

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

近年我々が報告した Asidan は、脊髄小脳変性症様の小脳障害に加え、ALS に類似した運動ニューロン障害を呈する新たなタイプの遺伝性神経変性疾患であり、その原因が 20 番染色体の NOP56 遺伝子内の GGCCTG リピート延長であることを既に報告している。

Asidan 患者では舌萎縮が高度に認めるのにも関わらず、嚥下障害が比較的軽度であることが分かってきたため、嚥下造影、舌圧測定、インピーダンス咽頭図を用いて嚥下機能を評価した。嚥下運動全般を評価する嚥下造影検査では Asidan 患者では嚥下障害の頻度が比較的少なく、口腔期を選択的に評価できる舌圧測定では、ALS と SBMA は舌圧低下を認めた一方 Asidan 患者では有意な低下は認めなかった。以上のことから Asidan 患者では舌萎縮はあるものの舌圧低下は軽度であり、このことが嚥下機能が低下しない大きな原因と考えられた。

また NOP56 は、TDP43 や FUS などと同様 RNA プロセッシングに関与していることが知られているため、ALS モデルマウス脊髄運動ニューロンにおける NOP56 蛋白の発現を TDP43, FUS 蛋白と比較検討をした。結果としては TDP43, FUS はともに 18 週齢になってはじめて頸腰髄の残存運動ニューロンで有意な減少を認めたのに対し、NOP56 は発病早期 14 週齢の時点から、明らかな蛋白発現の減少を認めた。以上のことから NOP56 が ALS 病態になんらかの関与していることが示唆された。

研究分担者：阿部 康二

研究機関名：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
脳神経内科学

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は選択的運動ニューロン変性により四肢筋力低下、球麻痺、呼吸筋麻痺を来し死に至る致死的な疾患である。一方、脊髄小脳変性症 (SCA) は小脳の神経細胞が変性・脱落することにより小脳失調を来す疾患の総称である。近年我々が報告した ALS/SCA crossroad mutation Asidan (SCA36)は、脊髄小脳変性症に特徴的な小脳障害に加え、病状の進展にともない筋萎縮性側索硬化症に類似した運動ニューロン障害を呈する新たなタイプの遺伝性神経変性疾患である。その原因は 20 番染色体上に存在する NOP56 遺伝子のイントロン上にある

GGCCTG の 6 塩基の繰り返し配列が数千個に増えていることであることが分かっている。

これまでの検討から、Asidan は罹病期間が長く、かつ舌萎縮が高度に認めるのにも関わらず、嚥下障害が比較的軽度であることが分かってきた。

そこで我々はその理由を明らかにするため、Asidan 患者と他運動ニューロン疾患患者における嚥下障害の比較検討を行った。

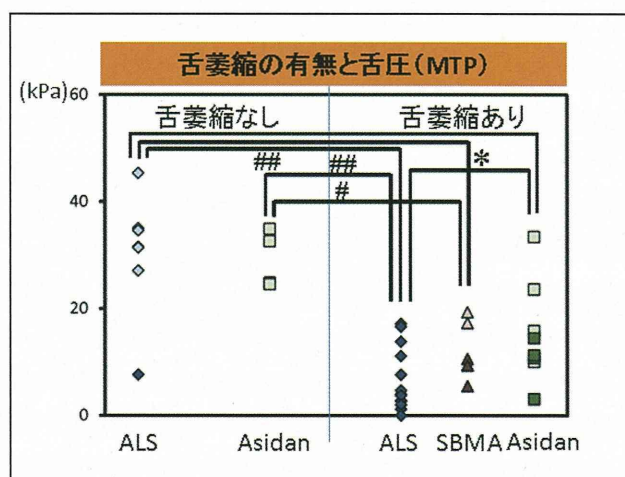


図1. デジタル舌圧計の評価結果

ALS 患者では健常者と比較して有意に舌圧の低下を認めた。一方、Asidan 患者では、舌萎縮がある患者でも舌圧低下は比較的軽度であった。

また NOP56 は、ALS の原因遺伝子として近年注目を集めている TDP43 や FUS などと同様に RNA プロセッシングと関与していることが知られている。そこで今回我々は ALS モデルマウスの

脊髄運動ニューロンにおける NOP56 蛋白の発現を詳細に検討したので併せて報告する。

B. 研究方法

2011 年 10 月から現在まで岡山大学病院および関連病院の外来を受診した筋萎縮性側索硬化症

(ALS) 患者 20 名、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) 患者 6 名、Asidan (SCA36) 患者 12 名を対象として調査を行った。また比較のために年齢を一致させた健常者 10 名についても検査を行った。評価は舌圧測定 (MTP)、嚥下造影 (VFS)、インピーダンス咽頭図 (IPG) を用いて各疾患での嚥下障害の特徴を分析した。

(倫理面への配慮)

本研究は岡山大学医学部倫理審査委員会の審査承認を受けた。

また NOP56 蛋白発現に関する実験には ALS のモデル動物である G93ASOD1 トランスジェニックマウスを用いた。10 週を運動障害発症前、14 週を発症初期、18 週を発症末期のモデルとし、コントロールとして野生型マウスを用いた。

各週齢での頸髄、腰髄、舌下神経核、大脳皮質、小脳皮質を免疫組織学的検討ならびウエスタンブロット法により NOP56 蛋白の発現を検討した (図 1)。(倫理面への配慮)

本研究は岡山大学動物実験委員会の審査承認を受けた。

C. 研究結果

<Asidan 患者の嚥下評価>

嚥下運動全般を評価する嚥下造影検査では ALS 70%、SBMA 50%、Asidan 33%と Asidan 患者では嚥下障害の頻度が少なかった。口腔期を選択的に評価できる舌圧測定では、ALS と SBMA で健常者群と比較し有意に低下していたが、Asidan 患者では有意な低下は認めなかった (図 1)。咽頭期を選択的に評価するインピーダンス咽頭図では ALS 患者は Iwp (咽頭期に要する時間) と Ns (1 回の嚥下で出現する波形の数) が延長している傾向があったが、SBMA では Iwp と Ns とともに健常者群に近いパターンであった。Asidan はその中間程度の変化を認めるのみであった (図 2)。咽頭期におけるインピーダンス変化率も

同時に評価を行ったが各疾患群間で特に明らかな差は認めなかった。

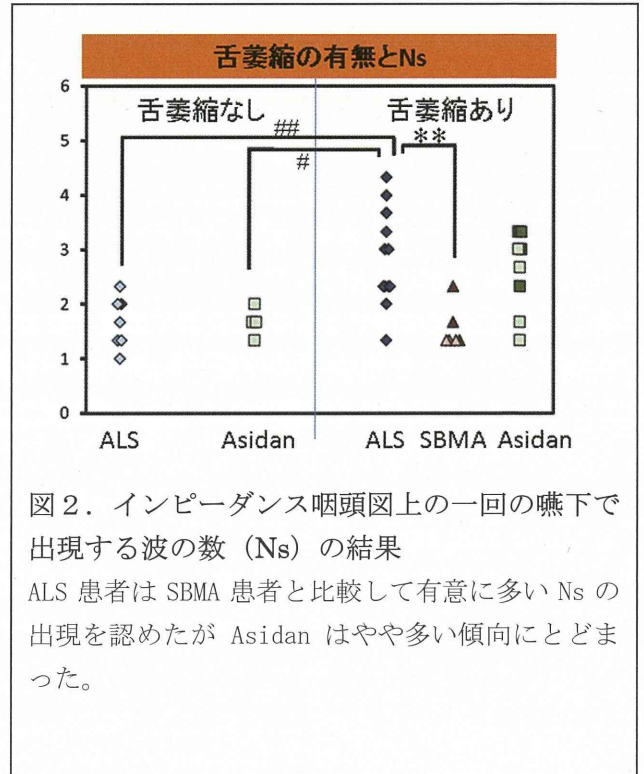


図 2. インピーダンス咽頭図上の一回の嚥下で出現する波の数 (Ns) の結果

ALS 患者は SBMA 患者と比較して有意に多い Ns の出現を認めたが Asidan はやや多い傾向にとどまった。

<NOP56 蛋白の発現変化>

TDP43 に対する免疫染色学的検討の結果、ALS モデルマウスの腰髄、頸髄では、発症後期の 18 週齢になってはじめて残存運動ニューロンあたりの TDP43 陽性率の減少を認めた。同様に FUS に対する免疫染色学的検討では、ALS モデルマウスの腰髄、頸髄で、発症後期 18 週齢で残存運動ニューロンあたりの FUS 陽性率の減少を認めた。

一方、NOP56 に対する免疫組織学的検討の結果では、ALS モデルマウスの頸腰髄では、発症初期 14 週齢で既に有意に残存運動ニューロンあたりの NOP56 陽性率の有意な減少を認めた。

ウエスタンブロット法を用いて、TDP43, FUS, NOP56 蛋白を検討したが、免疫染色の結果と同様の結果が確認された。

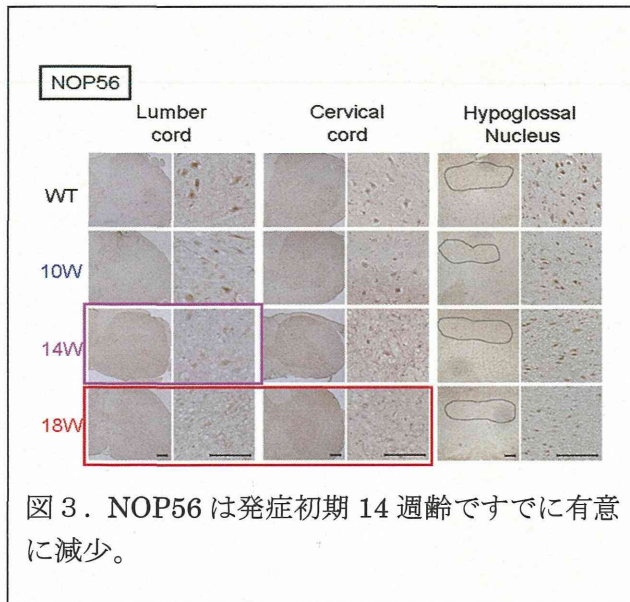


図 3. NOP56 は発症初期 14 週齢ですでに有意に減少。

D. 考察

Asidan 患者では舌圧の低下が軽度であり、このことが嚥下機能が低下しない大きな原因と考えられた。またこのことから同時に、舌で食塊をのどの奥に送り込む口腔期の一連の動きが、嚥下機能の中でも特に重要であることが示唆された。この口腔期嚥下機能を被爆なしで、簡便かつベッドサイドで調べることができる舌圧測定は臨床上非常に有用と考えられた。

また ALS における運動ニューロン変性に RNA 代謝異常が関わっていると推定されているが、今回 Asidan 関連遺伝子として新たに注目された NOP56 についても、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

Asidan 患者では舌萎縮を呈するものの、舌圧の低下は軽度にとどまり、長い罹病期間を経ても嚥下機能は比較的良く保たれる。

ALS マウス脊髄運動ニューロンにおいて、Asidan 関連遺伝子 NOP56 蛋白は発症初期から減少する。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morimoto N, Yamashita T, Sato K, Kurata T, Ikeda Y, Kusuhara T, Murata N, Abe K. Assessment of swallowing in motor neuron disease and

Asidan/SCA36 patients with new methods. J Neurol Sci(2013) 324(1-2):149-55.

2. Miyazaki K, Yamashita T, Morimoto N, Sato K, Mimoto T, Kurata T, Ikeda Y, Abe K. 2013. Early and selective reduction of NOP56 (Asidan) and RNA processing proteins in the motor neuron of ALS model mice. Neurol Res 35(7):744-754.

2. 学会発表

なし

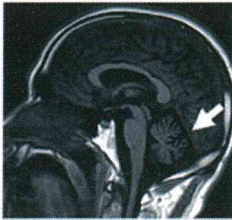
H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし

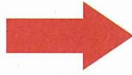
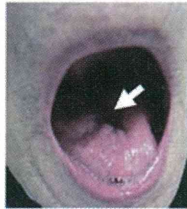
新しいALS/SCD crossroad mutation Asidanの臨床的特徴と病態

難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班
 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学 阿部康二

小脳失調症で発症し

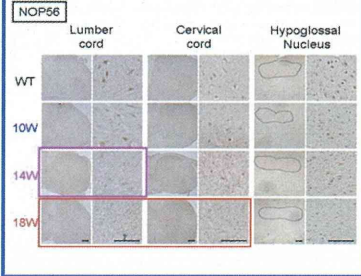


罹病期間が進むと運動ニューロン障害が明らかになる



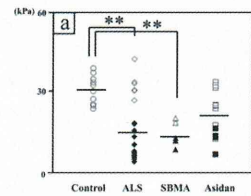
病態解析

NOP56はALSマウス脊髄で発症初期から発現が低下する。

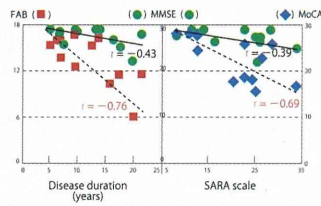


臨床的特徴

Asidan患者の舌圧はALSやSBMAほど低下せず機能的予後良好



進行期に前頭葉機能障害を認める



Asidanの病態メカニズムを明らかにし
 新規治療法開発を目指す。

神経変性疾患に関する調査研究
研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

ALS の病態解明に向けて、主に剖検例を用いて神経病理学的検討を行い、以下のような結果を得た。

1) 同一の *TARDBP* 変異があっても臨床症状と病理所見が異なることを報告した。2) ラット顔面神経引き抜き損傷モデルの顔面神経核の神経細胞では高頻度に Golgi 装置の微細化がみられた。3) ALS の脊髄前角細胞では対照例と比較して、BTBD10 蛋白発現の低下が有意にみられた。4) 112 例の非 ALS 例の動眼神経核には 18 例 (16.1%) で細い糸状の pTDP-43 陽性構造が細胞質内にみられた。5) optineurin は ALS に特徴的な封入体に陽性である以外に、多くの神経変性疾患や CJD に特徴的な構造物においても陽性であった。6) Bunina 小体の一部は抗 peripherin 抗体で陽性であった。7) 35 年間の ALS 入院例の検討では、発症の高齢化や球麻痺発症例が増加していた。

研究分担者：岡本 幸市

所属機関名：群馬大学大学院医学系研究科

脳神経内科学

A. 研究目的

ALS の病態解明に向けて、主に当研究所での剖検例を用いて神経病理学的検討を行った。

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。

C. 研究結果

1) 家族性 ALS の検討^{1) 2)}

A315E *TARDBP* 変異を有する 1 家系の中の 4 例について遺伝子、臨床、神経病理所見を検討した。

4 例全例で運動ニューロン徴候を呈し、さらに 2 例では同時にパーキンソン症候もみられた。2 例

の剖検例の検討では Bunina 小体やリン酸化 TDP-43 (pTDP-43) 封入体が神経細胞やグリア内にみられた。運動ニューロン徴候のみを呈していた

1 例ではさらに後索と脊髄小脳路の変性および Clarke 核の神経細胞の脱落を伴っていた。パーキンソン症候を伴っていたもう 1 例では黒質の高度の神経細胞脱落がみられたが、Lewy 小体はみられなかった。以上から、同一の *TARDBP* 変異があっても臨床症状と病理所見が異なることを報告した。

また、我々が経過をみている *TARDBP* 変異を有する

家族性 ALS の患者の皮膚から、京都大学の井上らのグループが iPS 細胞を作成し、今後の ALS の病態解明や治療法の開発に貢献するものと期待される。この患者さんは最近剖検され、現在神経病理学的に検索中である。

2) 動物実験^{3) 4)}

東京都医学総合研究所の渡部らが作成したラット顔面神経引き抜き損傷モデルの顔面神経核の神経細胞を抗 Golgi 装置抗体 (抗 MG-160 抗体) を用いて経時的に検索した。引き抜き損傷後ではヒト ALS でみられるものと同様の Golgi 装置の微細化 (fragmentation) が高頻度にみられるが、顔面神経切断では同様の変化はみられないことを報告した。

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

に關与しているものと考えられ、報告した。

3) TDP-43 の検討⁵⁾

ALS 例では pTDP-43 は中枢神経系に広範に出現しているが、ALS 例以外の疾患でも海馬領域を中心にみられており、それは恐らく二次的現象と考えられている。我々は非 ALS 例の動眼神経核内の神経細胞内に稀ならず pTDP-43 陽性構造がみられることに気づき、多数例で検討してみた。112 例の非 ALS 例では 18 例 (16.1%) に細い糸状の TDP-43 陽性構造が細胞質内にみられた。その出現頻度は加齢とともに増加し、80-89 歳では 37 例中 10 例

(27.0%) であり、その 10 例中 6 例の側頭葉では Alzheimer 病に相当する老人性変化がみられた。27 ALS 例では 13 例 (48.1%) に pTDP-43 陽性構造がみられたが、非 ALS 例のものよりも強い免疫反応を示していた。非 ALS 例での動眼神経核での pTDP-43 の発現は恐らく加齢現象と考え報告した。

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。

4) 症例報告^{6) 7) 8)}

Cockayne 症候群の 1 剖検例で、主に小脳皮質と延髄下オリーブ核に pTDP-43 陽性がみられることを報告した。

75 歳の孤発性 ALS の剖検例で、多数の FUS 陽性がみられたので症例報告した。

前頭側頭葉変性症 (FTLD) とは前頭葉と側頭葉前方形に病変の主座をおく非 Alzheimer 型変性疾患を指す臨床的症候群である。FTLD は蓄積している異常蛋白により FTLD-TAU や FTLD-TDP などと呼ばれている。FTLD は 65 歳以前に発症することが多く、65 歳以後の発症例は稀とされてきたが、高齢発症の FTLD も最近報告されるようにな

っている。我々は死亡時年齢が 101 歳であった FTLD-TDP の 1 剖検例を経験したので報告した。

5) optineurin⁹⁾

家族性 ALS (ALS) 患者の一部で optineurin 遺伝子の変異があることが報告され、新たな家族性 ALS の 1 型として注目されている。孤発性および家族性 ALS 剖検例における optineurin についての免疫組織学的検討では、脊髄前角細胞内にみられる skein-like inclusions や round hyaline inclusions が optineurin 陽性であると報告されており、optineurin は ALS の特異的なマーカーとなり得るのではないかと考えられているが、ALS 以外の神経変性疾患では同様の検討はなされていないため検討した。ALS における skein-like inclusion と round hyaline inclusion, 認知症を伴う ALS における ubiquitin 陽性タウ陰性神経細胞内封入体、好塩基性封入体、Alzheimer 病における神経原線維変化と dystrophic neurites, Parkinson 病における Lewy 小体と Lewy neurites, 多系統萎縮症における glial cytoplasmic inclusion, Pick 病における Pick 小体、および CJD における腫大化した神経細胞が optineurin 陽性であった。ALS における Bunina 小体は optineurin 陰性であった。optineurin は ALS に特徴的な封入体に陽性である以外に、多くの神経変性疾患や CJD に特徴的な構造物においても陽性であることを初めて報告した。

6) Bunina 小体¹⁰⁾

Bunina 小体は ALS に特徴的な運動神経細胞内封入体でありその本体はなお不明である。我々は Bunina 小体が抗 cyastain C 抗体および抗 transferrin 抗体で陽性であることを報告してきたが、今回 Bunina 小体の一部が抗 peripherin 抗体で陽性に免疫染色されることを報告した。

7) 臨床的検討^{11) 12)}

群馬大学神経内科に 1978 年から 2012 年までに入院した 287 例の ALS 患者について検討した。

200 例 (69.7%) は四肢で発症し、87 例 (30.3%) は球麻痺で発症していた。35 年間をみると 70 歳以上の高齢発症例、認知症を伴う例、球麻痺で発症する ALS 例が増加していた。

急速に進行する ALS のサポートは難しく、今回急速に進行し死に至った ALS 例の 6 例について、末期の状態につい

て検討し報告した。

D. 考察

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita Y, Ikeda M, Yanagisawa T, Senoo Y, Okamoto K: Different clinical and neuropathological phenotypes of familial ALS with A315E *TARDBP* mutation. *Neurology* 77: 1427-1431,2011.
- 2) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaoka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MCN, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H: Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Science Translational Medicine* 4:1-8,2012.
- 3) Fujita Y, Watabe K, Ikeda K, Mizuno Y, Okamoto K: Morphological changes of Golgi apparatus in adult rats after facial nerve injuries. *Neuropathology* 31: 42-47, 2011.
- 4) Furuta N, Makioka K, Fujita Y, Ikeda M, Takatama M, Matsuoka M, Okamoto K: Reduced expression of BTBD 10 in anterior horn cells with Golgi fragmentation and pTDP-43-positive inclusions in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 33:397-404,2013.
- 5) Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K: Comparison of phosphorylated TDP-43-positive inclusions in oculomotor neurons in patients with non-ALS and ALS disorders. *J Neurol Sci* 315:20-25,2012.
- 6) Sakurai A, Makioka K, Fukuda T, Takatama M, Okamoto K: Accumulation of phosphorylated TDP-43 in the CNS of a patient with Cockayne syndrome. *Neuropathology*

33:673-677,2013.

7)

Fujita Y, Fujita S, Takatama M, Ikeda M, Okamoto K: Numerous FUS-positive inclusions in an elderly woman with motor neuron disease. *Neuropathology* 31:170-176,2011.

8)

岡本幸市, 五十嵐健祐, 勝山 彰, 福田利夫, 高玉真光: 超高齢発症のFTLD-TDPの1剖検例. *79:760-762,2013.*

9)

Osawa T, Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K: Optineurin in neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 31:569-574,2011.

10)

Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K: Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *JNeurolSci* 302:14-18,2011.

11) Furuta N, Makioka K, Fujita Y, Okamoto K: Changes in the clinical features of amyotrophic lateral sclerosis in rural Japan. *Intern Med* 52:1691-1696,2013

12) Ushikubo M, Tomita C, Inokuma A, Ikeda M, Okamoto K: Illness course and circumstances of death among individuals with rapidly progressive amyotrophic lateral sclerosis. *International Medical Journal* 20: 446-449, 2013.

2. 学会発表

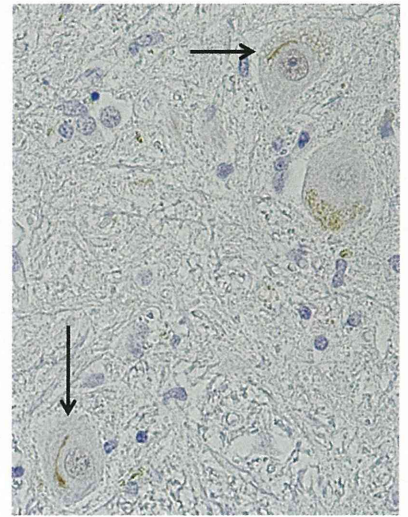
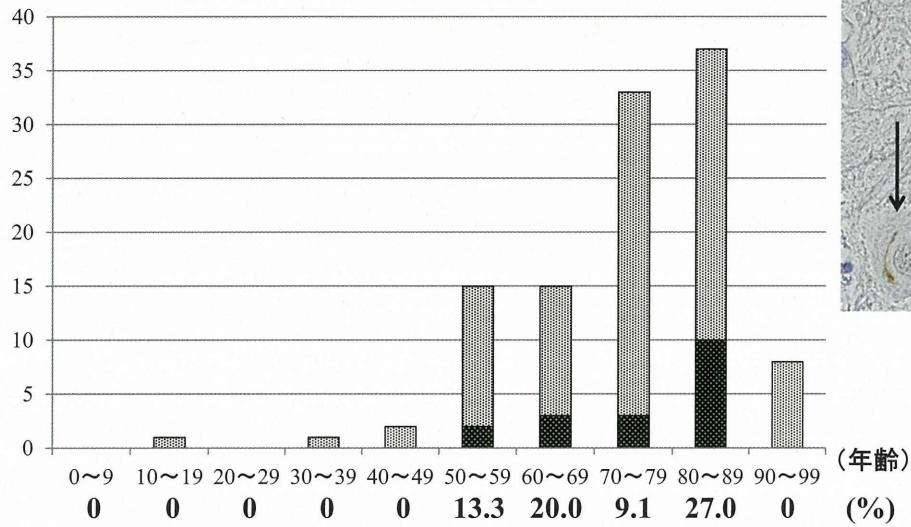
H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

112例の非ALS群

難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班
 研究分担者: 岡本 幸市
 所属機関名: 群馬大学大学院医学系研究科 脳神経内科学

症例数



■ 動眼神経核内の神経細胞内に封入体(図, 矢印)を認めた症例(18例)

□ 動眼神経核内の神経細胞内に封入体を認めなかった症例(94例)

%: 各年齢層において封入体が陽性の割合

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

本研究期間で、我々は筋萎縮性側索硬化症(ALS)にて3つの成果を上げた。①本邦のALSにおけるc9FTD/ALSの頻度を検討し、家族性ALSの発端者58例中2例(3.4%)で認めた。非欧米人種においても欧米人と同様のリスクハプロタイプを有し、そこから新規に異常伸長が生じると考えた。

②TDP-43発現抑制培養細胞およびALS罹患神経組織にて、核内小体の一つであるGEM小体数が減少していることを明らかにした。③TDP-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。

研究分担者：小野寺 理

所属機関名：新潟大学脳研究所 分子神経疾患

資源解析

A. 研究目的

我々は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態を明らかにするために、次の3つの目標を設定した。① c9FTD/ALS (OMIM 105550)は欧米人で最も頻度が高いALSであり、強い創始者効果が想定されている。一方で、非欧米人のc9FTD/ALSはこれまで報告されていない。本症の本邦での頻度を検討し、その遺伝・病理学的特徴を明らかにする。

② ALSにおいてTAR DNA binding protein of 43kDa(TDP-43)の機能低下(loss of function)によるRNA代謝異常を介した神経変性モデルが注目されている。我々はTDP-43発現低下培養細胞およびALS罹患神経組織においてmRNAのスプライシングに関連する機能的RNA、U small nuclear RNAs(U snRNAs)のうちU12 snRNAを中心とした低下がみられる事を既に見出している。U snRNAsは脊髄性筋萎縮症(SMA)モデルマウスにおいても減少が報告されており(Zhang et al. Cell 2007)、運動神経の選択的変性との関連が注目

される。U snRNAsの成熟、発現にはSMN蛋白およびその複合体形成蛋白、さらに同蛋白を主要構成成分とする核内小体GEM小体が重要であることが知られている。TDP-43は核内蛋白であり、Cajal小体、PML小体、GEM小体などの各種核内小体と共局在する(Wang et al. PNAS 2002)。本研究はTDP-43と核内小体の関連に注目し、U snRNAs減少の具体的機序を明らか

にすることを目的とする。③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

各々について方法を述べる

① 日本人familial ALS(FALS)58例、sporadic ALS(SALS)110例およびコントロール180例を対象とした。genomic DNAを抽出後、既報(DeJesus-Hernandez M et al. Neuron 2011;72:245-56, Renton AE et al. Neuron 2011;72:257-68)に従いrepeat-primed PCR法でGGGGCCリピートの異常伸長の有無を検討した。リピートを挟むプライマーを用いたPCRによりリピート数の

genotyping を行った。また、欧米人の c9FTD/ALS で報告されているリスクハプロタイプ関連の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) を TaqMan PCR 法と直接塩基配列決定法で検討した。異常伸長を認めた 1 例では病理学的検討を行った。本研究を実施するにあたり、新潟大学倫理委員会の承諾と患者・家族からの同意を得た。

② A) TDP-43 を発現抑制した培養細胞、および ALS 脊髄前角運動神経細胞中における GEM 小体の定量 control/TDP-43 siRNA HeLa 細胞を作成し、GEM 小体数の定量を行った。同細胞で抗 SMN 抗体にて免疫染色を行い、核内の GEM 小体数の定量を行った。また control/ALS 患者由来脊髄標本を用いて、TDP-43/SMN の二重染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡と 3D 画像解析ソフト Imaris を用いて運動神経細胞内の GEM 小体数の定量を行った。B) TDP-43 発現抑制培養細胞および ALS 患者由来神経組織における SMN 蛋白および複合体形成蛋白の発現量の定量。SMN 蛋白および複合体形成蛋白の発現量をウエスタンブロット (WB) 法で定量し、同蛋白の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。また control/ALS 患者由来の神経組織 (脊髄、大脳皮質運動野、小脳) における SMN mRNA 発現量をリアルタイム PCR (qRT-PCR) 法で定量した。C) TDP-43 発現抑制培養細胞および ALS 患者由来神経組織における Splicing 異常の検討 control/TDP-43 siRNA U87-MG 細胞および control/ALS 患者由来の大脳皮質運動野における U12 snRNA 依存性の splicing 変化を qRT-PCR 法で定量した。

(倫理面への配慮)

使用した剖検検体、遺伝子サンプルは、匿名化し研究を実施した。当院遺伝子倫理院会の承認を得て行った。

C. 研究結果

各々の結果について述べる

① FALS の発端者 58 例中 2 例 (3.4%) で C9ORF72 遺伝子のイントロン 1 内における GGGGCC リピートの異

常伸長を認めた。SALS 110 例、コントロール 180 例には異常伸長例を認めなかった。平均リピート数は 3 群で有意差はなかった (異常伸長例を除いた FALS 群 = 3.96 ± 2.85 , SALS 群 = 3.31 ± 2.25 , コントロール群 = 3.62 ± 2.44 , $p = 0.225$, Kruskal-Wallis 検定)。異常伸長を認めた 2 例について、欧米人の c9FTD/ALS に関連するリスクアレルの有無を検討したところ、rs3849942 (A アレル) から rs2453556 (G アレル) にかけて 43 kb におよびリスクアレルを有していた。コントロール群において、リスクハプロタイプのタグ SNP である rs3849942 のリスクアレル A の有無により GGGGCC リピート数を比較検討すると、A アレルを有する群は有さない群より有意にリピート数が多かった (平均リピート数 : A アレルあり群 = 5.67 ± 2.95 , A アレルなし群 = 3.13 ± 2.02 ; $p < 0.001$, Mann-Whitney U 検定)。これは FALS 群、SALS 群においても同様の結果であった (異常伸長例を除いた FALS 群 : A アレルあり群 = 5.90 ± 3.91 , A アレルなし群 = 3.36 ± 2.13 ; $p < 0.01$, SALS 群 : A アレルあり群 = 5.68 ± 3.21 , A アレルなし群 = 3.04 ± 1.96 ; $p < 0.001$, Mann-Whitney U 検定)。異常伸長を認めた 2 例は、ともに親の発症はなく同胞に発症を認めた。どちらも 60 歳代に、1 例は手の脱力で、もう 1 例は構音障害で発症し、ともに発症 3 年以内に死亡した。認知症やパーキンソンニズムの合併はなかった。

病理学的検討を行った 1 例では、運動神経領域に局限した神経細胞脱落とグリオーシスを認め、中心前回と脊髄前角の残存神経細胞内に Bunina 小体と TDP-43 陽性細胞質内封入体 (NCI) を認めた。グリア細胞質内にも TDP-43 陽性封入体を認め、錐体路においては NCI より多く認めた。一方、リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) 陽性封入体はほとんど認められなかった。頸髄前角において TDP-43 と pTDP-43 の両抗体を用いて蛍光二重免疫染色を行ったところ、残存神経細胞内の TDP-43 陽性スケイン様封入体が pTDP-43 では染色されなかった。c9FTD/ALS では、小脳と海馬に p62 陽性、TDP-43 陰性の細胞内封入体を認めることが報告されており (Al-Sarraj S et al. Acta Neuropathol 2011;122:691-702)、本例でも検討を行ったところ、小脳顆粒細胞と海馬の顆粒細胞、CA4 から CA2 にかけての錐体細胞に p62 陽性、TDP-43 陰性の NCI を認めた。

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

HeLa 細胞における GEM 小体の検討では、コントロール : 平均 2.64 ± 1.68 /細胞、TDP-43 抑制細胞 : 1.30 ± 1.33 /細胞

($P < 0.05$)であり、TDP-43 を発現抑制すると GEM 小体数は減少した。

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

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

siRNA 法で TDP-43 発現を抑制した HeLa 細胞, SHSY-5Y 細胞での WB 法の検討では、SMN 蛋白および複合体形成蛋白 Gemin6,8 の有意な発現低下を認めた。qRT-PCR 法での検討では複数の

SMM mRNA 選択的スプライシング多型において、TDP-43 発現抑制群で有意な発現低下を認めた。

患者由来の神経組織(脊髄, 大脳皮質運動野, 小脳)における SMN mRNA 発現量は対照群, ALS 群で有意な変化を認めなかった。

3. TDP-43 発現抑制培養細胞および ALS 患者由来神経組織における Splicing 異常の検討 U12 snRNA 依存性の intron を有する IPO-4 mRNA での検討では、TDP-43 siRNA U87-MG 細胞および ALS 患者由来の大脳皮質運動野において、対照群と比較して有意なスプライシング異常が認められた。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, ノザンプロットティング, 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、ノザンプロットティング, 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ェ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。

③ 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, ノザンプロットティング, 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、ノザンプロットティング, 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ェ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

まず、我々は、非欧米人で初めて c9FTD/ALS を見出した。2例とも親の発症がなく同胞の発症を認めたことから、新規に異常伸長が生じた可能性が考えられた。c9FTD/ALS の頻度は、ヨーロッパの FALS の 40%強、北米の FALS の 23.5%と高頻度であり、強い創始者効果が想定されている(Mok K et al. *Neurobiol Aging* 2012;33:209.e3-8)。一方、フィンランドの SALS の 21%、北米の SALS の 4.1%と SALS においても頻度が高いことから、疾患に関連したリスクハプロタイプはリピートが伸びやすい傾向をもち、そこから新規に異常伸長が生じるという仮説も想定されている(DeJesus-Hernandez M et al. *Neuron* 2011;72:245-56)。本邦の2例のハプロタイプは、家系内の他の親族の DNA が得られていないため決定できないが、2例とも欧米人の c9FTD/ALS に関連するリスクアレルを 43kb にわたって有しており、日本人においてもリスクハプロタイプを背景に新規に異常伸長が生じる可能性が示唆された。異常伸長のないコントロール群において rs3849942 の A アレルを有するとリピートが長い傾向となった結果は、欧米からの既報(DeJesus-Hernandez M et al. *Neuron* 2011;72:245-56)と同様であり、これもリスクハプロタイプを背景に新規に異常伸長が生じるとする仮説を支持する。日本人で欧米人より c9FTD/ALS の頻度が低いのは、母集団におけるリスクアレルの頻度が欧米人よりかなり低いことによると思われる(国際 HapMap プロジェクトのデータによると、rs3849942 の A アレルの頻度は、HapMap-CEU 23.5%、HapMap-JPT 7.6%)。ただし、このハプロタイプがどのようにしてヨーロッパから日本へ伝わってきたかは不明である。

病理学的には、変性が運動神経系に限局し、Bunina 小

体やTDP-43陽性NCIを下位運動神経内に認めるといった古典的なSALSと同様の病理像に加えて、小脳と海馬にp62陽性、TDP-43陰性のNCIを有する特徴を認めた。欧米人のc9FTD/ALSでも同様の封入体が報告されており、本邦のc9FTD/ALSにおいても共通した特徴と言える。ただし、欧米人では核内にもp62陽性、TDP-43陰性の封入体を認めると報告されているが、本邦の症例では認めなかった(AI-Sarraj S et al. *Acta Neuropathol* 2011;122:691-702)。p62はユビキチン化された蛋白と結合し、これをユビキチンプロテアゾーム系およびオートファゴゾームに運ぶ作用をもつことが知られていることから、c9FTD/ALSで認めるp62陽性封入体は、p62が病態に関与するTDP-43以外のなんらかの蛋白の凝集体を認識している可能性がある。また、本例のTDP-43陽性NCIはpTDP-43では染まらなかった。これまで病理像が明らかとなっているALS型のc9FTD/ALSは欧米で10例に満たないが、同様の特徴は示されていない。TDP-43とpTDP-43の染色性の異同については今後の症例の蓄積が必要である。

次に我々は、ALS罹患神経組織において、U12を中心とするU snRNAsの低下を見出した。U12snRNAを含むminor spliceosomeを中心とした、組織特異的なU snRNAsの低下とsplicing変化は運動神経選択的変性に重要であることが報告されている(Zhang et al. *Cell* 2007, Pellizzoni et al. *Cell* 2012)。U snRNAsの低下の機序として、SMN蛋白および核内小体GEMについて検討を行った。TDP-43発現抑制培養細胞ではmRNA、蛋白レベルでSMN蛋白の低下を認めたが、ALS罹患組織ではmRNAの発現に変化を認めなかった。一方でGEM小体数は培養細胞系およびALS罹患運動神経において優位な低下を認めた。TDP-43およびFUS遺伝子変異による家族性ALS由来のfibroblastにおいてもGEM小体数の減少が報告されている(Yamazaki et al. *Cell Rep* 2012)。運動ニューロン疾患におけるGEM小体の低下は共通した病理所見の可能性があり、U snRNAsの低下、スプライシング異常という共通の病態機序の背景としても重要と考えられる。

最後にTDP-43増加時における発現抑制機構を明らかにした。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

① 初めて非欧米人のc9FTD/ALSを見出した。日本人における頻度は低いが、欧米人と同様のリスクプロタイプを背景に新規に異常伸長が生じる可能性が示唆された。病理学的には、古典的なSALSの変性所見に加えて、小脳と海馬にp62陽性、TDP-43陰性の細胞質内封入体を認める特徴を有する。

② ALS罹患組織において、GEM小体の減少、U12 snRNAの低下、U12 snRNA依存的なMinor splicingの異常が存在する事を示した。これらはALS、SMA共通に認められ、運動神経選択的障害のメカニズムとして重要と考えられる。

③ 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 theneuregulin-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. Minor splicing 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.* 2013Dec;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.* 2013Sep;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.
- 8) Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kato T, Watanabe N, Yamahira A, Kondo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. *PLoS One.* 2012;7(8):e43120.
- 9) Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012 Sep 25.

2.学会発表

- 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)
- 6) 第 53 回 日本神経学会総会 (2012 年 5 月 23 日) 石原智彦, 志賀篤, 横尾麻衣子, 有泉優子, 横関明男, 譚春鳳, 柿田明美, 西澤正豊, 高橋均, 小野寺理. 「ALS 患者神経組織ではスプライシング関連機能性 RNA が低下する」
- 7) Society For Neuroscience 2012, (New Orleans, Oct,17,2012) Tomohiko Ishihara, Atsushi Shiga, Akio Yokoseki, Akiyoshi Kakita, Masatoyo Nishizawa, Hitoshi Takahashi, Osamu Onodera 'Reduction of U12 snRNAs in nervous tissues with TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis'

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

孤発性 ALS の大多数の症例に見られ、運動ニューロン死を引き起こす疾患特異的分子異常である、RNA 編集酵素 ADAR2 の発現低下と、ALS の病理学的指標である TDP-43 病理とは同一の運動ニューロンに生じている。両者の分子連関を検討し、ADAR2 の発現低下から TDP-43 病理形成に至る分子カスケードを明らかにした。すなわち、ADAR2 発現低下が、順次、GluA2 のグルタミン・アルギニン (Q/R) 部位 RNA 編集活性の低下、未編集型 GluA2 をサブユニットに持つ Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の発現、運動ニューロン細胞質 Ca^{2+} 濃度上昇、 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼであるカルパインの活性化、TDP-43 の切断による易凝集性断片の増加、細胞質凝集塊への全長および断片化 TDP-43 の巻き込みによる封入体形成および核内 TDP-43 の減少・喪失、を引き起こすというカスケードである。この分子カスケードは、孤発性 ALS 運動ニューロン以外に、加齢に伴う運動ニューロンの変性・TDP-43 局在異常にも働いていることを高齢マウスにおいて明らかにし、加齢が ALS の危険因子であることの分子基盤である可能性を示した。また、ALS 関連遺伝子の一部にはこのカスケードを引き起こすものがあることを *FUSP525L* 変異症例の検討から明らかにした。カルパイン依存性 TDP-43 断片形成には、カルパイン活性化メカニズムの他、変異 TDP-43 タンパクのカルパイン脆弱性が *TARDBP* 関連 ALS の TDP-43 病理形成メカニズムである可能性を示した。したがって、TDP-43 病理に特徴付けられる ALS では、起因する分子メカニズムが異なってもカルパイン依存性の易凝集性 TDP-43 断片形成が共通したメカニズムであると考えられる。さらに、カルパイン活性化には、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる様々なメカニズムの関与が考えられ、活性化カルパインによる易凝集性 TDP-43 断片形成が、様々な神経疾患で観察される TDP-43 病理形成にも中心的役割を持つ可能性を考察した。

研究分担者：郭 伸

所属機関名：東京大学大学院医学系研究科 附属

疾患生命工学センター臨床医工学部門

A. 研究目的

TDP-43 病理は ALS の病理学的指標とされ、大多数の ALS 症例の運動ニューロンに観察される (1, 2)。したがって、運動ニューロンにおける TDP-43 病理の出現メカニズムの解明は ALS の病因と密接に関連すると考えられる。

我々は ALS 症例の大多数を占める孤発性 ALS 患者剖検脊髄の解析から、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体のサブユニット GluA2 に本来生ずべき RNA 編集を欠いた未編集型 GluA2 が発現していること、これが RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の発現低下に依ることを明らかにしてきた (3-5)。GluA2 の RNA 編集は、アデノシン-イノシン変換 (A-to-I RNA editing) 酵素 ADAR2 により特異的に触媒され、孤発性 ALS 運動ニューロンには ADAR2 遺伝子発現の著明な低下が起こっている (3)。この分子変化が運動ニューロン死の直接原因であることが ADAR2 遺伝子のコンディショナルノックアウト

トマウスの解析から明らかになり (6)、孤発性 ALS の病因と深く関わる分子変化であると考えられる。しかも、ADAR2 発現低下は、ALS の病理学的指標とされる TDP-43 病理と、同一の運動ニューロンに生ずることを ALS 患者の脊髄の免疫組織学的検索から明らかにした (7)。

このような知見から、ADAR2 発現低下と TDP-43 病理形成との関連を調べることにより、ALS の病因解明が進むと考えた。

B. 研究方法

1) TDP-43 病理と ADAR2 発現低下の間に分子連関が想定されるため、TDP-43 病理が ADAR2 発現低下をもたらす可能性を培養細胞系を用いて検討し、逆の関係の可能性をコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) を用いて検討し、分子カスケードを明らかにすることを目的とした。

2) その結果、後者のメカニズムが明らかになったので、ADAR2 発現低下が TDP-43 病理を引き起こすメカニズムを培養細胞、リコンビナント蛋白の解析、モデル動物を用いた *in vivo* での検討、ヒト剖検脳における同様の分子変化の同定、により検討した。

3) また、ALS 以外にもみられる TDP-43 病理形成に、ADAR2 発現低下から始まる分子カスケードと共通のカスケードが働いているかどうかを、加齢に伴う運動ニューロンにおける変化、遺伝性 ALS 運動ニューロンにおける TDP-43 病理形成メカニズムの解析から検討を加えた。

C. 研究結果

1-1) 培養細胞での検討から、全長 TDP-43 の発現レベルの上昇・低下、C 末端断片の発現、ALS 関連変異 TDP-43 の発現の何れも ADAR2 遺伝子発現に変化を及ぼさなかった(8)。

1-2) AR2 マウスの脊髄の解析から、ADAR2 発現の低下・欠損により、TDP-43 の正常な核内局在が失われ、細胞質への局在しないし消失が観察された。特に、細胞質で多数の TDP-43 陽性の凝集体を形成し、核内の TDP-43 が減少乃至消失している運動ニューロンが観察され、ALS の TDP-43 病理に極めて類似した病理像を呈していた(9)。この変化は、ADAR2 を欠損しながら編集型 GluA2 を発現する AR2res マウスには観察されなかったことから、ADAR2 発現低下そのものではなく、未編集型 GluA2 発現による Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体発現が引き起こすことが明らかになった(9)。

2) 以上の結果から、ALS 運動ニューロンの TDP-43 病理形成は AMPA 受容体からの Ca^{2+} 流入増加による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により引き起こされる可能性が考えられたため、以下の実験を行った。

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。したがって、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により TDP-43 に働くプロテアーゼが活性化される可能性がある。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、極めて高い、特異的な切断活性を持つことが明らかになった(9)。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(9)。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(9)。TOF-MS の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、N 端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(9)。

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 C 末端を欠いた N 端断片が豊富に含まれていることが明らかになり、同様の分子カスケードが ALS の運動ニューロンにも働いていることが示された(9)。

3-1) 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*) 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(9)。

3-2) TDP-43 の局在異常は ALS 運動ニューロン以外にも前頭側頭葉変性症やアルツハイマー病の大脳皮質にも観察される。また、神経症状を呈さない高齢者の脳にも観察されることが知られている。高齢者運動ニューロンにおける TDP-43 の局在変化を高齢マウスで検討し、そのメカニズムを解析した。1.5 歳齢以上の野生型マウスでは運動ニューロンでは TDP-43 の正常な核への局在が消失ないし低下し、細胞質に局在している運動ニューロンが増加していることが分かった。しかも、そのような運動ニューロンでは未編集型 GluA2 が発現しており、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体が発現していることが想定され、ALS 運動ニューロン同様、カルパイン依存性断片の発現による局在異常であることが想定された。

3-3) 2009 年に *FUS/TLS* 遺伝子変異が ALS の発症と関連することが報告された(10, 11)。弱年発症、急性の経過を辿る好塩基性封入体を持つ孤発性 ALS (12) が *FUS* 遺伝子に

P525L 変異を持つ事が明らかになり、剖検脊髄を検討したところ、ADAR2 活性低下に依り未編集型 GluA2 が発現していた。変異 FUS が ADAR2 遺伝子発現を低下させている可能性が明らかになった。

D. 考察

本研究において、ALS 運動ニューロンに特異的に観察される TDP-43 病理の形成メカニズムを明らかにした。

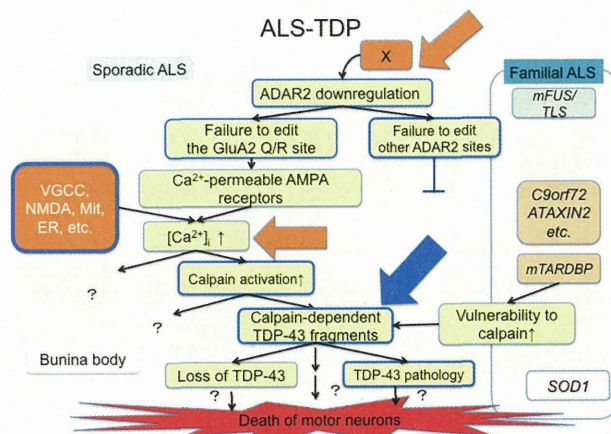
カルパインによる TDP-43 断片の形成が TDP-43 病理のトリガーになることを示す結果を得た(図)。さらに、大多数の孤発性 ALS に見られる ADAR2 の発現低下がその上流のメカニズムであること、一部の遺伝性 ALS ではこの分子カスケードが働いていること、また、カルパイン断片の形成には、カルパインの活性化の他、TDP-43 のカルパイン基質としての脆弱性亢進によるメカニズムが *TARDBP* 変異をもつ ALS (*13-17*)には働いていることが示唆された(9)(図)。変異 *TARDBP* 関連 ALS の運動ニューロンでは ADAR2 発現の低下はみられないが、運動ニューロンは GluA2 を含まない Ca^{2+} 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ので、変異 TDP-43 は運動ニューロンで切断を受けやすく、ALS の表現型をとると考えられる。

TDP-43 がカルパインにより特異的に切断され、その N 端断片が高い凝集性をもつこと、カルパインの TDP-43 切断活性は従来想定されていたカスパーゼより遥に高いこと、ALS 運動ニューロンでは Ca^{2+} 流入増加により直接カルパインが活性されることから、TDP-43 病理形成におけるカルパイン断片の役割は中心的であると考えられ、加齢に伴う TDP-43 の局在異常にも関与していることが示された(18)。ALS・FTLD の脳脊髄ではカルパイン断片の他、C 端断片も発現しており、カルパインの活性化に引き続き活性化されるカスパーゼなどの関与も考えられる。

したがって、TDP-43 病理が観察される疾患では、様々な形のカルパインの活性化メカニズムが関与している可能性が考えられ、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性変化の他、様々な Ca^{2+} 透過性イオンチャネルからの流入、ミトコンドリアや細胞内小器官 ER など細胞内 Ca^{2+} 貯蔵器官からの放出によりカルパインが活性化されるメカニズムの関与の検討

が必要であることが示唆された(図オレンジ矢印)。

更に、TDP-43 病理の形成には凝集性 TDP-43 断片が継続して産生される必要があることも示唆される。例えば、脳虚血や外傷後に TDP-43 の局在異常がみられても一過性である。活性化されたカルパインが直ちに内因性カルパスタチンにより不活性化されることを考えると、断片が凝集されるためには Ca^{2+} 濃度上昇が継続しておこり、カルパインの活性化が自足する必要があると考えられる(9)。逆に、カルパインが過剰に活性化すると易凝集性断片をさらに可溶性断片に切断するため、凝集塊を形成しにくくなる。このように、脳虚血や脳外傷などで活性化する NMDA チャネルや電位依存性カルシウムチャネルからの一過性の大量の Ca^{2+} 流入は凝集塊を形成しにくい環境であると考えられる。したがって、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体からの適度の Ca^{2+} 流入が持続的に起こる細胞内環境や、基質として脆弱である変異 TDP-43 の発現は、凝集性 TDP-43 断片を継続的に形成し TDP-43 病理の形成に適した細胞内環境であることが想定される。



図：孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 発現低下から TDP-43 病理形成・細胞死に至る分子カスケード。TDP-43 病理形成にはカルパイン依存性断片の形成(青矢印)が中心的な役割を持つ。遺伝性 ALS の一部にはこのカスケードに合流するものがある。

一方、変異 FUS ALS 症例では ADAR2 発現低下に依るカルパインの活性化が生ずるのにもかかわらず TDP-43 病理が

観察されなかった理由としては、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体発現のスピードは速いために Ca²⁺流入量が多く、カルパインの活性化が高度であったためと考えられる。実際、モデルマウスの TDP-43 局在変化を観察すると、細胞内 TDP-43 はホモ接合体 AR2 マウスよりヘテロ接合体 AR2H マウスに観察されやすく(9)、ホモ接合体 AR2 マウスの Ca²⁺透過性がヘテロ接合体 AR2 マウスの 5-6 倍高いことを考えると、TDP-43 の局在の違いはカルパインの活性化の程度の違いを反映していると考えられる。

FUS/TLS や *TARDBP* 以外にも *C9ORF72* 関連 ALS (19, 20) など、TDP-43 病理が観察されるが、これらにもカルパイン断片が関与していると考えられ、そのメカニズムを解析することにより、ALS-TDP に共通した分子カスケードを明らかにすることが可能であると考えられる。

同時に、TDP-43 病理が観察されない ALS では、カルパイン断片を形成せずに運動ニューロン死に至るカスケードが働いていることが想定され、事実 TDP-43 病理が観察されない SOD1 関連 ALS ではカルパインの活性化が証明されていない(21, 22)。

TDP-43 病理形成メカニズムの解析により、一部の ALS 関連遺伝子異常にも、大多数の孤発性 ALS に通ずるメカニズムが働いていること、また、TDP-43 病理を形成しない別の運動ニューロン死メカニズムがあること、が明らかになってきた。ALS の原因は複数存在することが想定されるが、幾つかのカスケードに収斂されるように思われ、その中でも TDP-43 病理形成メカニズムにも多様性があることが明らかになったことは、治療標的を特定する上にも重要な知見であると考えられる。

TDP-43 断片の形成には、*TARDBP* 関連 ALS を除き、細胞質 Ca²⁺調節機構の破綻によるカルパインの異常な活性化が主要な役割を示していることから、TDP-43 病理は、Ca²⁺流入が生理的にも高い運動ニューロンに形成されやすい病理変化であると考えられる。さらに、TDP-43 病理が観察されるニューロン種はある特定のニューロン種であり、海馬錐体細胞など活動性の高いニューロンであることから、運動ニューロン以外の細胞に形成される TDP-43 病理にも同様の細胞質 Ca²⁺調節機構の破綻が生じていること

が予想される。そのメカニズムの解析によりさまざまな TDP-43 プロテオパチーの病因説明が進むと期待される。また、TDP-43 病理の正常化は、今後治療的介入法が開発された場合の有効性のバイオマーカーとしての有用性が期待される。

E. 結論

TDP-43 病理の形成には易凝集性カルパイン断片の形成が中心的な役割を持っている。孤発性 ALS における ADAR2 発現低下から TDP-43 病理形成に至る分子カスケードは、様々な TDP-43 プロテオパチーにおける TDP-43 病理形成メカニズムと部分的に共通性があると想定される。

文献：

1. Arai T, et al: *Biochemical and biophysical research communications* 351, 602-611, 2006.
2. Neumann M, et al: *Science* 314, 130-133, 2006.
3. Hideyama T, et al: *Neurobiology of disease* 45, 1121-1128, 2012.
4. Kawahara Y, et al: *Nature* 427, 801, 2004.
5. Takuma H, et al: *Ann Neurol* 46, 806-815, 1999.
6. Hideyama T, et al: *J Neurosci* 30, 11917-11925, 2010.
7. Aizawa H, et al: *Acta Neuropathol* 120, 75-84, 2010.
8. Yamashita T, et al: *Neuroscience research* 73, 153-160, 2012.
9. Yamashita T, et al: *Nat Commun* 3, 1307, 2012.
10. Kwiatkowski TJ, Jr., et al: *Science* 323, 1205-1208, 2009.
11. Vance C, et al: *Science* 323, 1208-1211, 2009.
12. Aizawa H, et al: *J Neurol Sci* 176, 109-113, 2000.
13. Gitcho MA, et al: *Ann Neurol* 63, 535-538, 2008.
14. Kabashi E, et al: *Archives of neurology* 66, 281-282, 2009.
15. Sreedharan J, et al: *Science* 319, 1668-1672, 2008.
16. Van Deerlin VM, et al: *Lancet neurology* 7, 409-416, 2008.

17. Yokoseki A, *et al*: *Ann Neurol* 63, 538-542, 2008.
18. Hideyama T, *et al*: *PLoS one* 7, e43469, 2012.
19. DeJesus-Hernandez M, *et al*: *Neuron* 72, 245-256, 2011.
20. Renton AE, *et al*: *Neuron* 72, 257-268, 2011.
21. Stifanese R, *et al*: *The Journal of biological chemistry* 285, 631-643, 2010.
22. Wootz H, *et al*: *Experimental cell research* 312, 1890-1898, 2006.

(倫理面への配慮)

東大倫理委員会の承認を得、症例の解析は匿名化して行った。東大動物委員会の承認を得た。

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. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, Kwak S: Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis* 45 : 1121-28, 2012.
2. Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S, Kwak S: Abnormal processing of TDP-43 does not regulate 2 activity in cultured cell lines. *Neurosci Res* 73:153-160, 2012.
3. Hideyama T, Teramoto S, Hachiga K, Yamashita T, Kwak S: Co-occurrence of TDP-43 mislocalization with reduced RNA editing enzyme, ADAR2, in aged mouse motor neurons: implications for age-related acceleration of ALS. *PLoS One* 7(8) e43469, 2012.
4. Yamashita T, Hideyama T, Hachiga K, Teramoto S, Takano J, Iwata N, Saido T, Kwak S: A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology. *Nat Commun* 3:1307, 2012.

他 23 編

2. 学会発表

1. Kwak S: Failure of RNA editing and ALS pathogenesis. ALS Conference. Tarry Town NY, September 7-9, 2011.
2. Kwak S: Calpain cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Biology of Alzheimers in Health and Disease. Science Research Conferences FASEB*, Saxtons River, Vermont, July 21-26, 2013.

他 40 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

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

この3年間の研究成果としては、2つの新規運動ニューロン病の原因遺伝子を特定したことである。optineurin (OPTN)は常染色体劣性遺伝形式をとる筋萎縮性側索硬化症(ALS)家系から、そしてTRK-fused gene (TFG)は近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチーHereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P)の家系を解析することにより同定された。OPTNはNuclear factor kappa Bの活性に影響を及ぼし、TFGはALS関連タンパク質の細胞内輸送に影響を及ぼすことが明らかとなった。こうした治験は今後の治療戦略を立てる上で極めて重要であり、iPS細胞やモデル動物を対象にドラッグスクリーニングを行えば、日本発の革新的治療の開発に繋がると考えられる。

研究分担者：梶 龍児

所属機関名：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 臨床神経科学分野

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)をはじめとする運動ニューロン病の治療開発のためには、運動ニューロン死に至る病的な生化学カスケードを解明する必要がある。病的生化学的カスケードを抑制する、もしくは活性化することにより進行を抑制する治療法を開発することが可能となる。遺伝子異常による運動ニューロン病を解析することで、孤発症例にも共通の病態を明らかにすることができる可能性があり、治療法開発の上では最重要である。本研究目的として、遺伝子異常が疑われる家族性運動ニューロン病を対象に、連鎖解析、大規模シーケンス解析を行い、病的生化学的カスケードを明らかにすることである。

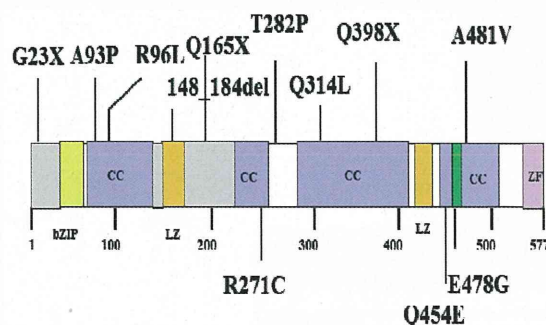
B.研究方法

血族婚家系で見られた筋萎縮性側索硬化症(ALS)、および沖縄および関西地方に存在するHMSN-P家系を対象に臨床遺伝学的研究を行った。全ゲノムの一塩基多型Single Nucleotide Polymorphism(SNP)やマイクロサテライトを用いて連鎖解析およびハプロタイプ解析を行った。さらに全ゲノムエキソームシーケンス解析を行った。原因遺伝子を同定した後、シーケンス対象を孤発性ALSまで広げ解析を行った。バイオインフォマティクス解析や培養細胞における発現実験を行い、ALSで判明している病態とオーバーラップがないか、新規の病態メカニズムがないかを検討した。本

研究における患者に対する説明と同意の取得法、サンプル採取のプロトコル・患者の個人情報保護は、徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会において審議され承認されている(平成23年7月12日付け、「神経・筋疾患における遺伝子解析」)。遺伝子組換え実験は、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会において承認を受けている(平成23年8月2日承認、承認番号(第23-58号))。

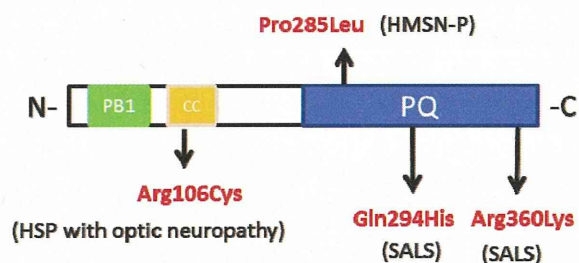
C.研究結果

血族結婚症例で共通に見られたホモ接合体領域を第10番染色体上に見出した。候補遺伝子のシーケンス解析によりOptineurin (OPTN)遺伝子に欠失変異が認められた。さらに解析対象を孤発例まで広げた結果、10以上の変異が確認された。またその後、日本人のみならず白人においても変異は報告された。

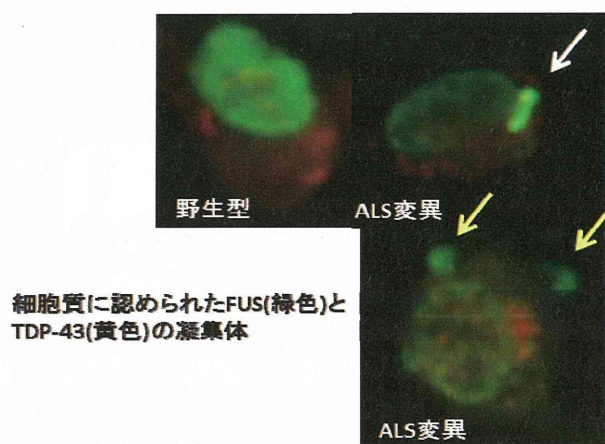


エクソン欠失変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異が確認され、培養細胞に発現させた機能解析実験によりNuclear factor kappa Bの抑制効果に変異に

より消失していることが確かめられた。また、剖検組織を使った免疫組織化学的検索において、抗OPTN抗体陽性細胞質内封入体が認められた。HMSN-P家系においては、第3番常染色体長腕に存在するTRK-fused gene (TFG)にミスセンス変異Pro285Leuが見出された。コドン285Proは種を超えて進化の上で温存されており、機能予想プログラムでは病的な意義があることが示唆された。また、この変異は健常コントロールには存在しておらず、データベースにも登録されていなかった。興味深いことに、沖縄、関西家系では同じ変異を有していた。ハプロタイプ解析より共通の創始者が存在していることよりも、2人の独立した創始者が存在することが示唆された。ALS患者を対象にシーケンス解析を広げた結果、孤発性ALS(SALS)で2つのミスセンス変異を見出した。HMSN-Pで見つかった変異と同様、変異はPQドメイン内にあった。



ALS患者で見つかった変異を培養細胞にて発現させ、ALS関連タンパクであるFUS (Fused in Sarcoma), TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43), Optineurin (OPTN)の細胞内局在の変化を観察したところ、FUS, TDP-43の局在の変化が認められた。本来、核内に多く発現している蛋白質が細胞質内に凝集体を形成するように存在していることが確認された。



D. 考察

OPTNは当初、家族性正常眼圧緑内障の原因遺伝子として報告されていた。今回見出されたALS変異はNuclear factor kappa B活性に特異的に影響を及ぼしていることが分かった。家族性正常眼圧緑内障変異にはその影響が認められず、Nuclear factor kappa B活性はALS発症の主要なメカニズムであると考えられた。

HMSN-Pで原因遺伝子として見つかったTFGは小胞体-ゴルジ体における細胞内輸送に関与していることが線虫における研究で明らかになっている。TFG-HMSN-P患者の病理では、TFGおよびTDP-43の細胞内凝集が認められている。今回見つかったALS患者の変異はFUSの細胞内局在に変化が認められた。変異によってALS関連蛋白の細胞内局在が変わる可能性が推測され、さらに表現型に影響を及ぼしている可能性がある。

E. 結論

OPTNとTFGの発見により、これまで知られていなかった異常な生化学的カスケードが運動ニューロン病で明らかになった。そしてNuclear factor kappa B活性を調整する、あるいはTFG凝集抑制といった修飾治療(disease modifying therapy)の可能性が明らかになった。

F. 健康危険情報

無

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamada M, Izumi Y, Ayaki T, et al. Clinicopathologic features of autosomal recessive amyotrophic lateral sclerosis associated with optineurin mutation. *Neuropathology*. Jul 29 2013.
2. Hiroyuki Ishiura, Wataru Sako, Mari Yoshida, Toshitaka Kawarai, Osamu Tanabe, Jun Goto, Yuji Takahashi, Hidetoshi Date, Jun Mitsui, Budrul Ahsan, Yaeko Ichikawa, Atsushi Iwata, Hiide Yoshino, Yuishin Izumi, Koji Fujita, Kouji Maeda, Satoshi Goto, Hidetaka Koizumi, Ryoma Morigaki, Masako Ikemura, Naoko Yamauchi, Shigeo