

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591250

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の神経病理学的、分子遺伝学的検討

研究課題名(英文)Neuropathological and molecular genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

藤田 行雄(Fujita, Yukio)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70420172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)におけるTDP-43とFUSの関連について検討した。その結果、通常の孤発性ALSにおいてTDP-43はFUSの局在に影響を及ぼしているが、FUS陽性封入体を有するALSではFUSはTDP-43とは独立して病因になる可能性が考えられた。また、ALSの新たな病因となる蛋白としてElongator protein3 (ELP3)に注目した。ALSの前角細胞内にはELP3抗体陽性の封入体が存在し、TDP-43と共存していたが、それは非運動ニューロンでは認められなかった。ELP3の更なる研究はALSで運動ニューロン特異的に変性を起こす機序の解明に役立つ可能性があると考えた。

研究成果の概要(英文)：First, we examined the relationship between TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using immunohistochemical methods. About 30% of the neurons having TDP-43-positive inclusions lost the nuclear staining of FUS. On the other hand, the nuclear staining of TDP-43 was well preserved in the all neurons containing FUS-positive inclusions. We considered the pathogenic pathway of FUS proteinopathy is independent from TDP-43 proteinopathy, however; abnormal TDP-43 may interact with FUS protein in patients with ALS. Second, we performed neuropathological studies with anti-elongator protein 3 (ELP3) antibodies in patients with ALS. ELP3-positive inclusions were seen in the anterior horn cells, and ELP3 immunoreactivities were co-localized with those of TDP-43. On the other hand, TDP43-positive inclusions in the non-motor neurons were negative for ELP3. Our results suggest that ELP3 may have an important role of the degeneration of motor neurons in ALS.

研究分野：神経病理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は代表的な神経変性疾患であり、国内外で多数の広範な研究がなされている。近年、ALS の病因として TDP-43 や fused in sarcoma (FUS) など RNA 関連蛋白の異常が存在することが明らかとなり注目されているが、神経細胞の変性機序はなお解明されておらず、さらなる RNA 関連蛋白の詳細な検討が必要とされている。

## 2. 研究の目的

(1) ALS の代表的な病因となる RNA 関連蛋白として TDP-43 と FUS の関連性について明らかにする。つまり TDP-43 と FUS はそれぞれ独立して病因となるのか、協調して病因となるのかについて ALS 神経細胞内で認められる封入体に注目し明らかにする。

(2) Elongator complex protein (ELP) は RNA polymerase II による転写を促進する因子として発見されており、特にその6個のサブユニットの1つである ELP3 はヒストンをアセチル化し、転写を活性化する。さらにまた、ELP3 は微小管のチューブリンのアセチル化を促進し、微小管を安定化させる働きを有しているとされる。つまり ELP3 は微小管の安定性と不安定性を制御しモーター蛋白の輸送の調整に関与していると考えられている。さらに Simpson らは ELP3 の遺伝子多型が ALS と関連があることを報告している。これらのことから ELP3 が ALS の病因となる可能性を考え、ALS 剖検例における ELP3 の異常を神経病理学的に明らかにすることを目的とした。

(3) ALS 原因遺伝子 *alsin* が Rac1/PI3K/Akt3 系路を介して ALS 原因遺伝子 SOD1 変異体の誘導する死を抑制することが報告されている。BTBD10 はこの Akt3 の結合因子として同定され、BTBD10 の高発現により SOD1 変異体を持つ神経細胞への毒性を抑制することが報告されている。この BTBD10 が孤発性 ALS

においていかに働くのかについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) TDP-43 と FUS の関連について

1) TDP-43 陽性封入体を有する孤発性 ALS (SALS) 12 例 (ALS-TDP) のホルマリン固定パラフィン包埋 3 $\mu$  厚の脊髓ミラー切片を用いる。一方を抗リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) 抗体で、もう一方を抗 FUS 抗体を用いて免疫染色を施行する。神経細胞を pTDP-43 の染色性によって A) 異常集積を認めないもの、B) 細胞質内に顆粒状に染色性がみられるもの、C) skein-like inclusion を有するもの、D) round inclusion を有するものの4つに分類し、それぞれの神経細胞における FUS の局在を検討する。

2) FUS 陽性封入体を有する高齢発症の SALS1 例および家族性 ALS (FALS) 3 例 (*FUS* P525L 変異 1 例、*FUS* R521C 変異 2 例) の計 4 例のホルマリン固定パラフィン包埋 5 $\mu$  厚の脊髓切片を用いる (ALS-FUS)。これらに対して非リン酸化 TDP-43 抗体と抗 FUS 抗体を用いて 2 重免疫染色を施行する。発色には TDP-43 を DAB、FUS には VIP を用いて同一神経細胞におけるそれぞれの局在を検討する。

### (2) ALS 神経細胞内での ELP3

コントロール 3 例、SALS10 例の脊髓、黒質、小脳、海馬のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 5 $\mu$  厚切片と 3 $\mu$  厚のミラー切片を作製し、10 種類の ELP3 の各部位を認識する抗 ELP3 抗体を用いて SAB 法で免疫組織染色を施行する。抗 ELP3 抗体で細胞質内の封入体が陽性に染色された場合、さらにミラー切片を用いて神経細胞内封入体を抗リン酸化 TDP-43 抗体と抗 ELP3 抗体を用いて同一細胞内での陽性率の頻度、染色性の違いを検討する。適切な切片に対して蛍光 2 重染色でのそれぞれの共存の有無を確認する。

### (3) ALS 神経細胞内の BTBD10

SALS および FALS のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて BTBD10 に対する抗体を用いて免疫組織染色を施行し、運動神経細胞での BTBD10 の染色性を検討する。さらに染色性の低下した細胞がみられる場合、TDP-43 陽性封入体との関連をミラー切片、蛍光 2 重染色を施行し検討する。

## 4. 研究成果

### (1) TDP-43 と FUS の関連について

1) A) pTDP-43 陽性所見が認められない 42 個の神経細胞全てで FUS の染色性は核に認められた (図 1 a1, a2)。B) 微細顆粒状の pTDP-43 陽性封入体を有する神経細胞 40 個のうち 6 個で FUS の核に対する染色性が失われていた (図 1, b1, b2)。C) skein-like inclusion を有する神経細胞では FUS の核に対する染色性が保たれたものが 4 個、染色性が失われていたものが 9 個認められた (図 1, c1, c2)。TDP-43 と FUS との共存が認められた細胞は 1 個のみであった。D) round inclusion を有する神経細胞 9 個中 4 個で核の染色性が失われていた。

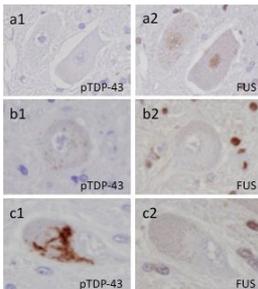


図 1

2) ALS-FUS での TDP-43 の局在  
細胞質内には TDP-43 陽性の異常所見は見られない。さらに FUS 陽性封入体を有していても、その核はすべて TDP-43 抗体で明瞭に染色された (図 2)。

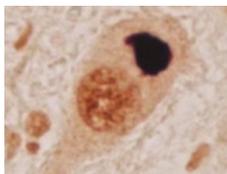


図 2 紫; FUS 抗体、  
茶; TDP-43 抗体

この結果から、TDP-43 と FUS が封入体内で共存するとは言いえないが、pTDP-43 の染色で異常を認める神経細胞で正常の FUS の核への染色性が失われている細胞も認められたこと

から TDP-43 の異常が FUS の局在に影響を及ぼしていることが考えられた。一方、ALS-FUS では細胞質内に FUS 陽性封入体が存在していても、TDP-43 の染色性はすべて核に認められており、FUS 陽性封入体の形成に TDP-43 の関与はないものと考えられた。

### (2) ALS 神経細胞内での ELP3

コントロール例では ELP3 の染色性は主に細胞質にびまん性に認められ、軽度核にも陽性所見が認められた。TDP-43 陽性封入体を有する孤発性 ALS では 10 種類の ELP3 抗体うち C 末を認識する 3 種の抗体で前角細胞内に ELP3 陽性の封入体が認められた。封入体は円形、糸くず状、円の周辺のみなど様々な形態のものが認められた。グリア細胞には陽性所見はみられず、プニナ小体は ELP3 陰性であった。ELP3 と TDP-43 の染色性の関連では非リン酸化 TDP-43 抗体の染色性が核に認められる正常の神経細胞では ELP3 抗体の染色性はコントロール例と同様に主に細胞質に認められ、封入体形成は見られなかった。リン酸化 TDP-43 抗体と ELP3 抗体を用いたミラー切片による検討ではリン酸化 TDP-43 抗体で細胞質内に顆粒状に染色性される陽性構造物は ELP3 抗体では染色されなかったが (図 3 a1, a2)、一方で凝縮したものは、ELP3 抗体で陽性であった (図 3 b1, b2 矢印)。また、糸くず状のリン酸化 TDP-43 陽性構造物はやはり ELP3 陽性であったが、リン酸化 TDP-43 陽性のグリア細胞内封入体は ELP3 では染色されなかった。

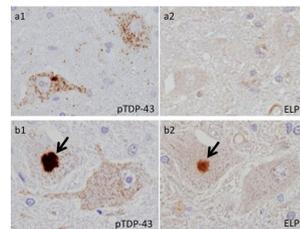


図 3

これらの結果は ALS10 例中 7 例で認められた。このうちの 3 例では TDP-43 陽性封入体は運動ニューロンを超えて広範に存在しており、この 3 例について非運動ニューロン内の

TDP-43 陽性封入体が ELP3 抗体で染色されるかについて検討した。その結果、それぞれ黒質、海馬歯状回顆粒細胞、小脳歯状核には TDP-43 陽性封入体が認められたが、連続切片に対する ELP3 C 末抗体による染色では陽性所見は認められなかった (図 4)。

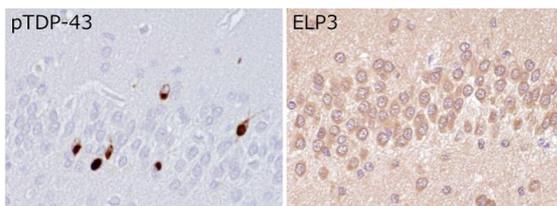


図 4

ELP3 は TDP-43 同様に RNA 代謝に関連する蛋白であり、ALS の病因として近年注目されている RNA 代謝異常をさらに強く示唆する所見であると考えた。また、今回の検討では用いた 10 種類の ELP3 抗体のうち C 末を認識する抗体でのみ封入体は染色され、これら封入体に含有されるのは ELP3 の断片化など何か修飾を受けたものである可能性が考えられた。

一方で TDP-43 陽性封入体が非運動ニューロンにも広がるのに対して、黒質、海馬歯状回顆粒細胞、小脳歯状核でみられる TDP-43 陽性封入体は ELP3 抗体に対して陰性であった。このことは ELP3 が運動ニューロン特異的に封入体形成に関与する可能性が有ることを示していると考えられた。

### (3) ALS 神経細胞内の BTBD10

BTBD10 の発現が低下した神経細胞では TDP-43 の局在に異常をきたし、Golgi 装置の微細化が生じていることを見だし、論文発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Okamoto K, Amari M, Fujita Y, Makioka M, Fukuda T, Suzuki K, Takatama M. Cytoplasmic TDP-43 accumulation in cells of the adrenal medulla in individuals with or without amyotrophic lateral

sclerosis. *Neuropathology* 34; 535-540, 2014 (査読 有)

2. Ikeda M, Hirayanagi K, Arai M, Kakuda S, Makioka K, Furuta N, Takai E, Kasahara H, Tsukagoshi S, Fujita Y, Amari M, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K. Encephalopathy with amyloid angiopathy and numerous plaques in low levels of CSF A $\beta$ 1-40/A $\beta$ 1-42. *Amyloid* 21; 238-245, 2014 (査読 有)

3. Furuta N, Makioka K, Fujita Y, Okamoto K. Changes in the clinical features of amyotrophic lateral sclerosis in rural Japan. *Intern Med* 52; 1691-1696, 2013 (査読 有)

4. Furuta N, Makioka K, Fujita Y, Ikeda M, Takatama M, Matsuoka M, Okamoto K. Reduced expression of BTBD10 in anterior horn cells with Golgi fragmentation and pTDP-43-positive inclusions in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 33; 397-404, 2013 (査読 有)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Fujita Y, Okamoto K, Fujita S, Ikeda Y. ELP3-positive inclusion in motor neuron diseases. JOINT CONGRESS OF EUROPEAN NEUROLOGY. (Istanbul, Turkey), 2014.6.3 発表

2. Fujita Y, Kitani M, Takatama M, Ikeda M, Okamoto K. TDP-43 and FUS pathology in amyotrophic lateral sclerosis. 16th congress of the European Federation of Neurological Societies. (Stockholm, Sweden), 2012.9.9 発表

3. 藤田行雄, 木谷茉莉, 高玉真光, 岡本幸市. 抗 ELP3 抗体を用いた ALS の神経病理学的検討. 第 53 回日本神経学会学術大会 (東京), 2012.5.23 発表

4. 古田夏海, 牧岡幸樹, 藤田行雄, 高玉真光, 岡本幸市. ALS における BTBD10 蛋白発現についての病理学的検討. 第 53 回日本神経学会学術大会 (東京), 2012.5.25 発表
5. 水野裕司, 藤田行雄, 高玉真光, 岡本幸市. 非 ALS 患者群の動眼神経核内の神経細胞胞体内にみられたリン酸化 TDP-43 陽性構造物に関する検討. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 (新潟), 2012.6.30 発表
6. 藤田行雄, 木谷茉莉, 高玉真光, 池田将樹, 岡本幸市. ALS における TDP-43 と FUS の病理学的検討. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 (新潟), 2012.6.30 発表
7. 藤田行雄, 池田将樹, 藤田清香, 渡辺光法, 岡本幸市. FUS R521C 変異を認めた家族性 ALS の母娘剖検例. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 (東京), 2013.4.26 発表
8. 藤田行雄, 池田将樹, 藤田清香, 渡辺光法, 岡本幸市. ALS-FUS における Golgi 装置の形態変化. 第 54 回日本神経学会学術大会 (東京), 2013.5.31 発表
9. 藤田行雄, 岡本幸市, 池田佳生. 運動ニューロン疾患における神経細胞およびグリア細胞内封入体 -ELP3 抗体を用いた検討-. 第 55 回日本神経学会学術大会 (福岡), 2014.5.22 発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 行雄 (FUJITA YUKIO)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 7 0 4 2 0 1 7 2

### (2) 研究分担者

岡本 幸市 (OKAMOTO KOICHI)

群馬大学・その他部局・名誉教授  
研究者番号: 0 0 1 2 4 6 5 2

### (3) 研究分担者

池田 将樹 (IKEDA MASAKI)  
群馬大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 5 0 2 2 2 8 9 9