTDP-43 の異常凝集がみられた (Fig.2)。

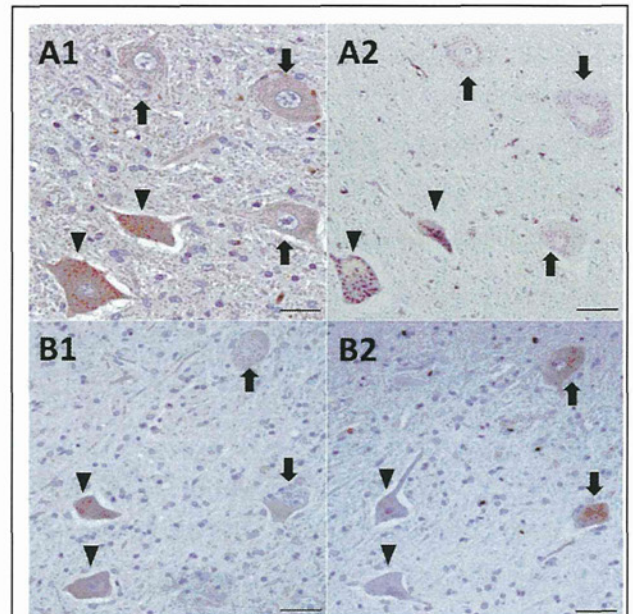


Fig.2 ミラー切片を用いた脊髄前角細胞における ALS 症例の検討。

免疫染色は抗 BTBD10 蛋白抗体 (A1, B1)、抗 TGN46 抗体 (A2)、抗 pTDP-43 抗体 (B2) を示している。BTBD10 蛋白発現が減少している神経細胞 (A1, B1 矢印) では、Golgi 装置の微細化 (A2 矢印) および pTDP-43 (B2 矢印) の異常凝集がみられた。BTBD10 蛋白発現が正常な神経細胞 (A1, B1 矢頭) では、Golgi 装置は正常 (A2 矢頭) で pTDP-43 の異常凝集はみられなかった (B2 矢頭)

BTBD10 蛋白発現が正常である神経細胞で、Golgi 装置が正常であるものは平均 89.6% (86.2~92.5%)、pTDP-43 の異常凝集がみられないものは平均 91.8% (89.7~93.1%) で、BTBD10 蛋白発現が減少している神経細胞で、Golgi 装置が正常であるものは平均 10.5% (7.5~13.8%)、pTDP-43 の異常凝集がみられないものは平均 8.0% (6.9~10.3%) で、BTBD10 蛋白が正常である神経細胞では、有意に正常な Golgi 装置 ($p < 0.001$) または pTDP-43

凝集正常 ($p < 0.001$) が多くみられた。

一方、BTBD10 蛋白発現が減少している神経細胞では、Golgi 装置の微細化がみられたものは平均 93.5% (92.9~94.3%)、pTDP-43 の異常凝集がみられたものは平均 95.1% (93.8~96.5%) で、BTBD10 蛋白発現が正常な神経細胞では、Golgi 装置の微細化がみられたものは平均 6.5% (平均 5.7~7.1%)、pTDP-43 の異常凝集がみられたものは平均 4.8% (3.5~6.2%) で、BTBD10 蛋白発現が減少している神経細胞では、有意に Golgi 装置の微細化 ($p < 0.001$) または pTDP-43 異常凝集 ($p < 0.001$) が多くみられた。

D. 考察

大多数の ALS 症例で、TDP-43 が異常凝集することが知られているが、今回、BTBD10 蛋白発現減少と pTDP-43 の異常凝集に強い関係が示されたことから、BTBD10 蛋白発現減少は ALS の病態に共通する機序である可能性が考えられた。

BTBD10 蛋白発現が減少している神経細胞の大部分では、pTDP-43 の異常凝集が起こっているのと同時に、Golgi 装置の微細化がみられた。Golgi 装置は神経細胞における蛋白の軸索輸送に関与しており、TDP-43 が異常蓄積する神経細胞では高率に Golgi 装置の微細化がみられることを以前に報告した (Fujita et al, 2008)。微小管は細胞内の軸索輸送に関わる働きが知られているが、微小管の安定化に関わる蛋白質である stathmin は Akt により活性化されることが知られている (Karst et al, 2011)。BTBD10 蛋白は Akt を活性化させることから、BTBD10 蛋白発現減少により微小管の不安定化が起こり、細胞内の軸索輸送が障害され、Golgi 装置の微細化が起こった可能性が推察される。

E. 結論

ALS の脊髄前角細胞では対照例と比較して、BTBD10 蛋白発現の低下が有意にみられ、BTBD10 蛋白の発現が低下している運動神経細胞では、Golgi

装置の微細化や、pTDP-43 の異常集積が高頻度でみられたことより、BTBD10 蛋白の発現低下は、ALS における運動ニューロン変性過程に関与しているものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furuta N, Makioka K, Fujita Y, Ikeda M, Takatama M, Matsuoka M, Okamoto K. Reduced expression of BTBD10 in anterior horn cells with Golgi fragmentation and pTDP-43-positive inclusions in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* (in press).

2. 学会発表

1. 古田夏海, 牧岡幸樹, 藤田行雄, 高玉真光, 岡本幸市. ALSにおけるBTBD10蛋白発現についての病理学的検討. 第53回日本神経学会総会, 東京, 2012.
2. Furuta N, Fujita Y, Takatama M, Matsuoka M, Okamoto K. Reduced expression of BTBD10 in anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis. 16th congress of the European Federation of Neurological Societies, Stockholm, Sweden, 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

パーキンソン病が先行した筋萎縮性側索硬化症の3例

研究分担者 梶 龍児¹⁾

研究協力者 和泉唯信¹⁾，藤田浩司¹⁾，小泉英貴¹⁾，鎌田正紀²⁾，
隅蔵大幸³⁾，初田裕幸³⁾，村山繁雄³⁾

1) 徳島大学神経内科，2) 香川大学神経内科，
3) 東京都健康長寿医療センター・高齢者ブレインバンク

研究要旨

パーキンソン症状が先行した筋萎縮性側索硬化症（ALS）の3例を経験した。3例とも levodopa で運動症状の改善は認めないものの MIBG 心筋シンチでの取り込み低下を示した。続発した ALS の経過は早く全て1年以内に人工呼吸器を要する状態になった。死亡した1例の神経病理所見は ALS とパーキンソン病であり、海馬に強調される神経原線維変化は認めず ALS/PDC-Kii とは異なる疾患であった。

A. 研究目的

パーキンソン病（PD）が先行した筋萎縮性側索硬化症（ALS）3例の臨床所見および1例の神経病理所見を提示する。

B. 研究方法

3例とも両親に血族結婚なく家系内に神経疾患はいない。症例1：67歳、女性。64歳時に動作緩慢が出現しPDと診断され、レボドパを600mgまで増量したが無効。67歳時から前傾姿勢が強くなり、同じ頃から左手足の脱力を認めた。その時点で、脳神経系に異常所見なし、運動系では左上下肢に筋力低下あり、右手関節に軽度筋強剛を認めるが、静止時振戦なし。深部反射は上肢正常で下肢亢進、Chaddock 反射両側陽性。感覚系に異常なし。Camptocormia あり、小刻み歩行ですくみも認める。自律神経系では軽度の起立性低血圧あり。HDS-R 25/30、FAB 14/18。筋力低下が徐々に進行し筋電図で広範な活動性脱神経所見を認めALSの合併と考えた。68歳時にNPPVを導入。呼吸状態安定していたが突然死し剖検を行った。症例2,3はパーキンソニズムの発症が65,67歳でALS症状の出現が69,68歳。ともにパーキンソニズムにレボドパは無効

