

D&E. 考察と結論

今回の解析では病気の素因となりうる Mbp 単位の大きな DNA 構造変化は確認できなかった。しかし、他の測定法では検出しにくい 1kbp への比較的短い構造変化について現在解析を進めている。また、発症年齢、性別なども含めた素因遺伝子、構造変化についての解析も進めていく予定である。対象例を増やして解析する事により、キアリ奇形に有意差を持って頻度の高い CNV 領域を特定できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべき事無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 矢部一郎, 佐々木秀直: 染色体構造変化: 多系統萎縮症でのアプローチ. 臨床神経 2013; 53(11): 1333-5
- 2) Sakushima K, Hida K, Yabe I, Tsuboi S, Uehara R, Sasaki H: Different surgical treatment techniques used by neurosurgeons and orthopedists for syringomyelia caused by Chiari I malformation in Japan: clinical article. J Neurosurgery Spine 2013; 18(6): 588-92

2. 学会発表

- 1) 矢部一郎、谷野美智枝、矢口裕章、瀧山晃弘、蔡華英、林由起子、田中伸哉、佐々木秀直; *DNAJB6* 遺伝子変異による LGMD に伴った前頭側頭性認知症の知的所有権の取得状況 (予定を含む)

3. その他

いずれも該当無し

1. 特許取得
2. 実用新案特許

前頭側頭葉変性症と筋萎縮性側索硬化症における 筋交感神経活動は類似している

研究協力者 瀧山嘉久¹⁾

新藤和雅¹⁾、長坂高村¹⁾

1) 山梨大学医学部神経内科学講座

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）では筋交感神経活動（MSNA）が安静時増加していることが多く、前頭側頭葉変性症（FTLD）においても血圧が変動し易いなどの循環器系異常の報告があり、病理学的背景に類似点があるとされている ALS と FTLD 患者において、MSNA に類似性があるかどうかを検討することとした。対象は、FTLD 患者 8 例と年齢を一致させた ALS 患者 11 例（認知症 3 例含む）である。方法は、腓骨神経から導出した MSNA と心電図、血圧を同時測定し、安静時と頭部挙上負荷時の記録を行い、安静時の心拍数、平均血圧、MSNA 及び負荷時のそれぞれのパラメーターの増加反応を定量化し、両群間及び健常成人 15 人の値と比較した。結果は、安静時心拍数と平均血圧は 3 群間に有意差はみられず、両疾患群では MSNA の基礎活動は健常者群より有意に増加していた ($p < 0.05$)。両疾患群の頭部挙上負荷に対する反応性は、心拍数と平均血圧は軽度低下し、MSNA の増加反応は有意に低下していた ($p < 0.01$)。FTLD と ALS は、血圧を調節する自律神経活動である MSNA の比較においては、安静時活動及び負荷時の反応性には差がみられなかった。

A. 研究目的

これまで、我々は筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者において、末梢神経の活動を直接観察できる微小神経電図法を用いて、血圧の調節において重要な働きを持つ筋交感神経活動（MSNA）の記録を行って来た。結果として、ALS では安静時の MSNA が健常者及び筋萎縮のある筋疾患患者と比較して増加していることをこれまで報告してきた。この結果は、これまでの ALS では交感神経機能亢進があるとの他の生理学的な検討結果と一致するものであった。一方、前頭側頭葉変性症（FTLD）においては、血圧が変動し易いなどの循環器系異常の報告が散見されるが、自律神経系に関する詳細な検討は少ない。両疾患は、病理学的及び遺伝的な背景に類似点があるとされており、ALS 患者で認められた MSNA 異常が FTLD

患者においてもみられるかどうかを検討することとした。

B. 研究方法

対象は、FTLD 患者 8 例であり、年齢は 65～79（ 70.9 ± 4.7 ）歳、男性 2 例女性 6 例、MMSE 16～22（ 19.0 ± 2.3 ）であった。罹病期間は 1～3（ 2.1 ± 0.6 ）年であった。自律神経症状としては、3 例に便秘と排尿障害を認めた。FTLD 患者群と年齢を一致させた ALS 患者は 11 例であり、年齢は 64～78（ 71.5 ± 4.8 ）歳、男性 4 例女性 7 例、Jablecki 重症度スコア 8～29（ 17.0 ± 6.7 ）であり、臨床的に認知症のある患者が 3 例含まれていた。罹病期間は 8～42（ 17.7 ± 9.1 ）ヶ月であった。自律神経症状としては、4 例

に便秘を認めた。

方法は、室温 24～26℃の検査室において、患者を仰臥位安静とし、これまで報告してきたものと同様の検査機器及び記録同定方法を用いて、微小神経電図法 (MNG) により右側腓骨神経から筋交感神経活動 (MSNA) を導出・記録した。MNG の測定方法及び基本的な手技については、日本ニューログラム学会倫理指針に従って行い、全ての対象者について文書にて同意を得て行った。MSNA と胸部誘導心電図、右上肢血圧を同時に測定し、安静時と頭部挙上負荷時の記録を行った。計測したパラメーターは、安静時の心拍数、平均血圧、MSNA 及び負荷時の各パラメーターの増加反応であり、それぞれを定量化し各個人の定量値とした。両群間及び健常成人 15 人 (年齢 62～83 歳、男性 5 人、女性 10 人) の値と比較し、統計には、unpaired t-test を用い、 $p < 0.05$ 以下を有意と判定した。

C. 研究結果

安静時の心拍数と平均血圧は 3 群間に有意差はみられず、両疾患群では MSNA の基礎活動は健常者群より有意に増加していた ($p < 0.05$ 、図 1)。両疾患群の頭部挙上負荷に対する反応性は、心拍数と平均血圧は軽度低下し、MSNA の増加反応は有意に低下していた ($p < 0.01$ 、図 2)。

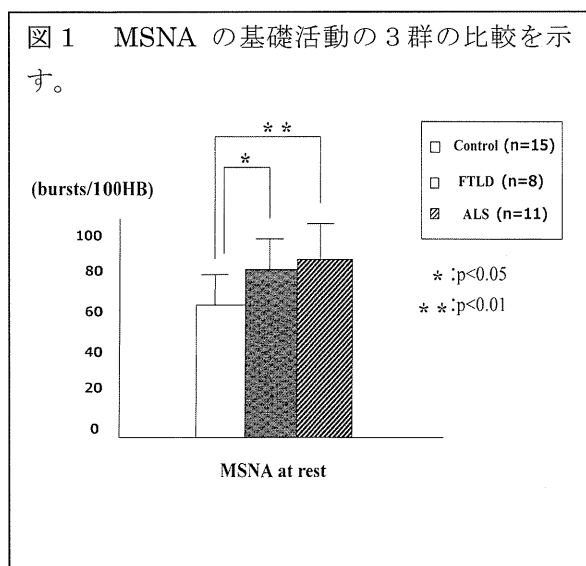
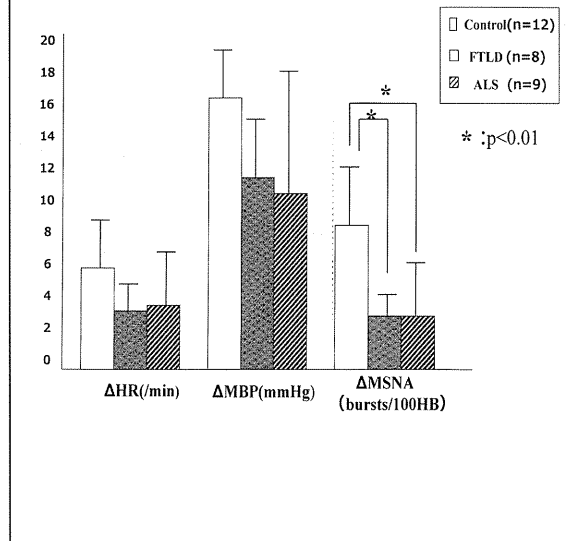


図 2 頭部挙上負荷による心拍数、平均血圧、MSNA の反応性における 3 群の比較を示す。



D. 考察

今回の著者らの検討結果からは、FTLD と ALS では、血圧を調節する自律神経活動である MSNA の比較においては、安静時活動及び負荷時の反応性には差がみられなかった。ALS の MSNA は病早期には増加傾向となるが、病状進行とともに低下傾向となることが確認されており、そのことが心・血管系の自律神経機能の評価を複雑にしているとされている。FTLD では血圧の易変動性や起立性低血圧などの報告があり、ALS と同様の自律神経機能異常が関与している可能性がある。FTLD でも MSNA における時間的な変動の検討が必要と考えられた。

E. 結論

FTLD では認知症性疾患としての特徴が目立ち、ALS では運動ニューロン疾患としての筋症状が前景に立ち、臨床的には異なる症状が主症状となっている。しかし、病理学的な背景に類似点があるとの報告以来、両疾患の関連性を示唆する報告が増えてきており、同一の遺伝子異常を持つ FTLD/ALS の家系の報告も相次いでいる。今回の検討結果からは、血圧を調節する自律神経活動の病態にも類似した特徴があるものと考えられた。

F.健康危険情報

報告なし。

G.研究発表

1.論文発表

- 1) 新藤和雅:自律神経障害のみられる神経疾患における循環器系異常. 自律神経 50:4-5、2013.
- 2) 新藤和雅:神経内科的疾患による認知症. 日本早期認知症学会誌 6:16-21、2013.
- 3) 新藤和雅:体温調節障害のみられる神経疾患における皮膚交感神経活動. 自律神経 50:216-218、2013.

2.学会発表

- 1) 新藤和雅、ほか:前頭側頭葉変性症患者と筋萎縮性側索硬化症患者における筋交感神経活動の比較. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月29日、東京.
- 2) 新藤和雅:筋萎縮性側索硬化症と自律神経障害. 第66回日本自律神経学会総会シンポジウム、2013年10月24日、愛知.

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。

孤発性 ALS-TDP と遺伝性 ALS とを結ぶ病因関連分子連関について：

孤発性 ALS の疾患特異的分子異常の解析から

研究分担者 郭 伸^{1,2)}

研究協力者 山下 雄也¹⁾、蔡慧玲¹⁾、寺本さやか¹⁾

1) 東京大学医学系研究科疾患生命工学センター、2) 国際医療福祉大学臨床医学研究センター

研究要旨

孤発性 ALS における疾患特異的な分子異常である ADAR2 の発現低下と TDP-43 病理形成を繋ぐ分子カスケードを解明した。すなわち、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の発現に伴い活性化したカルパインによる易凝集性 TDP-43 断片の形成が TDP-43 病理形成に繋がることが分かった。この分子カスケードは、変異 *TARDBP* 関連 ALS や変異 *FUS* 関連 ALS における分子カスケードとも一部共通していた。さらに、TDP-43 病理の観察される ALS (ALS-TDP) のみならず、TDP-43 病理を形成する他の神経疾患 (TDP-43 プロテオノパチー) においてもカルパイン依存性 TDP-43 断片の形成が TDP-43 病理形成に主要な役割を持つことが想定された。カルパイン依存性 TDP-43 断片を形成するメカニズムの多様性が想定され、個々の疾患における分子カスケードの解析が病態理解に繋がると予想される。

A. 研究目的

大多数の ALS 症例の運動ニューロンには TDP-43 病理が観察され (ALS-TDP)、少数例には観察されない (ALS-nonTDP)。近年の ALS 関連遺伝子の発見により、20 以上の責任遺伝子が同定されてきており、遺伝性 ALS における ALS-TDP、ALS-nonTDP の病理像はその遺伝子変異により規定されている。また、ALS 症例の大多数を占める孤発性 ALS の大多数は ALS-TDP であるものの少数例は ALS-nonTDP である。

本発表では、孤発性 ALS 運動ニューロンの分子変化の解析から想定される疾患特異的分子変化である ADAR2 の発現低下と TDP-43 病理を結ぶ分子カスケードの解析から、異なる遺伝的背景を持つ ALS の病因とこの分子カスケードとの関連がどのように想定されるのかを考察し、ALS の病因理解に資することを目的とする。

B. 研究方法

孤発性 ALS の分子病態モデルマウスであるコン

ディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) における TDP-43 病理形成分子メカニズムの解析から、ADAR2 発現低下から TDP-43 病理に至る分子カスケードを解析し、孤発性 ALS と既知の遺伝性 ALS の分子連関を考察する。

In vivo 実験：孤発性 ALS の分子病態モデルマウスであるホモ接合体・ヘテロ接合体 AR2 マウスに生じた分子異常を解析した。分子メカニズムを in vivo で解析するために、対照として ADAR2 欠損が Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の異常発現に依ることを示す AR2res マウス、カルパインノックアウトマウス、カルパイントランスジェニックマウスを用いた。免疫組織化学、組織ホモジネートを用いた蛋白解析を行った。

In vitro 実験：培養細胞 (Neuro2a, HeLa) lysate を用いたカルパインの TDP-43 切断活性のアッセイ、特異的プロテアーゼ阻害剤を用いた特異性の検討、TOF-MS を用いた切断断片の解析、患者組織の蛋白解析を行った。

C. 研究結果

TDP-43 病理の形成は TDP-43 が断片化し、その断片の凝集性が高まることがトリガーになることが想定されている(1)。孤発性 ALS 運動ニューロンではグルタミン・アルギニン (Q/R) 部位が未編集の GluA2 が発現し(2, 3)、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の発現により細胞内 Ca²⁺濃度が持続的に上昇している(4)。したがって、Ca²⁺依存性プロテアーゼの活性化が TDP-43 の異常な切断に関与している可能性がある。

ニューロンに発現する候補プロテアーゼとしてカルパインの TDP-43 切断活性を調べたところ、従来 TDP-43 切断の有力な候補であると考えられてきた caspase-3 に比べても遙かに高く、しかも特異的な切断活性を持つことが明らかになった。AR2 マウス脊髄ではカルパインが活性化し、カルパイン依存性 TDP-43 断片が形成されていることが明らかになった。カルパインの内因性インヒビターであるカルパスタチンのノックアウトマウスでは TDP-43 の局在異常が早期から見られること、逆にカルパスタチンのトランスジェニックマウスでは TDP-43 の切断が抑制されることから、カルパインによる TDP-43 の切断が運動ニューロンに生じていることが証明された。

カルパイン依存性断片の MALDI-TOF-MS による解析によりカルパインが TDP-43 の C 末端側を切断することが明らかになった。培養細胞への強発現実験からその断片の凝集性が極めて高いことが明らかになり、ADAR2 発現低下が TDP-43 病理を形成する分子カスケードが解明できた。

患者脳脊髄に発現している TDP-43 断片を解析するとカルパイン断片相当の断片が豊富に含まれていることが明らかになり、カルパインも活性化していることから、動物を用いた in vivo 実験・in vitro 実験での解析から明らかになった分子カスケードが ALS の運動ニューロンにも働いていることが示された。

以上の検討から、カルパイン断片が TDP-43 病理形成に中心的な役割を持つことが明らかになった。一方、TDP-43 遺伝子 (*TARDBP*) に変異をもたない孤発性 ALS のみならず、*TARDBP* 変異をもつ ALS の運動ニューロンにも TDP-43 病理が観察される。そのメカニズムを検討した結果、ALS に関連する変異 TDP-43 は野生型 TDP-43 に比べカルパインによる切断に脆弱であることが分かった。変異 *TARDBP* 関連 ALS の運動ニューロンでは ADAR2 発現の低下はみられないが、GluA2 を含まないことによる Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の発現が多いことにより、他のニューロンよりカルパイン活性が高いため、運動ニューロン選択的な TDP-43 病理が観察されると考えられる。

D. 考察

AR2 マウスおよび in vitro 実験の検討から、TDP-43 病理の形成にはカルパイン依存性かつ易凝集性 TDP-43 断片の形成が主要な役割を果たしていると考えられた(5)。その分子カスケードは以下のように要約されよう：ADAR2 発現低下→GluA2 Q/R 部位における RNA 編集活性の低下→未編集型 GluA2 の発現→Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の発現→細胞質 Ca²⁺濃度上昇→カルパインの活性化→易凝集性 TDP-43 断片の増加→凝集体の形成→核内 TDP-43 の巻き込み→核からの TDP-43 喪失→運動ニューロン死。

カルパイン依存性断片に相当する TDP-43 断片がカルパインの活性化と共に ALS および FTL-ALS 脳脊髄組織に見られたことから、この AR2 マウスに観察された分子メカニズムは、孤発性 ALS における TDP-43 病理形成にも働いていると考えられる(5)。

カルパイン依存性 TDP-43 断片の形成には、カルパインの活性化の他に、基質側 TDP-43 のカルパイン切断に対する脆弱性の獲得のメカニズムがあることが分かり、野生型 TDP-43 を発現する孤発性 ALS と変異 TDP-43 を発現する *TARDBP* 関連 ALS とでは、カルパイン依存性断片・TDP-43 病理

形成の分子メカニズムが異なることが明らかになった(5)。

更に、細胞内 Ca^{2+} 濃度は多様な調節機構が働いていることから、TDP-43 断片形成に関わるメカニズムに多様性があると想定される(5)。実際、変異 *FUS* 関連 ALS では、ADAR2 の発現低下が生じており(2)、孤発性 ALS と同様の細胞死カスケードが働いていることが想定され、カルパインの活性化を通じた TDP-43 病理形成メカニズムは *TARDBP* 関連 ALS を除いた ALS-TDP 一般に通じることが予測される。さらには、ALS 以外の TDP-43 病理形成にも通じるメカニズムであると考えられ、多様なカルパインを活性化させるメカニズム(主に細胞内 Ca^{2+} 濃度を持続的に上昇させるメカニズム)との関連を検討していくことにより ALS-TDP の病態理解が進むと期待される。

E. 結論

カルパインによる TDP-43 の易凝集性断片への切断が TDP-43 病理形成に関わっている。

文献：

1. Chen-Plotkin AS, *et al*: *Nat Rev Neurol* 6, 211-220, 2010.
2. Hideyama T, *et al*: *Neurobiology of disease* 45, 1121-1128, 2012.
3. Kawahara Y, *et al*: *Nature* 427, 801, 2004.
4. Seeburg PH: *Neuron* 35, 17-20, 2002.
5. Yamashita T, *et al*: *Nat Commun* 3, 1307, 2012.

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)

(倫理面への配慮)

東京大学倫理委員会、実験動物委員会の承認をえ、症例の解析は匿名化して行った。

1. 論文発表

1. Yamashita T, Chai H, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S, Kwak S: Rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model by intravenous AAV9-ADAR2 delivery to motor neurons. *EMBO Mol Med* 5:1710-19, 2013.
2. Yamashita T and Kwak S: The molecular link between inefficient GluA2 Q/R site-RNA editing and TDP-43 pathology in motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* in press.

他 7 編

2. 学会発表

1. Kwak S: Calpain cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Biology of Calpains in Health and Disease. Science Research Conferences FASEB*, Saxtons River, Vermont, July 21-26, 2013.

他 12 編

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

TDP-43 mRNA のポリ A 選択とスプライシングを介した自己蛋白量の制御機構

研究分担者 小野寺理⁴⁾

研究協力者 須貝章弘¹⁾、小山哲秀²⁾、加藤泰介¹⁾、志賀篤³⁾、今野卓哉¹⁾
小山美咲¹⁾、石原智彦¹⁾、西澤正豊¹⁾、

1) 新潟大学脳研究所神経内科 2) 新潟大学研究推進機構超域学術院

3) 新潟大学脳研究所病理学分野 4) 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

筋萎縮性側索硬化症（ALS）関連蛋白である TDP-43 は、正常細胞において一定量に制御されている。一方、TDP-43 の過剰発現系では神経細胞死がもたらされる。このことは、TDP-43 の量の異常に細胞が脆弱である可能性を示唆している。さらに核内蛋白である TDP-43 は、ALS 罹患細胞において、核内から消失し封入体を形成している。これらの事実は、TDP-43 の量制御機構と ALS における TDP-43 病態との密接な関連を示唆している。我々は、TDP-43 が自己 pre-mRNA 3'UTR に結合し、遠位 polyA 付加部位の使用を誘導し、さらに exon6 内での複数のスプライシングを惹起することにより、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構を介した自己 mRNA の分解を引き起こしていることを明らかにした。また、遠位 polyA 付加部位を使用するものの exon6 内のスプライシングを受けない mRNA が一部存在し、これらは核内に保持されることを示した。このような自己 mRNA の polyA 選択、スプライシング、核内保持を介した協調的な自己制御機構により、TDP-43 は発現量を制御している。

A. 研究目的

核内蛋白である TDP-43 は、正常細胞において一定量に制御されている。一方、TDP-43 の過剰発現系では神経細胞死がもたらされ、TDP-43 の遺伝子欠損マウスは胎生致死をきたす。これらは、TDP-43 の量の異常に細胞が脆弱である可能性を示唆している。さらに、筋萎縮性側索硬化症（ALS）においては、TDP-43 が核から消失し、細胞質で封入体を形成している。したがって、TDP-43 の量制御機構と ALS における TDP-43 病態には密接な関連が示唆される。

TDP-43 は自己 mRNA の 3'UTR に結合し自己蛋白の発現量を抑制している。しかしながら、どのような機序により、この発現抑制がなされているのかについては明確になっていない。我々は、この量制御機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

TDP-43 を発現誘導しうる HEK293 細胞と、TDP-43 exon6 を含むミニジーンを用いて解析した。核質と細胞質に分離し、total RNA を抽出し、polyA(+)RNA を精製し、ノザンブロットイング法により解析を行った。TDP-43 mRNA の各スプライシングアイソフォームの発現量を、逆転写-定量リアルタイム PCR により解析した。TDP-43 mRNA の細胞内局在を in situ ハイブリダイゼーション法により解析した。

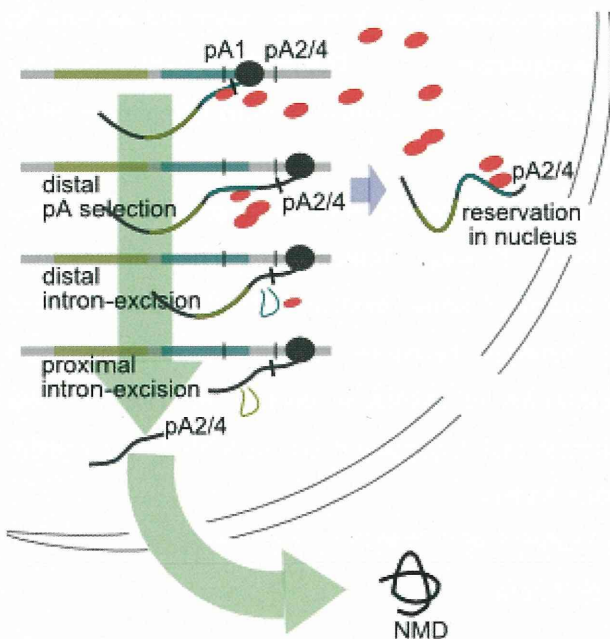
C. 研究結果

外来性 TDP-43 の発現誘導により内在性 TDP-43 は消失した。このとき細胞質内の内在性 TDP-43 mRNA は消失する一方、核内には一定量の mRNA が残存することを、RT-PCR、ノザンブロットィ

ング、in situ ハイブリダイゼーションにより示した。核内に残存した mRNA は遠位の polyA 付加部位を使用したものであった。さらにナンセンス依存性 mRNA 分解機構 (NMD) の阻害剤であるシクロヘキサミドで処理すると、外来性 TDP-43 発現時に、exon 6 のスプライシングをうけた内在性 TDP-43 mRNA が増加することを、ノザンプロッティング、定量 PCR により示した。このスプライシングは、exon6 内の遠位イントロンに続き近位イントロンにおいて起こることをミニジーンを用いた実験により示した。NMD による mRNA の分解には、この 2 ヶ所のスプライシングが重要であることを示した。さらに、このスプライシングとは独立に、TDP-43 増加時には遠位 polyA 付加部位を使用する mRNA が増えることを定量 PCR により示した。

D. 考察

我々は、TDP-43 増加時における発現抑制機構を明らかにした (図)。



TDP-43 が自己 pre-mRNA の 3'UTR に結合すると、polyA 付加部位が近位 polyA 付加部位から遠位 polyA 付加部位へ変化する。これにより、exon6 内の遠位イントロンの 3'スプライス部位が表出

し、このスプライシングが起こる。このスプライシングは、近位イントロンのスプライシングを惹起する。この 2 ヶ所のスプライシングを受けた mRNA は、細胞質において NMD による分解を受ける。一方、遠位 polyA 付加部位を使用した mRNA の一部は、スプライシングを受けず核内に保持される。このような自己 mRNA の選択的 polyA 付加、スプライシング、核内保持を介した協調的な自己制御機構により、TDP-43 は自己蛋白の発現量を制御している。

ALS 病理では TDP-43 は核内で減少している状態にある。したがって今後、TDP-43 減少時における TDP-43 mRNA の動態を明らかにしていく必要がある。さらに、ALS 罹患細胞における TDP-43 mRNA の各アイソフォームの局在および量の変化を解明することにより、ALS における TDP-43 病態の理解が深まるものと考えられる。

E. 結論

TDP-43 は、自己 mRNA の polyA 選択、スプライシング、核内保持を介して、自己蛋白の発現量を抑制している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1 Onodera O. Molecular pathogenesis of ALS in TDP43 era. *Rinsho Shinkeigaku*.2013;53(11):1077-9.

2 Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G; JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown RH Jr, Nomoto M,

Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S. ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet.* 2013 Nov 7;93(5):900-5.

3 Onodera O, Ishihara T, Shiga A, Ariizumi Y, Yokoseki A, Nishizawa M. Minorsplicing pathway is not minor any more: Implications for the pathogenesis of motor neuron diseases. *Neuropathology.* 2013 Sep 22. doi: 10.1111/neup.12070.

4 Kanazawa M, Tada M, Onodera O, Takahashi H, Nishizawa M, Shimohata T. Early clinical features of patients with progressive supranuclear palsy with predominant cerebellar ataxia. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 Dec;19(12):1149-51.

5 Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, Yokoseki A, Arakawa K, Sekine Y, Shimohata T, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Onodera O, Takahashi H. Sporadic ALS with compound heterozygous mutations in the SQSTM1 gene. *Acta Neuropathol.* 2013 Sep;126(3):453-9.

6 Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, Kato T, Tan CF, Sato T, Miki Y, Yokoo M, Fujino T, Koyama A, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2013 Oct 15;22(20):4136-47.

7 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.* 2013 Apr;84(4):398-401.

2 学会発表

1) 須貝 章弘、小山 哲秀、今野 卓哉、加藤 泰介、西澤 正豊、小野寺 理：TDP-43量はTDP-43に惹起される自己 mRNA のスプライシングで制御される：第 54 回日本神経学会学術大会（2013年 5 月、東京）

2) 小山 哲秀、須貝 章弘、今野 卓哉、加藤 泰介、石原 智彦、西澤 正豊、小野寺 理：TDP-43は mRNA の自己調節機構を介して自身の蛋白量を制御する：包括脳ネットワーク 2013 年度夏のワークショップ（2013年 8 月、名古屋）

3) Akihiro Sugai, Akihide Koyama, Taisuke Kato, Takuya Konno, Tomohiko Ishihara, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera: Alternative splicing or polyadenylation, which is the major mechanism for auto-regulation of TDP-43? : RNA Metabolism in Neurological Disease: 8th Brain Research Conference (November 2013, San Diego)

4) Akihiro Sugai, Akihide Koyama, Taisuke Kato, Takuya Konno, Tomohiko Ishihara, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera: Alternative splicing or polyadenylation, which is the major mechanism for auto-regulation of TDP-43? : Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting (November 2013, San Diego)

5) Akihide Koyama, Akihiro Sugai, Taisuke Kato, Takuya Konno, Tomohiko Ishihara, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera: TDP-43 is autoregulated by multiple excisions of introns in exon6 and reservation of mRNA in nucleus by TDP-43 : 24th International Symposium on ALS/MND (December 2013, Milan)

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

筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭葉変性症における共通画像マーカーの探索

分担研究者 祖父江 元

共同研究者 千田譲¹、梶田道人¹、渡辺宏久¹、陸雄一¹、勝野雅央¹、石垣診祐¹、熱田直樹¹、伊藤瑞規¹、中村亮一¹、渡辺はづき¹、原一洋¹、坪井崇¹、米山典孝¹、長縄慎二²

1)名古屋大学医学部神経内科 2)名古屋大学放射線科

研究要旨

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）44例、運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症（FTLD-MND）7例、髄液検査にてアルツハイマー病変化を認めない behavioral variant FTD（bvFTD）9例、意味性認知症（SD）6例に対し、高次脳機能検査および脳容積解析と SPM を用いた DTI のマッピング解析を行った。ALS は高次脳機能検査が正常（ALS-NC）であった 19例と、何らかの異常（ALS-CD）を認めた 25例に再分類化した。3T-MRI 画像を撮像し、Voxel Based Morphometry（VBM）による脳容積解析と SPM を用いた拡散テンソル（DTI）のマッピング解析を行い、それぞれ健常群または ALS-NC 群との群間比較を行った。ALS-CD 群・FTD-MND 群・FTLD 群では前頭葉・側頭葉の灰白質萎縮と尾状核の萎縮、拡散テンソルでは前頭葉から基底核、特に尾状核周囲から視床での Fractional Anisotropy（FA）低下を認めた MRI 統計画像解析による孤発性 ALS と FTLD の共通性を検討し、TDP-43 proteinopathy の共通画像マーカーを探索しえた。

A. 研究目的

近年、孤発性筋萎縮性硬化症（ALS）と前頭側頭葉変性症（FTLD）は、共通の分子病理基盤として TDP-43 を有することが判明してきた。FTLD の臨床病型は behavioral variant FTD（bv-FTD）、意味性認知症（SD）、進行性非流暢性失語に分類されるが、SD では高率に、bvFTD では半数以上に TDP-43 病理を認めると報告されている。今回我々は、孤発性 ALS と、bvFTD、SD を対象とした FTLD 64 例に、高次脳機能検査および脳容積解析（VBM）と SPM を用いた DTI のマッピング解析を行うことで孤発性 ALS と FTLD における共通画像マーカーを探索した。

B. 研究方法

対象は孤発性 ALS 44例（男性 26例、女性 18例）、運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症（FTLD-MND）7例（男性 6例、女性 1例、平均検査時年齢 67.3±12.4 歳）、運動ニューロン疾患を伴わない前頭側頭型認知症（FTLD）15例（男性 9例、女性 6例、bv-FTD 9例・SD 6例、平均検査時年齢 65.2±5.6 歳）。ALS は FAB、Digit-Span 評価点、Word-Fluency（音素・意味）、ADAS 再認識課題の 4 因子を用いてクラスター解析を行い、認知機能が正常な ALS（ALS normal cognition: ALS-NC）19例（平均検査時年齢 57.2±8.9 歳）と FTLD-MND の診断基準を満たさないものの認知機能の低下を認めた ALS（ALS cognitive-decline: ALS-CD）25例（平均検査時年齢 63.9±11.9 歳）

の二群に分けて検討した。3T-MRI 画像（3D-T1 と拡散テンソル (DTI)）を撮像し、脳容積解析と SPM を用いた DTI のマッピング解析を行い、健常 24 例（男性 12 例、女性 12 例、平均検査時年齢 62.3 ±6.1 歳）との群間比較を行った。

C. 研究結果

高次脳機能障害の様式は、ALS-NC、ALS-CD、FTLD-MND、FTLD で類似した低下パターンを示し、この順に前頭葉機能を中心とした高次脳機能の低下が高度となった。

脳容積解析について、健常群と比較した際の皮質画像では、4 病型群いずれの画像においても背外側前頭前野、下前頭回、弁蓋部、下側頭回前方に萎縮を認め、LS-NC<ALS-CD<FTD-MND<FTLD の順に萎縮の範囲は広範囲で、その程度も高度であった。また ALS-CD、FTD-MND、FTLD では ALS-NC に比べて共通して前頭葉眼窩面や側頭極の萎縮を主体とした萎縮を認め、ALS-CD<FTD-MND<FTLD の順に萎縮の範囲は広範囲で、その程度も高度であった ($p<0.001$)。

皮質下画像では島回、尾状核、視床に共通して萎縮を ALS-CD、FTD-MND、FTLD に認め、ALS-CD<FTD-MND<FTLD の順に萎縮は広範囲かつ高度となった ($p<0.001$)。DTI 解析では、ALS 全体では錐体路周囲と前頭葉の FA 低下を認め、脳萎縮の傾向と同様 ALS-CD で ALS-NC と比べ前頭葉により強い FA 低下を認めた。FTLD-MND と FTLD は前頭葉から側頭葉に FA 値低下を認めた。また ALS-CD、FTD-MND、FTLD では尾状核周囲と前方帯状回に FA 低下を認めた ($p<0.001$)。

D. 考察

大脳萎縮と DTI 異常所見の分布は ALS-NC 群、ALS-CD 群、FTLD-MND 群、FTLD 群で類似し、この順で高度かつ広範囲となった。共通して異常を認める皮質領域としては、前頭前野、側頭葉棘、側頭葉下面が挙げられた。

臨床的に FTD を呈する症例の病理学的基盤は TDP-43、タウ、FUS と多岐に渡るが、本研究では

髄液検査で A β 42 とリン酸化タウの比率を測定するとともに、経過中に核上性眼球運動障害や易転倒性の出現した症例は除外した。FUS を除外することは困難であるが、一般に FTD の中で FUS を病理学的に有する症例の比率は少なく、家族歴の無い症例を選択することで、出来る限り TDP-43 proteinopathy を背景病理に有する症例を選択するように努めた。今後、病理学的な確認が必要であるが、TDP-43 proteinopathy で共通して病変の生じやすい大脳皮質、白質、皮質下構造のある可能性が示された。

尾状核は前頭前野と密接な線維連絡があり、学習、記憶、計画立案等に係わり、正しい行動計画立案や、行動結果の評価に基づく適切な副目標選択に重要な役割を果たすことが、前頭 - 島 - 側頭回路は社会的にコミュニケーションを成立させる共有情報を処理することが、側頭葉棘は社会性や情動処理と密接に関連していることが、視床前核は記憶との関連が示されており、これらの領域の病変は、行動障害、記憶障害、社会脳やコンテキスト（コミュニケーションの場で使用される言葉や表現を定義づける背景や状況そのもの）認知・処理などの障害と密接に関連するものと思われる。

また発症年齢は ALS-NC 群では他の群よりも有意に若かった。これは我々が報告してきたように TDP-43 proteinopathy では発症年齢によって大脳病変の広がり異なる可能性を支持するものであり、今後さらなる検討が必要である。

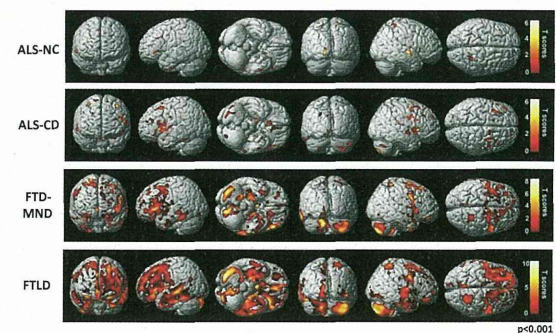


図 1：皮質の萎縮（対健常群）

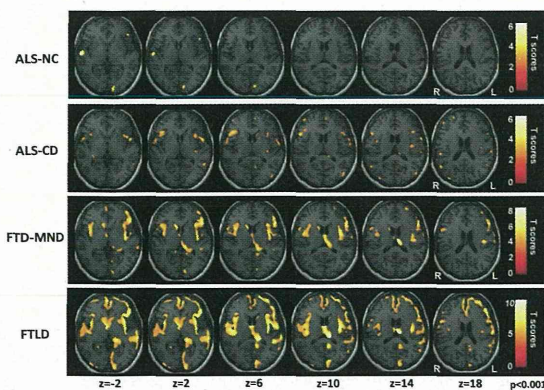


図 2 : 皮質・皮質下の萎縮 (対健常群)

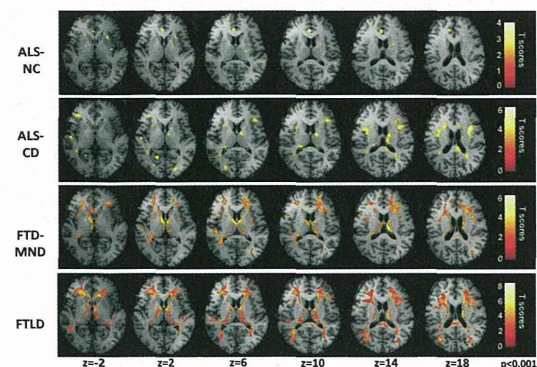


図 3 : FA 低下部位 (対健常群)

E. 結語

ALS-NC 群、ALS-CD 群、FTLD-MND 群、FTLD 群において、VBM での脳萎縮と DTI での異常所見の共通性を皮質、白質、皮質下構造物で認め、その特徴的な分布は共通画像マーカーになりうると思われた。

F. 健康危険情報：特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, et al. Lower motor neurons are commonly involved in TDP-43-related frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis JAMA neurology 2013 (in press).

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, et al. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry.

013;84:1365-71.

Tsujimoto M, Senda J, Ishihara T, et al.

Behavioral changes in early ALS correlate with voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging. J Neurol Sci. 2011;307:34-40.

Senda J, Kato S, Kaga T, et al. Progressive and widespread brain damage in ALS: MRI voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging study. Amyotroph Lateral Scler.2011;12:59-69.

2. 学会発表

Senda J, Riku Y, Sobue G, et al. Brain degeneration in ALS patients as detected by VBM and DTI: similarities with FTLD. 19th Human Brain Mapping, June 2013, Seattle, USA.

千田 謙, 坪井 崇, 祖父江 元他. 筋萎縮性側索硬化症に対する脳容積・拡散テンソル Voxel-Based Analysis 法を用いた検討. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013. 5.

梶田道人, 陸 雄一, 祖父江 元他. 脳容積・拡散テンソル Voxel-Based Analysis MRI 画像による前頭側頭葉変性症 (FTLD) 大脳病変の特徴. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013. 5.

梶田道人, 陸 雄一, 祖父江 元他. 脳容積・拡散テンソル Voxel-Based Analysis MRI 画像による前頭側頭葉変性症 大脳病変の特徴. 第 32 回日本認知症学会学術集会, 松本, 2013. 11.

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

ALS を含む通常剖検例の一般諸臓器におけるリン酸化 TDP-43 の 蓄積に関する検討

研究分担者 岡本 幸市¹⁾

研究協力者 甘利雅邦¹⁾，藤田行雄²⁾，牧岡幸樹²⁾，福田利夫³⁾，鈴木慶二¹⁾，高玉真光¹⁾

- 1) 公益財団法人老年病研究所附属病院， 2) 群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学，
3) 群馬大学大学院保健学研究科

研究要旨

ALS を含む通常剖検例の一般臓器を対象に，抗 TDP-43 抗体および抗リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) 抗体などを用いて免疫組織学的に検討した．腎および内分泌・外分泌腺の一部の細胞の細胞質内に，TDP-43 や pTDP-43 に反応する構造がみられた．western immunoblotting では human kidney cytoplasmic lysate で 45 kDa に相当する部位に抗 pTDP-43 抗体で反応するバンドがみられた．上記の臓器における TDP-43 や pTDP-43 の発現は普遍的にみられ，病的な発現ではなく，細胞の機能に関連しているものと考えられる．しかしながら，上記の陽性細胞の大半は autoclave 処理で，程度は軽いがビオチンで反応してしまい，非特異的な反応をみている可能性があり，真に TDP-43 や pTDP-43 が細胞質内に存在しているかどうかについてはさらに別な方法での再検討が必要である．

A. 研究目的

ALS の原因はなお不明である．1970 年代から 1980 年代にかけて，本邦を中心に ALS 例での肝機能障害が注目され，肝生検が行われ，電顕でミトコンドリアの異常などが指摘されていた．しかしながらその後は ALS 例での一般臓器の検討はほとんどなされていない．一方，2006 年に ALS や前頭側頭葉変性症にみられる封入体の構成成分として見出された TDP-43 は，全ての細胞の核内に発現しているが，一般臓器では protein-aggregate myopathies の骨格筋でのみリン酸化 TDP-43 (pTDP-43) の凝集がみられている．

今回，剖検例の腎に pTDP-43 の強い発現がみられるのを見出したことを契機に，ALS を含む通常剖検例の一般臓器における TDP-43 と pTDP-43 の発現などについて検討を行った．

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

検体の採取にあたっては，患者または家族の informed consent を得た．

パーキンソン病 1 例を含む通常剖検例 9 例 (13 歳から 88 歳)，孤発性 ALS 4 例 (56 歳から 75 歳)，FTLD-TDP 剖検例 (101 歳) 1 例の一般臓器のホルマリン固定パラフィン切片を用いた．HE 染色，抗 TDP-43 抗体 (Proteintech)，3 種類の抗 pTDP-43 抗体 (当科で作成した抗体，Cosmo Bio のポリクロナール抗体，Cosmo Bio のモノクロナール抗体)，抗 ubiquitin 抗体 (DAKO, polyclonal)，抗 p-62-N 抗体 (PROGEN, polyclonal) を用いて免疫染色を行った．Ubiquitin 以外は 121°C，5 分間の autoclave 処理を行った．対照は autoclave 処理ありとなし群で，一次抗体なしで免疫染色を行った．さらに，human kidney cytoplasmic and

membrane lysates を用いて western immunoblotting も行った。

C. 研究結果

今回用いた TDP-43 及び pTDP-43 抗体は、ALS 脊髄前角細胞で見られる skein-like inclusions や round inclusions を特異的に認識した。なお、これらの抗体は、ALS 脊髄では autoclave などの前処置をしないと染まらない。

今回の所見のまとめは以下のようである。

1) 全ての症例の腎皮質の細胞質は抗 pTDP-43 抗体と抗 TDP-43 抗体でびまん性に強く染色された。一部の核は TDP-43 で染色性が低下しているようにみえた。skein-like inclusions や round inclusions はみられなかった。腎髄質細胞の細胞質の染色は、ないかあっても弱かった。抗 ubiquitin 抗体と抗 p-62-N 抗体では陽性所見を呈したが、その程度は弱かった。

2) 唾液腺の導管、その他一部ではあるが、副腎、膝外分泌細胞、気管支腺、食道腺、下垂体、精巢の Leydig 細胞、胸腺の Hassall 小体の中央、側脳室の脈絡叢などに陽性所見がみられた。

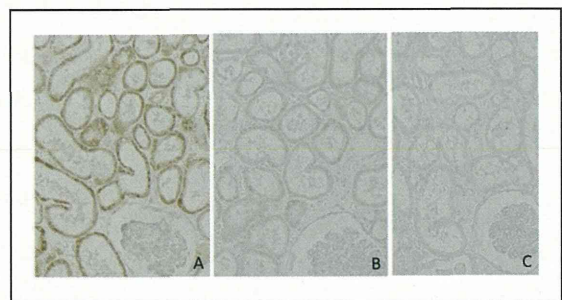
3) 副腎髄質細胞は、TDP-43 では陽性であったが、pTDP-43 では陰性であり、染色性に解離がみられた。

4) western immunoblotting では human kidney cytoplasmic lysate で 45 kDa に相当する部位に抗 pTDP-43 抗体で反応するバンドがみられた。

5) 一次抗体なしの対照染色では、副腎髄質と胸腺 Hassall 小体の中央以外は、autoclave 処理をすると、上記の pTDP-43 陽性細胞に対応する細胞では、その程度は弱いが生じた。autoclave 処理なしでは陽性所見はみられなかった。ALS の脊髄前角細胞では autoclave 処理をしても skein-like inclusions や round

inclusions は一次抗体なしでは陰性であった。

図 1 腎皮質。A: autoclave 前処理後 pTDP-43



(Cosmo Bio polyclonal), B: autoclave 前処理後・一次抗体なし, C: autoclave 前処理なし・一次抗体なし

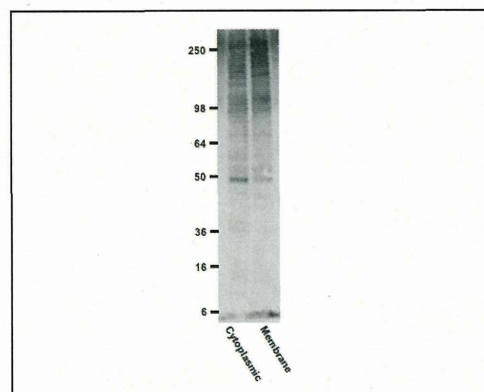


図 2 Immunoblotting of a human kidney cytoplasmic lysate using an anti-pTDP-43 antibody detected several bands, including a band at about 45 kDa (left lane); however, immunoblotting of a human kidney membrane lysate showed a weak similar pattern (right lane).

D. 考察

TDP-43 は不均一核内リボ核酸蛋白の一種であり、核に局在し、細胞質と核の間を行き来して、多面的な RNA 制御を行っている蛋白である。ALS では TDP-43 は核から細胞質へ脱出して異常に凝集・不溶化・蓄積し、神経細胞の変性へと導くと想定されている。TDP-43 は全ての細胞の核内に発現しているにもかかわらず、一般臓器では protein-aggregate myopathies の骨格筋でのみ

pTDP-43 の凝集がみられている。

そこで今回、一般臓器における TDP-43 や pTDP-43 の細胞質内における発現の有無を検討した。肝臓には発現はほとんどなく、腎皮質に強い発現がみられ、さらに一部の分泌腺にも陽性所見がみられた。腎皮質と側脳室の脈絡叢ではほとんどすべての細胞が陽性であったが、唾液腺の導管、副腎、膵外分泌細胞、気管支腺、食道腺、下垂体、精巢の Leydig 細胞などでは一部の細胞のみが陽性であり、その理由は不明である。これらの所見は検索した剖検例のすべてでみられ、細胞変性はなく、病的な所見と考えられず、細胞の機能との関連が示唆された。腎細胞質の抽出物による western immunoblotting でも 45 kDa に相当する部位に抗 pTDP-43 抗体と反応するバンドがみられ、腎に pTDP-43 が存在することを支持している。

しかしながら、一般臓器で TDP-43 と pTDP-43 が陽性であった細胞の大半は、autoclave で前処理後、一次抗体なしで染色すると、弱いながらも陽性を呈し、非特異的なビオチン反応と考えられた。

今回の結果は、非特異的なビオチン反応をみている可能性があり、真に TDP-43 や pTDP-43 が細胞質内に存在しているかどうかについては、さらに別な方法での再検討が必要である。

E. 結論

ALS を含む通常剖検例の一般臓器でも、腎および内分泌および外分泌腺の一部の細胞の細胞質内に、抗 TDP-43 抗体や抗 pTDP-43 抗体に反応する構造がみられた。これらの臓器では、細胞質内における TDP-43 や pTDP-43 の発現は普遍的みられ、病的な発現ではなく、細胞の機能（分泌？）に関連しているものと考えられる。

しかしながら、副腎髄質を除き、上記の陽性部位では autoclave 処理で、程度は軽いがビオチンで反応してしまい、非特異的な反応をみている可能性があり、真に pTDP-43 が細胞質内に存在しているかどうかについては、さらに別な方法での再検

討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

筋萎縮性側索硬化症の大脳皮質における TDP-43 組織像の多様性の検討：

臨床病理、および生化学的解析

研究分担者 高橋均¹⁾

研究協力者 竹内亮子¹⁾²⁾、他田真理¹⁾、志賀篤¹⁾、今野卓哉²⁾、豊島靖子¹⁾、
小野寺理³⁾、西澤正豊²⁾、柿田明美¹⁾、

1)新潟大学脳研究所病理学分野、2)同神経内科、3)同分子神経疾患資源解析学

研究要旨

FTLD-TDP は大脳皮質の pTDP-43 陽性組織像により分類され、臨床像との関連が示されている。また、生化学的解析では、大脳皮質における断片型 pTDP-43 の出現様式も組織分類に対応してそれぞれ異なることが提唱されている。一方、ALS の大脳皮質についての詳細な検討はなされていない。今回、孤発性 ALS 128 例の剖検例を用いてこれを詳細に解析し、臨床像および生化学的特性との関連を検討した。ALS の大脳皮質では pTDP-43 に標識される NCI と DN の頻度は症例毎に異なっていた。DN の多寡を指標に症例を 2 群に分類すると、DN が多い群では下位運動ニューロン脱落が軽度であるにもかかわらず早期に死に至っており、また、レンズ核にシナプス状の pTDP-43 陽性構造を高率に認めるといった特徴があった。この群では、神経細胞死以前に機能障害をきたしている可能性が考えられ、今後、シナプス状の陽性構造との関連性についてさらに検討を進める必要がある。

A. 研究目的

近年、TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) 陽性構造物を伴う筋萎縮性側索硬化症 (ALS)-TDP と前頭側頭葉変性症 (FTLD)-TDP は、一連のスペクトラム上の疾患として捉えられている。FTLD-TDP は大脳皮質のリン酸化(p)TDP-43 陽性組織像により Type A から Type D の 4 つのタイプに分類され、それぞれ臨床像と相関することが報告された (Mackenzie et al. 2011, Acta Neuropathol)。この分類では、前頭側頭型認知症を伴う運動ニューロン疾患は Type B を呈するとされている。

また、生化学的解析では、大脳皮質における断片型 pTDP-43 の出現様式は、FTLD-TDP の大脳皮質組織像による分類と相関を認め、ALS と FTLD-TDP type B は同じバンドパターンを示したと報告されている (Hasegawa et al. 2008, Ann Neurol)。

これまで ALS に伴う大脳皮質組織像についての詳細な検討はなされていないため、これを解析し、臨床像および生化学的特性との関連を多数例で

検討する。

B. 研究方法

はじめに、ALS を「脊髄前角細胞にプニナ小体またはスケイン様封入体を有し、かつ神経細胞脱落を認め、臨床的に運動障害で発症もしくは認知症発症から 1 年以内に運動障害を呈したものと定義した。孤発性 ALS 連続剖検例 128 例から TDP-43 陰性の 2 例と検索困難な 15 例を除き、111 例を対象とした。まず、リン酸化特異 TDP-43 抗体 (pS409/410) を用い、Nishihira らの ALS 分類に従い、海馬歯状回に神経細胞質内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusion:NCI) を欠く ALS Type 1 とそれを有する Type 2 に分類した。Type 2 の側頭葉皮質における pTDP-43 陽性組織像を変性神経突起 (dystrophic neurite:DN) の量に従って分類し、臨床像や組織像および TDP-43 の生化学的特性との関連を検討した。

統計学的解析には、 χ^2 検定、Student の t 検定を用いた。

C. 研究結果

孤発性 ALS111 例において、Type 1 は 78 例、Type 2 は 33 例であった(図 1)。ALS Type 2 の 33 例のうち 22 例では、側頭葉皮質に認められる DN は少数であり (sparse DN 群)(図 1)、そこには pTDP-43 陽性 NCI が種々の程度に認められた。この群の組織所見は、Mackenzie らによる FTLD-TDP 分類では Type B に相当するか、あるいは類似するものと考えられた。一方、他の 11 例では比較的多くの DN に加え、NCI や threads を伴うなど多彩な陽性所見が認められた (abundant DN 群)(図 2)。両群を比較すると、罹病期間の平均(人工呼吸器装着症例を除く)は abundant DN 群で 13.1 ± 4.3 ヶ月、sparse DN 群では 23.7 ± 17.1 ヶ月であり、abundant DN 群で有意に短く生命予後が不良であった ($p=0.025$)。組織学的には、abundant DN 群では下位運動ニューロンの脱落は有意に軽度であり(表 1)、また興味深いことに、レンズ核におけるシナプス状の pTDP-43 陽性像が 91% (10/11 例) と高率に認められた(図 3)。この所見は、sparse DN 群では 9% (2/22 例) のみにしか認められなかった。

また、pTDP-43 陽性 NCI の量を側頭葉皮質と運動野で比較すると、側頭葉皮質の NCI が多い症例が各群の約半数ずつでみられた。

Western Blotting による生化学的解析では、断片型 pTDP-43 の出現様式は両群間で明らかな相違は認められず、既報の FTLD-TDP Type B のそれと同様であった(図 4)。

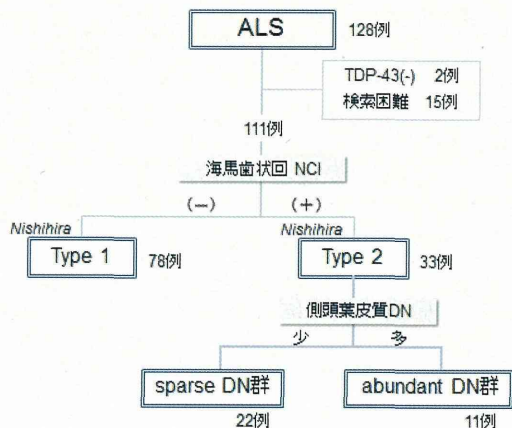


図 1. 孤発性 ALS128 例の側頭葉皮質における pTDP-43 陽性組織像による分類。海馬歯状回に NCI を認める Type 2 33 例のうち、22 例では側頭葉皮質の DN は少なく (sparse DN 群)、11 例では多数

であった (abundant DN 群)。

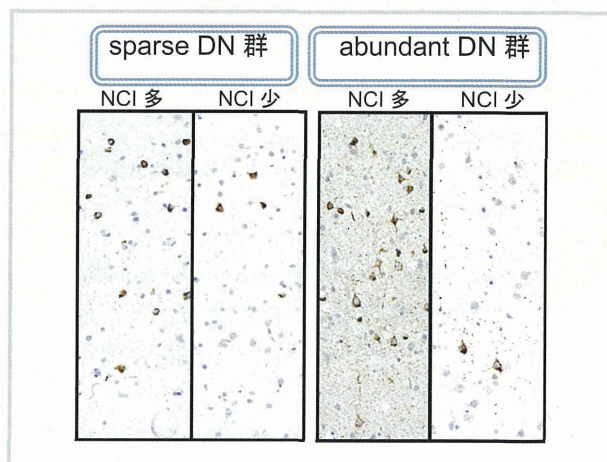


図 2. 側頭葉皮質の代表的な組織像。(pTDP-43 免疫染色) abundant DN 群では、点状あるいは長さを持った dystrophic neurite を多数認める。

		sparse DN 群 n = 22	abundant DN 群 n = 11	p 値
神経細胞脱落 1: mild 2: moderate 3: severe mean±S.D.	運動野	2.1 ± 0.7	2.5 ± 0.7	0.099
	脊髄前角	2.1 ± 0.6	1.5 ± 0.4	0.003
	XII	2.6 ± 0.6	1.4 ± 0.5	< 0.001

表 1. 運動ニューロン脱落。運動ニューロンの脱落の程度を 3 段階で評価し、mild を 1 点、moderate を 2 点、severe を 3 点として、平均値を示す。上位運動ニューロンについては 2 群間で明らかな差を認めないが、下位運動ニューロンでは abundant DN 群で脱落が軽度であった。

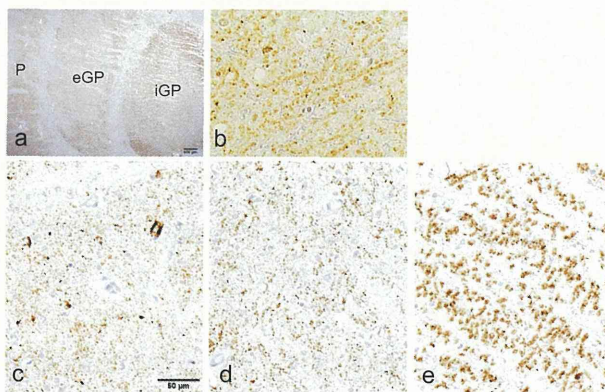


図 3. レンズ核の pTDP-43 陽性像。ルーペ像でも染まりが確認され (a)、被殻 (c)、淡蒼球外節 (d) および内節 (e) の拡大像ではシナプス状の陽性構造を多数認める。これらは抗リン酸化非依存性 TDP-43 抗体免疫染色でも描出される (b)。

a, c-e : pTDP-43、 b : TDP-43

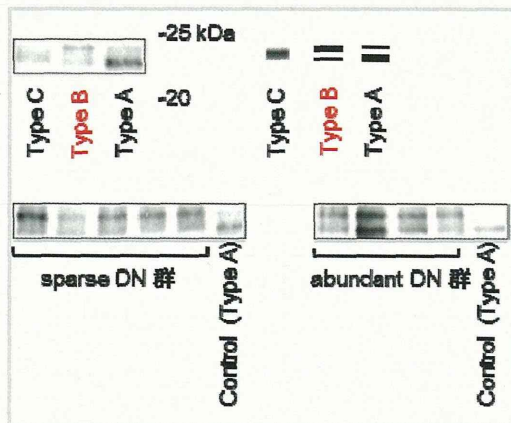


図 4. pS409/410 抗体を用いたサルコシル不溶性画分の Western Blotting. 20~25kDa に出てくる C 末断片のバンドパターンは、sparse DN / abundant DN の両群で、FTLD-TDP 病理分類における Type B のパターンと類似している。

D. 考察

ALS に伴う大脳皮質 TDP-43 陽性組織像は一様ではなく、神経細胞体のみ蓄積を認める症例と、神経細胞体と神経突起に蓄積を認める症例が存在した。これらの組織像の違いにかかわらず、ウェスタンブロットによる断片型 TDP-43 の出現様式には、明らかな相違を認めなかった。

今回の検討から、abundant DN 群の臨床病理学的な特徴として、①レンズ核にシナプス状の pTDP-43 陽性点状構造を多数認めること、②下位運動ニューロンの脱落が軽度であること、それにもかかわらず、③生命予後が不良であることが示された。すなわち、この群では神経細胞死が起きる前に症状が進行しているということであり、神経細胞死より前に細胞の機能不全が起きていることが推測された。シナプス状の pTDP-43 陽性像との関連性については、更に検討が必要である。

今回対象とした ALS Type2 33 例において、運動野より側頭葉皮質に多数の NCI を認めた症例が 18 例、逆に運動野により多くの NCI を認めた症例が 15 例あった。このような組織像の結果から、ALS に伴う大脳皮質病変の進行の仕方として、前頭側頭葉から始まり運動野に向かうパターンと、運動野から始まり前頭側頭葉に向かうパターン

があると考えられた。いずれのパターンで進行しても、一部では臨床的に認知症を呈することが示唆された。

E. 結論

ALS の大脳皮質では pTDP-43 に標識される構造物は多彩であり、NCI と DN の頻度は症例毎に異なっていた。DN の多寡を指標に症例を分類すると、そこには臨床的あるいは組織学的に特徴が認められた。abundant DN 群では下位運動ニューロン脱落が軽度であるにもかかわらず、早期に死に至っている。この群では、神経細胞死以前に機能障害をきたしている可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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 respirator. 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大脳皮質における 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