

紀伊 ALS-parkinsonism-dementia complex 家系の臨床病理学的検討

研究分担者 葛原茂樹¹⁾
研究協力者 三室マヤ²⁾, 小久保康昌³⁾

1) 鈴鹿医療科学大学, 2) 愛知医科大学加齢医学研究所, 3) 三重大学地域イノベーション研究科

研究要旨

紀伊半島東部 ALS 集積地 H 地区の家族性 ALS/PDC の臨床的病理学的検討し、次の結論を得た。臨床表現型は 3 中核徴候である運動ニューロン病 (MND)、非定型 parkinsonism、dementia (apathy-abulia type) がオーバーラップし多様であったが、神経病理学的には共通性があり、2 種類の基本病変として、ALS associated TDP-43 proteinopathy と高度の tauopathy involving neurons and glias が併存した。A β 病変や α -シヌクレイン病変が高度なものもあった。遺伝素因を背景に発症する家族性 ALS/PDC は、臨床表現型は症例ごとに多様であるが、病理学的にはほぼ共通の所見を呈する疾患単位であることを示唆する。

A. 研究目的

紀伊半島南部地域には高集積する筋萎縮性側索硬化症 (ALS) とパーキンソン認知症複合 (parkinsonism-dementia complex: PDC) は、臨床病型と神経病理学的所見が多様であり¹⁾、その臨床的病理学的特徴や診断基準は確立しておらず、そのことが原因解明 (遺伝子、環境因)、病態解明 (iPS 細胞など)、治療・予防などの研究の支障になっている。本研究の目的は、共通の病因的背景を有すると考え得る家族性発症例を通じてこれらの点を明らかにすることである。

B. 研究対象と方法

対象. 東部集積地 H 地区では、数世代にわたって多数の発症者がいる家系がある^{1,2)}。その中で、複数の剖検例が得られた A 家系について、臨床症状と病理所見を検討した。本家系では発端者を含めて、4 世代で 23 名が発症していたが、臨床所見が記録されている 17 例と 6 剖検例 (赤塗り) を検討対象とした。

検討事項 (Table 1)。臨床所見では、病歴や検診の記載から、後方視的に、運動ニューロン病 (MND)、パーキンソニズム (P)、認知症 (D) の主要徴候の有無を検討した。剖検例においては、

通常の神経病理学的染色に加えて、各種鍍銀染色、Gallyas 染色を行い、免疫組織化学的検討は、タウ (AT-8)、A β 、 α -シヌクレイン、TDP-43 について実施した。古い剖検例は残存する標本の範囲内で検討した。

(倫理面への配慮)

三重大学医学部倫理委員会の承認を得て、人権と個人情報に十分配慮して実施した。

Table 1
Clinical and neuropathological features studied

I. Clinical features
1. Motor neuron disease (MND) signs Upper motor neuron signs, lower motor neuron signs, bulbar signs
2. Parkinsonism Tremor, rigidity, akinesia, truncal instability, posture, gait
3. Dementia Memory, orientation, speech, behavior, hallucination, apathy, abulia
4. Others
II. Neuropathological findings
1. ALS pathology in upper and lower motor neurons, and TDP-43 proteinopathy
2. Tauopathy in nerve cells and glial cells
3. A β pathology
4. Lewy bodies and α -synucleinopathy
5. Others

C. 研究結果

医師が診察し、臨床診断名や身体所見の記載のある 17 例のまとめを table 2 に示す。臨床症状と診断名は多様であったので、症例ごとに初発症状とその後に加わった症状を分けて示した。MND の下位分類として、上位と下位の MND 症状が揃い ALS 診断基準³⁾を満たすものを ALS とし、ALS の基準を満たさない場合は進行性球麻痺 (PBP)、脊髄性筋萎縮症 (PMA)、原発性側索硬化症 (PLS) とした。上位 MND 症状は、腱反射の亢進だけでなく、クローヌス、痙性、病的反射のいずれかを伴っている場合に陽性とし、下位 MND 徴候は、筋萎縮、筋力低下、筋線維束性収縮が見られる場合に陽性とした。

その結果からは、臨床病型としては、MND 単独群 (ALS、PBP、PMA) と D 単独群 (D だけで MND や P の所見の記載なし) と、2 つ以上の中核症状がオーバーラップした ALS-D 群 (MND と D)、PDC 群 (P と D)、PDC-MND 群 (P と D に MND) の 5 型に分類され、極めて多様であった。

Table 2 Summary of the clinical manifestations of the 17 cases

Case No	Sex	Clinical diagnosis	Age at onset	Initial symptom	Interval by years	Overlap symptom	Age at death	Duration (months)
1	M	ALS	57				64	85
2	F	ALS	39				45	62
3	M	PMA	62				63	14
4	M	ALS-D	44				51	84
5*	F	ALS-D	65		5y		66	10
6	M	PBP-D	43		<1y		45	13
7*	M	PMA-D	70		1y		77	94
8	F	PDC	59		6y		70	129
9	F	PDC	68		8y		79	
10*	F	PDC	59		1y		72	154
11	F	PDC	66		7y		76	122
12*	F	PDC	60		7y		76	122
12*	F	PDC	60		3y		74	168
13	F	PDC	57		8y			
14*	F	PDC-ALS	53		2y		60	100
15	M	D	58		1y		65	84
16	F	D	71				81	120
17*	M	D	56				63	83

Dementia MND Parkinsonism

M: male, F: female, P: parkinsonism, D: dementia, PMA: progressive muscular atrophy, PBP: progressive bulbar palsy, PDC: parkinsonism-dementia complex *: autopsy

Table 3 Summary of the neuropathological findings of the 6 autopsy cases

Case No	Sex	Clinical diagnosis	Age at death	Neuropathological findings						
				ALS		Tauopathy		α SNA	Aβ	TD P-43
				UMN	LMN	Neuron	Glia			
5*	F	ALS-D	66							
7*	M	PMA-D	77							
10*	F	PDC	72							
12*	F	PDC	74	NA						
14*	F	PDC-ALS	60							
17*	M	D	63	NA	NA		NA	LB on HE		NA

Dementia MND Parkinsonism

UMN: upper motor neuron, LMN: lower motor neuron, α SNA: α-synuclein, NA: not available, LB: Lewy body, HE: hematoxylin-eosin staining

これらの中で剖検された 6 例のまとめを Table 3 に示す。脊髄標本がない症例や、限られた部位や染色しか利用できない症例はあったが、共通所見として、肉眼的な前頭側頭葉萎縮 (figure a)、ALS 病変 (figure d) と高度のタウ病変を認めた。

タウ陽性病変はニューロンとグリアの両方に認められた。ニューロンにおいては、PDC で従来から報告されているように⁴⁾、脳幹と内側側頭葉に最も高度で (figure b)、それ以外の大脳皮質、基底核、小脳歯状核、脊髄にまで広範に広がっていた。星状グリア内タウ陽性封入体は軟膜下や血管周囲に高度で、白質や変性した側索内の星状グリアにも認められた (figure 2b-g)。さらに thorn-like, tuft-like, astrocytic plaque-like など、従来、進行性核上性麻痺 (PSP) や皮質基底核変性症 (CBD) に疾患特異的として報告されている封入体⁵⁾に類似した構造が認められた。

Aβ 陽性の老人斑は、ほとんど認めない例が多かったが、多数認められた例もあった (No14、No17)。α-シヌクレイン陽性のレビー小体は、散見される程度であったが、老人斑多数出現の 1 例 (No14) においては、大脳皮質にも極めて多数出現していた。TDP43 染色を施した全例で、海馬歯状回神経細胞内と脊髄前角細胞内に skein-like inclusion を含む封入体を認めた。出現は限局性で、神経突起内封入体は乏しい type B⁶⁾であった (figure 1d-g)。

この他の特記すべき所見として、死亡直前まで臨床的に MND 徴候を認めなかった PDC 例 (No 10) の脊髄において明瞭な ALS 病変が確認されたことが、運動野にはタウ陽性正常細胞が多数認められ、上位運動ニューロンの変性を示唆した。

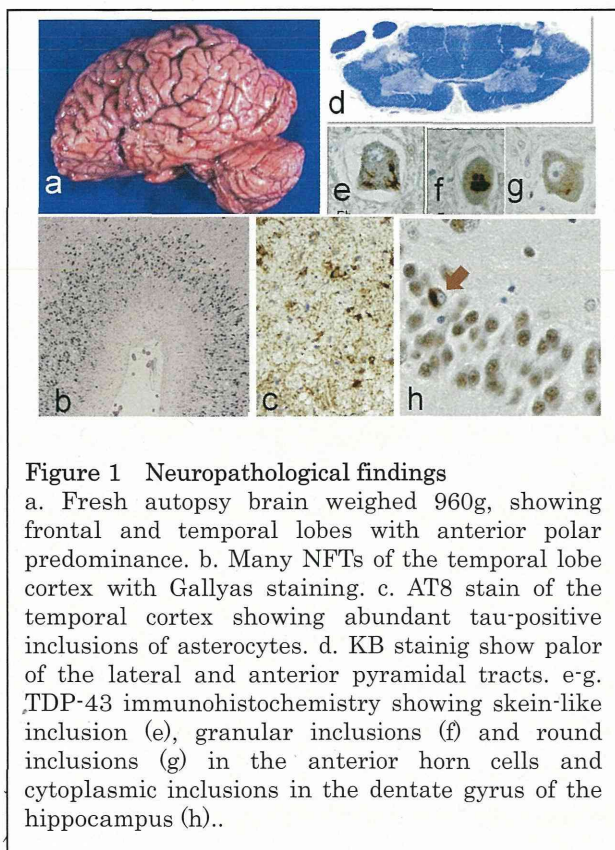


Figure 1 Neuropathological findings
 a. Fresh autopsy brain weighed 960g, showing frontal and temporal lobes with anterior polar predominance. b. Many NFTs of the temporal lobe cortex with Gallyas staining. c. AT8 stain of the temporal cortex showing abundant tau-positive inclusions of astrocytes. d. KB staining show palor of the lateral and anterior pyramidal tracts. e-g. TDP-43 immunohistochemistry showing skein-like inclusion (e), granular inclusions (f) and round inclusions (g) in the anterior horn cells and cytoplasmic inclusions in the dentate gyrus of the hippocampus (h)..

D. 考察

紀伊 ALS/PDC は、中核症状である MND、P、D の出現する症状と順序が症例ごとに異なるために、原因検索や遺伝子解析を行う際に、対象が均質な疾患であるのか、不均一な疾患であるのかの判断に困難を感じる。この問題を解決することを目的に、同一家系内で複数の剖検例がある家族性発症例を選び、臨床表現型と病理所見を比較した。

その結果、同一家系内であっても臨床病型は非常に多様で数病型に分類されることが判明した。一方、病理所見については臨床像の多様さとは対照的にほぼ一樣な所見を呈し、中枢神経系のニューロンとグリアに広範かつ高度に出現するタウ病変、および ALS associated with TDP-43 病変が基本的病理所見であった。この基本病変は臨床病型の如何にかかわらずほとんど同じであった。生前に MND 徴候が明らかでなかったが、病理学的には典型的 ALS 病変を認めた家族性 PDC 例を、著者は過去にも報告しており²⁾、ALS at the preclinical stage と思われる。TDP-43 陽性封入体は、ALS における好発部位である脊髄前角細胞や海馬歯状回細胞に全例に認められ、病理学的

ALS に関連した所見と思われる。タウ病変と TDP-43 ALS 病変の 2 つが一元的な原因によるものか、2 つの疾患の合併であるのかは、今後の検討課題である。

A β 病変は軽微であったが、2 例では高度であった。一方、軽度の α -シヌクレイン病変は殆どの症例に見られたが、高度の A β が認められた 1 例では、多数の皮質型 LB が認められた。このような病変が、PDC の範疇に含まれるものか、アルツハイマー病やレビー小体型認知症との合併であるのかは、今後、多数の剖検例の検討や、原因と病理変化の成立機序の解明を通じて明らかにされるであろう。

E. 結論

紀伊半島 H 地区の数世代にわたって多数の発症例と複数の剖検例がある紀伊 ALS/PDC 家系を臨床的病理学的に検討し次の結論を得た。臨床表現型は、MND、parkinsonism、dementia の主要 3 徴候が、単独あるいは複数で出現し、多様な臨床症候を示す。しかし、神経病理学的には、臨床表現型の多様さとは対照的に、TDP-43 ALS pathology + tauopathy involving both neurons and glias を特徴とする疾患単位と考えられる。

ALS 病変とタウ病変は一元的原因によるものか、二元的原因による 2 つの疾患の合併であるかは、今後の検討課題であり、より多数の剖検例の検討、遺伝子解析などによって解決されるものと思われる。

文献

- 1) Kuzuhara S, Kokubo Y: Amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex in the Kii peninsula of Japan (Muro disease): a review on recent and new concept. In Strong MJ (editor) Amyotrophic lateral sclerosis and the frontotemporal dementias. p39-54, Oxford University Press, Oxford. 2012.
- 2) Kuzuhara S, Kokubo Y, et al: Familial amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan: clinical and neuropathological study and tau analysis. Ann Neurol 49:501-511 2001.

3) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000;1:293-299.

4) Mimuro M, Kokubo Y, et al. Similar topographical distribution of neurofibrillary tangles in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex in people living in the Kii peninsula of Japan suggests a single tauopathy. *Acta Neuropathol.* 113:653-658, 2007.

5) Dickson DW, Kouri N, et al. Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *J Mol Neurosci.* 2011;45:384-389.

6) Mackenzie IR, Neumann M, et al. A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta Neuropathol.* 2011;122:111-113.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 葛原茂樹. 紀伊 ALS/パーキンソン認知症複合. 辻 省次、高橋良輔 編、中山書店、東京、p 459-468, 2013

2) 葛原茂樹. 紀伊・グアムの ALS. 全てが分かる ALS (筋萎縮性側索硬化症)・運動ニューロン疾患. 辻 省次、祖父江 元 編、中山書店、東京、p 125-134, 2013

3) Kihira T, Okamoto K, Yoshida S, Kondo T, Iwai K, Wada S, Kajimoto Y, Kondo T, Kokubo Y, Kuzuhara S. Environmental characteristics and oxidative stress of inhabitants and patients with amyotrophic lateral sclerosis in a high-incidence area on the Kii Peninsula, Japan. *Intern Med.* 52:1479-1486, 2013.

4) Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012;27:1413-1417.

5) Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K,

Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya K, Yokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTLD, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord.* 19:15-20, 2013;.

2. 学会発表

1) Kuzuhara S. Invited speaker. Clinical spectrum and genetics of Kii ALS-PD complex, in the Session: The Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease in Scientific topic "Motor neuron disease". XXIst World Congress of Neurology, Vienna, Austria, September 21-26, 2013

2) 葛原茂樹. 難病研究における臨床調査と疫学的重要性. シンポジスト. シンポジウム. 難病対策の転換期における基盤整備の取り組み. 第72回日本公衆衛生学会総会, 三重県総合文化センター, 2013. 10. 23-25

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

SQSTM1 遺伝子に複合ヘテロ接合性変異を認めた ALS の 1 剖検例

研究分担者 高橋均¹⁾

研究協力者 清水宏¹⁾、豊島靖子¹⁾、志賀篤¹⁾、横関明男²⁾、荒川恵子²⁾、関根有美²⁾、
下畑享良²⁾、池内健²⁾、西澤正豊²⁾、柿田明美¹⁾、小野寺理³⁾、

1)新潟大学脳研究所 病理学分野、2)同 神経内科、
3)同 脳神経リソース研究部門 分子神経疾患資源解析学分野

研究要旨

近年 ALS 患者に、p62 蛋白質をコードする *SQSTM1* 遺伝子にヘテロ接合性変異が見出され、注目されている。我々は下位運動神経細胞に p62 陽性/TDP-43 陰性の特異な胞体内封入体を認めた孤発性、高齢発症の ALS を経験し、本例には *SQSTM1* 遺伝子に p. [Val190Met]; [Val1153Ile] の複合ヘテロ接合性変異が見出された。本例は *SQSTM1* 遺伝子のヘテロ接合体であることにより、p62 単独陽性の特異な封入体が下位運動神経細胞に出現した可能性が考えられた。*SQSTM1* 遺伝子変異が ALS の発症や臨床病理に与える影響を明らかにするために、複合ヘテロやホモ接合体の剖検例集積が重要であると考えられる。

A. 症例

死亡時 75 歳男性、家族歴に特記事項なし。72 歳両手の脱力を自覚、その後の半年間で下肢・体幹筋の萎縮、筋力低下、線維束性収縮が出現し、針筋電図においても舌・四肢筋に線維束性収縮が認められた。腱反射は低下していた。筋萎縮の進行はやや緩徐であり、末期まで歩行が可能、また嚥下障害はなく経口摂取が可能であった。30 か月で肺炎、呼吸不全のため死亡。病的反射は死亡 1 か月前に初めて誘発された。認知症、錐体外路症状、自律神経症状、また骨ペーজেット病の臨床症状や検査所見はいずれも認められなかった。

B. 病理所見

脳重は 1315g、脳の外観は尋常であったが、脊髄は細く前根の萎縮が明らかであった。組織学的にも下位運動系（特に頸髄）の変性が優位な ALS であり、Betz 細胞の脱落は軽度で、錐体路変性も明らかではなかった(図 1a)。その一方、下位運動神経細胞は頸髄前角では高度、腰髄前角(図 1b)では中等度、舌下・顔面神経核(図 1c)では軽度で脱落していた。また、ブニナ小体は認められな

かった。さらに、下位運動神経細胞には、TDP-43、リン酸化 TDP-43 (pTDP)、アルファシヌクレイン、ユビキチン陽性の胞体内封入体は認められなかった。他方、p62 免疫染色では残存下位運動神経細胞の胞体内に球状～不定形な封入体 (NCIs) を認め(図 1d)、スケイン様の形態を示すものはごく稀に認めるのみであった(図 1e)。また、p62 陽性の腫大突起や希突起膠細胞胞体内封入体 (GCIs) も認められた(図 1f)。p62 陽性 NCIs は、連続切片による解析では、ユビキチン、TDP-43(図 1g)、pTDP-43、アルファシヌクレインには陰性であり、封入体含有細胞の核は TDP-43 に正常に染色性された。二重免疫染色による解析でも p62 陽性 NCIs は、ユビキチン(図 1h)、TDP-43(図 1i)に陰性であった。p62 陽性 NCIs は、電顕的にリボソーム様の顆粒状構造から成り、一部に線維状構造を含んでいた(図 1j)。

また、視床下核、橋核、小脳歯状核にも p62 陽性 NCIs を認め、これらの領域では TDP-43 陽性構造は認められなかった。

他方、運動野皮質をはじめ、下位運動系以外の様々な領域には TDP-43 陽性の NCIs・GCIs が少数

出現し(図 1k)、p62 免疫染色でも同様の形態・分布を示す封入体が認められたが(図 1l)、それらの出現量は TDP-43 陽性封入体と比較し少なかった。TDP-43 陽性 NCI の広がりには Nishihira らの type 1 に相当した(Acta Neuropathol 116: 169-182, 2008)。大脳皮質の TDP-43 病理については、陽性構造の殆どが NCI であることから MacKenzie の type B に相当した(Acta Neuropathol 122: 111-113, 2011)。また海馬、小脳には、C9orf72 変異 ALS で報告されている p62/ubiquitin 2 陽性構造は認めなかった。さらに、黒質・青斑核の軽度の神経細胞脱落と共に、脳幹~大脳辺縁系にアルファシヌクレイン陽性 Lewy 小体/Lewy 突起の出現を認め(図 1m-o)、パーキンソン病を合併していた。病理所見を表 1 にまとめた。

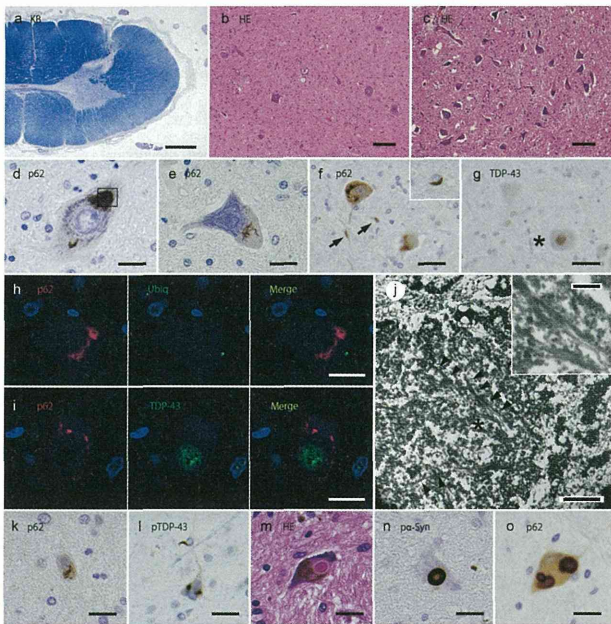


図 1 組織所見。a 前角は萎縮。側索変性は認めない(第 4 頸髄)。b 中等度の神経細胞脱落(腰髄前角)。c 軽度の神経細胞脱落(顔面神経核)。d 下位運動神経細胞に認めた p62 陽性 NCI (腰髄前角)。e スケイン様の p62 陽性 NCI は極めて稀に出現(腰髄前角)。f p62 陽性構造は神経細胞胞体内のみならず、神経突起(矢印)やオリゴデンドログリア胞体内(inset)にも認めた(顔面神経核)。g p62 陽性 NCI は TDP-43 陰性で、封入体含有細胞核の TDP-43 染色性は保持(*) (f の連続切片)。h, i 二重免疫染色。p62 陽性 NCI はユビキチン陰性(h, 舌下神経核)、TDP-43 陰性(i, 腰髄前角)。j p62

陽性 NCI はリボソーム様の顆粒状構造から成り、部分的に線維状の構造も含んでいた(矢印、inset) (d の拡大)。k p62 陽性 NCI (視床下核)。l pTDP-43 陽性 NCI と GCI (前頭葉皮質)。m-o レヴィー小体 (m 黒質、n 中脳網様体、o 延髄網様体)。

	Neuron loss	p62		pTDP-43		Ubiquitin		pc-Syn
		NCIs	GCI	NCIs	GCI	NCIs	GCI	LBS
Cerebral cortex								
Frontal	-	+	+	+	+	+ (*LBS)	-	+
Motor	+	+	+	++	++	-	-	-
Insular	-	+ (*LBS)	+	+	+	+ (*LBS)	-	+
Temporal	-	+	+	+	+	+ (*LBS)	-	+
Occipital	-	-	-	-	-	-	-	-
Subcortical area								
Ammon	-	+	+	+	+	-	-	-
Dentate gyrus	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdaloid nuclei	-	+ (*LBS)	+	-	+	+ (*LBS)	-	++
Putamen	-	+	+	+	+	-	-	-
Globus pallidus	-	+	+	+	-	-	-	-
Thalamus	-	+	+	++	+	+ (*LBS)	-	+
Subthalamic nucleus	-	+	+	-	-	-	-	-
Basal nucleus of Meynert	-	++ (*LBS)	-	-	-	++ (*LBS)	-	+++
Brainstem								
Superior colliculus	-	-	-	+	+	-	-	-
Oculomotor nucleus	-	-	-	-	-	-	-	-
Red nucleus	-	+	++	+	++	-	-	-
Substantia nigra	+	+	+	+	+	+ (*LBS)	-	+
Facial nucleus	+	++	+	-	-	-	-	-
Pontine nucleus	-	+	+	-	-	-	-	-
Locus ceruleus	++	+ (*LBS)	-	-	-	+ (*LBS)	-	++
Hypoglossal nucleus	+	+	-	-	-	-	-	-
Dorsal vagal nucleus	+	++ (*LBS)	-	-	-	++ (*LBS)	-	+++
Ambiguous nucleus	-	-	-	-	-	-	-	-
Medullary reticular formation	-	+	+	+	+	+ (*LBS)	-	++
Inferior olivary nucleus	-	+	+	+	+	-	-	-
Cerebellum								
Cerebellar cortex	-	-	-	-	-	-	-	-
Dentate nucleus	-	+	-	-	-	-	-	-
Spinal cord								
Cervical anterior horn	+++	++	+	-	-	-	-	-
Lumbar anterior horn	++	++	+	-	-	-	-	-
Intermediate lateral nucleus	-	+	+	-	-	-	-	+
Clarke nucleus	-	-	-	-	-	-	-	-

pTDP-43, phosphorylated TDP-43; pc-Syn, phosphorylated α -Synuclein; NCIs, neuronal cytoplasmic inclusions; GCI, glial cytoplasmic inclusions; LBS, Lewy bodies. *LBS, p62- or ubiquitin-positive NCIs were mostly Lewy bodies.

表 1 病理所見のまとめ

脳幹の下位運動神経核および脊髄前角に、比較的豊富に p62 単独陽性 NCIs、GCI を認めた。

C. SQSTM1 遺伝子解析

本例は p62 に関連した特異な ALS 病理像を呈したことから、SQSTM1 遺伝子を検索したところ、p.Val90Met (エクソン 2)、p.Val153Ile (エクソン 3) の二つの変異が同定され(図 2a, b)、これらは対立アレル上に存在していた(複合ヘテロ接合性変異)。p.Val153Ile は、Fecto らが ALS で既に報告している (Arch Neurol 68: 1440-1446)。これらの変異は In-house の正常対照 189 人には検出されなかった。p.Val90Met は最近公開された日本人の遺伝子変異データベース (Human Genetic Variation) には登録があり(ヘテロ接合性変異の頻度 5 人/727 人)、また p.Val153Ile は海外のデータベース (NHLBI-ESP) に登録されていた(同頻度 9 人/6497 人)。遺伝学的にコドン 90 および 153 のメチオニンは様々な種で比較的よく保存され

ていた(図 2c, d)。Polyphen2 では、p.Val90Met は possibly damaging、p.Val153Ile は benign という結果であった。

また本例には、*TDP-43*、*CHMP2B*、*VCP*、*C9orf72* 遺伝子に変異は認められなかった。

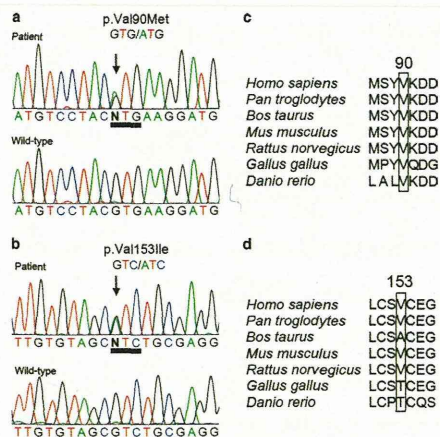


図 2 *SQSTM1* 遺伝子解析

p.Val90Met (a)と p.Val153Ile (b)は対立アレルのエクソン 2、エクソン 3 上に存在する。コドン 90 と 153 のメチオニンは様々な種で比較的良好に保存されている(c, d)。

D. 考察

SQSTM1 遺伝子は p62 をコードし、骨ページェット病の原因遺伝子として知られている。近年 ALS 患者に *SQSTM1* 遺伝子のヘテロ接合性変異が見いだされ、注目を集めている (Fecto et al, Arch Neurol 68: 1440-1446, 2011)。これまで ALS では約 30 の変異が見いだされ、それらはエクソン 1-8 に存在し、c. 1165+1G>A (A390X) 以外は全てミスセンス変異である。さらに ALS と骨ページェット病を合併した変異例の報告もある (Teyssou E et al, Acta Neuropathol 125: 511-522, 2013 (c. 1165+1G>A, p. Pro392Leu); Kwok CT et al, Eur J Hum Genet, Aug 14, 2013 (p. Pro392Leu))。しかしながら家族例の報告が乏しく、また家系内での変異と ALS の co-segregation も十分明らかにされていない。さらにいくつかの変異は、大規模な公式データベース上でも登録がある (p. Pro392Leu では、ヘテロ接合性変異の保有頻度は 22 人/5999 人 (NHLBI-ESP))。このように現段階では、ヘテロ接合性変異が ALS の発症そのものに

どのような影響を与えるかについては、未だ十分明らかにされていない状況であると考えられる。

SQSTM1 遺伝子にヘテロ接合性変異を持つ ALS の病理像については、Teyssou E らが報告し (Acta Neuropathol 125: 511-522, 2013)、家族例 1 例 (c. 1165+1G>A) および孤発例 2 例 (p. Met87Val、p. Lys102Glu) において、ブニナ小体や TDP-43 陽性 NCI の出現を含め、通常の孤発性 ALS と区別がつかなかったとしている。他方、複合ヘテロ接合性変異を持つ自験例では、下位運動神経系においてブニナ小体や TDP-43 陽性 NCI を欠き、かつ p62 単独陽性 NCI の出現を認めるなど、特異な病理像が認められた。本例では *SQSTM1* 遺伝子変異の複合ヘテロ接合体であることにより、p62 に関連した特異な病理像が出現した可能性が考えられた。なお、Mori らは通常の孤発性 ALS の下位運動神経細胞において、ブニナ小体と TDP-43 陽性 NCI の出現には密接な関連があることを報告している (Neuropathol Appl Neurobiol 36: 345-352, 2010)。本例においてブニナ小体を欠くことは、TDP-43 陽性構造を認めないことと矛盾がないように思われた。

一方本例では、運動野皮質を含め、下位運動神経系以外の領域には少数ながら TDP-43 陽性 NCI、GCI の出現を認めた。p62 はユビキチン・プロテアソーム系ないしはオートファジーによる蛋白分解に関与し、断片化 TDP-43 の分解に寄与することが報告されている (Tanji K et al, J Neurosci Res 90: 2034-2042, 2012)。本例では *SQSTM1* 遺伝子変異により、p62 による断片化 TDP-43 の分解機構が障害され、TDP-43 の蓄積を引き起こした可能性があるが、この解釈は、TDP-43 の沈着がない下位運動神経系にはあてはまらない。TDP-43 と p62 の蓄積様式の違いを説明することは困難であるが、本例と同様の病理所見が *SQSTM1* 遺伝子変異の複合ヘテロないしホモ接合体例において再現されるかを待ちたい。

Fecto らは、*SQSTM1* 遺伝子にヘテロ接合性変異をもつ ALS の 14 例中 2 例でパーキンソニズムを認めたと報告している (Arch Neurol 68: 1440-1446, 2011)。また、前述のヘテロ接合体剖検例では、3 例いずれにも黒質の変性が認められたが、レビー小体はなかったと記載されている

(Teyssou E et al, Acta Neuropathologica 125: 511-522, 2013)。現時点では、自験例でのレヴィー小体病の合併は偶発的であると考えられる。

E. 結論

孤発性、高齢発症 ALS 一部検例の下位運動神経細胞に p62 陽性/TDP-43 陰性の特異な NCI の出現を認め、その *SQSTM1* 遺伝子に p. [Val90Met];[Val153Ile] の複合ヘテロ接合性変異が同定された。ALS における *SQSTM1* 遺伝子変異の病的意義を明らかにするために、さらなる複合ヘテロおよびホモ接合性変異例の臨床病理学的集積が望まれる。

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 の一部検例. 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

約 30 年意思伝達可能であった呼吸器装着した孤発性筋萎縮性側索硬化症 (sALS) : 変性が運動ニューロンにほぼ限定され、運動ニューロンに封入体がない 3 剖検例

研究分担者 清水俊夫²⁾,

研究協力者 望月葉子¹⁾⁶⁾, 林 健太郎²⁾, 中山優季³⁾, 上出正之⁴⁾, 荻野美恵子⁵⁾,
小森隆司¹⁾, 磯崎英治²⁾, 中野今治²⁾

東京都立神経病院 1) 検査科, 2) 脳神経内科, 3) 東京都医学総合研究所難病ケア看護研究室,
4) 厚木市立病院救急部, 5) 北里大学医学部神経内科学, 6) 東京都立北療育医療センター神経内科

研究要旨

約 30 年間文章にて意思伝達可能な意思伝達能力 stage I であった気管切開・人工呼吸器 (TPPV) 下の孤発性筋萎縮性側索硬化症 (sALS) 3 例の臨床病理像を検討した。全例手の脱力で発症した男性である。運動障害の進行は緩徐で、TPPV 導入は発症から 6 年～14 年、眼球運動は保たれていた。神経病理学的には上位・下位運動ニューロン系にほぼ限局した変性で、脊髄前角には比較的形態学的に保たれた神経細胞も残存してアストログリアの反応が乏しく、進行の緩徐さに対応した像であった。大脳皮質ニューロンの TDP-43 陽性封入体は 1 例でのみごく少数観察された。しかし、TDP-43 陽性封入体、プニナ小体は運動ニューロンに欠如していた。典型的な sALS とは異なる ALS の一群が存在する可能性がある。

A. 研究目的

れわれは、気管切開・人工呼吸器 (TPPV) 導入を早期に要した ALS 例は重症化が早く、全随意運動が消失して現在の補助手段では意思伝達不能である意思伝達能力 stage V (表 1) (totally locked-in state)まで進行する可能性が高い事を報告した。そして、stage V の症例は病理学的に運動ニューロンの高度変性に加えて脳幹被蓋の高度萎縮と多系統変性を呈する事を示した。

本年度は、TPPV を導入して長期間、文章にて意思表出が可能な stage I に止まる sALS 例の特徴を明らかにする。

B. 研究方法

約30年間意思伝達能力stage IであったTPPV下のsALS 3例の臨床病理像を検討した。

表1. 意思伝達能力Stage

Stage	
I	文章にて意思表出が可能
II	単語のみ表出可能
III	yes/noのみ表出可能
IV	残存する随意運動はあるがyes/noの確認が困難なことがある
V	全随意運動が消失して意思伝達不能な状態

[林 健太郎ほか, 臨床神経 2013;53:98]

C. 研究結果

1) 臨床経過

症例1: 48歳時に右手脱力で発症した男性。四肢腱反射が亢進し、8ヶ月で歩行障害と構音障害が出現した。8年で気管切開して経管栄養

となった。人工呼吸器を13年後に夜間のみ、25年後に終日装着。26年目に完全四肢麻痺になったが、眼球運動障害はなかった。悪性腫瘍のため28年で死亡。

症例2：55歳時に右手脱力で発症し、左手脱力と構音障害も生じた男性。5年後に嚥下障害、10年後に痙縮による歩行障害が出現し、14年後にTPPVを導入された。15年後頃から頭部CTにて前頭側頭葉萎縮の進行が認められた。28年後から時に一過性のせん妄状態を呈した。上肢は完全麻痺だが、膝をわずかに屈曲可能であった。また、垂直方向に軽度眼球運動制限があったが、新聞を読めた。29年目に突然死。

症例3：31歳時に右上肢脱力で発症した男性。6年でTPPVを導入され、経管栄養開始。21年後に完全四肢麻痺になった後に安定し、眼球運動障害は出現しなかった。33年後に急性循環不全で死亡。

2) 神経病理学所見

脳重は、症例1 1190 g, 症例2 1030 g, 症例3 1290g。症例2の前頭葉が軽度萎縮していたが明らかな神経細胞脱落はなく、白質にもグリオシスはみられなかった。3例とも上位・下位運動ニューロン系にほぼ限局した変性で、線条体、淡蒼球、視床、扁桃核、海馬に著変なかった。脳幹の萎縮は軽度で内部の構造は良く保たれていた。脊髄前角の神経細胞脱落は、症例1と2は中等度、症例3では高度であったが、いずれの症例でも比較形態学的に保たれた神経細胞も少数残存していた。また、アストログリアの反応が乏しく、マクローファージの出現はなく、進行の緩徐さに対応した像であった。

脊髄ではTDP-43神経細胞質内封入体 (NCI)、ブニナ小体は運動ニューロンを含めていずれの細胞にも観察されなかった。大脳皮質ニューロンのTDP-43陽性NCIは症例1, 2では見られず、症例3でのみごく少数側頭極で観察された。さらに、症例3ではTDP-43陽性NCIが歯状回顆粒細胞、延髄網様体、下オリーブ核でも少数見られた。

なお、FUS陽性NCI, SOD1陽性NCIも見られなかった。

D. 考察

3例とも症状進行が緩徐で、発症からTPPV導入まで長期間であった。症例1と2は最期まで緩徐進行性経過だが、症例3は途中で進行が止まった様に見えた。いずれの症例も眼球運動が保たれていた事で、意思伝達が可能であった。神経病理学的変化は、臨床像を反映して、運動ニューロンにほぼ限定されており、比較的形態が保たれた神経細胞の残存と乏しいアストログリアの反応が目についた。

sALSはTDP-43 proteinopathyとして捉えられており、TDP-43 aggregatesの出現が特徴である。しかし、TDP-43陽性NCI, ブニナ小体は運動ニューロンに認められなかった。これらの封入体の数が非常に少ないために観察できなかった可能性は否定できないが、封入体を形成した神経細胞が脱落し、形成しなかった細胞のみが残存している可能性、または、封入体形成とは異なる機序による神経細胞脱落の可能性が考えられた。

E. 結論

進行が非常に緩徐で、運動ニューロン系の変性にほぼ限定され、典型的なsALSとは異なるALSの一群が存在する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
現在投稿中

2. 学会発表

望月葉子, 清水俊夫, 水谷俊雄. 当院最長罹病期間でも病理学的変化が軽度な筋萎縮性

側索硬化症. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2010 (4) 東京.

望月葉子、林健太郎、中山優季、清水俊夫、長尾雅裕、小森隆司、松原四郎、水谷俊雄. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における意思伝達障害に及ぼす病理学的特徴. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012(5) 東京.

林 健太郎, 望月葉子, 中山優季, 上出正之, 小森隆司, 松原四郎. 経過 5 年で呼吸器装着し、全経過 33 年の意思伝達が良好に保たれた筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の 1 剖検例. 第 54 回 日本神経病理学会総会学術研究会, 2013 (4) 東京.

望月葉子, 林 健太郎, 中山優季, 清水俊夫, 上出正之, 小森隆司, 松原四郎, 水谷俊雄.

約 30 年意思伝達可能であった呼吸器装着した孤発性筋萎縮性側索硬化症 2 例の臨床病理. 第 54 回 日本神経学会学術大会, 2013 (5) 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。

ALS の進行を規定する因子の探索同定 - JaCALS の解析から -

研究分担者 祖父江 元¹⁾

研究協力者 熱田直樹¹⁾、中村亮一¹⁾、渡辺はづき¹⁾、渡辺宏久¹⁾、伊藤瑞規¹⁾、千田譲¹⁾、
平川晃弘²⁾、中柄昌弘²⁾、飯田有俊³⁾、池川志郎³⁾、JaCALS

1) 名古屋大学神経内科 2) 名古屋大学先端医療・臨床研究支援センター
3) 理化学研究所ゲノム医科学研究センター

研究要旨

多施設 ALS 患者前向きコホートである JaCALS で集積された経時的臨床情報およびゲノム遺伝子を用いて、ALS 患者の進行パターンを類型化し、それに関連する遺伝子多型の網羅的探索を行った。その結果、p 値 10^{-8} 台で急速進行型と関連する一塩基多型 (SNPs) を複数見出し、それらが連鎖不平衡状態にあることを確認した。進行と関連する遺伝的素因の同定は病態抑止治療の分子標的の同定などを通して、創薬に寄与できる可能性がある。

A. 背景・研究目的

多施設共同の ALS 患者経時的臨床情報収集、ゲノム遺伝子収集システムである Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) は、本研究班をベースに構築され、ALS 患者の登録、遺伝子検体蓄積を行ってきた。現在全国 30 施設が参加し、2013 年 11 月現在で、882 例の ALS 患者前向き臨床情報が収集、蓄積され、合わせてゲノム遺伝子が蓄積されている。名古屋大学神経内科が事務局を担当している。

孤発性 ALS の病態には多くの遺伝子が関与していることが想定されるが、遺伝子多型情報と JaCALS において蓄積された多彩な前向き臨床情報との関連を解析、検証することにより、ALS の進行や予後に結びつく遺伝子を抽出し、関連する分子の同定につなげられる可能性がある。このような検討は既に癌で大きな成果を挙げており、特定の遺伝子多型が個々の癌の予後推定や治療にきわめて重要になってきている。またこれらを通して病態解明の糸口にもなっている。ALS を

はじめとする神経変性疾患でも癌と同様に予後や病像に影響する遺伝子多型が存在することが予想される。

本研究は前向き臨床像として蓄積された ALS 臨床データを用い、ALS 患者の多彩な臨床像と遺伝子多型との関連を解析し、進行や予後に関わる病態関連遺伝子を探索することを目的とする。ALS の進行に関連する因子が同定できれば、治療法開発の重要な手がかりとなる可能性がある。

B. 研究方法

臨床情報および、遺伝子検体はすべて文書でのインフォームドコンセントを得て登録、保存した。臨床調査票および血液検体はすべて登録施設内で連結可能匿名化を行い、名古屋大学内に設置した臨床データベースおよびゲノム遺伝子保存センターに保管する体制とした。日常生活活動度 (ADL) の評価は日本版 ALSFRS-R を用いた。経管栄養導入や呼吸器装着などの病気の進行を示す重要なイベントおよび ALSFRS-R について、3 ヶ月に一度、臨床研究コーディネーター (CRC)

から患者もしくは主介護者に対して電話インタビューによる調査を行った。登録した施設での診療が継続されている患者については、医師による臨床評価を一年に一回実施するものとした。CRCには、研究の概要、関連する倫理指針、研究実施手順、既知のALS臨床像、患者および介護者に対して行うべき配慮等に関する研修を実施した。プライマリーエンドポイントを死亡もしくは気管切開を伴う人工換気(TPPV)導入と定義した。エンドポイントについて、電話調査または医師による評価で時期を定めた。

JaCALSにおいて蓄積された遺伝子リソースについて、全ゲノム網羅的な遺伝子多型タイピングを行った。SNPアレイは、70万SNPs+25万exome chipを搭載したIllumina社製HumanOmniExpressExome BeadChipを使用した。

2006年2月から2012年10月までにJaCALSに登録され、孤発性で、改訂El Escorial診断基準でpossible以上、登録時呼吸器未装着であり、発症から5年までのALSFRS-R推移データが得られているALS患者465例を対象とした。混合分布モデルを用いた解析により、ALSFRS-Rの経時的変化パターンを分類を行い、得られた分類と発症年齢、性別、発症部位および遺伝子多型との関連解析を行った。遺伝子多型関与のモデルとして、Dominant model: メジャーアレルホモの例に対するマイナーアレル保有例のオッズ比、Recessive model: メジャーアレル保有例に対するマイナーアレルホモ例のオッズ比、Additive model: マイナーアレルが一つ増えることに対するオッズ比、以上の3パターンを用いた。(倫理面への配慮)

ALS患者コホートの構築、網羅的ゲノム解析については、研究に参加するすべての施設で倫理委員会承認を得た。研究対象者には倫理委員会にて承認された説明書・同意書を用いて十分な説明を行い、文書同意を得て参加いただいた。検体・資料を分析する際には、氏名・住所・生年月日などの個人情報を取り除き、匿名符号をつけ、連結可能匿名化して厳重に管理した。

C.研究結果

混合分布モデルにより、ALSFRS-Rの経時的変化は急速進行型、シグモイド型、単調減少型、緩徐型の4型に分類された。

図1. 経過・進行の類型化

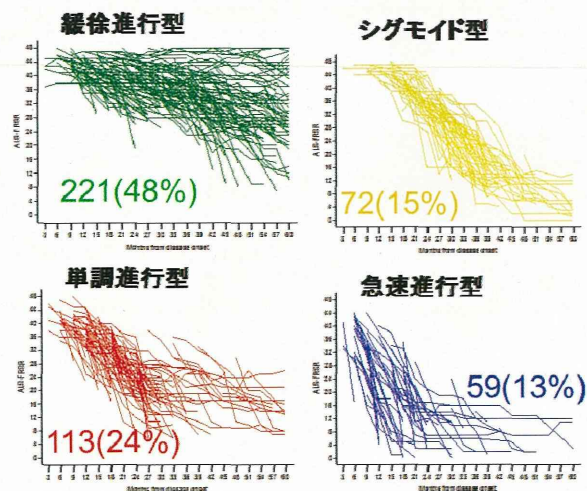


図1に発症からのALSFRS-R値推移を4型に分類した図を示す。

これら4つの類型と関連する臨床的因子を表1に示すが、有意なものを認めなかった。

表1 類型と臨床的因子との比較

変数	急速進行型		単調進行型		シグモイド型		緩徐進行型		P
	N	%	N	%	N	%	N	%	
発症65歳以上	28	47.5	54	47.8	23	31.9	82	37.1	0.075
男性(vs女性)	26	44.1	69	61.1	45	62.5	129	58.4	0.125
上肢発症	27	45.8	48	42.5	29	40.3	109	49.3	0.477
下肢発症	20	33.9	41	36.3	25	34.7	53	24	0.068
頸部発症	1	1.7	3	2.7	1	1.4	7	3.2	0.826
球麻痺発症	14	23.7	26	23	19	26.4	53	24	0.963
リルゾールあり	37	62.7	66	58.4	50	69.4	120	54.3	0.133

類型と遺伝子多型との関連解析においては、急速進行型と関連するSNPsがRecessive modelにおいて見出され、そのうち7つがp値 10^{-8} 台であった。そのManhattan plotを図2に示す。また、図3に示すHaplotype解析でこれらのSNPsは強い連鎖不平衡状態にあることが示された。

図2 Manhattan plot (急速進行型と関連)
(Recessive model)

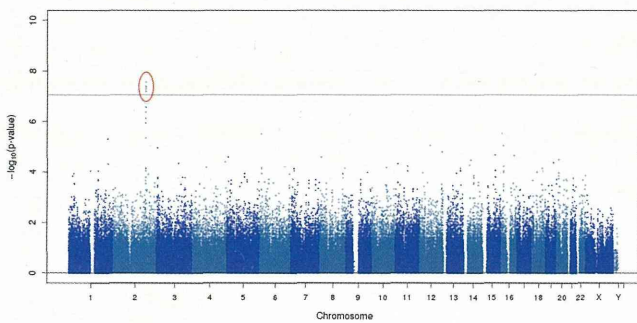
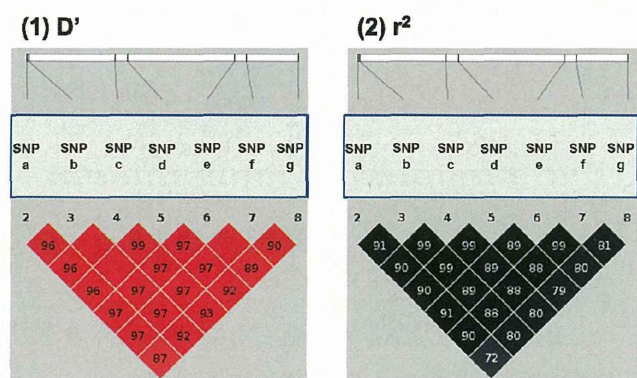


図3 Haplotype 解析



これらの解析結果から、7つのSNPsが含まれる連鎖不平衡ブロック内もしくは近傍に、ALSが急速進行型になる素因が存在する可能性が強く示される。

D. 考察

孤発性 ALS の病態関連分子探索において、これまで ALS 患者群と正常コントロール群とのゲノムワイド関連解析が行われており、ALS と有意な関連を示す遺伝子多型が複数報告されてきている。しかしこれまでに報告された遺伝子多型は ALS の発症にオッズ比 1.3 程度の影響を示すものであり、ALS 治療介入法開発の手がかりとなるような画期的成果はまだ得られていない。本研究では多彩な前向きに蓄積された ALS 患者臨床像を基に解析を行った点が特徴である。

非常に多彩な ALS 患者の進行を左右する遺伝的因子の同定を行うことで、病態抑止治療法開発のための分子標的を見出せる可能性がある。また、ALS を初めとする神経変性疾患の進行抑制に対する治験においては、自然歴の多彩さから β エラ

一、すなわち本来有効な薬剤の効果を検出できない可能性があることが課題の一つとされてきた。進行を左右する遺伝的因子は治験の割り付け因子として活用するなど、治験デザインの改善に寄与できる可能性がある。

進行を左右する遺伝子多型は創薬に対して直接の寄与が期待できるものであり、今回の解析で有意なレベルのSNPsが存在することを示せた意義は大きいと考えられる。

E. 結論

数十万個の遺伝子多型を解析するゲノムワイド関連解析の場合、有意であることを示すためには 10^{-8} 台以下の p 値が必要とされるのが一般的である。その水準を満たし、ALS の進行に関連する遺伝子多型が存在することを示した。大規模 ALS 患者前向きコホートと蓄積された遺伝子を基に、病因 (発症) に関わる遺伝子のみならず、病態 (経過、予後、病型など) に関わる遺伝子の探索が可能である。これらは孤発性 ALS 病態解明の重要な糸口になりえると同時に、創薬に向けた分子標的となりえる。

F. 健康危険情報

特記なし。

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. 2013;84:1365-71.

2.学会発表

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H et al.
Neck weakness is a potent prognostic factor in
sporadic amyotrophic lateral sclerosis. 24th
International Symposium on ALS/MND,
December, 2013, Milan, Italy

中村亮一、熱田直樹、渡辺はづき、ほか. 頸部屈
筋の筋力低下は ALS における独立した予後予測
指標である. 第54回日本神経学会学術大会, 東京,
2013. 5.

渡辺はづき、熱田直樹、中村亮一、ほか. ALS 患
者の症状進行パターン: 多施設共同 ALS コホー
トの解析から. 第54回日本神経学会学術大会, 東
京, 2013. 5.

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

特記なし。

日本人家族性 ALS における FUS/TLS 遺伝子変異の重要性について

研究分担者 青木正志¹⁾

研究協力者 加藤昌昭¹⁾、割田 仁¹⁾、井泉瑠美子¹⁾、西山亜由美¹⁾、島倉奈緒子¹⁾、安藤里紗¹⁾

1) 東北大学大学院 医学系研究科 神経・感覚器病態学講座 神経内科学分野

研究要旨

〔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を侵す神経変性疾患であり、その一部の原因として遺伝子異常が報告されている。これまで当科では家族性 ALS 患者の遺伝子検査を行ってきた。Fused in sarcoma/translated in liposarcoma (FUS/TLS)遺伝子変異を伴う家族性 ALS は Superoxide dismutase 1 (SOD1)に次いで頻度が高く、ALS の病態解明に重要な遺伝子である。今回我々は、FUS/TLS 遺伝子変異を認めた家族性 ALS の変異と家系内の臨床型について検討した。

〔方法〕常染色体優性遺伝の遺伝形式が疑われる家族性 ALS115 家系において SOD1、FUS/TLS、TDP-43、VCP、C9ORF72、PFN1、C9ORF7 について遺伝子解析を行った。その中で FUS/TLS 遺伝子に変異を認めた患者についてその変異と家系内の臨床型を検討した。

〔結果および考察〕全 115 家系の遺伝子検査の結果、9 家系に 8 種類の FUS/TLS 遺伝子変異が認められた。発症年齢は平均 39 歳と若年発症で、進行が早く、上肢～頸部からの発症が多く、下位運動ニューロン優位な傾向があった。60 代以降に下肢から発症し、緩徐進行な変異や、浸透率の低い変異もあり、遺伝子変異により症状の違いがあることが示唆された。

〔結論〕FUS/TLS 遺伝子変異を伴う家族性 ALS は若年発症、下位運動ニューロン優位な臨床形が多く、変異と表現形が関連している。

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を侵す神経変性疾患であり、その一部の原因として遺伝子異常が報告されている。これまで当科では家族性 ALS 患者の遺伝子検査を行ってきた。Fused in sarcoma/translated in liposarcoma (FUS/TLS)遺伝子変異を伴う家族性 ALS は Superoxide dismutase 1 (SOD1)に次いで頻度が高く、ALS の病態解明に重要な遺伝子である。今回我々は、FUS/TLS 遺伝子変異を認めた家族性 ALS の変異と家系内の臨床型について検討した。

B.研究方法

当科で収集した常染色体優性遺伝の遺伝形式が疑われる家族性 ALS115 家系で遺伝子解析を行った。SOD1、FUS/TLS、TDP-43、VCP、C9ORF72、PFN1 について直接シーケンス (C9ORF72 は repeat-primed PCR) を行い変異の有無を検討した。その中で FUS/TLS 遺伝子に変異を認めた患者についてその変異と家系内の臨床型を検討した。

(倫理面への配慮)

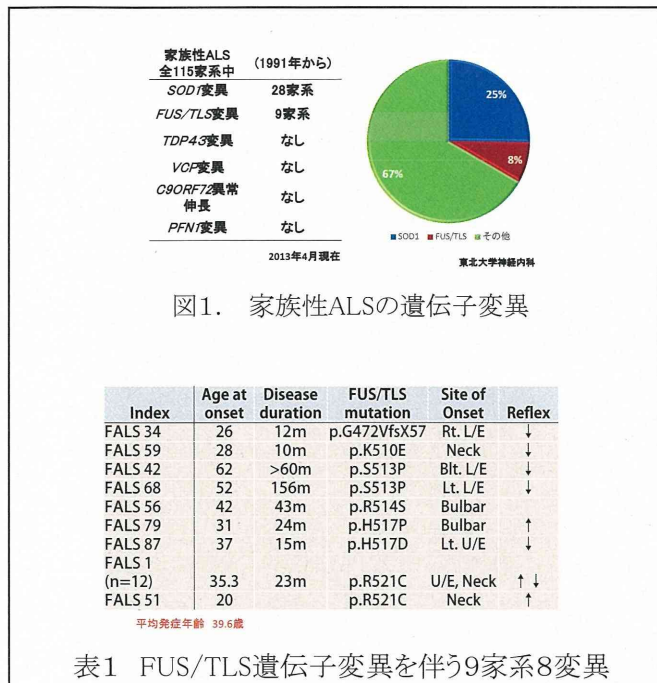
すべての遺伝子操作は東北大学 DNA 組換え実験指針に従い、個人を同定できない形で発表し、個人情報には鍵のかかる戸棚に保管、DNA は連結可

能匿名化で保存している。東北大学倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

全 115 家系の遺伝子検査の結果、9 家系 (8%) に 8 種類の FUS/TLS 遺伝子変異が認められた。

(図 1)



発症年齢は平均 39 歳と若年発症で、進行が早く、上肢～頸部からの発症が多く、下位運動ニューロン優位な傾向があった。

特に核移行シグナル部位に変異をもつ K510E, R514S, H517D/P, R521C の 5 つの変異は似た臨床型を呈した。海外の報告例でもこれらの変異をもつ家系の症状は同様であった。

しかし、核移行シグナル分子との接合部から離れた部位にある遺伝子変異を認めた S513P 変異は 60 代以降での発症、下肢からの発症、進行も緩徐といった経過を示した。

また、核以降シグナルよりも上流に位置し、フレームシフトを起こす変異である G472VfsX57 の家系では、小児期から症状を認め、数十年の経過を示す非常にゆっくりとした経過を示す例や、ある時点から急速に進行したような経過を示す

例があり、他の FUS/TLS 遺伝子変異を認める家系とは全く異なる経過を示していた。

D. 考察

FUS/TLS 変異を認める家族性 ALS の多くが核移行シグナル部位に変異を持ち、①若年発症、②急速な経過、③上肢～球症状からの発症、④下位運動ニューロン障害優位、を呈する。

変異の部位が核移行シグナルと関連する部位とは異なる部分にある遺伝子変異では、症状は異なっていた。また、遺伝子のより上位でフレームシフトやストップコドンを起こす変異では更に特異な臨床型を呈する場合があることがわかった。核内への移行障害と機能消失が病態と関連することを示唆するのかもしれない。

E. 結論

FUS/TLS 遺伝子変異を伴う家族性 ALS は若年発症、下位運動ニューロン優位な臨床形が多く、変異と表現形が関連している。

F. 健康危険情報

特記事項なし

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

Tanaka H, Shimazawa M, ..Aoki M, et al., ITIH4 and Gpx3 are potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis, J Neurol, (2013) 260: 1782-97

2. 学会発表

加藤昌昭、割田 仁、鈴木直輝、井泉瑠美子、島倉奈緒子、安藤理沙、青木正志

東北大学における家族性 ALS 遺伝子検査の検討第 53 回日本神経学会総会 2012 年 5 月 29 日～6 月 1 日 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

筋萎縮性側索硬化症の新規病因遺伝子 *ERBB4* (ALS19) の同定

研究分担者 ¹⁾辻 省次、
研究協力者 ²⁾高橋 祐二、¹⁾石浦 浩之、¹⁾三井 純、¹⁾後藤 順

1) 東京大学神経内科 2) 国立精神・神経医療研究センター・病院・神経内科

研究要旨

目的：FALS の新規原因遺伝子を同定する。

対象と方法：既知の病因遺伝子未同定の、常染色体優性遺伝性 FALS の一家系において、不完全浸透を考慮に入れた連鎖解析により、病因遺伝子の候補領域を同定した。発端者、同胞発症者、非発症の親に対して、全ゲノム配列解析を施行した。公的データベース及び、In house のデータベースに存在する塩基置換を除外し、病因遺伝子候補を同定した。得られた候補遺伝子に対して、FALS 364 例、SALS 818 例の変異解析を施行した。同定された塩基置換については、培養細胞(COS-7 細胞)を用いた発現実験による機能解析を施行した。

結果：全ゲノム配列解析及び連鎖解析により、*ERBB4* c.2780G>A (p. Arg927Gln) を同定した。FALS 364 例、SALS 818 例の変異解析により、カナダ人家系で同一変異を、また日本人孤発例で *de novo* 変異 c. 3823C>T (p. Arg1275Trp) を同定した。COS-7 を用いた発現実験により、NRG-1 による ErbB4 の自己リン酸化が、変異特異的に低下していることが判明した。

結論：*ERBB4* は FALS の病因遺伝子である (ALS19 と命名)。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、5-10%が家族性 ALS (FALS)、90-95%が孤発性 ALS (SALS) といわれており、FALS の 30-40%は依然病因遺伝子未同定の家系である。FALS の病因遺伝子同定が進まない理由として、発症年齢が高齢かつ進行が急速なことから、連鎖解析による候補領域の絞り込みを可能にするような、複数世代にわたる大家系を得ることが困難なこと、遺伝的異質性が高く、複数家系における変異の同定が困難なことがあげられる。これらの問題点を解決するためには、1. 次世代シーケンサーとゲノムインフォマティクスによる大規模ゲノム解析 2. 国内外の大規模多施設共同研究 を推進していくことが必要である。このような背景のもと、本研究では FALS の新規病因遺伝子を同定することを目的に

B. 研究方法

既知の病因遺伝子未同定の、高齢発症の常染色体優性遺伝性 FALS の一家系において、常染色体優性遺伝形式を仮定し、不完全浸透を考慮に入れた連鎖解析により、病因遺伝子の候補領域を同定した。発端者、同胞発症者、非発症者の親に対して、Illumina GA IIx を用いた全ゲノム配列解析を施行した。得られた塩基置換のリストから、dbSNP135、1000 Genomes、NHLBI-ESP などの公的データベース及び、in house の全ゲノム及びエクソームデータベースに存在する塩基置換を除外した。候補領域に存在する非同義塩基置換について、日本人正常対象 441 例でスクリーニングし、疾患特異的な変異を有する遺伝子を同定した。得られた候補遺伝子に対して、国内外の多施設共同研究により、FALS 364 例、SALS 818 例

の変異解析を施行した。同定された塩基置換については、培養細胞(COS-7細胞)を用いた発現実験による機能解析を施行した。

(倫理面への配慮)

書面によるインフォームドコンセントを得て、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、所属機関の研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C.研究結果

連鎖解析及び全ゲノム配列解析により、病原性変異の可能性が高いものとして *ERBB4* c.2780G>A (p. Arg927Gln)を同定した。FALS 364例、SALS818例の変異スクリーニングにより、カナダ人家系で同一変異を、また日本人孤発例で *de novo* 変異 c. 3823C>T (p. Arg1275Trp)を同定した。孤発例においては、本人および両親の SNP genotyping により家族関係を確認した。ハプロタイプ解析により、c. 2780G>A 変異は日本人家系とカナダ人家系で独立に生じていることを確認した。変異が認められたアミノ酸は、種を越えて保存されており、PolyPhen-2 を用いたアミノ酸置換の影響予測では Probably damaging と判定された。ErbB4 は受容体チロシンキナーゼであり、Neuregulin (NRG) の結合により二量体化して自己リン酸化され、下流のシグナルを活性化する。COS-7 を用いた発現実験により、NRG-1 による ErbB4 の自己リン酸化が、変異特異的に低下していることが判明した。

D.考察

これまでの研究で、ErbB4 は運動神経細胞の生存に深く関わっていることが明らかになっている。*ErbB4* のホモ接合性ノックアウト(KO)マウスは胎生致死であるが、運動神経の軸索伸長に異常をきたし、ヘテロ接合性 KO マウスは軽度ではあるが運動機能異常を来すことから、ErbB4 の機能低下が ALS19 における運動神経細胞死を引き起こすと考えられる。これらの結果は、NRG 等に

よる ErbB4 の刺激が ALS の治療につながる可能性を示唆する。

E.結論

ERBB4 は FALS の病因遺伝子である (ALS19 と命名: MIM 615515)。

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

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;93(5):900-905.

2.学会発表

なし

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許出願

P13-0067 筋萎縮性側索硬化症の新規病因遺伝子

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし