

神経変性疾患の臨床診断の精度上昇への取り組み

小野寺 理¹⁾

下畑享良¹⁾，豊島靖子²⁾，金澤雅人¹⁾，西澤正豊¹⁾，高橋均²⁾，柿田明美²⁾，饗場郁子³⁾，池内健⁴⁾，村山繁雄⁵⁾，森田光哉⁶⁾，徳田隆彦⁷⁾，瀧川洋史⁸⁾，中島健二⁸⁾，横山裕一²⁾，石原 智彦⁹⁾，小山 哲秀¹⁰⁾，他田 真理²⁾，熱田 直樹^{11) 12)}，祖父江 元^{11) 12)}

1)新潟大学脳研究所神経内科，2)同病理学，3)独立行政法人国立病院機構東名古屋病院神経内科，4)新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター遺伝子機能解析学，5)東京都健康長寿医療センター，6)自治医科大学内科学講座神経内科学部門，7)京都府立医科大学大学院医学研究科分子脳病態解析学，8)鳥取大学医学部脳神経内科 9) 同分子神経疾患資源解析学科，10) 同 システム脳病態学分野，11) 名古屋大学 12) JaCALS 事務局

研究要旨

本研究では、変性疾患の診断精度を上げるための包括的な試みを3つの疾患にて行った。まず、小脳性運動失調が目立つ進行性核上性麻痺 progressive supranuclear palsy with predominant cerebellar ataxia (PSP-C) の臨床像を明らかにし、臨床診断基準を作成した。病理学的に診断が確定した PSP-C 4 例と、臨床的に鑑別を要する多系統萎縮症 (MSA-C) 11 例の臨床像の比較を行った。この結果、PSP-C は成人発症、緩徐進行性で、体幹および四肢の小脳性運動失調、垂直性核上性注視麻痺、転倒を伴う姿勢保持障害を呈するものの、自律神経障害や hot cross bun sign を認めない疾患と考えられた。以上を踏まえ、臨床診断基準案を作成した。PSP の臨床病理学的スペクトラムは広く、次に、その組織学的病変分布とタウ蓄積アストロサイトの形態から、連続性を示す3群 (typical PSP、PNLA type1、PNLA type2) を見出し、その臨床症状上の特徴を抽出した。さらに筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、ALS の鑑別において、SMA type4 の重要性は低いことを示し、本邦においても SMN2 の遺伝子量多型と ALS の発症に関連がある事を示した。

本研究では、変性疾患の新たな診断分類、その症状に寄与する因子を同定することを目的とした。

初年度は、進行性核上性麻痺の新たな疾患分類として、初期から小脳性運動失調が目立ち、経過中、脊髄小脳変性症と臨床診断されている進行性核上性麻痺の一群 progressive supranuclear palsy with predominant cerebellar ataxia (PSP-C) (Kanazawa M et al. Mov Disord 24:1312-1318, 2009; Kanazawa M et al. Parkinsonism Relat Disord 19:1149-51, 2013) の臨床像を明らかにし、臨床診断基準を作成することを目的とした。

次年度は PSP の亜型と考えられている Pallido-

の予後に関わる因子を抽出することを目的とした。

最終年度は、代表的な成人発症の運動神経疾患である、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) について、代表的な下位運動ニューロン疾患: Lower motor neuron disease (LMND) である脊髄性筋萎縮症: Spinal muscular atrophy (SMA) の原因遺伝子 Survival motor neuron: SMN の copy 数多型: copy number status (CNS) の関連について検討した。

B. 研究方法

臨床的に鑑別を要する MSA-C と臨床像の比較を行った。具体的には、病理学的に診断が確定した PSP-C 4 例と MSA-C 11 例の臨床像を、診療録を用いて後方視的に比較した。病初期の鑑別が可能か検討することを目的として、発症から 2 年以内の臨床像を比較した。また頭部 MRI 所見についても検討を行った。

また PNLA に関しては PSP 関連疾患と病理診断された連続剖検例 PSP 関連疾患 40 剖検例を対象として検討した。

ALS については Droplet digital PCR (ddPCR) を用いて、SMN1,2 遺伝子の CNS を測定した。本邦の ALS データバンク JaCALS および当施設保有遺伝子検体から ALS 503 例、コントロール 399 例の解析を行った。

