

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591113

研究課題名（和文）TDP-43 の神経細胞核における発現は筋萎縮性側索硬化症の臨床経過に関与する

研究課題名（英文）Nuclear TAR DNA binding protein43 expression correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis.

研究代表者

隅 寿恵（SUMI HISAE）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30403059

研究成果の概要（和文）：我々は、弧発性 ALS 患者の一次運動野における神経細胞質内に形成される TDP-43 陽性封入体と錐体路変性（延髄レベル）との関係を病理学的に解析したところ、TDP-43 の細胞内凝集は神経細胞ではなく主にグリア細胞内に認められ、その数と錐体路変性とは明らかな相関を認めなかった。さらに、ALS モデルマウスの脊髄の大型神経細胞における核の TDP-43 発現と神経変性の関係を定量的に評価し有意な所見を得た。また脊髄白質においてリン酸化 TDP-43 の高発現を認め、軸索変性にリン酸化 TDP-43 が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The relationship between the aggregation of TDP-43 in the and the degeneration of pyramidal tract in the upper motor neurons was analyzed in ALS cases, which was not significantly observed. In ALS1 model mice, phosphorylated TDP-43 was observed in the white matter of spinal cord, suggesting that TDP-43 might be related to the axonal degeneration in ALS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症（ALS）、TDP-43、軸索変性、上位運動ニューロン、疾患モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は上位及び下位運動ニューロンが選択的に傷害され、3-4 年で死に至る難病である。運動神経細胞における TDP-43 の凝集と細胞内分布の変化が ALS における神経変性に深く関与すると考えられているが、TDP-43 の細胞内凝集が神経変性の直接的な原因となりうるのかについては

議論が多い。

## 2. 研究の目的

ALS 患者および ALS 疾患モデルマウスにおける上位及び下位運動ニューロンの変性と TDP-43 の細胞内凝集・細胞内局在の変化との関係を病理学的に明らかとする。

### 3. 研究の方法

(1) ALS モデルマウスである変異 SOD1 遺伝子(G93A)トランスジェニックマウス脊髄に対して抗 TDP-43 抗体を用いて免疫組織学的染色を施行し、脊髄灰白質における細胞核(N)、細胞体(C)の断面積を画像解析ソフト(VH-H1A5, Keyence)を用いて定量的に評価してN/C比を算出し、各個体において細胞核におけるTDP-43発現性との関連性を解析した。HGF, BDNFなどの成長因子、ACH4K12, ACH3, Meth3K9など転写に関連する分子に対する免疫染色を施行し、マウスの寿命やTDP-43の発現との関連を解析した。

(2) ALS モデルマウスである変異 SOD1 遺伝子(G93A)トランスジェニックマウス脊髄においてTDP-43、リン酸化TDP-43に対する免疫組織学的染色を施行し、Luxol Fast Blue(LFB)染色を重染色し、コントロールマウスと比較検討した。

(3) 弧発性ALS 15症例の中心前回についてTDP-43に対する抗体(1:3000, Protein Tech Group)を用いて免疫染色し、髄鞘染色(LFB染色)を合わせて施行した。2等分した皮質部分を皮質浅層、皮質深層とし、さらに皮質直下白質、深部白質を加えた4部位を解析対象としてデジタルカメラにて画像を取り込んだ。各部位10視野におけるTDP-43陽性封入体の数を神経細胞、グリア細胞に分けて計測した。グリア細胞封入体の面積を解析ソフトウェア(VH-H1A5, Keyence)を用いて計測した。中心前回における錐体細胞の変性を定性的に評価した。延髄パラフィン切片を用いてリン酸化ニューロフィラメントに対する免疫染色を施行し、さらに髄鞘を青く染めるLFB染色を重染色して、錐体路における神経変性を定性的に評価した。一次運動野におけるTDP-43陽性封入体数と、錐体細胞変性あるいは錐体路変性の関連をそれぞれについて関連性を解析した。

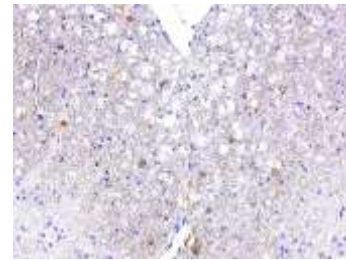
### 4. 研究成果

(1) 統計学的解析が可能な数の前角細胞が残存するG93AマウスとALS症例において、細胞核におけるTDP-43の発現が高い前角細胞では発現の低い前角細胞よりも核及びN/C比が統計学的有意に大きく( $p < 0.05$ ; Wilcoxon rank sum test)、一方では細胞体に有意差を認めないことが明らかとなった。さらに、TDP-43発現の高い神経細胞の多いG93Aマウス群では、TDP-43発現の低い神経細胞の多いG93Aマウス群よりも有意に神経細胞数が多く残存し( $p < 0.01$ ; Wilcoxon rank sum test)、寿命が長いことが明らかとなった。灰白質における変性した神経細胞の細胞突起や封入体だけで

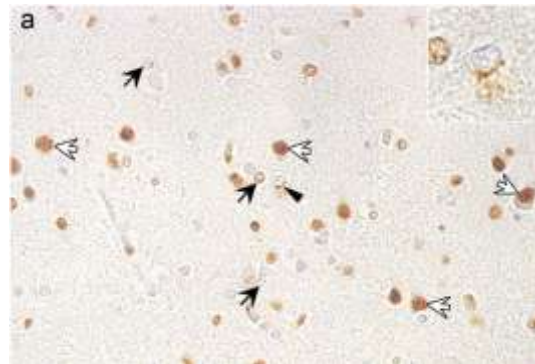
なく、白質にもリン酸化TDP-43陽性構造物を認め、一部はLFB陽性であった。HGF, BDNFなどの成長因子、ACH4K12, ACH3, Meth3K9など転写に関連する分子に対する免疫染色では有意な所見が得られなかった。

(2) コントロールでは細胞核がTDP-43に陽性となり、リン酸化TDP-43に対して陰性であった。G93Aマウス脊髄の灰白質では残存する神経細胞の胞体や突起や封入体がTDP-43陽性となり、白質では軸索変性の高度な外側を中心にTDP-43やリン酸化TDP-43、かつLFB陽性の構造物を多数認めた。ALSにおける神経変性は、TDP-43の細胞内凝集だけでなくTDP-43の核からの移行そのものが、病態に関与する可能性が示唆された。

写真)  
G93Aマウス終末期の脊髄白質にリン酸化TDP-43陽性の構造物を多数認める。



(3) ALS患者の上位運動ニューロンでは、皮質における神経細胞内封入体(NCI)はグリア細胞内封入体(GCI)よりも有意に少なく( $p < 0.05$ )、ほとんどが微小顆粒状であった。GCIは他の3部位よりも有意に多く皮質深層に分布し( $p < 0.05$ , Wilcoxon signed rank test)、封入体を多く認める症例ではGCIは全体に大型化していた。封入体有する細胞の核は、神経細胞では一部変形し萎縮していたが、グリア細胞では類円形で変形を認めず、封入体有するオリゴデンドロサイト周囲では明らかな脱髄を認めなかった。神経細胞よりグリア細胞内において有意に多数のTDP-43陽性封入体が存在したが、それらの数と上位運動ニューロンの変性とは明らかな相関を認めなかった。GCIの数と大きさは症例間によって差があり、錐体路変性の程度とは相関しなかった。



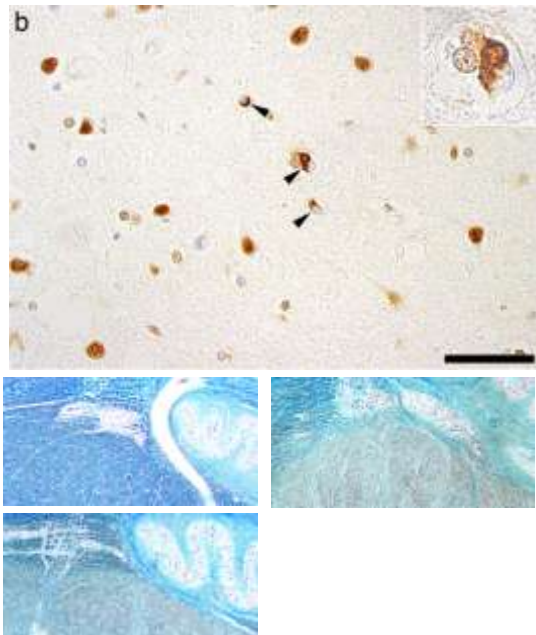


写真) TDP-43 に対する免疫組織学的染色  
 弧発型 ALS 症例の中心前回

a グリア細胞内 TDP-43 陽性封入体の頻度は少なく、封入体も小型である。b 多数のグリア細胞内 TDP-43 陽性封入体認める症例では封入体も大型である。

写真) KB 染色 弧発型 ALS 症例の延髄

左上; コントロール延髄レベルの錐体路 右上; 写真 a の TDP-43 陽性封入体の少なかった症例における錐体路では高度な変性を認める 下; 写真 b の TDP-43 陽性封入体の多かった症例における錐体路では中等度の変性を認める

#### 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 2 件)

1. Beck G, Sugiura Y, Shinzawa K, Kato S, Setou M, Tsujimoto Y, Sakoda S, Sumi-Akamaru H. Neuroaxonal dystrophy in calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> beta deficiency results from insufficient remodeling and degeneration of mitochondrial and presynaptic membranes. *J Neurosci*. 2011 31(31):11411-11420.

2. Yamadera M The influence of the TDP-43 positive cytoplasmic inclusions upon cells in primary motor area of SALS cases. *Medical Journal of Osaka University* 2010 53;25-35

[学会発表] (計 14 件)

1. 別宮 豪一、隅 寿恵、杉浦 悠毅、新沢 康英、加藤 信介、瀬藤 光利、辻本賀英、佐古田 三郎 Group VIA phospholipase A<sub>2</sub> 遺伝子欠損マウスにおける軸索末端の変性メカニズム 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 18 日 名古屋

2. 隅寿恵、山寺みさき、別宮豪一、藤村晴俊、加藤信介、佐古田三郎 孤発性 ALS 一次運動野における TDP-43 陽性細胞質内封入体の局在と頻度 第 52 回日本神経病理学会 2011 年 5 月 18 日 名古屋

3. Hisae Sumi, Koei Shinzawa, Shinsuke Kato, Yoshihide Tsujimoto, Saburo Sakoda Axonal degeneration associated with degenerated membranes of mitochondria in Group VIA phospholipase A<sub>2</sub> knockout mice. XVIIth International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, Sep 12, 2010

4. 別宮 豪一、隅 寿恵、加藤信介、山寺みさき、佐古田三郎 孤発性 ALS 症例の腰髄前角細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化 第 51 回日本神経学会総会、平成 22 年 5 月 21 日 東京

5. 山寺みさき、隅寿恵、別宮豪一、藤村晴俊、加藤信介、佐古田三郎 孤発性 ALS 一次運動野における TDP-43 陽性細胞質内封入体の形成に伴う細胞への影響 第 51 回日本神経学会総会 平成 22 年 5 月 21 日 東京

6. 隅寿恵、加藤信介、新沢康英、辻本賀英、佐古田三郎 Group VIA phospholipase A<sub>2</sub> 遺伝子欠損マウスにおけるミトコンドリア変性 第 51 回日本神経学会総会 平成 22 年 5 月 21 日 東京

7. 山寺みさき、隅寿恵、別宮豪一、藤村晴俊、加藤信介、佐古田三郎 孤発性 ALS 一次運動野における TDP-43 陽性細胞質内封入体の形成に伴う細胞への影響 第 51 回日本神経病理学会総会 平成 22 年 4 月 24 日 東京

8. 隅寿恵、加藤信介、新沢康英、辻本賀英、佐古田三郎 Group VIA phospholipase A<sub>2</sub> 遺伝子欠損マウスにおけるミトコンドリア変性 第 51 回日本神経病理学会総会 平成 22 年 4 月 24 日 東京

9. 別宮 豪一、隅 寿恵、加藤信介、山寺みさき、佐古田三郎 孤発性 ALS 症例の腰髄

前角細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化 第 51 回日本神経病理学会総会 平成 22 年 4 月 24 日 東京

1 0. 隅寿恵、加藤信介、新沢康英、辻本賀英、佐古田三郎 groupVIA phospholypase A2 beta 遺伝子欠損マウスの神経病理学的解析 日本臨床分子形態学会 2009 年 9 月 4 日 神戸

1 1. 隅寿恵、加藤信介、持丸裕子、藤村晴俊、衛藤昌樹、佐古田三郎 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に關与する 第 50 回神経病理学会 2009 年 6 月 5 日 高松

1 2. 別宮 豪一、隅 寿恵、加藤信介、山寺みさき、佐古田三郎 ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化 第 50 回神経病理学会 2009 年 6 月 5 日 高松

1 3. 山寺みさき 隅寿恵 別宮豪一 藤村晴俊 加藤信介 佐古田三郎 孤発性筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 陽性グリア封入体 第 50 回神経病理学会 2009 年 6 月 5 日 高松

1 4. 別宮 豪一、隅 寿恵、加藤信介、山寺みさき、佐古田三郎 ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化 第 50 回神経学会総会 仙台 2009 年 5 月 21 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

隅 寿恵 (SUMI HISAE)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30403059

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし