

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20240037

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症と TDP-43：その病理像の全貌と分子病態機序の解明

研究課題名（英文）Amyotrophic lateral sclerosis and TDP-43: elucidation of the entire neuropathological picture and molecular pathomechanism

研究代表者

高橋 均 (TAKAHASHI HITOSHI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：90206839

研究成果の概要（和文）：我々は、臨床病理学的並びに免疫組織化学的に筋萎縮性側索硬化症剖検例を検討し、孤発性 ALS、は広汎な部位の神経細胞及びグリア細胞の双方を侵す TDP-43 プロテインパチーであることを示した。また、TDP-43 遺伝子改変マウスを作製し、ヒト患者凍結脳と併せ分子生物学的解析を行った結果、ALS は“TDP-43 の機能としての他の遺伝子に対する選択的スプライシングの異常、あるいは TDP-43 自身への選択的スプライシングの異常”によって引き起こされる可能性を示唆する今後に向けた予備的データを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We examined clinicopathologically and immunohistochemically a large series of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) cases, including those having long disease durations with artificial respiratory support. In each case, various brain regions were immunostained with an antibody against TDP-43, showing occurrence of TDP-43-positive neuronal (NCIs) and glial cytoplasmic inclusions in many regions, including the lower motor neuron nuclei. The results obtained indicate that SALS is a multisystem neuro-glial proteinopathy of TDP-43 and can show two pathological phenotypes (types 1 and 2; type 2 can be distinguished from type 1 by the presence of TDP-43-positive NCIs in the frontotemporal cortex, hippocampal formation, neostriatum and substantia nigra). We also generated a transgenic TDP-43 KO mouse model for further biochemical and molecular analyses on the pathomechanisms underlying SALS. The several data obtained strongly suggest that our next target is “splicing abnormalities of TDP-43”.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
総計	28,800,000	8,640,000	37,440,000

研究分野：神経病理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

2006年、Neumannら及び Araiらによって

ユビキチン陽性、タウ・シヌクレイン陰性の神経細胞内封入体を有する前頭側頭葉変性

症及び筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) において、その病的タンパクとして、正常では核内に存在する TDP-43 が同定された。我々は、その報を受けて、世界に先駆けて、この TDP-43 について孤発性及び家族性 ALS 剖検例を用いた免疫組織化学的研究を行い、その成果を発表した (Tan C-F et al., Acta Neuropathol 2007)。

2. 研究の目的

ALS は神経変性疾患の中でも代表格とされる難病である。本研究では、ALS における病的タンパクである TDP-43 の発現細胞、部位、程度を明らかにし、我々が示してきた孤発性 ALS の神経病理像 (Pioa Y-S et al, Brain Pathol 2003) と比較検討し、その全貌、つまり「ALS とはどのような疾患か」を明らかにするとともに、TDP-43 の関わる分子病態機序の解明を目指すものである。

3. 研究の方法

本研究所に長年にわたって収集・保存・管理されてきた多数の ALS 剖検例を用いて、病理組織学的、免疫組織化学的、生化学的、そして分子生物学的手法を駆使し、またそれらを専門とする研究者・連携研究者から成る共同研究体制下に研究を展開する。

4. 研究成果

(1) ALS における TDP-43 異常と臨床病理について。

①臨床病理学的に孤発性 ALS と診断された 35 症例 (人工呼吸器使用有、ARS⁺; 無、ARS⁻; 使用例は 10 年以上生存) を対象に、抗 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。その観察結果は、孤発性 ALS は広汎な部位の神経細胞及びグリア細胞の胞体内に TDP-43 の異常蓄積を認めるプロテオノパチーであることを示していた。



図 1. ALS 神経細胞 :

核内タンパク TDP-43 の核内→細胞質への変位と異常線維性凝集体の形成。

a 脊髄前角細胞、b 中脳赤核、c 延髄網様体。

統計学上、TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体の分布は 2 つの型に分けられた。1 型は脳幹・脊髄中心型、2 型は脳幹・脊髄に加え、大脳にも広汎に分布する型であった。ARS⁻および ARS⁺のいずれの症例も同じ 1 あるいは 2 型に分類され、2 型は認知症と有意な相関を

示した。

②下位運動ニューロン症状のみを認め、長期間生存し得た孤発性 ALS の 5 例を対象に免疫組織化学的検討を行った。通常の孤発性 ALS 群に比し、これらの症例では TDP-43 陽性神経細胞内封入体の数は明らかに少なく、その分布も限局性であった。また、アストロサイトと思われるグリア細胞内における異常 TDP-43 の蓄積は通常の ALS より目立ち、とくに変性の強い脊髄前角において著明であった。このような臨床型の ALS は、TDP-43 の動態から見ても通常の ALS とは異なっていた。

③人工呼吸器を使用し、長期生存し、臨床的に totally locked-in state へ移行した孤発性 ALS 1 剖検例の組織学的並びに免疫組織化学的検討を行った。上位・下位運動ニューロン系の変性は高度で、多くの部位の非運動ニューロン系でも高度であった。本例では、運動ニューロン系を含む多くに部位に TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体を認めた。それら個々の部位の変性の程度は強いが、TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体と神経細胞脱落の分布は孤発性 ALS の type 2 に相当した。つまり、本来 type 2 の TDP-43 陽性神経細胞胞体内封入体の分布を示す症例は人工呼吸器の導入後に本例のような多系統高度神経変性と totally locked-in state へ移行しえるものと考えられた。

以上、ALS は TDP-43 を指標とした場合、多系統変性症であり、病理学的には 2 つの型に分類可能であること、また、その病理型は、人工呼吸器による長期生存の影響を受けないことが示された。さらに、ALS には、TDP-43 異常が軽度で、臨床経過の長い亜型の存在が明らかとなった。

(2) 家族性 ALS の TDP-43 遺伝子異常について。

我々は、世界に先駆けて、非 SOD1、病理学的に孤発性 ALS と全く同様の像を呈する家族性 ALS の 1 家系 (Tagawa Aet al., Acta Neuropathol 2007; Tan C-F et al., Acta Neuropathol 2007) において、TDP-43 の遺伝子異常の存在することを見出した。

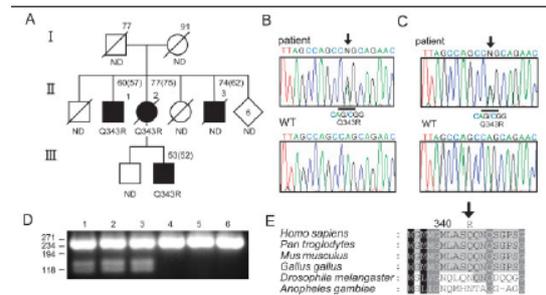


図 2. Q343R (A1028G) 変異を示す非 SOD1 家族性 ALS の 1 家系。

(3) ALS 以外の変性疾患である Machado-Joseph 病 (MJD) における TDP-43 の異常発現について。

遺伝性神経疾患のポリグルタミン病のひとつである MJD の 10 例を対象に脊髄・脳幹について TDP-43 の異常発現を免疫組織化学、生化学的に検討した。その結果、MJD の下位運動ニューロン胞体内のみに、選択的に TDP-43 が蓄積することが判明した。生化学的には、孤発性 ALS で認められる断片型 TDP-43 は検出されなかった。ALS における運動ニューロン変性・死における TDP-43 の病的メカニズムを考察する上で重要な新知見と考えられた。

(4) ALS の病態メカニズムに関する実験病理学的研究について—TDP-43 遺伝子改変マウスの作製—。

孤発性 ALS と同一の病理所見をもつ家族性 ALS に見いだされた変異型 TDP-43、Q343R 変異を導入したノックインマウスを作製した。12 ヶ月齢において、マウスは明らかな神経症状を示さず、また病理学的検索にても、神経細胞脱落や、異常凝集体を認めなかった。この結果より、変異型 TDP-43 による神経症状発症のためには、変異に加え、他の要因が必要であること、あるいはマウスモデルでは病態発症にさらに長時間を要すること、の 2 つの可能性が考えられた。

(5) ALS における TDP-43 異常に関する分子病理学的研究について。

① ALS 患者剖脳における TDP-43 スプライシングバリエーションの解析: TDP-43 のエクソン内でのスプライシングは、このエクソン内に、2 カ所にイントロンを形成することで制御されている。主なものは 1、5 番であり、1 番はナンセンス依存性分解機構で分解される。最初のイントロン 1 のスプライシングが極めて多様性に富むが、ここが正確なアクセプター、ドナーサイトを使用しない場合、イントロン 2 のスプライシングがおこらず、ナンセンス依存性分解機構が惹起されず、結果として、C 末の異なる TDP-43 が産生される。患者剖検例の脊髄由来 cDNA を検討し、これら C 末の異なる TDP-43 由来の mRNA の存在を確認した。

② TDP-43 のスプライシングを制御する因子の検討: mRNA 前駆体のスプライシングは mRNA 前駆体への抑制因子と促進因子の結合のバランスで制御されている。促進因子の代表的なものとして SC35、抑制因子としては hnRNP が挙げられる。TDP-43 のエクソン 6 はこれらの因子の結合領域を多く含む。元来 TDP-43 は hnRNP 結合蛋白であり、スプライシング抑制因子としての役割が推定されている。そこで我々は、TDP-43 そのものが TDP-43

のスプライシングに寄与すると考えた。KO マウスのヘテロ結合体にて TDP-43 の mRNA 量が減少していないこと、このマウスの線維芽細胞でスプライシングバリエーションの構成が変化していることを確認した。

③ TDP-43 により制御される SKAR、U12 依存性遺伝子産物のスプライシング異常の検討: ALS では、TDP-43 自身のスプライシング異常をきっかけとして、TDP-43 の機能喪失により神経障害がおくと推察した。実際、我々が作製した TDP-43 の KO マウスは胎生致死であり、また NSE-cre マウスと交配させた神経細胞での選択的 KO マウスも 2 週までに死亡した。このことは TDP-43 が神経細胞の維持に重要な役割を担っていることを示していた。TDP-43 の喪失によりスプライシング異常がおこる遺伝子として SKAR を単離した。

以上、TDP-43 のスプライシング異常を基軸とする病態メカニズム解明へ向けた基礎データを得ることができた。

まとめ: 3 年間の研究で、世界に先駆けて ALS における TDP-43 の詳細な神経病理学を提示するとともに、TDP-43 の遺伝子異常を有する家族性 ALS 家系を見出すことを通して、TDP-43 そのものが、その病態形成に重要な役割を担っていることを指摘した。また、いち早く TDP-43 遺伝子改変マウスの作成し着手し、最終年度では、改変マウス脳及び凍結剖検脳における TDP-43 について、分子生物学的解析を行った。その得られた基礎データから、今後我々は、ALS の病態を“TDP-43 の機能としての他の遺伝子に対する選択的スプライシングの異常、あるいは TDP-43 自身への選択的スプライシングの異常”によるとする仮説のもと、その病態メカニズム解明に向けた研究をさらに発展させる所存である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

- ① Soma K, Fu J-Y, Wakabayashi K, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 査読有, in press
- ② Shimazawa M, Tanaka H, Ito Y, Morimoto N, Tsurumi K, Kadokura M, Tamura S, Inoue T, Yamada M, Takahashi H, Warita H, Aoki M, Hara H. An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal

- models of familial ALS. PLoS One, 査読有, 2010; 5: e15307
- ③ Shimizu H, Yamada M, Toyoshima Y, Ikeuchi T, Onodera O, Takahashi H. Involvement of Onuf' s nucleus in Machado-Joseph disease: a morphometric and immunohistochemical study. Acta Neuropathol, 査読有, 2010; 120: 439-448
- ④ Fu Y-J, Nishihira Y, Kuroda S, Toyoshima Y, Ishihara T, Shinozaki M, Miyashita A, Piao Y-S, Tan C-F, Tani T, Koike R, Iwanaga K, Tsujihata M, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M, Kakita A, Ikeuchi T, Takahashi H. Sporadic four-repeat tauopathy with frontotemporal lobar degeneration, Parkinsonism, and motor neuron disease: a distinct clinicopathological and biochemical disease entity. Acta Neuropathol, 査読有, 2010; 120: 21-32
- ⑤ Mori F, Tanji K, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Relationship between Bunina bodies and TDP-43 inclusions in spinal anterior horn in amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathol Appl Neurobiol, 査読有, 2010; 36: 345-352
- ⑥ Shibata N, Kakita A, Takahashi H, Ihara Y, Nobukuni K, Fujinami H, Sakoda S, Kobayashi M. Increased expression and activation of cytosolic phospholipase A₂ in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol, 査読有, 2010; 119: 345-354
- ⑦ Ito Y, Yamada M, Tanaka H, Aida K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hozumi I, Inuzuka T, Takahashi H, Hara H. Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. Neurobiol Dis, 査読有, 2009; 36: 470-476
- ⑧ Shibata N, Kakita A, Takahashi H, Ihara Y, Nobukuni K, Fujimura H, Sakoda S, Sasaki S, Yamamoto T, Kobayashi M. Persistent cleavage and nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in motor neurons in the spinal cord of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Acta Neuropathol, 査読有, 2009; 118: 755-762
- ⑨ Nishihira Y, Tan C-F, Toyoshima Y, Yonemochi Y, Kondo H, Nakajima T, Takahashi H. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: widespread multisystem degeneration with TDP-43 pathology in a patient after long-term survival on a respirator. Neuropathology, 査読有, 2009; 29: 689-696
- ⑩ Tan C-F, Yamada M, Toyoshima Y, Yokseki A, Miki Y, Hoshi Y, Kaneko H, Ikeuchi T, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Selective occurrence of TDP-43-immunoreactive inclusions in the lower motor neurons in Machado-Joseph disease. Acta Neuropathol, 査読有, 2009; 118: 553-560
- ⑪ Nishihira Y, Tan C-F, Hoshi Y, Iwanaga K, Yamada M, Kawachi I, Tsujihata M, Hozumi I, Morita T, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration is associated with relatively mild TDP-43 pathology. Acta Neuropathol, 査読有, 2009; 117: 45-53
- ⑫ Oyanagi K, Yamazaki M, Takahashi H, Watabe K, Wada M, Komori T, Morita T, Mizutani T. Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. Neuropathol Appl Neurobiol, 査読有, 2008; 34: 650-658
- ⑬ Hozumi I, Yamada M, Uchida Y, Ozawa K, Takahashi H, Inuzuka T. The expression of metallothioneins is diminished in the spinal cords of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler, 査読有, 2008; 9: 294-298
- ⑭ Mori F, Tanji K, Zhang H-X, Nishihira Y, Tan C-F, Takahashi H, Wakabayashi K. Maturation process of TDP-43-positive neuronal cytoplasmic inclusions in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. Acta Neuropathol, 査読有, 2008; 116: 193-203
- ⑮ Nishihira Y, Tan C-F, Onodera O, Toyoshima Y, Yamada M, Morita T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. Acta Neuropathol, 査読有, 2008; 116: 169-182

- ⑯ Yokoseki A, Shiga A, Tan C-F, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. *TDP-43* mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 査読有, 2008; 63: 538-542
- ⑰ Zhang H, Tan C-F, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. TDP-43-immunoreactive neuronal and glial inclusions in the neostriatum in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. *Acta Neuropathol*, 査読有, 2008; 115: 115-122

[学会発表] (計 12 件)

- ① Fu Y.-J. et al. Pathological TDP-43 in a case of primary lateral sclerosis. 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, 6 October 2010, Indianapolis, USA
- ② Fu Y.-J. et al. An autopsy case of amyotrophic lateral sclerosis showing an upper-motor predominant form with frontotemporal lobar degeneration. 17th International Congress of Neuropathology, 12 September 2010, Salzburg, Austria
- ③ 付 永娟, ほか. 前頭側頭葉変性症 (FTLD) に属する新規 4 リポートタウオパチー: 3 剖検例におけるその臨床病理と生化学所見. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2010 年 4 月 24 日, 東京
- ④ 付 永娟, ほか. 前頭側頭葉変性を伴う上位運動神経系優位型の筋萎縮性側索硬化症の 1 剖検例. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2009 年 6 月 6 日, 高松
- ⑤ 豊島靖子, ほか. Machado-Joseph 病における TDP-43 の異常発現. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2009 年 6 月 6 日, 高松
- ⑥ 高橋 均, ほか. 孤発性 ALS をめぐる最近の知見—病理学から見た ALS. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2009 年 6 月 4 日, 高松 (招待講演)
- ⑦ 譚 春鳳, ほか. Dementia lacking distinctive histology (DLDH) と TDP-43: 1 剖検例の再検討. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2008 年 5 月 20 日, 東京
- ⑧ 西平 靖, ほか. 長期の臨床経過を示した孤発性筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 異常発現とその分布に関する免疫組織化学検討. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会,

2008 年 5 月 20 日, 東京

- ⑨ 西平 靖, ほか. 孤発性筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 異常発現とその分布に関する免疫組織化学検討. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2008 年 5 月 20 日, 東京

[その他]

○Yokoseki A, et al. *TDP-43* mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008; 63: 538-542

本論文発表内容については、「ALS: 新たな原因遺伝子 新潟大チーム発見」の見出しで毎日新聞 (2008, 4, 29) に掲載された。

○Nishihira Y, et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* 2008; 116: 169-182

本論文発表内容については、「Research Brief: Redefining ALS—Time to Think Laterally?」のタイトルで国際的研究者ネットワークである ALZHEIMER RESEARCH FORUM に掲載、討論 (May 2008) された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 均 (TAKAHASHI HITOSHI)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 90206839

(2) 研究分担者

譚 春鳳 (TAN CHEN-FENG)
研究者番号: 40447610
新潟大学・脳研究所・助教
豊島 靖子 (TOYOSHIMA YASUKO)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 20334675
小野寺 理 (ONODERA OSAMU)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 20303167

(3) 連携研究者

柿田 明美 (KAKITA AKIYOSHI)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 80281012
崎村 建司 (SAKIMURA KENJI)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 40162325
桑野 良三 (KUWANO RYOZO)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 20111734
横山 峯介 (YOKOYAMA MINESUKE)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 40090930