本研究はいずれも新潟大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

PSP-C は MSA-C と比較して、高齢で発症し (68.8 ± 4.4 歳 vs. 58.3 ± 7.4 歳; $P=0.009$), 垂直性核上性注視麻痺の頻度が高く (75% vs. 0% ; $P=0.011$), 発症 2 年以内の転倒も多かった (100% vs. 27.3% ; $P=0.026$)。また Gilman 分類を満たす著明な自律神経障害を認めなかった (0% vs. 90% ; $P=0.035$)。頭部 MRI では小脳は均整を保ったまま萎縮し、橋小脳槽の拡大を認めた (図 1)。進行期には第 4 脳室の開大も認めたが、hot cross bun sign を認めた症例はなかった。

以上を踏まえ、以下の臨床診断基準案を作成した。必須項目を、(A) 緩徐進行性、(B) 40 歳以上の発症、(C) 垂直性核上性注視麻痺、(D) 発症 2 年以内の体幹かつ四肢の小脳性運動失調、(E) 発症 2 年以内の転倒を伴う姿勢保持障害とし、除外項目を、著明な自律神経異常症と、頭部 MRI で hot cross bun sign とした。自律神経異常症は Gilman 分類の probable MSA に従い、尿失禁 (男

性では陰萎を伴う)、もしくは起立性低血圧 (起立後 3 分以内の収縮期 30 mmHg または拡張期 15 mmHg 以上の低下) の少なくともひとつを認めることとした。Probable PSP-C は A, B, C, D, E のすべてを認める症例とし、possible PSP-C は A, B, D, E を認める症例とした。

PNLA については、本症のタウ関連病理に関して、まず 2 種類のタウ陽性アストロサイト (TA と eTA) を同定した。TA と比較して、eTA は、形態が不規則で核近傍に短く太い突起様にタウの蓄積が観察された。G-B 銀染色によるアストロサイトの病理組織像により、40 例を 2 群に分類し、それぞれ TA 群 ($n=22$, 男 13/女 9) と eTA 群 ($n=18$, 男 8/女 10) とした。

AT8 陽性 TA は、細長い放射状の突起様構造を示し、eTA は、短く太い構造を示した。IMARIS を用いて同一サイズのボクセル内で測定した。AT8 陽性構造物の比較では、TA が eTA より有意に大きく、それを構成する粒子の大きさが小さく数が多いという結果を得た。

免疫電子顕微鏡像では、TA 群では AT8 陽性構造が核から遠位に伸びる細長い突起として観察された。一方 eTA 群では AT8 陽性構造が核近傍に集中していた。電子顕微鏡強拡大像では、両群で約 $10-13$ nm 径の細管構造 (straight tubules) から成る繊維束が認められた

eTA 群は全体にタウ病理の程度が軽いという特徴があり、その中には病変が PNL に限局する症例と、PNL を超えて病変が広がっている症例があることがわかった。タウ病変分布によりクラスター解析を行った結果、運動野、橋核、小脳歯状核などのタウ病理の強さによって、eTA 群が 2 群に分類された。本研究では、この 2 群を PNLA type1、type2 とした。

TA 群は eTA 群に比べ運動野、中脳被蓋、橋核、小脳歯状核の神経細胞脱落とタウ関連病理の

程度が強かった一方、淡蒼球・黒質・視床下核（PNL）では、神経細胞脱落の程度が PNLA type1, 2 群が PSP 群より強かった。既報で PNLA の特徴とされているスフェロイドの出現は各群で差を認めなかった

発症後 2 年以内の認知機能障害は、TA 群で有意に多くみられた ($p < 0.05$)。開眼失行を含む開眼困難は PNLA type1 群に優位に多く認められた ($p < 0.05$)。統計学的有意差を認めなかったものの、PSP の古典的症状である垂直方向眼球運動制限、転倒、姿勢反射障害、寡動は初期の段階で TA 群に多い傾向があった。一方で、振戦とすくみ足は全経過中で eTA 群に多い傾向があった。発症から歩行不能（車イス）になるまでの生存期間中央値は PNLA type 1 群で有意に長かった ($p < 0.05$)。PNLA の臨床的特徴とされる表現形である純粋無動症（または predominantly akinesia）は、eTA 群のみで認められた。

脱リン酸化後の画分では、TA 群（PSP 群）、eTA 群（PNLA type 1, type2）ともに CBD と共通の 4R を示すバンドを認めた。脱リン酸化未処理の画分では、CBD では 37kDa のバンドパターンを示したのに対し、TA 群 と eTA 群の低分子量 C 未断片化は 33kDa の従来の PSP バンドパターンを示した。

ALS の解析では、ALS 診断群 503 例における、SMN1 CNS は 0 copy 0 例（0%）、1 copy 6 例（1.2%）、2 copy 470 例（93.4%）、3 copy 24 例（4.8%）、4 copy 3 例（0.6%）であった。

一方で SMN2 CNS は、SMN2 遺伝子を 1 copy のみ有する例は、ALS 診断群 で 191/503 例（38.0%）、コントロール群では 123/399 例（30.8%）であり、ALS 群で有意に多く認められた（オッズ比 1.37 : 1.04-1.81, $p = 0.03$ ）。

D. 考察

病理学的に診断が確定した PSP-C 4 例と、臨床

的に鑑別を要する多系統萎縮症（MSA-C）11 例の臨床像の比較を行い、その結果をもとに臨床診断基準案を作成した。しかし病理学的に診断が確定された PSP-C 症例は 4 例と少ないことから、今後、全国調査による症例の蓄積を行い、診断基準の検証を行う必要がある。

近年、Ahmed ら⁴⁾は 400 以上の PSP 連続剖検例のうち、PNL に強い変性を認めるものの、PSP で通常冒される運動野、線条体、橋核および小脳歯状核の変性とタウ蓄積が軽度にとどまる 8 症例を見だし、この群を PSP-PNLA として PSP の一亜系と位置づけた。Ahmed らはその病理組織学的特徴として軸索スフェロイドが淡蒼球と黒質に多数出現することと、少数の TA を認めたことを報告している。神経細胞脱落とタウ関連病理の強度に基づくと、PSP-PNLA は本研究の eTA 群に合致すると考えられた。Ahmed らは運動野や尾状核におけるタウ関連病理の強度が PSP と PSP-PNLA を区別する上で有用であるとしているが、本研究ではタウ関連病理の強さに加えてタウ陽性アストロサイトの形態の違いが PSP と PSP-PNLA を区別する上で重要であることが示唆された。さらに、本研究では軸索スフェロイドは PSP-PNLA（eTA 群）の特異的所見ではないと考えられた。

臨床データ解析の結果、eTA 群には早期発症、長期経過、運動機能が比較的保たれるという特徴が認められた。罹病期間の長さは、eTA 群において運動野の神経細胞脱落とタウ関連病理が軽度であることが関与している可能性が考えられる。また、eTA 群は病初期には PD と診断されやすく、純粋無動症がみられやすいという特徴は興味深い。

ALS と SMN の関係では、今回の検討では ALS 診断群には、SMN1 欠損例、すなわち SMA 症例は存在しなかった。今回の結果からは、高齢発症の SMA type4 が存在し ALS と診

断されることは極めてまれと考えられた。

一方で ALS 群では対照群と比して、*SMN2* 遺伝子コピー数の減少が有意に多く認められ、発症のリスクファクターであることが示唆された。

SMN2 遺伝子コピー数の減少は、SMN 蛋白質の発現量に影響する。今回の検討例で、*SMN* 遺伝子 CNS を基にして SMN 蛋白質発現量を計算し (Veldink, Neurology, 2005), ALS 群, コントロール群と比較すると、SMN 蛋白低下群は ALS 診断群で 207/503 例 (41.2%), コントロール群では 122/399 例 (30.6%) であり、ALS 群で有意に多く認められた (オッズ比 1.58 : 1.20-2.09 p=0.001)。

SMN CNS と ALS 発症については、海外において複数の報告があるが、一定していない (Wang, J Neurol Sci, 2015)。これは、*SMN* CNS に地域差が存在することも一因と考えられる (Sangare, Ann Neurol, 2014)。本邦においても、*SMN* CNS が ALS 発症に影響することが示された点は重要である。

また *SMN2* CNS と ALS 進行速度との関連が報告されている (Veldink, Neurology, 2005)。我々の検討した症例群においても、*SMN* CNS と ALS 進行速度との関連について検討を進めていく予定である。

E. 結論

本研究の結果、PSP-C は、成人発症、緩徐進行性で、体幹および四肢の小脳性運動失調、垂直性核上性注視麻痺、転倒を伴う姿勢保持障害を呈するものの、自律神経障害や hot cross bun sign を認めない疾患と考えられた。以上を踏まえ作成した診断基準案を用いて症例の蓄積を行い、診断基準の検証を行う必要がある。

PSP の臨床病理学的スペクトラムは広く、そ

の組織学的病変分布とタウ蓄積アストロサイトの形態から、連続性を示す 3 群 (typical PSP、PNLA type1、PNLA type2) の存在が示唆された。今回の研究では明らかにできなかったアストロサイトの形態の違いに関係する分子の探索や、予後を予測するために重要となる臨床症状上の特徴などをさらに検討する必要がある。

さらに ALS では、本研究の結果、ALS の鑑別において、SMA type4 の重要性は低いことが示された。一方で本邦においても *SMN2* CNS と ALS の発症に関連がある事が示された。今後は、*SMN* CNS と ALS 進行速度との関連について検討を進めていく

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi K, Mochizuki Y, Takeuchi R, Shimizu T, Nagao M, Watabe K, Arai N, Oyanagi K, Onodera O, Hayashi M, Takahashi H, Kakita A, Isozaki E. Clinicopathological characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis resulting in a totally locked-in state (communication Stage V). Acta Neuropathol Commun. 30;4(1) 107 2016
2. Jiang H, Shimizu H, Shiga A, Tanaka M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Familial amyotrophic lateral sclerosis with an I104F mutation in the SOD1 gene: Multisystem degeneration with neurofilamentous aggregates and SOD1 inclusions. Neuropathology. 37(1) 69-77. 2016
3. Takeuchi R, Tada M, Shiga A,

- Toyoshima Y, Konno T, Sato T, Nozaki H, Kato T, Horie M, Shimizu H, Takebayashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Heterogeneity of cerebral TDP-43 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for clinico-pathologic subtypes. *Acta Neuropathol Commun.* 23;4(1) 61 2016
4. Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. Increased cytoplasmic TARDBP mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43. *Nucleic Acids Res.* 8;44(12)5820-36. 2016
 5. Yokoyama Y, Toyoshima Y, Shiga A, Tada M, Kitamura H, Hasegawa K, Onodera O, Ikeuchi T, Someya T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Pathological and Clinical Spectrum of Progressive Supranuclear Palsy: With Special Reference to Astrocytic Tau Pathology. *Brain Pathol.* 26(2) 155-66. 2016
 6. Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Brice A, Takashima H, Kikuchi A, Aoki M, Ishiura H, Yasuda T, Date H, Ahsan B, Iwata A, Goto J, Ichikawa Y, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Hara K, Kakita A, et al. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2(4) 417-26. 2015
 7. Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M, Tanaka A, Ito C, Toshimori K, Ogawa N, Terashima T, Maegawa H, Yanagisawa D, Tooyama I, Tada M, Onodera O, Hayasaka K. A mutation of COX6A1 causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet.* 4;95(3) 294-300. 2014
 8. Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 40(6) 783-8. 2014
 9. Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S, Camu W, Neitzel B, Onodera O, van Rheenen W, Pinto S, Weber M, Smith B, Proven M, Talbot K, Keagle P, Chesi A, Ratti A, van der Zee J, Alstermark H, Birve A, Calini D, et al. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. *J Med Genet.* 51(6) 419-24. 2014
 10. Kimura T, Jiang H, Konno T, Seto M, Iwanaga K, Tsujihata M, Satoh A, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology.* 34(4) 392-7. 2014

2.学会発表

Shimohata T, Kanazawa M, Takahashi H, et al. Clinicopathological features and diagnostic criteria for progressive supranuclear palsy with predominant cerebellar ataxia (PSP-C). Cure PSP 2014, International Research Symposium (Baltimore)

第 55 回神経病理学会総会学術研究会 横山裕一
ら「Astrocyte におけるタウの蓄積像に着目した
PSP 関連タウオパチーの連続性について」
2014 年 6 月 東京

第 57 回 日本神経学会学術大会
Ishihara T, Toyoda S , Koyama A , et al. The
SMN gene copy number states in Japanese
ALS patients.

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

特になし .