だった。ALSの出現から呼吸器を要するまで14カ月,8カ月と急速な進行をたどった。3例ともMIBG心筋シンチの取り込み低下を認めパーキンソニズムはパーキンソン病によるものと考えた。

（倫理面への配慮）

病理解剖にあたっては家族に十分な説明を行い書面による同意を得た。

C. 研究結果

症例1の脳重は1270gで外観に異常なし。組織学的には左室前壁・食道・脊髄・脳幹・辺縁系・新皮質に広範なレビー小体病理を認めた。脳幹底部・基底核や歯状核において、明かな変性やシヌクレイン免疫染色におけるglial cytoplasmic inclusion (GCI)を認めず、多系統萎縮症の病理学的所見は見られなかった。上位・下位運動ニューロンの変性を認め、脊髄・脳神経の運動神経核に抗リン酸化TDP43抗体陽性構造物を多数認めたことはALSに矛盾しない所見であった。非運動ニューロン領域におけるTDP43抗体陽性の神経細胞およびグリア細胞は橋核・網様体・下オリーブ核・背側副オリーブ核・淡蒼球外節・視床に局限していた。老人斑：後頭葉にごく少量のdiffuse plaqueを認める。classic plaqueは認めない。

海馬・嗅内野・被殻・小脳には認めない(Braak stage A, Thal phase 1)。神経原線維変化(NFT)：移行嗅内野に少量の AT8 陽性 GB 染色陰性 pretangle(PT)・NFT・neuropil thread (NT)を認める。嗅内野にはごく少量のみで、海馬支脚・固有海馬・T4以降には認めない。(Braak AT8 stage 1, Braak NFT stage 1)。

神経病理学的診断：PD、ALS

D. 考察

ALS/PDC-Kii との鑑別を要する3例を経験したが、1例の神経病理所見は海馬に強調されるNFTは認めずそれとは異なると考えた。基底核が保たれているにもかかわらず levodopa 不応性である理由は不明でありさらに検討する必要がある。

E. 結論

パーキンソン症状が先行したALSの3例を経験した。今後同様の症例を集積し病態の共通性を確認する必要がある。

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. 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): 320-329
2. Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G; Japanese Consortium

for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2012; 33(10): 2527.e11-16

3. Sako W, Ito H, Yoshida M, Koizumi H, Kamada M, Fujita K, Hashizume Y, Izumi Y, Kaji R. Nuclear factor κ B expression in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis and hereditary amyotrophic lateral sclerosis with optineurin mutations. *Clin Neuropathol* 2012; 31(6): 418-423

2. 学会発表

1. 和泉唯信, 宮崎由道, 島谷佳光, 寺澤由佳, 佐藤健太, 藤田浩司, 鎌田正紀, 川村和之, 瓦井俊孝, 梶龍児：筋萎縮性側索硬化症に合併するパーキンソニズムの頻度と臨床症状. 第53回日本神経学会学術大会, 東京, 2012年5月
- #### H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

紀伊半島 ALS-parkinsonism-dementia 家系症例の臨床と病理像の対比

研究協力者 葛原茂樹¹⁾

小久保康昌²⁾、佐々木良元²⁾

1) 鈴鹿医療科学大学, 2) 三重大学神経内科

研究要旨

紀伊半島 ALS 集積地の家族性発症 ALS-parkinsonism-dementia の同一家系に属す 2 世代の発症者 12 名の臨床徴候と 5 例の神経病理学的所見を検討した。初発症状は運動ニューロン病徴候、パーキンソニズム、認知症と異なっても、大部分の症例が経過中にパーキンソン・認知症複合となり、運動ニューロン病徴候を合併した症例もあった。剖検所見の特徴は、臨床病型如何にかかわらず、脳幹と大脳皮質に多数の NFT が出現し、ALS 病変を伴うという所見は共通していたので、単一疾患の臨床表現型の違いと考えた。原因は遺伝子異常の可能性が高いが、1940 年以降の出生者は発症年齢に達していても発症者がいないので、環境因の影響も否定できない。

A. 研究目的

紀伊半島南部には、グアム島と並ぶ筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）の高集積地域が点在する。高集積地の一つである三重県 H 地区の ALS は家族性発症例が多いことが、八瀬らにより指摘されていた。我々は、この地域にはグアムのパーキンソン認知症複合（parkinsonism-dementia complex: PDC）に、臨床的にも病理学的にも近似した疾患（紀伊半島 PDC）が存在し、家族性にも同一患者にもしばしば ALS と重複して出現することを明らかにした。本研究では、数世代にわたって ALS と PDC が発生している第家系の発症例について、臨床表現型と病理所見を対比検討することにより、本疾患の本体を検討する。

B. 研究方法

同一祖先の子孫に数世代にわたって ALS/PDC が発生している家系（図 1）の、第 6 世代と第 7 世代の発症者 12 例（男女それぞれ 6 例）と剖検例 5 例について、臨床症状、画像所見、神経病理学的所見を検討した。発症者の中で最も遅い出生年は 1939 年（症例 12）であった。発症者 12 例の中で神経内科的所見が評価されていたのは 6 例

で、その中の 2 例を含む 5 例が剖検されていた。古い症例が含まれているために、病歴、標本ともに不完全なものもあったが、当時の担当医や家族からもできる限りの情報収集を行った。

臨床表現型分類。従来の我々の研究から、本疾患に出現する主要徴候は、①上位および下位の運動ニューロン病（motor neuron disease: MND）徴候、②動作緩慢と筋強剛を中核症状とし、典型的安静時振戦を伴うことも伴わないこともあるパーキンソン症候群、③精神緩慢、無為、無関心を主徴とする認知症（dementia）であり、経過中にこれらが単独あるいは複数の組み合わせで出現してくることが判明している。初発症状、経過中に出現した症状と最終完成病型を検討した。

神経病理学的検討。脳と脊髄は、ホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック切片に、一般病的染色、鍍銀染色、Gallyas-Braak 染色、免疫組織化学染色（タウ/AT8、アミロイド A β 、TDP-43、 α -シヌクレイン）を施した。一般的病理組織学的所見と共に、特に ALS 病変、アルツハイマー神経原線維変化（neurofibrillar tangle: NFT）の出現量と分布、TDP-43 封入体の種類と部位に注目して検討した。古い症例に関して、パラフィン

ブロックが残っているものについては、神経病理学的特殊染色と免疫組織化学を追加した。

(倫理面への配慮)

三重大学医学部倫理委員会の承認を受けた。臨床情報に関しては、医学的データが損なわれない範囲内で、個人情報保護に配慮して扱った。

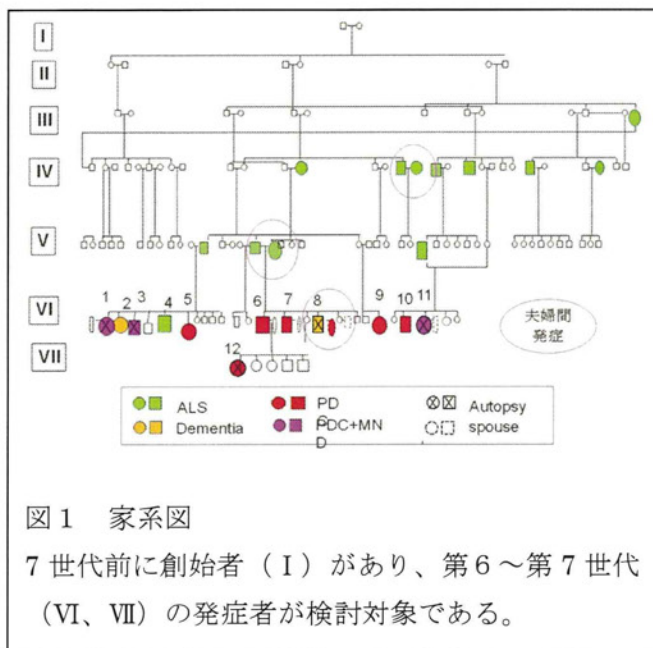


図1 家系図

7世代前に創始者（I）があり、第6～第7世代（VI、VII）の発症者が検討対象である。

C. 研究結果

家系図と対応させた発症者の位置、発症年齢と死亡年齢、初発症状、その後に出現した主要症状（意欲低下を特徴とする認知症、パーキンソン症状、上位運動ニューロン症状、下位運動ニューロン症状）、最終的な病型、病理学的所見を表1に一覧表にして示す。

最終的完成病型としては、次の4病型が認められた。ALSは運動ニューロン症状だけに留まったもので、古典的ALS、進行性球麻痺（PBP）、進行性筋萎縮症（PMA）のいずれかの病型を示した。ALS-dementia：ALS症状と認知症がほぼ同時期に出現し、パーキンソニズムが明らかでなかったもの。PDC：パーキンソニズムと認知症が相前後して出現したが、運動ニューロン症状が明らかでなかったもので、PDC with MND：PDC完成後に、上位あるいは下位の運動ニューロン障害症状が顕在化したもの。次に、代表的症例を提示する。

症例3 臨床診断 ALS (PMA)-Dementia

現病歴：70歳より認知症（物忘れ、意欲低下）が進行、76歳時に運動時の息切れ出現。肺炎と呼吸困難で入院。記憶障害と意欲低下があったが、人格は保たれコミュニケーションは可能であった。体幹と四肢筋の萎縮は中等度で、特に肋間筋と横隔膜の筋力低下による呼吸不全があった。気管切開し人工呼吸器を装着した。四肢腱反射減弱し、病的反射なし。脳CTとMRIで前頭側頭葉萎縮あり。肺炎治癒後に人工呼吸器離脱し、気管切開、車椅子レベルで退院した。77歳で肺炎にて死亡した。

神経病理学的所見（図2）：脳重1330g、前頭極と側頭極に限局性萎縮あり。前額断面で、海馬萎縮、黒質と青斑核の脱色素を認めた。ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色で、海馬神経細胞はCA1を中心にほぼ消失し、好酸性のghost tangleが密集した所見が認められ、Bielschowski染色で多数のNFTとして認められた。平野小体、細胞内塩基性NFTも散見された。

黒質と青斑核の神経細胞は高度に脱落し、NFTが出現していた。NFTは脳幹被蓋部の灰白質と諸核、側頭葉皮質にも多数認められ、前頭葉皮質まで及んでいた。老人班は認められなかった。脊髄

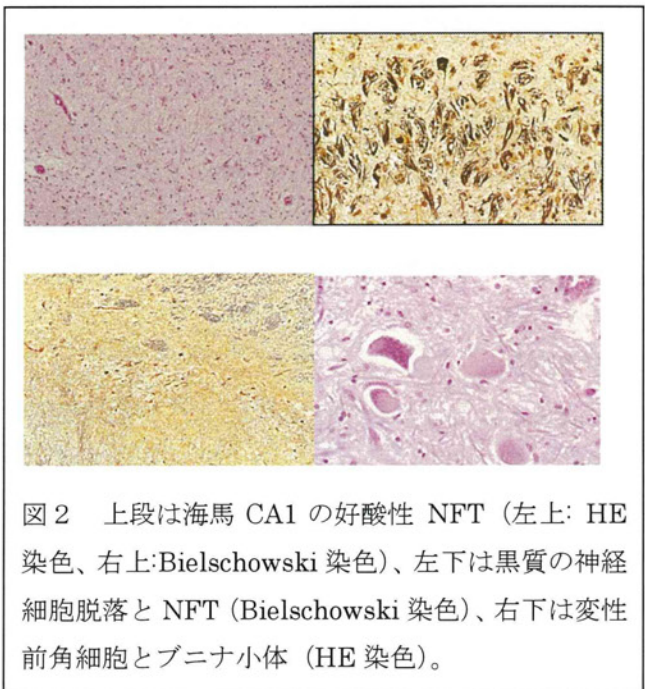


図2 上段は海馬CA1の好酸性NFT（左上：HE染色、右上：Bielschowski染色）、左下は黒質の神経細胞脱落とNFT（Bielschowski染色）、右下は変性前角細胞とプニナ小体（HE染色）。

表 1 12 症例の臨床症状と神経病理学的所見のまとめ

症例番号の青の 6 症例は神経学的診察で評価したもの、黄色の 5 例は剖検例

(D: dementia, P: parkinsonism, PDC+ALD: PDC followed by ALS, LMN: lower motor neuron, UMN: upper motor neuron, deg: degeneration, NA: not available, ND: not described, NFT: neurofibrillary tangle, LB: Lewy body, SP: senile plaque)

症例番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
発症年齢	64	86	69	57	67	47	65	57	72	53	40 頃	60
死亡年齢	71	94	77	65		52	70	63	82	60	45*	72
初発症状	D	D	D	ALS	PDC	PDC	D	D	PDC	D	PDC	P
最終臨床病	ALS-D	PDC	ALS-D	ALS	PDC	PDC	PDC	PDC	PDC	PDC	PDC+ALS	PDC
Dementia	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Parkinsonism	-	-	-	-	+	+	+?	+?	+	+	+	+
UMN signs	ND	-	-	ND	-				-	3+		1+
LMN signs	+		+	3+	-				-	3+		-
UMN deg	NA		-					NA		3+		-
LMN deg	+ XII		2+					NA		3+		2+
NFT	2+		3+					3+		3+		3+
TDP-43			+							+		+
LB								+		+		
SP	-		-					2+		-		-

は前角細胞が脱落し、残存細胞内にはグニナ小体が散見された。Klüver-Barrera luxol fast blue (KB) 染色では、側索の変性は明らかではなかった。TDP-43 陽性細胞内封入体が海馬歯状回の神経細胞内に散見された。

症例 2 高齢発症 PDC。 症例 3 の姉である。86 歳時に記憶障害が始まり、徐々に意欲低下が進行した。自発性欠如が目立ったが、行動心理学的症候群や幻覚なし。93 歳時の診察では、ボンヤリした表情で自発語は少なく、質問に短く答えるだ

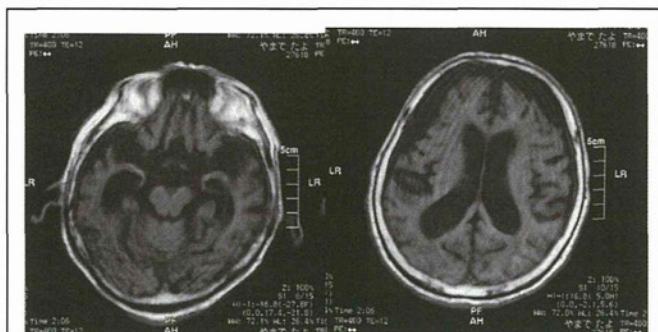


図 3 症例 2 MRI (T1WI)
海馬萎縮、前頭葉と側頭葉前に萎縮が高度。

けであったが、回答内容には誤りはなかった。歩行と動作は緩慢で、極く軽度の rigidity が認められたが、振戦はなかった。MRI (図 3) では、症例 3 や他の PDC 例と同様の、左右対称性で中等度の前頭側頭葉萎縮と高度の海馬萎縮・下角拡大が認められた。臨床診断は PDC。94 歳で死亡した。剖検なし。

症例 12 臨床診断：PDC。

本家系発症者で最も遅い 1930 年代出生。現病歴。H 地区で出生。20 歳代で結婚後は非集積地の市部にて生活。60 歳にパーキンソニズム（動作緩慢、筋強剛、振戦なし）発症し、L-ドパ著効せず。認知機能正常。左側上下肢で腱反射やや亢進、小手筋軽度萎縮、バビンスキー徴候陽性。65 歳時にももの忘れ出現。67 歳時から認知症とパーキンソニズム進行し、71 歳時には意欲低下とパーキンソニズムが高度。立位維持困難で介助で歩行。左側の腱反射亢進以外には、運動ニューロン徴候なく、筋萎縮や筋力低下はなし。MRI (図 4) では、海馬と前頭葉、側頭葉に中等度の萎縮を認めた。72 歳時に直腸がんで死亡。

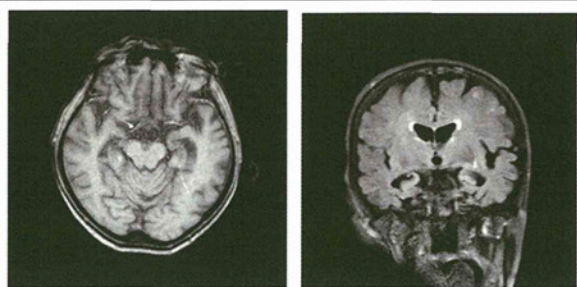


図 4 症例 12 の MRI (T1WI)
海馬萎縮が高度で、前頭葉と側頭葉にも中等度の萎縮あり。

剖検所見 (図 5)。脳重 1225g 前頭極と側頭極に萎縮が目立ち、海馬萎縮、黒質、青斑核脱色素を認めた。HE 染色で、海馬の神経細胞はほぼ消失し、好酸性の ghost tangle で占められていた。側頭回と島回には皮質型レビー小体が散見され、島回には典型的老人斑も散見された。脊髄前角細胞

数は保たれていたが、萎縮細胞や中心虎斑融解細胞が散見され、ブニナ小体が認められた。AT8 免疫染色では、神経細胞内 NFT が脳幹と大脳皮質、小脳歯状核に多数認められたことに加えて、軟膜下や血管周囲の星状グリア細胞内に多数のタウ陽性封入体が認められ、皮質下白質にも広範に認められた部位があった。大型の astrocytic plaque 様構造は、大脳皮質に広範に認められた。

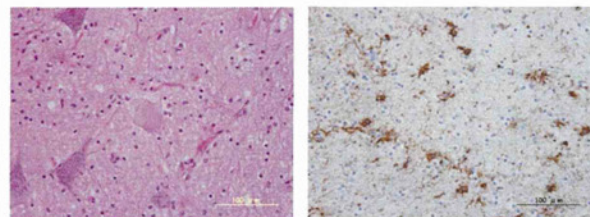


図 5. 症例 12. (左) 脊髄前角細胞のブニナ小体。
(右) 側頭葉白質と血管周囲のタウ陽性封入体を持つ星状グリアと astrocytic plaque 様の斑。

D. 考察

7 世代遡ると共通の創始者に収斂する紀伊半島 ALS・parkinsonism・dementia 家系の第 6 世代と第 7 世代の発症例 12 例を呈示した。全例が 1939 年以前の出生であった。6 例で神経学的診察が実施され、その中の 3 例を含む 5 例が剖検された。初発症状は、ALS, parkinsonism, dementia のいずれかであったが、ALS の 1 例を除いて最終的には認知症が出現して、ALS+dementia か PDC の病型となり、dementia は本家系の中核的症状と考えられた。全剖検例に、前頭側頭葉前極と海馬の萎縮、多数の NFT、Bunina 小体を伴う ALS 病変 (MND 徴候の有無に関係なく) が見られた。TDP-43 封入体は検査した全例にみられた。老人斑やレビー小体を認める例もあった。臨床病型が異なっても神経病理所見は共通しており、家族性 ALS・parkinsonism・dementia として単一疾患と考えられる。遺伝子異常が疑わしいが、1940 年以降の出生例がないことから、環境因の関与も否定できない。

E. 結論

紀伊半島の家族性 ALS・parkinsonism・dementia の 12 発症例(5 例が剖検例)を検討し、次の結論を得た。症例ごとに臨床表現型は多様であったが、病理所見は中枢神経系に NFT が多発し、ALS 病変を伴うという共通所見を呈し、単一疾患と考えられる。遺伝子異常による疾患が示唆されるが、1940 年以降の出生者に発症がないので、環境因子の影響も否定できない。

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

Kuzuhara S, Kokubo Y: Amyotrophic lateral sclerosis・parkinsonism・dementia complex in the Kii peninsula of Japan (Muro disease): a review on recent research and new concept. Amyotrophic Lateral Sclerosis and the Frontotemporal Dementias, Edited by Michael J. Strong, Oxford University Press, Oxford, UK, 2012, p39-54

Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S: α -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. J Neuropathol Exp Neurol. 2012 Jul;71(7): 625-630. doi: 10.1097/NEN.0b013e31825b9680

2. 学会発表

Kuzuhara S, Kokubo Y: Changing patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism・dementia complex (PDC) of the Kii peninsula of Japan The 13th Asian Oceanian Congress of Neurology 4-6 June 2012, Melbourne, Australia

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

筋萎縮性側索硬化症における髄液 microRNA プロファイリング解析

研究分担者 水澤英洋¹⁾

研究協力者 町田 明¹⁾、大久保卓哉¹⁾、松尾秀徳²⁾、横田隆徳¹⁾

1) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学

2) 国立病院機構長崎川棚医療センター神経内科

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の診断は、臨床症状とその経過および神経生理検査所見を組み合わせた臨床診断基準に従って行われているのが現状であるが、なかには診断に苦慮する症例も存在し、早期診断のための疾患バイオマーカーの確立が望まれている。我々は、近年、癌や免疫疾患の診断・治療に関する疾患バイオマーカーとして有望視されている microRNA（miRNA）に着目し、髄液中の miRNA を網羅的に解析するためのマイクロ RNA アレイの標準化法について検討した。従来用いられていた Global Normalization 法よりもより、個体間のバラツキの少ない、髄液に特化した標準化法である Top20th Normalization 法を新たに考案し、正常対照 9 例、ALS19 例の髄液検体を比較検討することで、ALS で有意に発現に差を認める 29 個（ALS で上昇：14 個、低下：4 個、ALS でのみ検出：11 個）の miRNA を確認した。これらのうち、高シグナルかつ定量性のある miRNA である、miR-A と miR-B の 2 つに至適な Cut off 値を設けることにより、正常対照と ALS を感度 68.4%、特異度 88.9% で判別することが可能となった。また ALS 髄液でのみシグナルが検出された miRNA のうち、miR-C、miR-D、miR-E、miR-F のいずれかが陽性である髄液を選択することで、感度 89.5%、特異度 100% で正常髄液との鑑別が可能であった。これらの miRNA の ALS の病態生理との関わりについてはまだ不明な点が多いが、ALS の早期診断のための疾患マーカーとして髄液中の miRNA が有用であることを示した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS)においては、近年の分子遺伝学及び分子生物学的進歩により、家族性のみならず孤発性においても関連遺伝子が多数同定されてきているが、多くは蛋白レベルでの機能を含めて不明なままである。また、その診断は依然として臨床症状とその経過および神経生理検査所見を組み合わせた臨床診断基準に従って行われているのが現状である。

microRNA (miRNA) は 21~23 塩基程度からなる短鎖 RNA で、標的となる mRNA に抑制的に働くことで遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしている。この miRNA の発現パターンが癌や免疫疾患、神経変性疾患でも変化することが報告

されており、miRNA の変化を血液などの体液を用いた疾患マーカーとして利用した報告が数多くみられるようになっている。しかしながら、他の体液と比較して髄液は RNA 量が少ないことや、髄液中の内因性コントロールとなる既知の miRNA がないことから、髄液中の miRNA の解釈には髄液に特化した標準化法やデータ解析法が必要である。

本研究では髄液中の miRNA を疾患マーカーとして利用できるマイクロ RNA アレイの測定系を確立するとともに、ALS の早期診断を可能とする疾患バイオマーカーとしての髄液 miRNA の探索・同定を試みた。

B. 研究方法

通常の診断目的で採取したヒト髄液を遠心

(500g x 10 分)することで細胞成分を取り除き、RNA 抽出後にマイクロ RNA アレイ(Toray 3D・GENE®)での解析を行った。臨床診断で正常と判明した髄液（正常対照）0.45mL, 0.9mL, 1.8mL の容量系列を作成し、定量性が認められた miRNA については、正常対照 9 例、ALS19 例を用いて解析を行った。

なお髄液採取に際しては、本大学脳神経外科・前原健寿先生/青柳傑先生、整形外科・大川淳先生/榎本光裕先生、頭頸部外科・岸本誠司先生、耳鼻咽喉科・角田篤信先生、血液内科・新井文子先生に御協力をいただいた。

(倫理面への配慮)

なおヒト髄液をサンプルとして使用するにあたり、本大学の倫理委員会を通じて承認・許可を得た（本学医学部倫理審査委員会第 512 番「神経筋疾患、ウイルス性疾患における RNA 発現プロファイル解析」で承認済み）。

C. 研究結果

マイクロ RNA アレイでの解析を行うことで、複数の正常対照髄液 0.9ml で定常的に発現している 337 個の miRNA が確認でき、そのうちシグナル強度の高い 41 個の miRNA については定量性を確認しえた（図 1）。

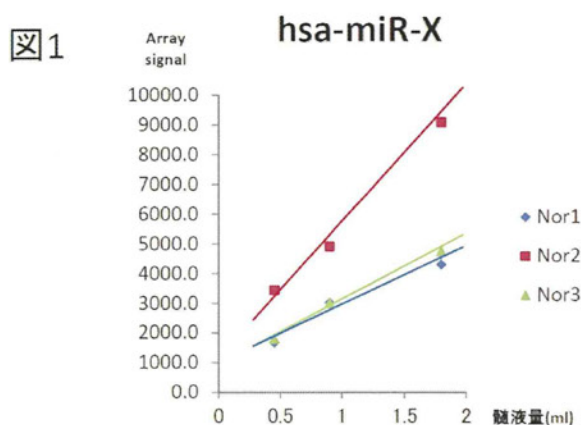
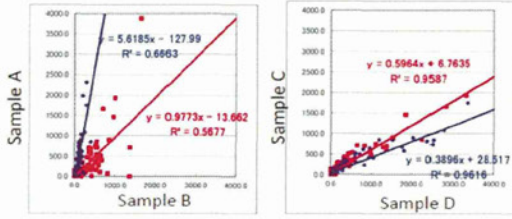


図 1:シグナル強度の高い 41 個の miRNA の 1 例. 各正常髄液検体(Nor1, Nor2, Nor3)で容量依存性にアレイシグナルが増加している。

1)髄液に特化したマイクロ RNA アレイ標準化法

miRNA の発現の比較に際しては、RNA 抽出効率などの実験手技によるバラつきが生じるため、評価に際しては標準化が必須となる。従来まで数多く用いられてきた Global Normalization 法（シグナル強度を順に並べた際の中央値が 25 になるようにした補正法）で髄液中の miRNA を補正すると、中央値として選択した miRNA が正常の個体間であってもそのシグナル強度がかなり変動するものを選択してしまう可能性がある。そのため我々は定量性を確認しえた、個体間のバラつきの少ない 41 個の miRNA の中央値である上位 20 番目の miRNA での補正(Top20th Normalization 法)を行った。そこで我々は、「正常髄液の網羅的解析における miRNA 群のシグナル値は全体として個体間で大きな差はない」という仮定のもと、個々のサンプルのシグナル強度を比較した場合に近似曲線が $y=x$ により収束する標準化法がより理想的であると考えた。従来の Global Normalization 法と我々が考案した Top20th Normalization 法を比較したところ、後者で補正したマイクロ RNA アレイのシグナル値の個体間の近似曲線の傾きがより $y=x$ に近付くことが示され、髄液中 miRNA のアレイシグナルの評価に際しては Top20th Normalization がより理想的であることが示された（図 2）。

図2



Global normalization
Top20th normalization

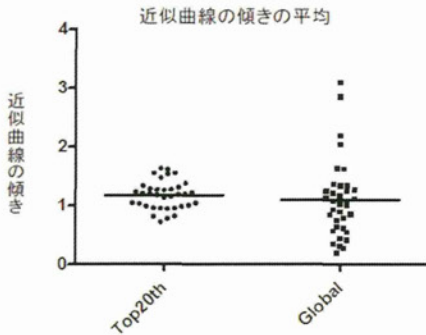


図2：正常髄液サンプル間のアレイシグナルの近似曲線が従来の Global normalization よりもより $y=x$ に収束し、サンプル間のバラつきを抑えることが可能になった

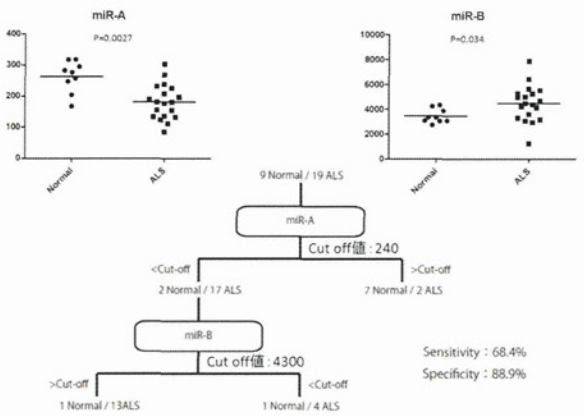
2) 正常髄液と比較して ALS で有意差を認めた miRNA

Top20th Normalization 法で標準化を行い、正常髄液対照 9 例、ALS 19 例の解析を行った。(ALS の診断基準は改訂版 El Escorial 基準を用い、血液の混入があった髄液は除外した)。

正常対照髄液と比較し、25 個の miRNA が ALS で高シグナルであり (うち 11 個については ALS でのみシグナルを検出)、4 個の miRNA が ALS で低シグナルであった ($p < 0.05$)。

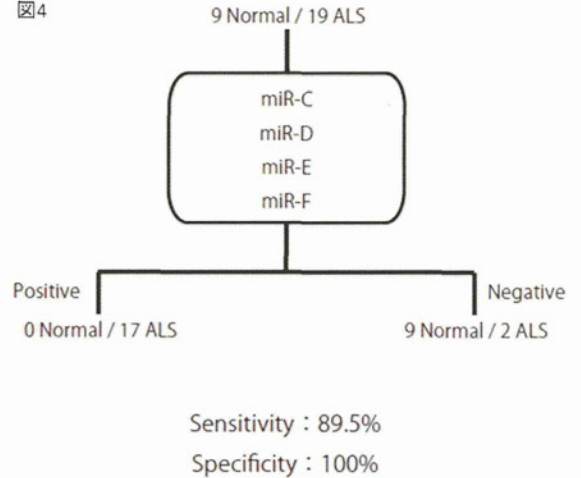
シグナル変化があった 29 個の miRNA のうち、マイクロ RNA アレイ上で高シグナルかつ、定量性が確認されている miRNA が 4 個存在し、そのうち miR-A と miR-B の 2 つに至適な Cut off 値を設けることにより、正常髄液と ALS 髄液を感度 68.4%、特異度 88.9% で判別することが可能であった (図 3)。

図3



また、ALS 髄液でのみシグナルが検出された miRNA のうち、miR-C, miR-D, miR-E, miR-F のいずれかが陽性である髄液を選択することで、感度 89.5%、特異度 100% で正常髄液との鑑別が可能であった (図 4)。

図4



D. 考察

今回、我々は髄液中の miRNA を疾患マーカーとして利用できるマイクロ RNA アレイの髄液に特化した標準化法を確立するとともに、ALS 患者の髄液で有意に変化する miRNA の検索・同定を行うことで、感度・特異度とも高く正常髄液との鑑別を行うことができた。

本稿執筆時点において ALS と miRNA の関与を示唆する既報としては 2 例を認めるのみであり

(Science. 2009;326(5959):1549-54.及び Gene. 2012;508(1):35-40.)、今回有意差を持って発現していた miRNA の ALS の病態生理との関わりについては今後の更なる知見の蓄積が待たれる。

E.結論

髄液中の miRNA を疾患マーカーとして利用できるマイクロ RNA アレイの測定系を確立した。正常髄液との比較において、ALS で有意に発現に差を認める 29 個(ALS で上昇：14 個、低下：4 個、ALS でのみ検出：1 個)の miRNA を確認した。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

Akira Machida, Takuya Ohkubo, Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota. Identification and profiling of exosome-derived miRNAs in human cerebrospinal fluid.

International Society for Extracellular Vesicles 2012. Sweden. 2012.4.19

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 における GEM 小体の異常：SMN との関連

研究分担者 小野寺理³⁾

研究協力者 石原智彦¹⁾，有泉優子¹⁾，志賀篤²⁾，佐藤達哉¹⁾，横関明男¹⁾
柿田明美²⁾，西澤正豊¹⁾，高橋均²⁾

1 新潟大学脳研究所 臨床神経科学部門 神経内科学分野

2 新潟大学脳研究所 病態神経科学部門 病理学分野

3 新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター脳科学リソース研究部門
分子神経疾患資源解析学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態機序の解明を目的として、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 GEM 小体の関連に着目し研究を実施した。TDP-43 発現抑制培養細胞および ALS 罹患神経組織にて、対照群と比較して GEM 小体数が減少していることを明らかにした。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において TAR DNA binding protein of 43kDa (TDP-43) の機能低下 (loss of function) による RNA 代謝異常を介した神経変性モデルが注目されている。我々は TDP-43 発現低下培養細胞および ALS 罹患神経組織において mRNA のスプライシングに関連する機能的 RNA, U small nuclear RNAs (U snRNAs)のうち U12 snRNA を中心とした低下がみられる事を見出している。U snRNAs は脊髄性筋萎縮症(SMA)モデルマウスにおいても減少が報告されており (Zhang et al. Cell 2007), 運動神経の選択的変性との関連が注目される。U snRNAs の成熟、発現には SMN 蛋白およびその複合体形成蛋白、さらに同蛋白を主要構成成分とする核内小体 GEM 小体が重要であることが知られている。TDP-43 は核内蛋白であり、Cajal 小体, PML 小体, GEM 小体などの各種核内小体と共局在する (Wang et al. PNAS 2002)。本研究は TDP-43 と核内小体の関連に注目し、U snRNAs 減少の具体的機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. TDP-43 を発現抑制した培養細胞、および ALS 脊髄前角運動神経細胞中における GEM 小体の定量
control/ *TDP-43* siRNA HeLa 細胞を作成し、GEM 小体数の定量を行った。同細胞で抗 SMN 抗体にて免疫染色を行い、核内の GEM 小体数の定量を行った。また control/ALS 患者由来脊髄標本を用いて、TDP-43/SMN の二重染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡と 3D 画像解析ソフト Imaris を用いて運動神経細胞内の GEM 小体数の定量を行った。
2. TDP-43 発現抑制培養細胞および ALS 患者由来神経組織における SMN 蛋白および複合体形成蛋白の発現量の定量
control/ *TDP-43* siRNA HeLa/SHSY-5Y 細胞における SMN 蛋白および複合体形成蛋白の発現量をウエスタンブロット (WB) 法で定量し、同蛋白の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。
また control/ALS 患者由来の神経組織 (脊髄, 大脳皮質運動野, 小脳) における SMN mRNA 発現量をリアルタイム PCR (qRT-PCR) 法で定量した。

3. TDP-43 発現抑制培養細胞および ALS 患者由来神経組織における Splicing 異常の検討

control/*TDP-43* siRNA U87-MG 細胞および control/ALS 患者由来の大脳皮質運動野における U12 snRNA 依存性の splicing 変化を qRT-PCR 法で定量した。

(倫理面への配慮)

使用した剖検検体は、匿名化して研究を実施した。

C. 研究結果

1. TDP-43 を発現抑制した培養細胞および ALS 脊髄前角運動神経細胞では GEM 小体数は減少する。

HeLa 細胞における GEM 小体の検討では、コントロール：平均 2.64 ± 1.68 /細胞，TDP-43 抑制細胞： 1.30 ± 1.33 /細胞 ($P < 0.05$) であり，TDP-43 を発現抑制すると GEM 小体数は減少した。

また脊髄前角運動神経細胞中の GEM 小体数の検討では対照群： 11.05 ± 2.14 ，ALS 群： 3.15 ± 1.30 であり，ALS 罹患組織において GEM 小体数は減少していた。

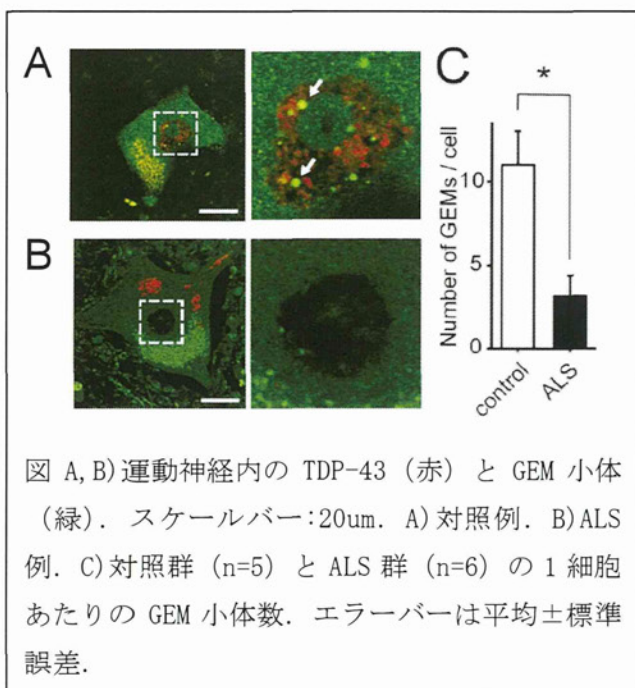


図 A, B) 運動神経内の TDP-43 (赤) と GEM 小体 (緑)。スケールバー: 20um。A) 対照例。B) ALS 例。C) 対照群 (n=5) と ALS 群 (n=6) の 1 細胞あたりの GEM 小体数。エラーバーは平均 ± 標準誤差。

2. TDP-43 発現抑制培養細胞では SMN 蛋白および複合体形成蛋白の発現が低下する。

siRNA 法で *TDP-43* 発現を抑制した HeLa 細胞，

SHSY-5Y 細胞での WB 法の検討では，SMN 蛋白および複合体形成蛋白 Gemin6, 8 の有意な発現低下を認めた。qRT-PCR 法での検討では複数の *SMN* mRNA 選択的スプライシング多型において，*TDP-43* 発現抑制群で有意な発現低下を認めた。患者由来の神経組織（脊髄，大脳皮質運動野，小脳）における *SMN* mRNA 発現量は対照群，ALS 群で有意な変化を認めなかった。

3. TDP-43 発現抑制培養細胞および ALS 患者由来神経組織における Splicing 異常の検討

U12 snRNA 依存性の intron を有する *IPO-4* mRNA での検討では，*TDP-43* siRNA U87-MG 細胞および ALS 患者由来の大脳皮質運動野において，対照群と比較して有意なスプライシング異常が認められた。

D. 考察

U12snRNA を含む minor spliceosome を中心とした，組織特異的な U snRNAs の低下と splicing 変化が運動神経選択的変性に重要であることが報告されている。(Zhang et al. Cell 2007, Pellizzoni et al. Cell 2012)。われわれも ALS 罹患神経組織において，U12 を中心とする U snRNAs の低下を見出しており，運動神経変性に共通するメカニズムとして重要と考える。

U snRNAs の低下の機序として，SMN 蛋白および核内小体 GEM について検討を行った。*TDP-43* 発現抑制培養細胞では mRNA，蛋白レベルで SMN 蛋白の低下を認めたが，ALS 罹患組織では mRNA の発現に変化を認めなかった。一方で GEM 小体数は培養細胞系および ALS 罹患運動神経において優位な低下を認めた。*TDP-43* および *FUS* 遺伝子変異による家族性 ALS 由来の fibroblast においても GEM 小体数の減少が報告されている (Yamazaki et al. Cell Rep 2012)。

運動ニューロン疾患における GEM 小体の低下は共通した病理所見の可能性があり，U snRNAs の低下，スプライシング異常という共通の病態機序の背

景としても重要と考えられる。

E. 結論

ALS 罹患組織において、GEM 小体の減少、U12 snRNA の低下、U12 snRNA 依存的な Minor splicing の異常が存在する事を示した。これらは ALS, SMA 共通に認められ、運動神経選択的障害のメカニズムとして重要と考えられる。

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

Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kato T, Watanabe N, Yamahira A, Kondo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. PLoS One. 2012;7(8):e43120.

Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012 Sep 25.

2. 学会発表

第 53 回 日本神経学会総会 (2012 年 5 月 23 日)
石原智彦, 志賀篤, 横尾麻衣子, 有泉優子, 横関明男, 譚春鳳, 柿田明美, 西澤正豊, 高橋均, 小野寺理. 「ALS 患者神経組織ではスプライシング関連機能性 RNA が低下する」

Society For Neuroscience 2012, (New Orleans, Oct, 17, 2012) Tomohiko Ishihara, Atsushi Shiga,

Akio Yokoseki, Akiyoshi Kakita, Masatoyo Nishizawa, Hitoshi Takahashi, Osamu Onodera 'Reduction of U12 snRNAs in nervous tissues with TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis'

