

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））

総合研究報告書

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究班

研究代表者 小久保 康昌

三重大学大学院地域イノベーション学研究所

研究要旨

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia in Kii peninsula; Kii ALS/PDC、牟婁病)は、中枢神経系へのリン酸化タウの集積を特徴とし、家系内集積性を有する原因不明の神経変性疾患であり、疾患の病態やスペクトラムについても未だ明らかとなっていない。したがって、本研究では、Kii ALS/PDC の key pathology であるタウオパチーを主軸とした検討を、生化学的な側面と併せて行い、病態や原因の解明及び治療の標的につながる糸口を神経病理学的側面から明らかにすることを目的とした。結果、Kii ALS/PDC において、ghost tangle や pre-tangle といった神経原線維変化の多発に加え、嗜銀顆粒と、特徴的なグリア病理の存在を明らかにした。また、特徴的なグリア病理が、タウ免疫プロットにおける4リピートタウの蓄積に影響を与えていると考えられた。更に、Kii ALS/PDC 患者小脳での広範な AT-8 陽性所見の分布を確認し、これまでに一部の進行性核上性麻痺症例にのみ報告のあるブルキンエ細胞におけるリン酸化タウの蓄積を認めた。また、小脳における多彩なグリア病変も合わせて存在することを確認した。但し、紀伊半島における新規遺伝子変異 ALS 例において特徴とされるユビキチン、p62 及びユビキリン2 蛋白の小脳での蓄積は確認できなかった。本研究により、Kii ALS/PDC における中枢神経内でのタウオパチーの分布や性質、並びに他のタウオパチーとの異同について詳細に明らかにし得た。

研究分担者氏名：村山繁雄

所属機関名：東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク、神経内科

A. 研究目的

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (amyotrophic lateral sclerosis/parkinson dementia complex; Kii ALS/PDC、牟婁病) は、中枢神経系へのリン酸化タウの集積を特徴とし、家系内集積性を有する原因不明の神経変性疾患であり、疾患の病態やスペクトラムを明らかにするためには他のタウオパチーであるアルツハイマー病、皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、或いは前頭側頭型認知症などの神経病理学的異同も重要な点である。本研究では、Kii ALS/PDC の key pathology であるタウオパチーを主軸とした検討を、生化学的な側面と併せて行うことを目的とする。本疾患の側頭葉を用いたタウ免疫プロットによる過去の検討では、tau isoform がアルツハイマー病パターン(3 repeat (3R)= 4 repeat (4R))を示すと報告されている。(Itoh N et al. 2003) 今回新たに最近例9例につ

いて免疫プロットを施行したところ、ほぼ4Rパターン1例、3R<4Rパターン3例、3R=4R(ADパターン)5例と、結果に多様性が見出された。牟婁病のタウオパチーについて、第一に、免疫プロットと組織病理学的所見を対応させることで、AD老年性変化との類似と相違を明らかにする。更に、2012年に古座川流域のALS例の一部にC9ORF72遺伝子変異が見つかり、昨今小脳病変が注目されている (Ishiura H et al. 2012)。三室らによる小脳のリン酸化タウ病変の報告はあるものの、免疫染色を含め詳細な検討はなされていない。したがって、Kii ALS/PDC におけるタウオパチーの広がり、並びに小脳病変を詳細に検討した。また、ユビキチン、p62 及びユビキリン2 蛋白についても併せて検討を行う。

B. 研究方法

対象は、臨床診断基準（日本神経学会ガイドライン）に従いKii ALS/PDC と診断された多発地区患者の連続開頭剖検例10例（平均年齢69.6歳：60-77歳、女性7人）とした。タウ免疫プロットについては、凍結側頭葉皮質使用し、Hasegawa

M, et al, Brain 2007 のプロトコールに準じて施行した。組織学的検索について、反対固定側海馬・側頭葉（免疫プロットに対応する部位）及び小脳ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6 μ m/9 μ m 厚連続切片を作成した。免疫プロットで4Rほぼ単独を示した1例については、保存全ブロックを使用した。通常染色（H.E. K.B. 染色）、Gallyas-Braak 鍍銀染色（GB）に加え、抗リン酸化タウ（AT-8 Pser242）、抗コピキチン抗体、抗p62抗体、抗コピキリン2抗体、抗カルバインゲン抗体を用いて、Ventana NX20 自動免疫染色により検討を行った。コントロールとして、高齢者ブレインバンク凍結半脳保存連続登録892例を使用した。また、免疫プロットに対応する固定側中側頭回にてタウ病変について以下の半定量的評価を行った（Fig.1）。倫理面において、本研究は国立大学法人三重大学及び独立行政法人東京都健康長寿医療センターにおける倫理委員会にて承認を得ている。個人情報に関しては、連結可能匿名化を行い、厳重に管理を行っている。また、患者または家族へのインフォームドコンセントを行い、同意を取得している。

C. 研究結果

タウ免疫プロットと臨床型分類との対比では、
 4R dominant 1例：PDC with ALS； 3<4R 3
 例：PDC with ALS 1例、ALS 1例、ALS with D

(Dementia) 1例、 3+4R (AD型) 5例：PDC with ALS 1例、PDC 2例、ALS 2例であった（Fig.2）。プロット陽性9例の海馬において、多数のghost tangle (GT)、神経原線維変化 (NFT)、pretangle (PT)、嗜銀顆粒 (AG)を認めた。更に、Gallyas陰性 AT-8陽性の星状膠細胞の斑状構造を認めた（Table 1, Fig.3a,b）。免疫プロットにてAD型を示した群は、GTの出現がより広範であった。NFT及び特徴的なグリア病変を半定量的に評価した結果、NFTをAD型でより豊富に認めた。また、嗜銀顆粒やグリア病変が免疫プロットで4RタウがADに比べ多い群が存在する根拠をなす可能性があることを確認した。更に、小脳における検討については全例にトルペド及びグルモース変性を認め、8例(80%)には多核或いは異常局在を示すプルキンエ細胞を見いだした（Fig.4）。リン酸化タウ陽性構造物は、白質及び歯状核には全例（Fig.5）、プルキンエ細胞には5例(50%)に存在した（Fig.6）。この5例はPDCの表現型を有し、ALS単独例に比して病変が強い傾向があり、バークマングリアやゴルジ細胞にリン酸化タウの蓄積を認め（Fig.7）、分布の多様性を示した（Table 2）。全例小脳症状は認めなかった。コピキチン関連蛋白に対する免疫染色は全例で陰性であった。



Figure 1. タウオパチーの組織学的半定量的評価基準

神経原線維変化；GB and AT-8 NFT score: none : 0, Sparse : 1 - 5, Moderate : 6 - 15, Frequent : 16 - ($\times 100$)、グリア病変 (Patchy astrocytic structure) ; 0, \pm : 1 - 5, 1+ : 6 - 9, 2+ : 10 - ($\times 100$)、嗜銀顆粒 ; 0, \pm : 1 - 19, 1+ : 20 - 49, 2+ : 50 - 99, 3+ : 100 - ($\times 400$)

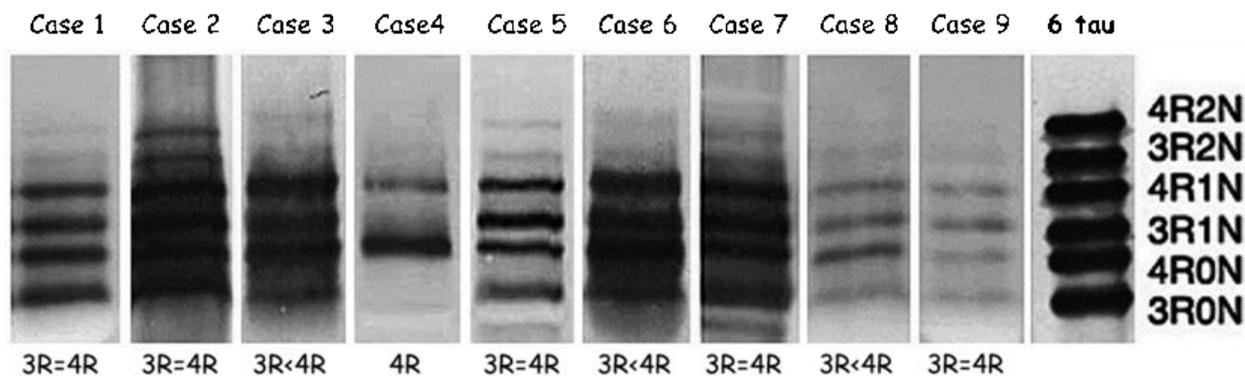


Figure 2. The tau isoform patterns of western blotting in nine Kii ALS/PDC cases. The right end ladder is examples of six tau isoforms

Case	Age/ Gender	Duration of illness, y	Clinical symptoms			ALS pathology	Middle temporal cortex (MT)					Blotting type
			P	D	A		AG	Subpial thorn	Patchy astrocytic structure	NFT score	AT-8 NFT score	
1	75 M	7	+	+	-	-	±	±	±	Frequent	Frequent	3R=4R
2	70 F	11	+	+	-	-	1+	+	±	Frequent	Frequent	3R=4R
3	60 F	8	+	+	+	+	±	+	2+	Moderate	Moderate	3R<4R
4	70 F	12	+	+	+	+	2+	+	±*	Moderate	Frequent	3R<4R
5	76 F	6	+	+	+	+	1+	-	±	Moderate	Frequent	3R=4R
6	77 M	7	-	+	+	+	±	+	1+	Sparse	Moderate	3R<4R
7	63 F	4	-	-	+	+	1+	+	1+	Frequent	Frequent	3R=4R
8	70 F	13	-	-	+	+	±	+	-	None	Sparse	3R<4R
9	70 F	10	-	-	+	+	-	+	±	Moderate	Frequent	3R=4R

* Many astrocytic plaque like structures were detected in case 4.

Table 1. The summary of clinical characteristics and neuropathological findings in nine Kii ALS/PDC cases.

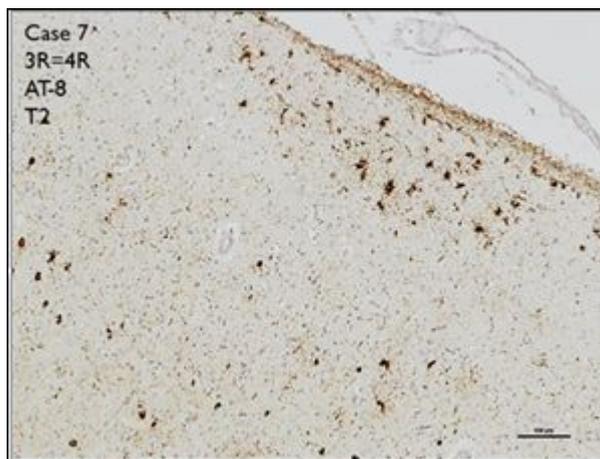
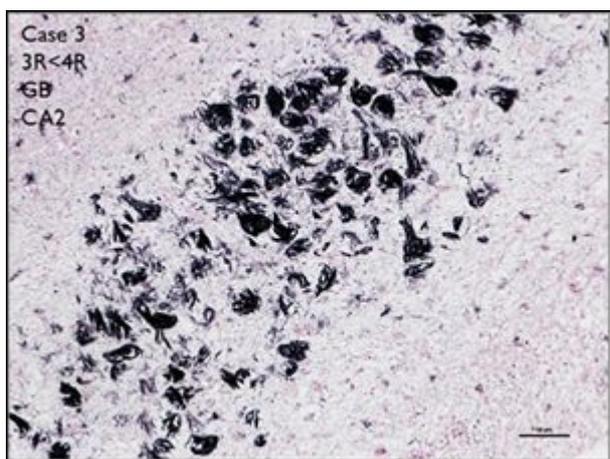


Figure 3a. Typical histopathological findings of Kii ALS/PDC in this study. Numerous tangles in hippocampus of case 3, AT-8 positive subpial thorn shaped astrocyte in case 7.

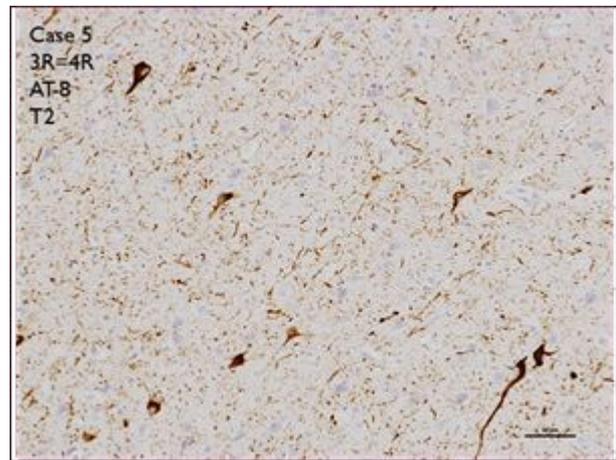
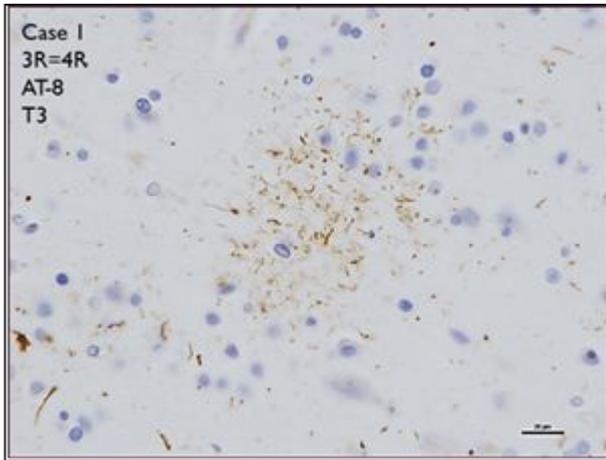


Figure 3b. Typical histopathological findings of Kii ALS/PDC in this study. AT-8 positive but GB negative patchy astrocytes in white matter of case 1 and many argyrophilic grains in case 5.

Case	Age	Sex	DOI (year)	Phenotype			Types of degeneration				Tau pathology					
				A	P	D	Dislocation of PCs	Multinucleus of PCs	Torpedo	Grumose degeneration	Cortex			WM		DN
											PCs	ML	GL	L	D	
Case 1	63	F	4	+	-	-	+	-	+	+	-	+	±	+	+	+
Case 2	70	F	13	+	-	-	+	-	+	+	-	-	±	-	±	±
Case 3	70	F	10	+	-	-	-	-	+	+	-	±	-	+	±	+
Case 4	77	M	7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 5	65	M	3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 6	76	F	6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Case 7	70	F	12	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 8	60	F	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 9	75	M	7	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	±	+
Case 10	70	F	11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

DOI: Duration of the illness

A: amyotrophy, P: parkinsonism, D: dementia

PCs: purkinje cells, ML: molecular layer, GL: granular layer, WM: white matter (L: lobe, D: deep), DN: dentate nucleus

±: quite a few neuropil threads without inclusions

*: severe white matter pathology

Table 2. Clinical profiles, neuropathological abnormality and distribution of tau pathology in the patients with Kii ALS/PDC

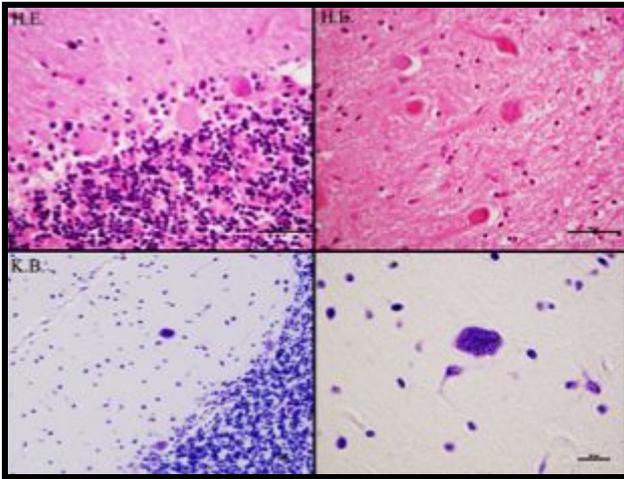


Figure 4 . In all cases, torpedoes and grumose degenerations are seen. There are multinucleated and dislocated Purkinje cells in the molecular layer of six cases.

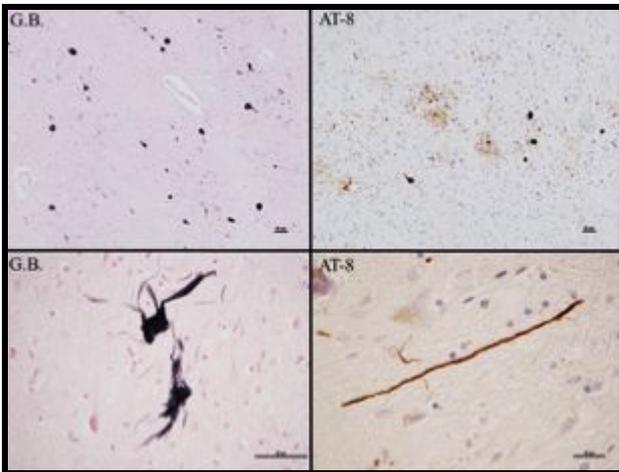


Figure 5 . In the dentate nucleus, there are a lot of NFTs and some coiled body. With AT-8 staining there are the neuropil threads, patchy astrocytes, and some long neuritis.

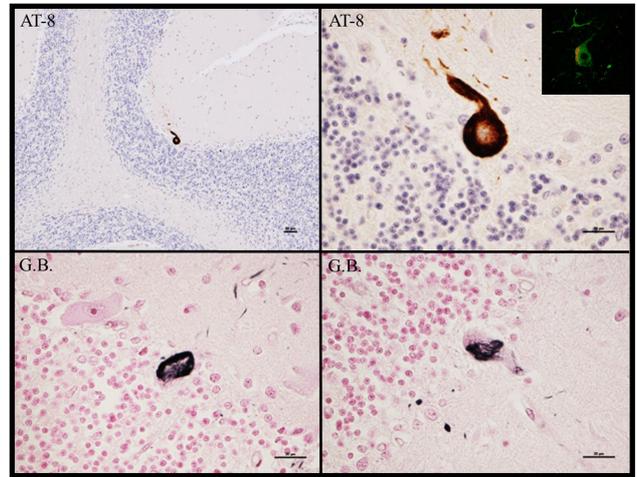


Figure 6 . A few Purkinje cells have AT-8 positive granular, filamentous, or aggregated structures. And the structures extend to the neurite. Fluorescent double staining of anti-phosphorylated tau and calbindin antibodies shows co-localization of them. By Gallyas-Braak silver staining, Purkinje cells have an argyrophilic profile.

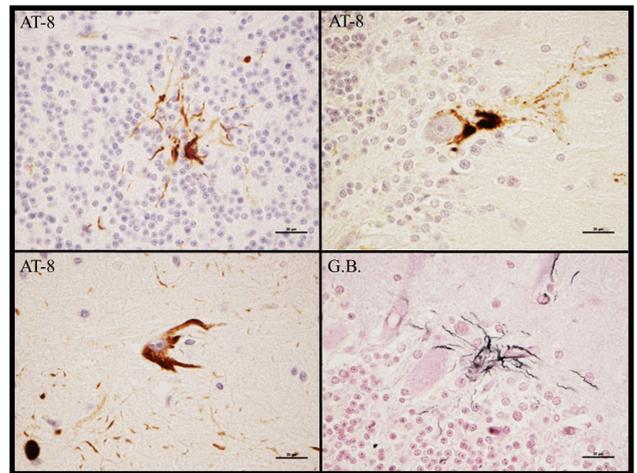


Figure 7 . There are AT-8 positive findings in a Bergmann like glia, projections of astrocyte and golgi cell in the granular cell layer.

D.考察

Kii ALS/ PDC において、NFT の多発に加え、嗜銀顆粒及び特徴的なグリア病理の存在を明らかにし、それらが免疫プロットにおける 4R tau の蓄積に影響を与えていると考えられた。また、白木、八瀬らは、Guamanian 及び Kii ALS/PDC において、多核かつ異常局在を示すプルキンエ細胞が存在すると報告した(Shiraki and Yase. 1991)。

三室らは、Kii ALS/PDC では主として歯状核に NFT が出現すると報告している(Mimuro M. 2007)。今回の検討では、Kii ALS/PDC 患者小脳での広範な AT-8 陽性所見の分布を確認し、これまでに一部の進行性核上性麻痺症例にのみ報告のあるプルキンエ細胞におけるリン酸化タウの蓄積を認めた。また、多彩なグリア病変も合わせて存在することを確認した。

E. 結論

Kii ALS/PDC における中枢神経内でのタウオパチーの分布や性質、並びに他のタウオパチーとの異同について、詳細な神経病理学的検討により明らかにし得た。

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

1. Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T. Enhanced antigen retrieval of amyloid β immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid β pathology in Alzheimer disease and its mouse model. *J Histochem Cytochem.* 2012 Oct;60(10):761-9.
2. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet.* 2012 Aug 10;91(2):320-9.
3. Saito Y, Inoue T, Zhu G, Kimura N, Okada M, Nishimura M, Kimura N, Murayama S, Kaneko S, Shigemoto R, Imoto K, Suzuki T. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and A β generation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2012 Oct 3;7:50.
4. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain.* 2012 Nov;135(Pt 11):3380-91.
5. Murayama S, Saito Y. [Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis in relation with pathological pattern of propagation]. *Rinsho Shinkeigaku.* 2012;52(11):1066-7.
6. Hasegawa M, Nonaka T, Suzukake M, Tsuji H, Tamaoka A, Yoshida M, Murayama S, Arai T, Akiyama H. [Prion-like protein propagation in neurodegenerative diseases]. *Rinsho Shinkeigaku.* 2012;52(11):1325-6.
7. Kokubo Y, Nomura Y, Morimoto S, Kuzuhara S. Cardiac ^{123}I -meta-iodobenzylguanidine scintigraphy in patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:306-8.
8. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraiishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S. α -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 Jul;71(7):625-30.
9. Kamiya H, Murayama S, Funabe S, Saito Y, Fukuda T. [An 87-year-old Man with Mild

- Cognitive Impairment, Accompanying Possible Drug-induced Parkinsonism]. *Brain Nerve*. 2012 Dec;64(12):1435-42.
10. Tuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome Integrity is Defective in the Motor Neuron Diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med*. 2012 Dec 19.
 11. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J. Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. *Amyotroph Laterl Scler*. 2012;13:562-6.
 12. Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y and the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Altered γ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*. 2012;4:344-52.
 13. Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima M, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama S, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H. Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology*. 2012;32:593-603.
 14. Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, Murayama S, Ihara Y; The Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Suspected limited efficacy of γ -secretase modulators. *Neurobiol Aging*. 2013 Apr;34(4):1101-1104.
 15. Funabe S, Takao M, Saito Y, Hatsuta H, Sugiyama M, Ito S, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Hattori N, Murayama S. Neuropathologic analysis of Lewy-related alpha-synucleinopathy in olfactory mucosa. *Neuropathology*. 2012;33:47-58.
 16. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann D. M, Akiyama H and Hasegawa M. Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep*. 2013;4:124-34.
 17. Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G and Yamanaka K. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med*. 2013;5:221-34.
 18. Fujita K,¹ Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H. Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt Jakob disease. *BMJ Open Journal*. 2013 (in press).
 19. 白井慎一, 高橋育子, 加納崇裕, 佐藤和則, 久保田佳奈子, 矢部一郎, 村山繁雄, 佐々木秀直. 長大な脊髄病変を伴い multiple biopsies にて組織診断された血管内リンパ腫の 1 例.

2.学会発表

1. 森本悟, 小久保康昌, 齊藤祐子, 長谷川成人, 葛原茂樹, 村山繁雄: 牟婁病におけるタウオパチーの、免疫化学的・免疫組織化学的研究. 第 53 回日本神経病理学会学術研究会 新潟. 2012.06.28-30.
2. 小久保康昌, 谷口彰, 長谷川成人, 早川雄馬, 森本悟, 齊藤祐子, 村山繁雄, 葛原茂樹: 紀伊 ALS/PDC における α -synuclein 病理. 第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ) 京都. 2012.10.11-13.
3. 村山繁雄, 高尾昌樹, 初田裕幸, 隅蔵大幸, 鈴木衣子, 野上茜, 伊藤慎治, 内野彰子, 木村有希, 小幡真希, 金丸和富, 小宮正, 仁科裕史, 椎名盟子, 砂川昌子, 広吉祐子, 江口桂, 森本悟, 徳丸阿耶, 石井賢二, 古田光, 新井富生, 赤津博康, 齊藤祐子, 柳澤勝彦, 小尾智一, 本吉康史, 清水潤, 池村雅子, 竹内壮介, 猪狩亨, 今福一郎, 角田幸夫, 福武敏夫, 星和栄, 西山和利 三上哲夫, 和泉雅信, 坂下直美, 東原真奈, 河合俊明, 岩田信恵, 相田真介: 「高齢者ブレインバンクプロジェクト」. 第 2 回 TOBIRA 研究交流フォーラム 東京. 2013.02.05.
4. 村山繁雄, 小幡真紀, 高尾昌樹, 初田裕幸, 隅蔵大幸, 鈴木衣子, 野上茜, 伊藤慎治, 内野彰子, 木村有希, 金丸和富, 小宮正, 仁科裕史, 椎名盟子, 砂川昌子, 広吉祐子, 江口桂, 森本悟, 徳丸阿耶, 石井賢二, 古田光, 新井富生: 「東京都健康長寿医療センターバイオリソースセンターの構築」. 第 2 回 TOBIRA 研究交流フォーラム 東京.2013.02.05.
5. 小久保康昌, 森本悟, 米田操, 広川佳史, 白石泰三, 長谷川成人, 村山繁雄, 葛原茂樹: パーキンソニズムで発症し、PDD との鑑別を要した紀伊 PDC の 1 例. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 東京. 2013.04.24-26.
6. 森本悟, 初田裕幸, 小久保康昌, 葛原茂樹, 村山繁雄: 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Kii ALS/PDC、牟婁病) における小脳の免疫組織化学的検討. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 東京. 2013.04.24-26.
7. 村山繁雄, 小幡真紀, 高尾昌樹, 初田裕幸, 隅蔵大幸, 鈴木衣子, 野上茜, 伊藤慎治, 内野彰子, 木村有希, 金丸和富, 小宮正, 仁科裕史, 椎名盟子, 砂川昌子, 広吉祐子, 江口桂, 森本悟, 徳丸阿耶, 石井賢二, 古田光: 老化に伴う認知・運動機能障害克服のための包括的研究リソース構築. 第 54 回日本神経学会学術大会 東京. 2013.05.29-06.01.
8. 森本悟, 初田裕幸, 小久保康昌, 葛原茂樹, 村山繁雄: 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Kii ALS/PDC、牟婁病) における小脳の免疫組織化学的検討. 第 54 回日本神経学会学術大会 東京. 2013.05.29-06.01.
9. Morimoto S, Kokubo Y, Hasegawa M, Shigeki K, Murayama S: Immunohistochemical study and western blotting of tauopathy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ parkinson dementia complex (PDC), Kii, Japan. [Annual Meeting 2012 of the American Association of Neuropathologists, Cicago]
10. Murayama S, Morimoto S, Kokubo Y, Kihira T, Yoshida Y, Yoshida M, Takahashi H, Kuzuhara S: Establishment of pathology center for amyotrophic lateral sclerosis/ parkinson disease complex in Kii Peninsula. [Alzheimer's Association International Conference 12th, Vanccouver].
11. Morimoto S, Hatsuta H, Kokubo Y, Shigeki K, Murayama S: Immunohistochemical study of the cerebellum in amyotrophic lateral scerosis (ALS)/ parkinson-dementia complex (PDC) in Kii peninsula

(ALS/PDC- Kii, Muro disease).
Alzheimer's & Dementia: The Journal of
the Alzheimer's Association, 2013;
9(Supple): S336 [Alzheimer's Association
International Conference 13th, Boston].

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

特記事項なし