

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：32653
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2014
 課題番号：22590965
 研究課題名(和文) 孤発性筋萎縮性側索硬化症の病態機序の解明

 研究課題名(英文) elucidation of pathomechanism in sporadic ALS

 研究代表者
 佐々木 彰一 (SASAKI, SHOICHI)

 東京女子医科大学・医学部・准教授

 研究者番号：40119962

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 孤発性ALSではTDP-43の核と細胞質間での輸送が障害され、不溶性の凝集体として細胞質にTDP-43が蓄積する。(2) 孤発性ALSの脊髄前角細胞ではオートファジーの賦活化が認められ、運動ニューロン変性に関与している。(3) ADAR2ノックアウトマウスでは、カルシウム透過性AMPA受容体を介した興奮毒性が運動ニューロンとグリアの細胞死に関与している。(4) ADAR2ノックアウトマウスでは、Ca²⁺の透過性が増加し、オートファジーを賦活化し、運動ニューロン死に関与している。(5) TDP ノックアウト マウスでは発症前期に一致して、血液-脊髄関門の一過性かつ可逆性の傷害が起こる。

研究成果の概要(英文)：(1) In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), TDP-43 trafficking between the nucleus and the cytoplasm is disturbed, resulting in an accumulation of TDP-43 in the cytoplasm in the form of insoluble aggregates. (2) Autophagy is significantly activated in the cytoplasm of motor neurons in sporadic ALS and may be involved in the pathomechanism of the neurodegeneration of motor neurons. (3) ADAR2-reduction is associated with progressive deterioration of nuclear architecture, resulting in vacuolated nuclei due to a Ca²⁺-permeable AMPA receptor-mediated mechanism. (4) Significantly increased autophagy flux in the degenerating motor neurons of ADAR2-knockout mice likely resulted from Ca²⁺ overload. (5) The temporary and reversible breakdown of the blood-spinal cord barrier at the early symptomatic stage could be a direct pathogenic consequence of the loss of TDP-43 protein in TDP conditional knockout mice.

研究分野：神経内科学

 キーワード：筋萎縮性側索硬化症 オートファジー TDP-43 ノックアウトマウス AMPA 受容体 RNA 編集 ADAR2-
 ノックアウトマウス カルシウム 血液-脊髄関門

1. 研究開始当初の背景

(1) 正常ヒトの脊髄とくに運動ニューロンにおける TDP-43 の分布に関しては、核内に存在すること以外、細胞質内のどの小器官に存在するかについては全く不明である。

(2) 孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態機序に関してオートファジーの関与が指摘されているが、いずれも ALS の動物モデルを用いての免疫組織学的研究であり、超微細構造に関してはヒト孤発性 ALS およびその動物モデルのいずれにおいても未だよく分かっていない。

(3) 孤発性 ALS の至適な動物モデルマウスであるとされるコンディショナル adenosine deaminase acting on RNA type2 (ADAR2) ノックアウトマウスの運動神経細胞死に関する病態機序は不明である。

(4) コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスにおけるカルシウムの細胞内流入とオートファジー誘導との関連については従来報告がない。

(5) TDP-43 蛋白の loss は ALS の病態機序に密接に関連していると考えられている。ALS のモデルマウスである TDP-43 コンディショナルノックアウト (TDP CKO) マウスの脊髄における血液脊髄関門の変化については不明である。

2. 研究の目的

(1) ヒト孤発性 ALS の脊髄前角での TDP-43 の細胞内分布を明らかにする。

(2) 孤発性 ALS の脊髄前角細胞の変性過程にオートファジーが関与しているかどうかを明らかにする。

(3) ALS の脊髄運動ニューロンでは、ADAR2 活性低下により、AMPA 受容体のサブユニットである GluA2 の未編集が起こり、AMPA 受容体の Ca²⁺透過性が亢進し、神経細胞死が生じると考えられている。孤発性 ALS のモデルマウスであるコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスの脊髄を電顕で観察することにより、運動神経細胞死の病態機序を検討する。

(4) コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスの運動神経細胞死にオートファジーが関与しているかを検討する。

(5) ヒト孤発性 ALS の脊髄では血液 - 脊髄関門 (BSCB) が障害されているとの報告が散見される。運動ニューロンに特異的な TDP-43 蛋白の脱落によって作成された ALS の動物モデルであるコンディショナルノックアウト (TDP CKO) マウスの BSCB を免

疫組織学的、電顕的およびウエスタンブロットで観察し、BSCB に変化がみられるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 死後 3 時間以内に剖検された孤発性 ALS 3 例 (年齢 70, 75, 83 歳、平均 76 ± 6.6 歳) および神経疾患以外の疾患で死亡した対照 3 例 (年齢 68, 75, 80 歳、平均 74.3 ± 6.0 歳) の脊髄前角を用いた。剖検時に脊髄前角を切り出して 2% グルタルに固定し、型の如く処理したあとエポキシに包埋した。プラスチック切片にトルイジンブルー染色を施して光顕で観察した。その後、至適部位を TDP-43 の抗体を用いて免疫電顕 (post-embedding 法) で観察した。

(2) 孤発性 ALS 12 例 (年齢 49-82 歳: 平均 66.8 歳) と対照 15 例 (年齢 48-83 歳: 平均 70.2 歳) の腰髄 (L1-L5) を、抗 LC3 抗体と抗 p62 抗体を用いて免疫組織学的に検索した。また、死後 6 時間以内に剖検された孤発性 ALS 16 例 (年齢 49-83 歳: 68.7 歳) と神経疾患以外の疾患で死亡した対照 15 例 (年齢 44-80 歳: 62.7 歳) の脊髄前角細胞を電顕で観察した。

(3) ホモ接合体 ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) (15 週、n=2、140 週、n=2)、ヘテロ接合体 ADAR2 ノックアウトマウス (AR2H) (14 週、n=2、17 週、n=2) および対照マウス (12 週、15 週、16 週、74 週、140 週、それぞれ n=2) の頸髄を光顕と電顕で観察した。

(4) ホモ接合体 ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) (15 週、n=2、140 週、n=2)、ヘテロ接合体 ADAR2 ノックアウトマウス (AR2H) (14 週、n=2、17 週、n=2、74 週、n=2) および対照マウス (12 週、15 週、16 週、74 週、140 週、それぞれ n=2) の頸髄を光顕および電顕で観察した。また、LC3、Atg5、Atg7 の各種抗体を用いて脊髄前角をウエスタンブロットで解析した (AR2、n=2、対照マウス、n=2)。

(5) 前発症期前期 (20 週、n=2)、前発症期後期 (36 週、n=2)、発症期前期 (50 週、n=2)、発症期後期 (100 週、n=2) の TDP CKO マウスおよび週齢を適合した野生型対照マウス (それぞれ n=2) の脊髄を光顕および電顕で観察した。MAC-2、fibrinogen、claudin-5 の抗体を用いて免疫組織学的に観察した。また、claudin-5、occludin および ZO-1 の抗体を用いて脊髄前角をウエスタンブロットで解析した (TDP CKO マウス、n=1、対照マウス、n=1)。

4. 研究成果

(1) 対照例では、TDP-43 の免疫活性は主に前角細胞およびアストロサイトやオリゴデ

ンドロサイトの核内と粗面小胞体にみられ、ときに神経細胞の細胞質内のミトコンドリアや前シナプス小胞にもみられた。ALSでも対照例と同様の分布を示したが、正常と思われる前角細胞の核内とくに核小体ではTDP-43の免疫活性が対照例と比較して低下し、中心染色質溶解などの変性した神経細胞の核では著明に減少していた。他方、正常と思われる前角細胞の粗面小胞体ではTDP-43の免疫活性が有意に増加しており、変性した前角細胞の細胞質ではさらに粗面小胞体の免疫活性の増加がみられた(ANOVA, SAS System, $p=0.0036$)。ユビキチン陽性封入体にもTDP-43の免疫活性がみられたが、Bunina小体にはみられなかった。ミトコンドリア、前シナプス小胞、グリア細胞では、TDP-43の免疫活性に両者間で差が認められなかった。【結論】TDP-43は粗面小胞体で合成され、核内に移行すると思われる。ALSではTDP-43の核と細胞質間での輸送が障害され、その結果、不溶性の凝集体として細胞質にTDP-43が蓄積することが示唆される。

(2) ALS症例では、正常と思われる前角細胞および変性した前角細胞の細胞質がときにLC3で陽性に染色された。ALSに特徴的なBunina小体、skein-like inclusionはLC3で陰性であったが、一部のround bodyの辺縁部が陽性に染色された。p62抗体ではround bodyやskein-like inclusionが陽性に染色されたが、Bunina小体は染色されなかった。電顕的観察では、ALS16例全例でオートファジーが認められ、とくに、変性した前角細胞の細胞質でよくみられた。2重の膜で囲まれたautophagosomeや単膜で囲まれたautolysosomeがみられ、内部にはミトコンドリアやリボソーム様構造物などの細胞小器官が観察された。また、オートファジーはALSに特徴的な封入体と関連してみられた。他方、対照例では、正常と思われる前角細胞の細胞質にオートファジーは認められなかった。【結論】孤発性ALS症例の脊髄前角細胞では共通してオートファジーの賦活化が認められたことから、孤発性ALSにおける運動ニューロンの変性の病態機序にオートファジーの関与が示唆される。

(3) トルイジンブルー染色を施したplastic切片での光顕的観察では、AR2(15週)とAR2H(14週、17週)で、ときに神経細胞の単純性萎縮とグリオージスがみられた。AR2H(74週)とAR2(140週)では、主に運動ニューロンに空胞変性が認められた。電顕では、AR2(15週)で電子密度の高い膜性構造物が、運動ニューロンの細胞質のほか、軸索内で観察された。AR2H(14週、17週)では、ときに萎縮した運動ニューロンが散見された。AR2H(74週)およびAR2(140週)では、空胞変性が主に運動ニューロンの核内に、ときに細胞質に認められた。アスト

ロサイトやオリゴデンドロサイトの核内にも、しばしば空胞変性がみられた。【結論】コンディショナルADAR2ノックアウトマウスでは、運動ニューロンとグリア細胞の主に核内に空胞変性がみられ、カルシウム透過性AMPA受容体を介した興奮毒性が運動ニューロンおよびグリア細胞の細胞死に關与しているものと思われる。

(4) AR2マウス(15週)では、前角細胞の細胞質が抗LC3抗体で染色され、AR2Hマウスでは、前角細胞の細胞質が抗LC3抗体に加えて、抗p62抗体でも陽性であった。AR2マウス(15週)の脊髄前角のウエスタンブロットでは、Atg5、Atg7およびLC3-IIなどのオートファジー関連蛋白が対照例に比較して有意に増加してみられた。電顕では、AR2およびAR2Hマウスの前角細胞の細胞質で、2重膜で被われたautophagosomeや単膜で被われたautolysosomeなどのオートファジー関連の構造物がみられた。これらのオートファジー関連の構造物は、病後期よりも病初期でより頻繁に認められた。対照例では、前角細胞の細胞質や有髄性軸索内にごく稀にautophagosomeがみられた。【結論】コンディショナルADAR2ノックアウトマウスでは、カルシウム透過性AMPA受容体を介して Ca^{2+} の透過性が増加することにより、運動ニューロンの細胞内でオートファジーが有意にupregulateされ、運動ニューロンの細胞死に關与しているものと思われる。

(5) 免疫組織学的にTDPCKOマウスでは発症前期から後期まで前角でのみMAC-2とfibrinogenの免疫活性化がみられた。癒着帯蛋白を用いた免疫組織学およびウエスタンブロットの解析では、TDPCKOマウスと対照マウスとの間で有意差はみられなかった。電顕では、TDPCKOマウスの発症前期でのみ内皮細胞、周皮細胞および血管周囲腔に空胞化あるいは浮腫状変化がみられたが、癒着帯はよく保たれていた。その他の病期では、BSCBは対照例同様よく保たれていた。【結論】運動ニューロンに特異的なTDP-43 proteinの脱落により、TDPCKOマウスでは発症前期に一致して、BSCBの漏出あるいは透過性の亢進を伴う一過性かつ可逆性の傷害が起こることが示唆された。TDPCKOマウスにおけるBSCBの一過性障害がさらに同マウスの運動ニューロンの変性の促進に關与していると考えられる。

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13件)

1) Sasaki S. Alterations in the blood-spinal cord barrier in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.

Neuropathol, 査読有, in press
2) Hino S, Sasaki S. Flail arm syndrome with cytoplasmic vacuoles in remaining anterior horn motor neurons: A peculiar variant of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*, 査読有, in press
3) Sasaki S., Iguchi Y, Katsuno M, Sobue G, Alterations in the blood-spinal cord barrier in TDP-43 conditional knockout mice. *Neurosci Lett*, 査読有, in press
4) Sasaki S., Yamashita T, Kwak S. Autophagy in spinal motor neurons in conditional ADAR2-knockout mice. *Neurosci Lett*, 査読有, in press
5) Takeda T, Uchihara T, Nakayama Y, Nakamura A, Sasaki S., Kakei S, Uchiyama S, Duyckaerts C, Yoshida M. Dendritic retraction, but not atrophy, is consistent in amyotrophic lateral sclerosis-comparison between Onuf's neurons and other sacral motor neurons. *Acta Neuropathologica Communications*, 査読有, 2:11, 2014
6) Sasaki S., Horie Y. The effect of an uninterrupted switch from donepezil to galantamine without dose titration on BPSD in Alzheimer disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders EXTRA*, 査読有, DOI: 10.1159/000362871, 2014
7) Sasaki S., Yamashita T, Hideyama T, Kwak S. Unique nuclear vacuoles in the motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. *Brain Res*, 査読有, 1550:36-46, 2014
8) Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J-I, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S., Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*, 査読有, 136:1371-1382, 2013, doi:10.1093/brain/awt029 (2013)
9) Ito H, Fujita K, Nakamura M, Wate R, Kaneko S, Sasaki S., Yamane K, Suzuki N, Aoki M, Shibata N, Togashi S, Kawata A, Mochizuki Y, Mizutani T, Maruyama H, Hirano A, Takahashi R, Kawakami H, Kusaka H. Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol*, 査読有, 121:555-7, 2011
10) Sasaki S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 査読有, 70:349-359, 2011
11) Sasaki S. Determination of altered mitochondria ultrastructure by electron microscopy. *Methods Mol Biol*, 査読有, 684:279-290, 2010
12) Sasaki S., Takeda T, Shibata N,

Kobayashi M. Alterations in subcellular localization of TDP-43 immunoreactivity in the anterior horns in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 査読有, 478:72-76, 2010
13) Sasaki S. Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 査読有, 69:346-355, 2010

〔学会発表〕(計 13 件)

1) Sasaki S. Sporadic lower motor neuron disease with a snake eyes appearance on the cervical anterior horns by MRI: A new clinical subtype? 24th International symposium on ALS/MND. Brussels, Belgium, Dec 6-8, 2014
2) Sasaki S., Iguchi Y, Katsuno K, Sobue G. The blood-spinal cord barrier is temporarily impaired in TDP-43 conditional knockout mice. 13th ICNMD. Nice, France, July 5-10, 2014
3) 佐々木彰一, 井口洋平, 勝野雅央, 祖父江元. TDP-43 コンディショナルノックアウトマウスにおける血液脊髄関門の変化. 第 55 回日本神経学会総会. 2014 年 5 月 21 日~5 月 24 日, 福岡
4) 佐々木彰一, 山下雄也, 日出山拓人, 郭伸. コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスにおけるオートファジーの検討. 第 54 回日本神経学会総会. 2013 年 5 月 29 日~6 月 1 日, 東京
5) Sasaki S., Iguchi Y, Katsuno K, Sobue G. Alterations in the blood-spinal cord barrier in TDP-43 conditional knockout mice. 24th International symposium on ALS/MND. Mirano, Italia, Dec 6-8, 2013
6) Sasaki S., Yamashita T, Hideyama T, Kwak S. Autophagy in the spinal motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. 23rd International symposium on ALS/MND. Chicago, USA, Dec 5-7, 2012
7) Sasaki S., Yamashita T, Hideyama T, Kwak S. Autophagy is involved in spinal motor neuron degeneration in conditional ADAR2-knockout mice. 6th International Symposium on Autophagy 2012. Okinawa, Japan, Oct28-Nov 1, 2012
8) 佐々木彰一, 日出山拓人, 郭伸. コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスの電顕的検討. 第 53 回日本神経学会総会. 2012 年 5 月 22 日~5 月 25 日, 東京
9) 佐々木彰一. ALS におけるオートファジーの関与. 厚労省研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「病態に根ざした ALS の新規治療法開発班」ワークショップ, 2011 年 9 月 22 日, 東京
10) 佐々木彰一. ALS におけるミトコンドリ

ア異常 形態学的変化について . 厚労省研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「病態に根ざした ALS の新規治療法開発班」ワークショップ, 2011 年 9 月 22 日, 東京
11) Sasaki S., Yamashita T, Hideyama T, Kwak S. Ultrastructural study of motor neurons of spinal cords in ADAR2-deficient mice. 22nd International symposium on ALS/MND. Sydney, Australia, Nov 30-Dec 2, 2011
12) 佐々木彰一、武田貴裕、本間温、岩田誠、内山真一郎。孤発性筋萎縮性側索硬化症の脊髄前角細胞におけるオートファジーの検討。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 18 日～5 月 20 日、名古屋
13) Sasaki S. Autophagy in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. 21st International symposium on ALS/MND. Orland, USA, Dec 11-13, 2010

〔図書〕(計 12 件)

- 1) 佐々木彰一。顔面神経麻痺。ガイドライン外来診療 2014。日経メディカル開発、東京、p536-538, 2014
- 2) 佐々木彰一。イヤート 2015 24 版。神経・精神・運動器疾患。メディクメディア社、東京、脱髄性疾患 J118-J121, 変性疾患 J129-J138, 末梢神経疾患 J168-J179, 2014
- 3) 佐々木彰一。シリーズ アクチュアル脳・神経疾患の臨床 すべてがわかる筋萎縮性側索硬化症・運動ニューロン疾患。中山書店、2013、1100
- 4) 佐々木彰一。ボツリヌス中毒。今日の神経疾患治療指針。第 2 版。P899-901、医学書院、東京、2013
- 5) 佐々木彰一。イヤート 2014 23 版。神経・精神・運動器疾患。メディクメディア社、東京、脱髄性疾患 J118-J121, 変性疾患 J129-J138, 末梢神経疾患 J168-J179, 2013
- 6) 佐々木彰一。神経内科学ノート 国試から臨床まで。医学書院、2013、191
- 7) 佐々木彰一。今日の神経疾患治療指針第 2 版。2013、1100
- 8) 佐々木彰一。顔面神経麻痺。ガイドライン外来診療 2014。2013、679
- 9) 佐々木彰一。イヤート 2013 22 版。神経・精神・運動器疾患。メディクメディア社、東京、脱髄性疾患・変性疾患 pJ121-J141, 末梢神経疾患 J172-J183, 2012
- 10) 佐々木彰一。顔面神経麻痺。ガイドライン外来診療 2012。日経メディカル開発、東京、p480-482, 2011
- 10) 佐々木彰一。イヤート 2012 21 版。神経・精神・運動器疾患。メディクメディア社、東京、脱髄性疾患・変性疾患 pJ112-J133, 末梢神経疾患 J162-J175, 2011
- 11) 佐々木彰一。イヤート 2011 20 版。神経・精神・運動器疾患。メディクメディア社、東京、精神神経系の薬剤 pJ67-J75, 変性

疾患 J116-J133, 末梢神経疾患 J162-J175, 機能性発作性疾患 J185-187, 2010
12) 佐々木彰一。筋萎縮性側索硬化症の近況。Year note series. Selected articles. 2011 メディクメディア社、東京、p1575-1589, 2010

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.als.gr.jp/>
Live Today for Tomorrow

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 彰一 (SASAKI Shoichi)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40119962