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

ALS および mSOD1(G93A)-Tg マウスの前角細胞における hypoxia-inducible factor-1 α の細胞質核輸送障害

研究分担者 吉良潤一

研究協力者 長柄祐子, 林 信太郎, 山崎 亮, 大八木保政
九州大学大学院医学研究院神経内科学

研究要旨

Vascular endothelial growth factor (VEGF)は運動ニューロンに対して神経保護的に作用する。我々は筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の脳脊髄液中のサイトカイン解析を行い、VEGF 値の低下が臨床的重症度と逆相関することを過去に報告した。今回、その機序を明らかにすべくALSとmSOD1 (G93A)-Tg マウス脊髄の前角細胞におけるVEGF、その転写因子であるhypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)、細胞質核輸送蛋白であるkaryopherin β (KAB)、核膜孔蛋白であるNup62の変化を、免疫組織化学的手法により半定量的に評価した。この結果、1) ALS患者の脊髄前角細胞では、細胞質内HIF-1 α の染色性の増加と核内VEGFの染色性低下を認めた。2) Tg マウスでは発症後のみでなく発症前から同様の所見を認め、更にHIF-1 α は細胞質内でKAB、Nup62と共局在し、細胞質核輸送障害を反映するNup62の核膜上での不連続性は、病期の進行とともに増加した。以上から、HIF-1 α の細胞質核輸送が核膜蛋白孔において障害されVEGFの産生が抑制されること、更にこの機序はALSの臨床症状発現に先行する病態である可能性が示唆された。

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の変性により進行性の全身の筋力低下や呼吸筋麻痺を来す。Vascular endothelial growth factor (VEGF)は、運動ニューロンに対して保護的に作用することが報告されている。我々はこれまでに ALS 患者の脳脊髄液中のサイトカイン解析を行い、VEGF 値の低下が臨床的重症度と逆相関することを明らかにした。今回この所見の背景に、VEGF 転写因子の細胞質核間輸送障害が存在するとの仮説を立て、病理学的に検証することを目的とした。

学的に検討し半定量的に評価した。HIF-1 α の細胞質核間輸送を担う karyopherin β (KAB)、核膜孔構成蛋白 nucleoporin 62 (Nup62) の経時的な発現変化も検討した。

(倫理面への配慮)

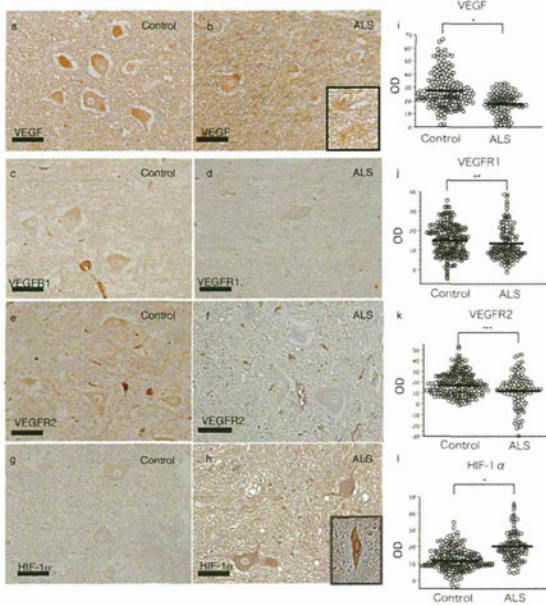
剖検材料を使用する研究であるため、患者本人への苦痛、負担はない。本研究は九州大学での倫理委員会の承認後に行われ、遺族からの承諾を書面で得ている。動物を使用する研究は、動物愛護の観点より当施設の動物実験に関する指針・マニュアルを遵守した。

B. 研究方法

VEGF 及びその転写因子である hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)の ALS、mSOD1 (G93A)-Tg マウス (発症前、発症初期、発症後期)の脊髄前角細胞における発現変化を、免疫組織化

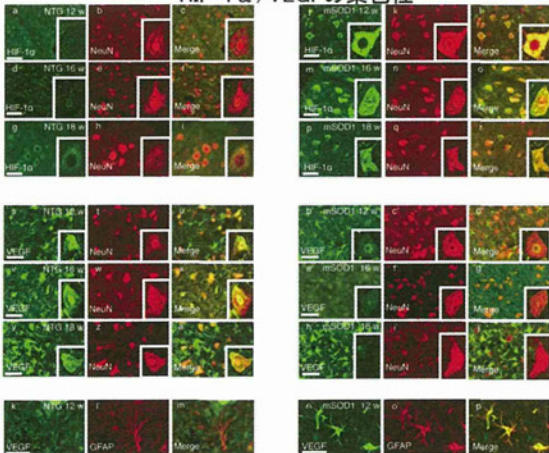
C. 研究結果

図 1 ALS症例、Control症例AHCsにおける VEGF、VEGFR1、VEGFR2、HIF-1 α の染色性



ALS 剖検例の検討では、前角細胞において核内 VEGF および VEGF 受容体の染色性が対照症例と比較して低下していた。一方で、HIF-1 α は細胞質内で染色性の増加を認めた。半定量評価では、何れも統計学的に有意な差を認めた(図 1)。

図 2 mSOD1-Tg mouse, non-transgenic mouse AHCsにおける HIF-1 α /VEGFの染色性



mSOD1-Tgマウスにて 細胞質内HIF-1 α 染色性が発症前より亢進

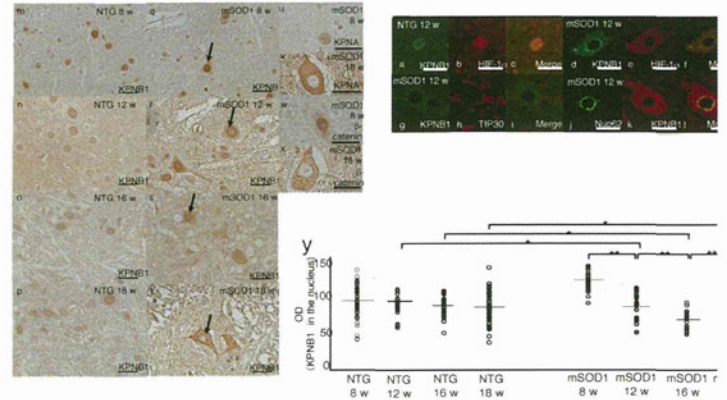
glial fibrillary acidic protein (GFAP), neuronal nuclei (NeuN), non-transgenic mouse(s)

mSOD1-Tg マウスにおいても HIF-1 α は前角細胞質内で染色性の増加を認め、その変化は発症前より認めた。一方で核内の VEGF 染色性の増

加はどの病期においても認めなかった。

Astrocyte では、VEGF の染色性の増加を発症前期より認めた。この前角細胞内での染色性の差異より HIF-1 α の細胞質核輸送障害の存在が示唆された(図 2)。

図 3 mSOD1-Tg mouse, non-transgenic mouse AHCsにおける HIF-1 α -karyopherin β 1 複合体の輸送



次に Tg マウスを用いて HIF-1 α の細胞質核輸送経路に着目して検討した。この結果、KAB と HIF-1 α は、non-Tg マウスでは核内で共局在するのに対して、mSOD1-Tg マウスにおいては核内のみでなく、細胞質内でも共局在した。KAB と競合的に結合する TIP30、Heat shock protein family との共局在は認めなかった。更に mSOD1-Tg マウス前角細胞においては、non-Tg マウスと比較して KAB の核内染色性は発症前より有意に低下し、病期の進行に従い更に有意な低下を示した。また KAB は Nup62 と共局在した。以上から、HIF-1 α の細胞質核間輸送障害は、複合体形成の阻害によるのではなく、核膜において障害機序が存在する可能性が示唆された (図 3)