

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

- 1) Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DM, Saito Y, Murayama S. (2013) 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2013 Nov 9. [Epub ahead of print]
- 2) Kobayashi Z, Akaza M, Ishihara S, Tomimitsu H, Inadome Y, Arai T, Akiyama H, Shintani S. (2013) Thalamic hypoperfusion in early stage of progressive supranuclear palsy (Richardson's syndrome): Report of an autopsy-confirmed case. *J Neurol Sci.* 335:224-227. doi:pil:S0022-510X(13)02891-8.10.1016/j.jns.2013.09.005.
- 3) Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H. (2013) Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barre syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *Int J Neurosci.* 2013 Oct 31. [Epub ahead of print]
- 4) Kobayashi Z, Kawakami I, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Kondo H, Shimomura Y, Haga C, Aoki N, Hasegawa M, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Ishizu H, Terada S, Onaya M, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Akiyama H, Mizusawa H. (2013) Pathological features of FTLN-FUS in a Japanese population: Analyses of nine cases. *J Neurol Sci* 335:89-95. doi:pil:S0022-510X(13)02884-0. 10.1016/j.jns.2013.08.035.
- 5) Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Comm* 1: 54.
- 6) Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4:124-134. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.007.
- 7) Kuwahara H, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Inaba A, Akiyama H, Mizusawa H. (2013) Cryptococcal meningitis accompanying lymphocytic inflammation predominantly in cerebral deep white matter: A possible manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Neuropathology.* 34:45-48. doi: 10.1111/neup.12046.
- 8) Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M. (2013) Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* 136:1128-1138. doi: 10.1093/brain/awt037.
- 9) Higashi S, Kabuta T, Nagai Y, Tsuchiya Y, Akiyama H, Wada K. (2013) TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular

stress. *J Neurochem* 126:288-300. doi: 10.1111/jnc.12194.

- 10) Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M (2012) Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 7(12):e52389. doi: 10.1371/journal.pone.0052389.
- 11) 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. (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* doi:10.1093/brain/awt230 [Epub ahead of print]
- 12) Kobayashi Z, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H (2013) Atypical FTLN-FUS associated with ALS-TDP: A case report. *Neuropathology* 33: 83-86. doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01325.x.

2.学会発表

- 1) 後藤潤, 後藤昇, 秋山治彦, 塩田清二. 視床出血: 支障の動脈血供給と関連する解剖学的分類. 第54回日本神経病理学会[2013.04.25, 東京]
- 2) 野中隆, 鈴掛雅美, 新井哲明, 赤津裕泰, 小尾智一, 吉田眞理, 村山繁雄, David Mann, 秋山治彦, 長谷川成人. 患者脳に蓄積した TDP-43 のプリオン様性質. 第54回日本神経病理学会[2013.04.25, 東京]
- 3) 鈴掛雅美, 野中隆, 細川雅人, 笈川貴行, 新井哲明, 秋山治彦, David Man, 長谷川成人. レビー小体型認知症患者脳不溶画分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. 第54回日本神経病理学会[2013.04.25, 東京]
- 4) 河上緒, 新井哲明, 新里和弘, 大島健一, 秋山治彦. 32歳時に抑うつ症状で発病した舞踏病様不随意運動を伴った認知症例. 第54回日本神経病理学会 [2013.04.25, 東京]
- 5) 河上緒, 長谷川成人, 新井哲明, 青木直哉, 勝瀬大海, 東晋二, 大島健一, 新里和弘, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 山下万貴子, 鈴木京子, 平安良雄, 秋山治彦. Tangle-predominant dementia の側坐核における病理学的検討. 第54回日本神経病理学会 [2013.04.25, 東京]
- 6) 望月葉子, 川田明広, 橋本智代, 秋山治彦, 川上秀史, 小森隆司, 小柳清光, 水谷俊雄, 松原四郎. FUS R521G 変異を伴った家族性筋萎縮性側索硬化症の1剖検例. 第54回日本神経病理学会[2013.04.26, 東京]
- 7) 河上緒, 新井哲明, 新里和弘, 大島健一, 秋山治彦. 舞踏病様不随意運動を呈する FTLN-FUS の臨床病理学的検討. 第32回日本認知症学会[2013.11.8, 松本]
- 8) 秋山治彦, 下村洋子, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 細川雅人. アルツハイマー病脳における神経炎症. 第32回日本認知症学会[2013.11.8, 松本]
- 9) 新井哲明, 河上緒, 小林禅, 野中隆, 長谷川成人, 細川雅人, 秋山治彦, 池田研二, 朝田隆. タウオパチー病理変化の基礎. 第32回日本認知症学会 [2013.11.10, 松本]

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

なし

TDP-43 proteinopathy 動物モデルの作製

研究分担者：細川雅人¹⁾

研究協力者：新井哲明^{1,2)} 鈴掛一増田雅美¹⁾ 野中隆¹⁾ 山下万貴子¹⁾ 長谷川成人¹⁾ 秋山治彦¹⁾

1) 東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野 認知症プロジェクト

2) 筑波大学 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 精神病態医学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) や前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTL) の発症メカニズムを明らかにするために、TDP-43 proteinopathy モデルマウスの作製をおこなった。ドキシサイクリン誘導型の TDP-43 トランスジェニックマウスを作製し、後天的に TDP-43 を過剰発現できることを確認した。現時点では神経細胞内において TDP-43 の異常凝集体は観察されていない。TDP-43 の異常凝集体が確認される個体が得られたのち、免疫組織化学染色、生化学的解析、認知機能に関する行動解析実験をおこなう予定である。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) や前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTL) の患者脳で観察される、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。ALS や FTL 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およ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。

B. 研究方法

1) ドキシサイクリン誘導型 TDP-43 トランスジェニックマウスの作製
出生後の任意の時期や、老齢になってから遺伝子発現を制御できるように pTRE-Tight vector (Clontech) を使い、TRE (tetracycline responsive element) の下流に①TDP-43 (K263E 変異)、②TDP-43 ΔNLS [Δ78-84]、③TDP-43 Δ12 [Δ78-84 & 187-192]、④GFP-TDP-43 Δ12 を組み込んだプラスミ

ドを作製した。作製したプラスミドを直線化したのち、常法によりトランスジェニックマウス (Tg) を作製した。

2) tetracycline transactivator (tTA) マウスの入手および reverse tetracycline transactivator (rtTA) マウスの作製

Doxycycline (Dox) 非投与時に前脳特異的に遺伝子発現が on になるマウスとして、tetracycline transactivator (tTA) を発現する CamK2a-tTA マウス (Dox-off) を Jackson Laboratory より入手した。

また、Dox 投与時に前脳特異的に遺伝子発現が on になるマウスが入手できなかったため、新たに CamK2a-rtTA (Dox-on) マウスを作製した。

3) TDP-43/tTA, TDP-43/rtTA マウスの作製

TDP-43 Tg と tTA Tg あるいは rtTA Tg を交配して、TDP-43/tTA, TDP-43/rtTA マウスを作製した。

TDP-43/tTA マウスは 1-2 ヶ月齢より Dox 不含の餌を食べさせることにより TDP-43 の発現を誘導した。

TDP-43/rtTA マウスでは同様の月齢より Dox 含有餌を食べさせることにより TDP-43 の発現を誘導した

その後、TDP-43 の発現を免疫組織化学染色および生化学的解析で確認した。

(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

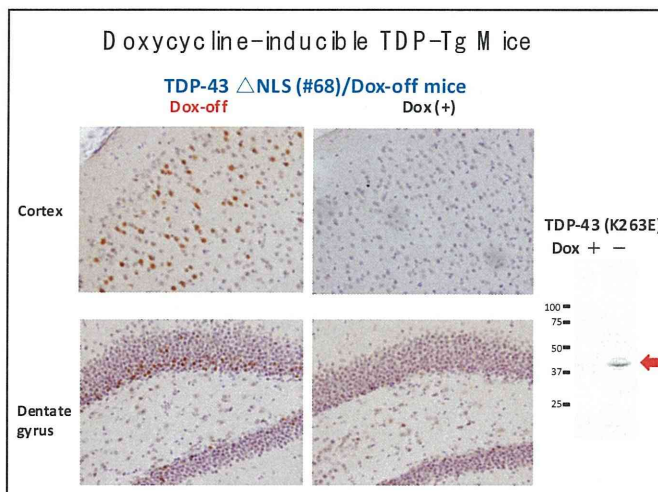
1) Dox-off 系統 TDP-43 Tg

TDP-43 Tg の作製では、TDP-43 の K263E 変異 1 系統、 Δ NLS 変異 4 系統、 Δ 12 変異 1 系統、GFP- Δ 12 変異 3 系統の作出に成功した。

GFP- Δ 12 変異 Tg 以外の全系統を Dox-off 系の CamK2a-tTA と交配したマウスでは、それぞれの TDP-43 の発現が免疫組織化学染色および生化学的解析で確認された (下図)。GFP- Δ 12 変異 Tg は作製された直後であり、現在 CamK2a-tTA マウスと交配中である。

1) Dox-on 系統 TDP-43 Tg

新たに作製した Dox-on (CamK2a-rtTA) マウスは 3 系統得られたが、2 系統からは遺伝子の入った子孫が得られなかった。残りの 1 系統は遺伝子の入った子孫が得られたので、TDP-43 Δ NLS 変異 Tg と交配し、Dox による発現誘導をおこなったが、TDP-43 の発現は観察されなかった。



D.考察

これまでに作製・報告された TDP-43 トランスジェニックマウスでは、フェノタイプが出るものは誕生時から後肢の異常・けいれんなどが現れている。世界中で作られている TDP-43 Tg はいずれも同じような状況にある。このような出生時からの TDP-43 の過剰発現による悪影響を除くため、Dox 誘導型の TDP-43 トランスジェニックマウスを作製し、後天的に TDP-43 を過剰発現できることを確認した。まだ加齢が十分でないため、あるいは他の理由により、神経細胞内において TDP-43 の異常凝集体は観察されていない。TDP-43 の異常凝集体が確認される個体が得られたのち、認知機能に関する行動解析実験をおこなう予定である。

E.結論

ALS や FTLD 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。今回作製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。さらなる詳細な解析が必要である。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Brain 136 (Pt 4): 1128-1138.
2. Akitake Y, Nakatani Y, Kamei D, Hosokawa M, Akatsu H, Uematsu S, Akira S, Kudo I, Hara S, Takahashi M (2013) 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 91 (7): 909-919.

3. Kobayashi Z, Kawakami I, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Kondo H, Shimomura Y, Haga C, Aoki N, Hasegawa M, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Ishizu H, Terada S, Onaya M, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Akiyama H, Mizusawa H (2013) Pathological features of FTLD-FUS in a Japanese population: Analyses of nine cases. Journal of the Neurological Sciences 335 (1-2): 89-95.

4. Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H (2013) Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. International Journal of Neuroscience [Epub ahead of print]

5. 細川雅人、新井哲明
前頭側頭葉変性症の病理と関連遺伝子
Clinical Neuroscience 26 (3): 334-342 (2013)

2.学会発表

1. 鈴掛(増田)雅美, 野中隆, 細川雅人, 笈川貴行, 秋山治彦, 長谷川成人
 α シヌクレイン線維の脳内接種は野生型マウスにレビー小体様病理を形成させる 第54回
日本神経病理学会 (東京 タワーホール船堀)
2013年4月

2. 鈴掛雅美、野中隆、細川雅人、笈川貴行、新井哲明、David M. A. Mann、秋山治彦、長谷川成人

蓄積 α シヌクレインはマウス脳内でプリオン様の伝播能を示す 第86回 日本生化学会 (横浜 パシフィコ横浜) 2013年9月

3. 近藤大三, 井関栄三, 笠貫浩史, 峯岸道子, 新井平伊, 細川雅人, 新井哲明, 日野博昭, 藤澤浩四郎, 小阪憲司

全経過16年で高度な大脳萎縮を呈した皮質基底核変性症の1剖検例 第32回 日本認知症学会 (松本 キッセイ文化ホール) 2013年11月

4. 秋山治彦, 下村洋子, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 細川雅人

アルツハイマー病脳における神経炎症 第32回 日本認知症学会 (松本 キッセイ文化ホール) 2013年11月

5. 新井哲明, 河上緒, 小林禅, 野中隆, 長谷川成人, 細川雅人, 秋山治彦, 池田研二, 朝田隆
タウオパチー病理変化の基礎 第32回 日本認知症学会 (松本 キッセイ文化ホール) 2013年11月

H.知的財産権の出願・登録状況 (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

Parkinson 病および Lewy 小体型認知症における 延髄のリン酸化 α -synuclein 陽性構造の検討

新井哲明¹, 高橋晶², 近藤ひろみ³, 大島健一⁴, 新里和弘⁴, 細川雅人³, 秋山治彦³, 朝田隆¹

¹筑波大学医学医療系臨床医学域精神医学, ²筑波大学医学医療域災害精神支援学講座, ³東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト, ⁴東京都立松沢病院精神科

研究要旨

Lewy 小体型認知症 (DLB) および Parkinson 病 (PD) では、早期から高炭酸換気応答 (Ventilatory response to hypercapnia:VRH) が低下する。その病理機序を明らかにするため、DLB および PD 患者の延髄呼吸中枢における α -synuclein 陽性構造について検討したところ、両群の縫線核、孤束核、ventrolateral medulla において、Lewy 小体、Lewy neurites (LN)、Lewy dots (LD) が認められた。 α -synuclein 蓄積による延髄呼吸中枢の機能低下が、VRH 低下の原因となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

Lewy 小体型認知症 (DLB) では、早期から高炭酸換気応答 (Ventilatory response to hypercapnia:VRH) が低下することが知られており、早期診断への有用性が期待されている。また、Parkinson 病 (PD) でも、DLB より頻度は低いが、やはり VRH が低下する例があることが報告されている。VRH とは、血中の二酸化炭素濃度あるいは pH の変化を延髄化学受容体が感知し、分時換気量が増加する現象であるが、DLB および PD において VRH が低下する機序は不明である。

DLB および PD では、リン酸化した α -synuclein (α -syn) の細胞内蓄積が神経変性を誘導すると考えられている。したがって、これらの疾患の患者では、延髄呼吸中枢に α -syn の蓄積が生じている可能性があるが、その詳細は不明である。血中の二酸化炭素上昇に伴う延髄での反応には、縫線核 (Raphe) を上位とし、孤束核 (nucleus of solitary tract SOL) および ventrolateral medulla (VLM) が関与していると考えられているため、本研究では DLB および PD 患者におけるこれらの神経核の α -syn 陽性構造について免疫組織化学的に検討した。

B. 研究方法

東京都医学総合研究所・認知症プロジェクト所蔵の DLB 12 例および PD 9 例を対象とした。延髄のホルマリリン固定パラフィン包埋切片に対し、リン酸化 α -syn 特異抗体を用いた免疫組織化学染色を施行し、呼吸中枢として報告されている Raphe obscurus (Raphe)、VLM、SOL の 3 つの核における α -syn 陽性構造の出現の有無を調べ、さらにそれらの数を両群間で比較した。

(倫理面への配慮)

筑波大学および東京都医学総合研究所の倫理規定を遵守し、プライバシーの保護には十分配慮した。

C. 研究結果

Raphe、VLM、SOL の 3 つの核のいずれにおいても、両群において種々の程度に α -syn 陽性構造が確認された。 α -syn 陽性構造の形態としては、Lewy bodies (LB)、Lewy neurites (LN)、Lewy dots (LD) の 3 種類が認められた。

DLB 群と PD 群において、3 つの核における LB、LN、LD の数を定量し、比較検討したところ、明らかな有意差は認められなかったが、Raphe における LB の数が PD より DLB が多い傾向 ($p=0.052$)

が認められた。

D. 考察

DLB および PD においては、延髄呼吸中枢に α -syn の蓄積が認められ、VRH の低下の病理学的基盤となっている可能性が示唆された。DLB において、Raphe における LB の数が PD より多い傾向があることは、VRH 低下の頻度が PD よりも DLB で高いことと関連するかもしれない。PD および DLB における VRH の低下は病期の早期から認められることから、延髄呼吸中枢における α -syn の蓄積も早期から生じる病理変化である可能性がある。

E. 結論

DLB および PD では、早期から延髄呼吸中枢に α -syn が蓄積し、VRH の低下を来す可能性がある。VRH は、ワクチン療法等によって蓄積した α -syn を除去する治療法の効果判定に有用である可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

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 FTLN-FUS associated with ALS-TDP: a case report. *Neuropathology* 33: 83-86, 2013
2. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M: Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136: 1128-1138, 2013
3. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M,

Murayama S, Mann DMA, Akiyama H, Hasegawa M: Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4: 124-134, 2013

4. Kobayashi Z, Kawakami I, Arai T, Yokota O, Tsuchiya K, Kondo H, Shimomura Y, Haga C, Aoki N, Hasegawa M, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K, Ishizu H, Terada S, Onaya M, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Akiyama H, Mizusawa H: Pathological features of FTLN-FUS in a Japanese population: Analyses of nine cases. *J Neurol Sci* 335: 89-95, 2013
5. Kobayashi Z, Akaza M, Ishihara S, Tomimitsu H, Inadome Y, Arai T, Akiyama H, Shintani S: Thalamic hypoperfusion in early stage of progressive supranuclear palsy (Richardson's syndrome): Report of an autopsy-confirmed case. *J Neurol Sci* 335: 224-227, 2013
6. Liu R, Yang G, Nonaka T, Arai T, Jia W, Cynader MS: Reducing TDP-43 aggregation does not prevent its cytotoxicity. *Acta Neuropathol Commun* 1: 49, 2013

2. 学会発表

1. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Yoshida M, Murayama S, Mann D, Akiyama H, Hasegawa M: Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates in diseased brains. The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's disease, Florence, Italy, 2013
2. Takahashi S, Arai T, Mizukami K, Kondo H, Oshima K, Niizato, K, Hosokawa M, Akiyama H, Asada T: Pathological background of the ventilatory response to hypercapnia in Dementia with Lewy Bodies and Parkinson's Disease. The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's disease, Florence, Italy, 2013

3. 野中隆, 鈴掛雅美, 新井哲明, 赤津裕泰, 小尾智一, 吉田眞理, 村山繁雄, Mann D, 秋山治彦, 長谷川成人: Prion-like properties of pathological TDP-43 in diseased brains. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2013 年 4 月 25 日, 東京, 2013
4. 鈴掛雅美, 野中隆, 細川雅人, 笈川貴行, 新井哲明, 秋山治彦, Mann D, 長谷川成人: レビー小体型認知症患者脳不溶性画分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. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2013 年 4 月 25 日, 東京, 2013
5. 河上緒, 新井哲明, 新里和弘, 大島健一, 秋山治彦: 32 歳時に抑うつ症状で発病し舞踏病様不随意運動を伴った認知症例. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2013 年 4 月 24 日, 東京, 2013
6. 河上緒, 長谷川成人, 新井哲明, 青木直哉, 勝瀬大海, 東晋二, 大島健一, 新里和弘, 近藤ひろみ, 羽賀千恵, 下村洋子, 山下万貴子, 鈴木京子, 平安良雄, 秋山治彦: tangle-predominant dementia の側座核における病理学的検討. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2013 年 4 月 25 日, 東京, 2013
7. 小林禅, 赤座実穂, 石原正一郎, 沼沢祥行, 富満弘之, 鶴浦康司, 稲留征典, 新井哲明, 新谷周三: 延髄呼吸中枢病変を認めた進行性核上性麻痺の 1 剖検例. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2013 年 4 月 26 日, 東京, 2013
8. 池嶋千秋, 吉村敦子, 久永明人, 根本清貴, 高橋晶, 文鐘玉, 井上操, 新井哲明, 朝田隆: 茨城県内 2 地域における認知症疫学調査の比較. 第 28 回日本老年精神医学会, 大阪, 2013 年 6 月 5 日
9. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann D, Akiyama H, Hasegawa M: Insoluble TDP-43 prepared from diseased brains has prion-like properties. Alzheimer's Association International Conference 2013, Boston, USA, 2013
10. Takahashi S, Arai T, Mizukami K, Kondo H, Oshima K, Niizato, K, Hosokawa M, Akiyama H, Asada T: Alpha-synuclein pathology in the medulla oblongata in association with the reduction of the ventilatory response to hypercapnia in dementia with Lewy bodies and Parkinson's Disease. Alzheimer's Association International Conference 2013, Boston, USA, 2013
11. Arai T, Kawakami I, Mizukami K, Ikeda K, Oshima K, Niizato K, Kobayashi Z, Hosokawa M, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H, Asada T: Tau pathology in the parahippocampal region is related to delusion in the elderly: neuropathological study of two autopsy cases. Alzheimer's Association International Conference 2013, Boston, USA, 2013

H.知的財産権の出願・登録状況（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。

C9ORF72 変異を有する日本人 ALS の一部検例

研究分担者：高橋 均¹⁾

研究協力者：今野 卓哉²⁾，他田 真理¹⁾，志賀 篤¹⁾，西澤 正豊²⁾，
小野寺 理³⁾，柿田 明美¹⁾

- 1)所属 新潟大学脳研究所 病理学分野
2)所属 新潟大学脳研究所 神経内科学分野
3)所属 新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野

研究要旨

C9ORF72 変異を有する ALS (c9ALS) として本邦唯一の剖検例の病理像を検討した。孤発性 ALS と同様、神経変性は上・下位運動ニューロン系に限局していた。本疾患に特異的とされる p62, ubiquitin, ubiquilin 陽性、かつ TDP-43 陰性の胞体内封入体を小脳顆粒細胞や海馬歯状回などに認めた。これらの封入体は、異常リピートから翻訳されるジペプチドリピート (DPR) 蛋白を認識する抗体によっても認識された。本症例の病理像は欧米人 c9ALS と共通であるが、DPR 蛋白と神経変性との関連は明らかでなかった。

A.研究目的

C9ORF72 変異は、欧米人 ALS の原因遺伝子として最も頻度が高く、変異に関連した複数の組織学的特徴が報告されている。しかし、本邦における C9ORF72 変異はきわめてまれであり、組織学的検討は十分なされていない。そこで本研究は、欧米の C9ORF72 変異を有する ALS (c9ALS) の疾患特異的組織像について、遺伝学的背景の異なる日本人 c9ALS における異同を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

我々は、日本人 ALS を対象としたスクリーニングを行い、C9ORF72 変異を有する唯一の剖検例を見出している (Konno T et al. J Neurol Neurosurg, Psychiatry 84:398-401, 2013)。この症例について、TDP-43, リン酸化 TDP-43 (pS409/410), p62, ubiquitin, ubiquilin, RBM45 の各抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。また、C9ORF72 遺伝子の非翻訳領域に存在する GGGGCC リピートか

ら、開始コドン非存在下の特殊な翻訳機構により翻訳されるジペプチドリピート (DPR) 蛋白を認識する抗体 (抗 poly Gly-Ala, 抗 poly Gly-Pro, 抗 poly Gly-Arg の三種。東京都医学総合研究所 鈴掛雅美先生、長谷川成人先生よりご提供) を用い、陽性構造物の分布や形態を検討した。さらに、小脳顆粒細胞に認められる細胞質内封入体について、抗 ubiquilin 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法で微細構造を観察した。

(剖検はご遺族の同意の下に、また、遺伝子解析は学内の倫理委員会の承認の下に行った)

C.研究結果

解剖時、脳重は 1,340g で、外表は特に異常なかった。大脳皮質運動野では Betz 巨細胞を含む錐体細胞の脱落を認め、胸髄の KB 染色では前側索が淡明化した索変性所見を認めた。脊髓前角と脳幹運動神経核 (V, VII および XII) に中等度から高度の神経細胞脱落とグリオシスを認めた。これらの下位運動神経核の残存神経細胞内に、Bunina

小体および ubiquitin 陽性のスケイン様封入体を認めた (Tan CF et al. Acta Neuropathol 113:535-542, 2007).

TDP-43 および RBM45 免疫組織化学

脊髓前角を含む下位運動神経細胞, 被殻小型神経細胞, 脳幹網様体, 淡蒼球, 視床, 大脳皮質運動野神経細胞に, TDP-43 陽性胞体内封入体 (NCI) を認めた. 上・下位運動神経灰白質や白質 (内包) には, TDP-43 陽性のグリア細胞 (オリゴデンドログリア) 内封入体 (GCI) も観察された (Tan CF et al. Acta Neuropathol 113:535-542, 2007). リン酸化 TDP-43 陽性封入体も同様に認めた. RBM45 抗体では, 数は少ないものの TDP-43 陽性封入体と同じ分布, 形態の NCI および GCI を認めた (図 1).



図 1. 頸髄前角 (左) に認めた RBM45 陽性 NCI と, 大脳皮質運動野 (右) に認めた RBM45 陽性 NCI (上) および GCI (下).

p62, ubiquilin および DPR 蛋白免疫組織化学

p62 陽性かつ TDP-43 陰性の胞体内封入体を, 小脳顆粒細胞と海馬 CA4, CA3 および CA2 の錐体細胞, 齒状回顆粒細胞に認めた (Konno T et al. J Neurol Neurosurg, Psychiatry 84:398-401, 2013). これらは ubiquilin 抗体でも同様に描出され, いずれも不整な点状や星形を呈していた. 海馬分子層に ubiquilin 陽性の aggregate-like formation を認めた.

DPR 蛋白は, 三種類の抗体のいずれでも描出できたが, 特に poly Gly-Ala に対する抗体が明瞭であり, 以下の解析にはこれを用いた. DPR 蛋白陽性 NCI は, 海馬齒状回と小脳顆粒細胞に最も多く認められたが (図 2), 前頭葉・側頭葉の皮質, 尾状核, 視床, 中脳水道周囲灰白質, 中脳黒質の神

経細胞内にも存在した. NCI より数は少ないが, 核内封入体も認められた. 下位運動神経には DPR 蛋白陽性封入体を認めなかった. 前頭葉深部白質では GCI も検出されたが, その数は TDP-43 陽性 GCI より少なかった. DPR 蛋白陽性 NCI は不整な点状や星形を呈し, これらの封入体は p62, ubiquitin, ubiquilin でも描出された. TDP-43 陽性 NCI とは分布, 形態とも異なっていた.

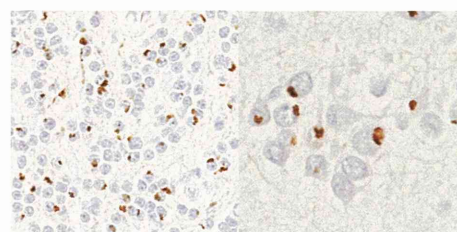


図 2. 小脳顆粒細胞 (左) と海馬齒状回 (右) に認められた抗 DPR 蛋白 (poly Gly-Ala) 抗体陽性封入体.

蛍光二重免疫染色では, 大脳皮質運動野の TDP-43 陽性封入体は RBM45 とよく共局在するのに対し, DPR 蛋白とは局在が異なっていた. 同部位の p62 陽性封入体の大部分は DPR 蛋白と共局在していたが, p62 陽性 GCI は DPR 蛋白陰性であった (図 3). 小脳顆粒細胞においては, p62 および ubiquilin 陽性 NCI の大部分が DPR 蛋白と共局在していた.

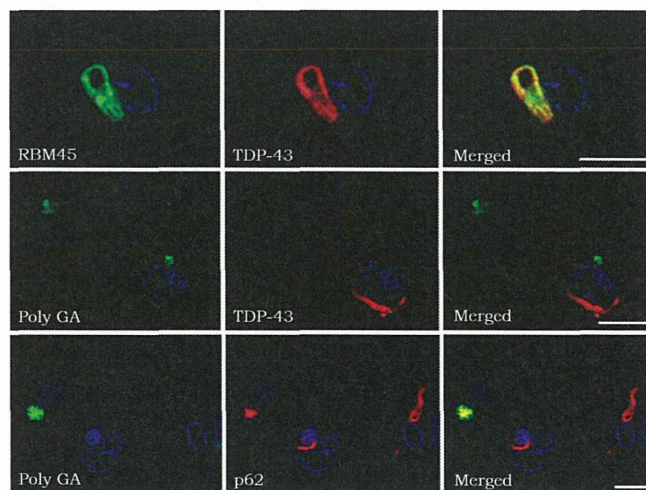


図 3. 大脳皮質運動野

抗ubiquilin抗体を用いた免疫電子顕微鏡法で小脳顆粒細胞内の封入体を観察では、不規則に並んだ線維性構造物から構成されていることを確認した(図4)。これはubiquitin抗体を用いて観察された既報(Lin W et al. *Neuropathology* 32:679-681, 2012)と類似していた。

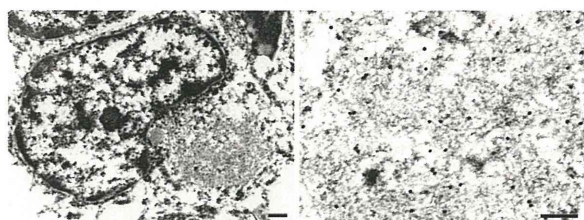


図4. 小脳顆粒細胞の胞体内封入体(左)とその拡大図(右)。

	Lower motor neurons	Motor cortex	Non-motor cortex	Dentate gyrus	Hippocampal CA4	Cerebellar granule cells
Neuronal loss	++	+	-	-	-	-
TDP-43	+	+	-	-	-	-
pTDP-43	+	+	-	-	-	-
RBM45	+	+	-	-	-	-
p62	+	++	++	++	++	++
Ubiquitin	+	+	+	+	+	++
Ubiquilin	-	+	+	++	+	++
Poly Gly-Ala	-	++	++	+++	++	+++

表1. 免疫組織化学的検索のまとめ

D. 考察

これまでのところ唯一の日本人c9ALS剖検例において、*C9ORF72*変異特異的病理学的特徴について検討した(表1)。孤発性ALSと同様の神経変性所見に加えて、小脳や海馬におけるp62陽性かつTDP-43陰性封入体を認め、これらは欧米人例での既報と一致した。DPR蛋白陽性封入体は、p62陽性かつTDP-43陰性封入体と分布、形態が一致しており、c9ALSに特異的な病理学的所見であると言える。c9ALSの病理像は、遺伝学的背景が異なる欧米人と日本人とで共通であり、*C9ORF72*変異の存在によって規定されると考えられた。

RBM45はTDP-43と挙動を共にし、陽性封入体の分布、形態とも類似しており、両者とも運動神経変性に関連した蛋白であると考えられた。一方

で、DPR蛋白は中枢神経系に広く分布しており、TDP-43とは異なり神経変性との関連は明らかではなかった。

E. 結論

c9ALSの神経病理像は、欧米人と日本人とで共通である。異常リピート由来のDPR蛋白と神経変性との関連は明らかでなく、DPR蛋白の疾患における病態意義については、今後の検討が必要である。

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) Konno T, Shiga A, Tsujino A, et al. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 398-401, 2013
- (2) Uemura M, Kosaka T, Shimohata T, et al. Dropped head syndrome in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 14: 232-233, 2013
- (3) Tanaka H, Shimazawa M, Takata M, et al. ITIH4 and Gpx3 are potential biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 260: 1782-1797, 2013
- (4) Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, et al. Transportin 1 accumulates in FUS inclusions in adult-onset ALS without *FUS* mutation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39: 580-584, 2013
- (5) Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, et al. Sporadic ALS with compound heterozygous mutation in the *SQSTM1* gene. *Acta*

Neuropathol 126: 453-459, 2013

- (6) Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, et al.
Decreased number of Gemini of coiled
bodies and U12 snRNA level in amyotrophic
lateral sclerosis. Hum Mol Genet 22:
4136-4147, 2013
- (7) Kimura T, Jiang H, Konno T, et al. Bunina
bodies in motor and non-motor neurons
revisited: a pathological study of an ALS
patient after long-term survival on a
respiurator. Neuropathology (in press)

2. 学会発表

- (1) 竹内亮子, 志賀 篤, 他田真理, ほか. 筋
萎縮性側索硬化症の脳皮質における
TDP-43 の組織学的および生化学的解析. 第
54 回日本神経病理学会, 2013, 4, 25, 東京
- (2) 横山裕一, 豊島靖子, 志賀 篤, ほか.
Pallido-nigro-luysian atrophy の一剖検例.
第 54 回日本神経病理学会, 2013, 4, 26, 東
京
- (3) 木村正志, 瀬戸牧子, 岩永圭介, ほか. 多
系統に変性をきたした孤発性 ALS の人工呼吸
管理による長期生存例. 第 54 回日本神経病
理学会, 2013, 4, 26, 東京

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

運動ニューロン疾患でみられる ELP3 抗体陽性封入体

藤田 行雄¹⁾

岡本幸市²⁾、池田佳生¹⁾

- 1) 群馬大学大学院脳神経内科学
- 2) 老年病研究所

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の脊髓切片に対して抗 ELP3 抗体を用いて神経病理学的に検討した。その結果 ALS の脊髓前角細胞内には ELP3 抗体陽性の様々な形態を示す封入体が存在しており、これらは TDP-43 および FUS と共存していることを見いだした。ELP3 は RNA 代謝に関連する蛋白であることから、ALS の病因としての RNA の異常をさらに強く示唆する所見であると考えられる。さらに、ELP3 は微小管の α -tubulin のアセチル化を促進することで微小管の安定と細胞内物質輸送を制御するが、この異常により様々な蛋白やオルガネラの輸送に障害が生じ、運動ニューロン死につながる可能性が考えられた。

A.研究目的

ALS の病因として TDP-43、FUS などの RNA 関連蛋白の異常が指摘されている。Elongator complex protein(ELP)は RNA polymerase II による転写を促進する因子として発見されており、特にその 6 個のサブユニットの 1 つである ELP3 はヒストンをアセチル化し、転写を活性化する（文献 1）。さらに ELP3 は微小管の α チューブリンのアセチル化を促進し、微小管を安定化させる働きを有しているとされる。つまり ELP3 はヒストン脱アセチル化酵素とバランスをとりながら微小管の安定性と不安定性を制御しダイニンやキネシンなどの微小管を足場とするモーター蛋白の輸送の調整に関与していると考えられている。さらに Simpson らは ELP3 の遺伝子多型が ALS と関連があることを報告している（文献 2）。これらのことから ELP3 が ALS の病因となる可能性を考え、ELP3 抗体を用いて ALS 例の神経病理学的検討を行った。

B.研究方法

コントロール 3 例、TDP-43 陽性封入体を有する通常の孤発性 ALS10 例、好塩基性封入体を有する孤発性 ALS1 例、FUS 遺伝子変異を有する家族性 ALS1 例の脊髓ホルマリン固定パラフィン包埋ブロッ

クから 5 μ 厚切片と 3 μ 厚のミラー切片を作製して、次の抗体を用いて免疫組織染色を施行した。抗体:ELP3 の C 末および N 末に対するポリクロナール抗体 (ABGENT)、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (当科作製)、非リン酸化 TDP-43 抗体 (Proteintech)、抗 FUS ポリクロナール抗体 (Sigma) および抗 FUS モノクロナール抗体 (Santacruz)

(倫理面への配慮)

剖検組織の検討につい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. コントロール例

ELP3 抗体の染色性は主に細胞質にびまん性に認められ、軽度核にも陽性所見が認められた（図 1）。

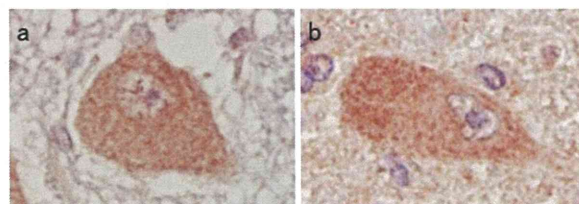


図 1 a) ELP3 抗体 (C 末)、b) ELP3 抗体 (N 末)

2. TDP-43 陽性封入体を有する孤発性 ALS

ELP3 抗体うち C 末を認識する抗体でのみ脊髄前角細胞内に ELP3 陽性の封入体が認められた。封入体は円形、糸くず状、円の周辺のみなど様々な形態のものが認められた (図 2)。グリア細胞には陽性所見はみられなかった。

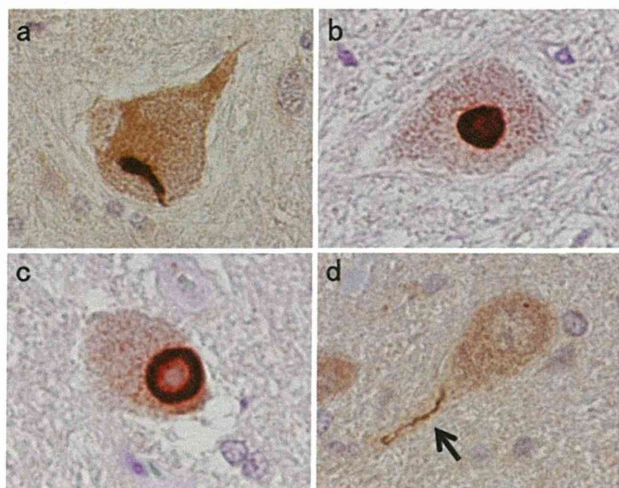


図 2 抗 ELP3 抗体 (C 末) による免疫染色
a) 線状、b) 円形、c) 周辺のみ、d) 神経細胞の突起内の ELP3 抗体陽性所見 (矢印)

ブニナ小体は ELP3 抗体では染色されなかった (図 3 矢印)

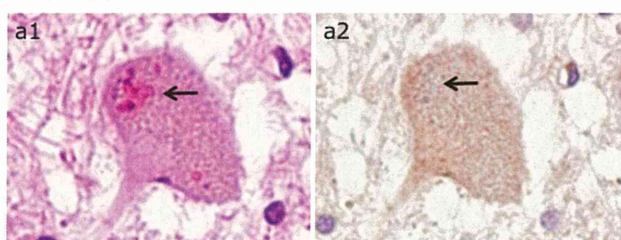


図 3 a1) HE 染色、a2) 脱色後に ELP3 抗体で免疫染色

3. ELP3 陽性封入体と TDP-43 陽性封入体との関連

ALS 例の前角細胞のうち非リン酸化 TDP-43 抗体の染色性が核に認められる正常の神経細胞では ELP3 抗体の染色性はコントロール例と同様に主に細胞質に認められ、封入体形成は見られなかった。リン酸化 TDP-43 抗体と ELP3 抗体を用いたミラー切片による検討ではリン酸化 TDP-43 抗体で

細胞質内に顆粒状に染色性される陽性構造物は ELP3 抗体では染色されなかったが (図 4 a1、a2)、一方で凝縮したものは、ELP3 抗体で陽性であった (図 4 b1、b2 矢印)。また、糸くず状のリン酸化 TDP-43 陽性構造物はやはり ELP3 陽性であったが (図 4 c1、c2)、リン酸化 TDP-43 陽性のグリア細胞内封入体は ELP3 では染色されなかった。

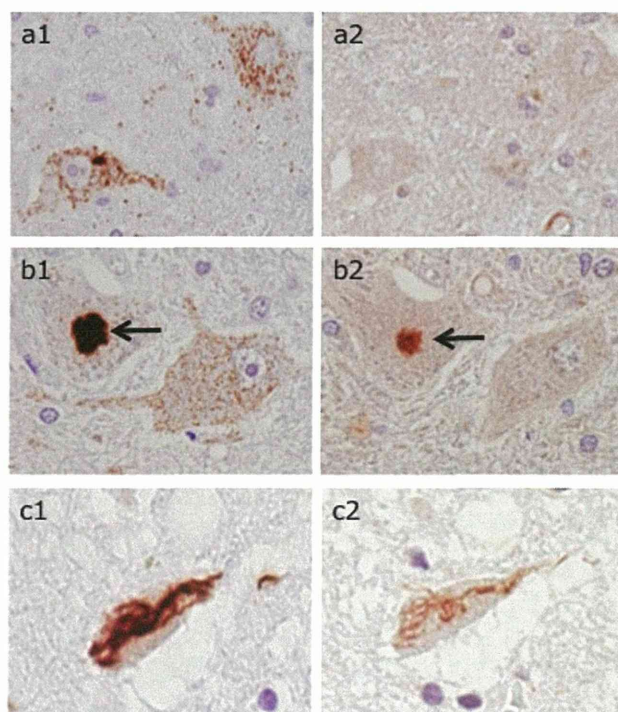


図 4 a1)-c1) リン酸化 TDP-43 抗体、a2)-c2) ELP3 抗体

TDP-43 と ELP3 は蛍光 2 重免疫染色では封入体内で共存していた (図 5)。

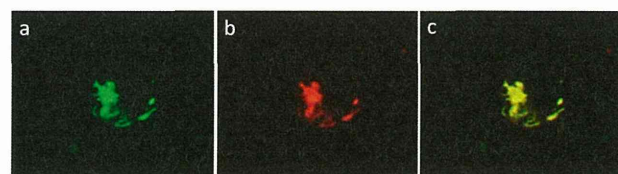


図 5 a) TDP-43 抗体、b) ELP3 抗体、c) Merge

4. 好塩基性封入体を有する ALS 例

HE でみられる好塩基性封入体は ELP3 抗体で明瞭に染色され、蛍光 2 重免疫染色では ELP3 は好塩基性封入体内で FUS と共存していた (図 6)。



図6 a)抗FUS抗体 b)抗ELP3抗体 c) Merge

H.知的財産権の出願・登録状況（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

D.考察

ALS患者の神経細胞内に認められるTDP-43およびFUS陽性封入体はELP3抗体で染色され、また、蛍光2重染色ではTDP-43とELP3、FUSとELP3は封入体内で共存していた。ELP3はTDP-43、FUSと同様にRNA代謝に関連する蛋白であり、ALSの病因として近年注目されているRNA代謝異常をさらに強く示唆する所見であると考えた。

また、ELP3は微小管の α -tubulinのアセチル化を促進することで微小管の安定、細胞内物質輸送を制御するとされ、このELP3の異常は様々な蛋白やオルガネラの輸送に障害が生じ、ALSの病態に関与する可能性も考えられた。

今後は各種ELP3抗体を用いてその認識部位による染色性の差異について検討、さらに微小管の障害はALS以外の神経変性疾患においても報告されており、他疾患におけるELP3の関与についても検討を加える予定である。

E.結論

ALSの病因としてELP3に対する研究も重要なことと考える。

文献

- 1) Nguyen L et al. Trends Mol Med 16:1-6, 2010
- 2) Simpson CL et al. Hum Mol Genet 18:472-481, 2009

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表：投稿中
2. 学会発表：なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））
「異常タンパク伝播仮説に基づく神経疾患の画期的治療法の開発」
（分担）研究報告書

レビー小体関連 α シヌクレイオパチー (Lewy body- related α - synucleinopathy: LBAS)
の脊髄内伝播に関する研究

隅蔵大幸¹、高尾昌樹¹、初田裕幸¹、野上茜¹、内野彰子¹、中野雄太¹、齊藤祐子³、村山繁雄^{1,2}

1. 東京都健康長寿医療センター神経病理（高齢者ブレインバンク）、2. 同神経内科・バイオリソースセンター、3. 国立精神・神経医療研究センター臨床検査部

研究要旨

脊髄および一次感覚線維におけるレビー小体関連 α シヌクレイオパチー (LBAS) の伝播を明らかにするため、高齢者連続開頭剖検例を用いた免疫組織学的研究を行った。脊髄 LBAS は下部脳幹や交感神経節との連絡を通じて出現する。一次感覚線維、交感神経節前線維における LBAS は軸索末端から細胞体へ逆行性に進展する。

A. 研究目的

脳内 LBAS 伝播は一定の経路が提唱されているものの例外も多く、未だ混沌としている。

脊髄内 LBAS に関しては一定の伝播経路は未だ明らかにされておらず、臨床との関連性についても分かっていないことが多い。そこで我々は高齢者ブレインバンク連続登録例を用いた網羅的免疫組織学的スクリーニングを行い、脊髄を脳・末梢組織と対比することで脊髄内 LBAS 伝播に関し検討を行った。

B. 研究方法

対象は 2003 年 1 月から 2013 年 7 月までの、当施設連続開頭剖検例 796 例である。中枢神経系として、嗅球、扁桃核、海馬、中脳、青斑核、延髄迷走神経背側核、第 4, 8, 12 胸髄、第 5 腰髄・第 2 仙髄を、末梢自律神経系として、胸部交感神経節、副腎、左室前壁、食道・胃移行部、皮膚を抗リン酸化 α シヌクレイン単クローン抗体 (psyn#64) で第一次スクリーニングを行った。いずれかの場所に陽性所見があれば、第二次スクリーニングとして、DLB 3rd Consensus Guideline 指定部位に加え、梨状葉、橋脚間被蓋核を加え検討した。脊髄に関しては、第 8 頸髄、馬尾・後根神経節 (DRG) を

加えた。psyn#64 免疫染色は Ventana NX20 を用いて行った。

(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

LBAS は一次スクリーニングで 265 例に陽性であったが、脊髄や DRG のみに限局している症例は認めなかった。脊髄後角には、免疫組織学的に神経突起内陽性所見 (Lewy neurite) のみ認める極早期においても約 10% の症例には LBAS を認め、症候性レビー小体病 (sLBD= PD: パーキンソン病/ 認知症を伴う PD: PDD/ レビー小体型認知症: DLB) では全例に LBAS を認めた。一方 DRG における LBAS 陽性率は sLBD においても約 60% と低く、LB 様凝集封入体は無症候期には認めず症候期にのみ認めた (図 1)。

脊髄灰白質の LBAS は下部脳幹 (延髄網様体、青斑核) の LBAS によく関連する (各々の相関係数 = 0.867 及び 0.825) 一方で、嗅球・扁桃核経路との相関関係は弱く (相関係数 = 0.602)、嗅球・扁桃核

と脊髄灰白質の両者が陽性の症例は全例が脳幹が陽性であった（図2）。脳幹にLBAS陽性かつ嗅球・扁桃核が陰性の場合、75%（12/16）は脊髄灰白質が陽性であった。一方で脳幹が陰性かつ嗅球・扁桃核が陽性の症例は、全例（n=51）脊髄灰白質が陰性であった。

LBASの蓄積量を半定量化し、脊髄灰白質の高位別に比較したところ、LBASは下部脊髄、とくに仙髄に有意に多く蓄積しやすいことが分かった。一次感覚ニューロン領域におけるLBASに関しては、DRG陽性例は全例が後角・後根が陽性であり、後根陽性例は全例が後角陽性であった。また、後根陰性例は一例を除き全例がDRG陰性であり、後角陰性例は全例がDRG・後根陰性であった。これは、一次感覚ニューロン領域におけるLBASは後角→後根→DRGの順に出現することを示唆する。

交感神経系では、LBASが交感神経節に局限する症例を認め、胸髄中間外側核陽性例の90.6%（115/127）は交感神経節が陽性であった。交感神経節と胸髄中間外側核のLBAS蓄積量の比較において、LBDの極早期から進行期の全経過において、交感神経節が上回っていた。

D. 考察

脊髄灰白質にはLBASはごく早期から出現するが、脊髄やDRGから発生することはなく、その他外部から脊髄に流入し、DRGには脊髄を介して広がる経路が示された。脊髄LBAS伝播の主経路は、直接の線維連絡を有する下部脳幹から尾側方向に進展してゆくものと考えられる。なぜ脊髄尾側に蓄積しやすいのかは謎であるが、病的蛋白の蓄積に関わる細胞内外の環境の違いが影響しているかもしれない。一方、脊髄とは直接の線維連絡を持たない嗅球・扁桃核系におけるLBASの動態は、脊髄とは独立したものであることが示された。見方を変えれば、今回我々は脊髄を注目したことで、脳内における嗅球・扁桃核経路の存在が間接的に証明された。

また脊髄LBAS伝播に関して、交感神経節から流入する経路の存在も確認された。この交感神経節前線維を介する経路や一次感覚神経系では、軸索末端から細胞体に向かって逆行して伝搬する傾向が示された。これは交感神経節後線維や腸管に至る副交感神経節前線維を逆行するという既報のLBASの動態に一致する結果であった。

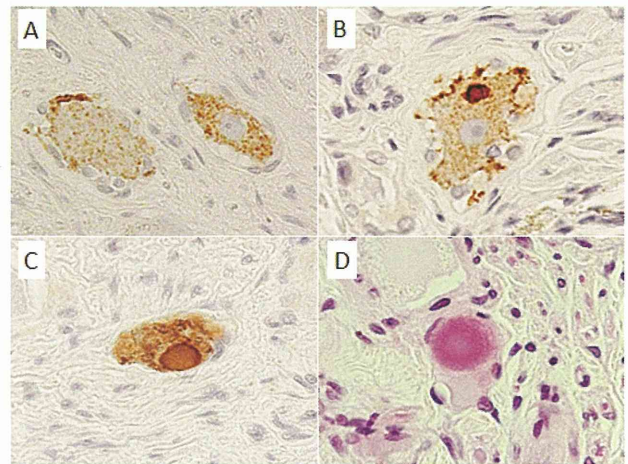


図1. DRGにおける抗リン酸化 α シヌクレイン単クローン抗体 (psyn#64) 免疫染色所見 (A-C)、およびHE染色所見 (D)。無症候期には神経細胞質内顆粒状陽性所見 (A) を認める。症候期にのみLB (D) およびLB様封入体 (B, C) を認める。

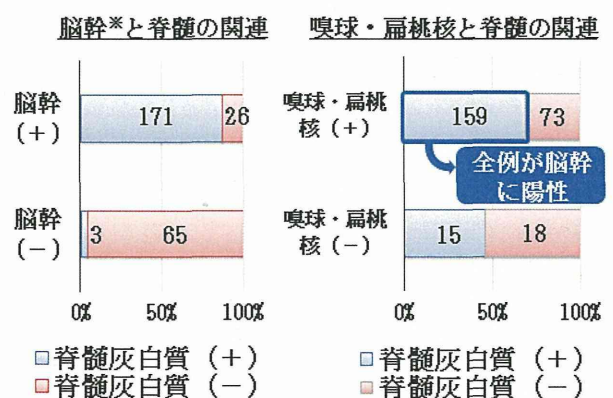


図2. 脳幹および嗅球・扁桃核と脊髄灰白質のLBAS陽性率の関連。脳幹陽性例は有意に脊髄が陽性である ($P < 0.00001$) (左図)。嗅球・扁桃核陽性例も有意に脊髄が陽性である ($P = 0.009$) が、陽性例 (n=159) 全例が脳幹陽性である (右図)。

※：迷走神経背側運動核、延髄網様体、青斑核、黒質。

E.結論

LBDにおいて、脊髄灰白質はもっとも早期から障害される解剖学的部位の一つである。

脊髄のレビー病理を考える上で、脳および末梢組織との相互関係を調べることは、LBDにおける α シヌクレインの病理メカニズムを知るうえで重要である。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1.論文発表

1. 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 (2013年度日本神経病理学会賞)
2. Miyakawa S, Ogino M, Funabe S, Uchino A, Shimo Y, Hattori N, Ichinoe M, Mikami T, Saegusa M, Nishiyama K, Mori H, Mizuno Y, Murayama S, Mochizuki H: Lewy body pathology in a patient with a homozygous Parkin deletion. *Mov Disord* 2013; 28(3): 388-391.
3. Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., Yoshida, M., Murayama, S., Mann, D. M., Akiyama, H. and Hasegawa, M. (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep* 4 (1): 124-34
4. Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DMA, Saito Y, Murayama S: 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol DOI* 10.1007/s00401-013-1191-9 (open access)
5. Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M: Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica Communications* 2013, 1:54 doi:10.1186/2051-5960-1-54

2.学会発表

1. Hatsuta H, Takao M, Ishii K, Ishiwata K, Saito Y, Kanemaru K, Arai T, Sahara T, Shimada H, Shinotoh H, Murayama S: 11C-Pittsburgh compound B PET imaging and postmortem neuropathologic analysis of amyloid β accumulation. *Human Amyloid Imaging*, Jan 16-18 2013, Miami.
2. Murayama S, Takao M, Hatsuta H, Sumikura H, Itoh S, Nogami A, Uchino A, Saito Y,: Systemic distribution of Lewy body pathology in an aging cohort. 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Australia Sydney, June 16-20 2013
3. Morimoto S, Kokubo Y, Hatsuta H, Kuzuhara S, Murayama S: Immunohistochemical Study of the Cerebellum in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)/Parkinson-Dementia Complex (PDC) in Kii Peninsula (ALS/PDC Kii, Muro Disease) . Alzheimer's Association International Conference. Boston, Massachusetts, July 13-18, 2013
123. Kanemaru K, Kanemaru I, Murayama S: nCSF SAPP β , Beta-Amyloid 42, Tau and P-Tau Levels in Alzheimer's Disease and Dementia With Lewy Bodies. Alzheimer's Association International Conference 2013. Boston, Massachusetts, July 13-18, 2013
4. Sanjo N, Higuma M, Hizume M, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Sakai K, Nozaki I, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Moriwaka F, Aoki M, Kuroiwa Y, Koyano S, Nishizawa M, Yokoseki A, Takeda M, Yoshiyama K, Inuzuka T, Abe K, Murai H, Murayama S, Takao M, Satoh K, Harada M, Saito N, Takumi I, Mizusawa H. Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. The XXIIth World Congress of Neurology, 9/21-9/26, 2013, Vienna, Austria

H.知的財産権の出願・登録状況（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。

急速に呼吸筋麻痺が進行し好塩基封入体を認めた ALS

吉田真理

辰己新水、三室マヤ、岩崎靖

1)所属 愛知医科大学加齢医科学研究所

研究要旨

症例は死亡時 35 歳男性で、家族歴 (-)、球麻痺と頸部・下肢の下位運動ニューロン障害で発症し、急速に呼吸不全が進行して全経過 5 ヶ月で死亡した。神経病理学的には下位運動ニューロンの脱落、好塩基性封入体を認め、神経細胞とグリア細胞の FUS 陽性封入体は運動系を越えた広がりを示した。神経細胞の腫大が散見され、錐体路変性は軽度であるが軸索腫大を認め軸索流の障害が示唆され、急速進行型 ALS-FUS の病態には軸索流の障害が関与している可能性が示唆された。

A.研究目的

FUS と TDP-43 は RNA 結合蛋白という共通点があるが、FUS 陽性症例は経過の早い例が多く、臨床像の違いも指摘されている。急速に呼吸筋麻痺が進行し FUS 陽性・好塩基封入体を認めた ALS-FUS 早期例の病理像の特徴を検討した。

B.研究方法

FUS 抗体 (Rabbit polyclonal, Sigma、賦活熱湯 40 分、1:300)、pTDP-43 抗体 (Rabbit polyclonal, Cosmo Bio, pS409/410-1、賦活熱湯 20 分、ギ酸 20 分、1:3000) を用いて検索した。

(倫理面への配慮)

遺族の承諾を得て病理解剖は施行されている。

C.研究結果

症例：死亡時 35 歳男性。

既往歴：幼少時の虫垂炎以外特記すべきものなし。

家族歴：なし。

臨床経過：半年前まで造園業の仕事をしており、特に自覚症状はなかった。2 ヶ月前から嚥下困難を自覚、1 ヶ月前から鼻声、呂律困難、流涎、臥位での首の挙上困難、左上肢や胸腹部の脱力、呼吸困難、短期間に 20kg の体重減少をきたし、神経内科を初診した。

初診時現症は、意識は清明、眼球運動異常や眼振はない。顔面の軽度筋力低下、舌の萎縮と線維束性収縮、軽度の構音障害を認めた。筋力は、頸部前屈の筋力低下 (MMT: 3)、上肢近位部は左優

位に低下 (MMT: 3)、上下肢遠位部の筋力はほぼ正常だが、Gowers は徴候陽性だった。頸部や四肢の線維束性収縮や筋萎縮は明瞭ではなかった。四肢腱反射は全般性に低下、Babinski 徴候陰性で、感覚障害や運動失調、自律神経障害はなかった。

検査所見では血算、生化学に異常はない。髄液検査は細胞数 4/3、蛋白 48mg/dl、糖 56mg/dl、IgG index 0.52、頭部 MRI、脊髄 MRI は著変なく、末梢神経伝導速度は左正中神経、尺骨神経、脛骨神経、腓腹神経の運動神経、感覚神経伝導速度は著変なく、conduction block (-)、右正中神経の反復刺激試験では waning (-)、waxing (-) だった。針筋電図は左上腕二頭筋、大腿直筋、前脛骨筋、fibrillation、positive sharp wave がわずかに出現、収縮時では long duration, high amplitude で neurogenic pattern を示した。肺機能では初診時のスパイログラムは、%VC 37.0%、FEV1.0% 100%と拘束性障害を認めた。血液ガスは pH7.347、PCO₂ 45.8 torr、PO₂ 77.8 torr、BE-0.6 mEq/l と PO₂ 低下を示し、すでに呼吸不全の状態にあることが判明した。

急速な球麻痺の進行、舌萎縮、呼吸不全は ALS を強く疑わせるが、若年発症で、上位運動ニューロン徴候が認められず、通常の ALS とは異なる非典型的な経過であった。食事指導を行い、本人に ALS の可能性を説明し、経過観察となったが、

2ヶ月後に誤嚥をきっかけに呼吸困難が増悪し、再入院となった。再度行った針筋電図なども前回と著変なく、進行性の球麻痺と下位運動ニューロン障害はALSに矛盾しないと考えられた。呼吸困難はあるものの歩行可能であったが、CO₂ナルコーシスが急速に進行し全経過5ヶ月で死亡した。

神経病理学的所見(図1,2)は脳重1350g、脊髓前根の萎縮、脊髓横断面では錐体路変性は不明瞭で、頸髄後索に軽度の淡明化を認めた。脊髓前角、舌下神経核は著明な細胞脱落、central chromatolysis、グリオシス、neuronophagiaを認め、残存する神経細胞には好塩基性封入体、FUS陽性封入体を認めた。FUS陽性封入体は運動系をこえて広い範囲に神経細胞とアストロサイトやオリゴデンドログリアに出現し、LMN、後角、Clarke柱、延髄・橋網様体、下オリーブ核、黒質、基底核、視床、視床下核、中心前回などに認めた。Bunina小体、TDP-43陽性封入体は陰性、中心前回と脊髓錐体路の変性はきわめて軽かった。FUS免疫染色では、前角細胞のびまん性の染色性、突起内の陽性像を認め、Gallyas-Braak染色にも網状陽性像を認めた。凍結組織がえられず遺伝子は未検索である。

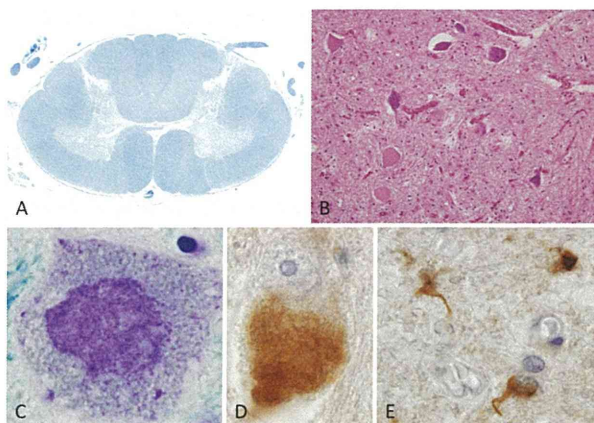


図1 頸髄後索の軽度淡明化を認め錐体路変性は不明瞭である(A)。腰髄前角細胞は高度に脱落し、central chromatolysis様細胞を多数認める(B)。残存する前角細胞内には好塩基性封入体(C)を認め、FUS陽性(D)を示す。グリア細胞にも多数のFUS陽性像を認める(E)。

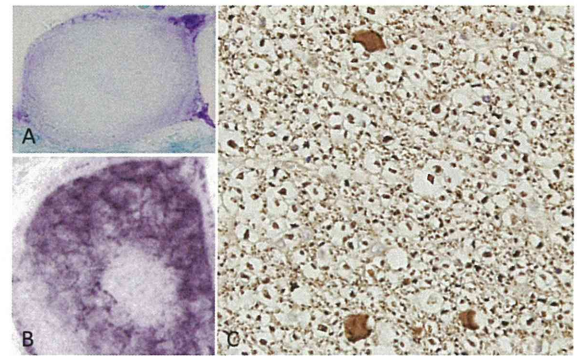


図2 残存する細胞には胞体が腫大(A)したものが目立ち、Gallyas-Braak嗜銀染色陽性の網状の線維性構造物の蓄積を認める(B)。錐体路は大径線維の脱落は目立たないが、pNF免疫染色陽性の腫大した軸索を散見する。

D. 考察

急速進行型ALS-FUSにcentral chromatolysis、神経細胞の腫大を多数認めた。ALS-TDP早期例でもみられる所見であるが、本例では特に細胞腫大が目立ち、また錐体路や前根に軸索腫大を認めたことから、軸索流の高度な障害が示唆された。遺伝子変異の存在も疑われるが未検索である。

E. 結論

急速進行型ALS-FUSの細胞病理像に、軸索障害を示唆する病理像を認めた。ALS-TDPとの病態の相違を反映する可能性があり、さらに検討が必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. Tatsumi S, et al. Argyrophilic grains are reliable disease-specific features of corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; 73(1):30-38
2. Riku Y, et al. Lower motor neurons are commonly involved in TDP-43-related frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurology* in press

JAMA Neurology in press

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし