

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830038

研究課題名(和文) プニナ小体を欠く筋萎縮性側索硬化症についての臨床病理学的研究

研究課題名(英文) A clinicopathological study of ALS cases lacking Bunina bodies

研究代表者

清水 宏 (Hiroshi, Shimizu)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：40608767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プニナ小体は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病理学的特徴の一つである。本研究では、プニナ小体を欠くALSの臨床病理像を明らかにすることを目的とし、ALS160剖検例を検討した。プニナ小体を欠くALSは28例(約17%)であり、下位運動神経系の変性が高度でプニナ小体の観察が不可能な7例、プニナ小体を欠く以外は通常のALSと区別不能な5例の他、SOD1およびFUS陽性構造を伴う各々8例および2例、SQSTM1遺伝子複合ヘテロ変異を持つ1例、さらに、運動系を含め多系統変性を示す1例、若年成人発症の1例などが含まれていた。プニナ小体を欠くALSには臨床病理学的に特異な例が含まれることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Bunina bodies, the pathologic hallmark of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), are eosinophilic chain-like inclusions typically found in the lower motor neurons. The aim of the present study was to elucidate the clinicopathological features of ALS in which Bunina bodies are not evident. Among 160 autopsied patients with ALS investigated, Bunina bodies were absent in 28 (17%), which included 7 cases showing very severe loss of lower motor neurons and 5 showing typical ALS features besides the absence of Bunina bodies. Among the remaining cases, 8 had SOD1-positive structures, 2 had FUS-positive structures, one showed compound heterozygous mutations in the SQSTM1 gene, one showed multisystem degeneration beyond the motor neuron systems, and one was a case of early adult onset ALS. In conclusion, we have confirmed that patients with ALS lacking Bunina bodies may show clinicopathological features atypical for ALS.

研究分野：神経病理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 プニナ小体 TDP-43

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は上位および下位運動神経細胞の脱落をきたす変性疾患であり、病理学的にはユビキチン陽性の神経細胞胞体内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions, NCIs) の出現を特徴とする。近年、NCIs の主要な構成蛋白質として TRA DNA binding protein-43 (TDP-43) が同定された。他方、プニナ小体は ALS の下位運動神経細胞胞体内に認められる、3-5 μm の球形・好酸性の構造物であり (図 1A)、シスタチン C に陽性を示す (図 1B)。プニナ小体の出現機序には不明な点が多いが、ALS に特異的に出現することから、その病態に何らかの関わりを持つと考えられている。

一方、孤発性 ALS 患者の 10%程度はプニナ小体を欠くことが知られている¹⁾。また、近年 ALS の遺伝的解析が進み、SOD1、FUS、Optineurin、CHMP2B などの遺伝子変異を伴う家族性 ALS でもプニナ小体が出現しないことが明らかにされた。プニナ小体を欠く ALS には、これらの遺伝子異常を有する例を含め、ALS として特徴のある症例が含まれる可能性があるが、こうした視点からの ALS 研究は行われていない。

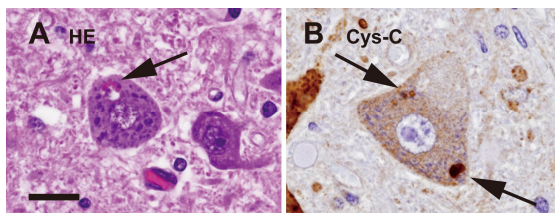


図1 プニナ小体 (A,B 矢印、Bar 40 μm)

2. 研究の目的

本研究は、当施設に標本が保存された ALS 剖検例の中からプニナ小体を欠く症例を抽出し、それらの臨床病理学的・遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

対象は、1965 年から現在までに当施設に標本が保存された ALS160 症例である。病理診断書にプニナ小体の記載のない症例を抽出した後、下位運動神経核 (V、VII、XII 脳神経核、C7、Th8、L4 レベルの脊髄前角) についての 4 μm 厚 HE 染色標本に加え、いくつかの部位でのシスタチン C 免疫染色標本を観察し、プニナ小体を認めない症例について、その臨床病理像、遺伝的背景を検討した。

4. 研究成果

(1) プニナ小体を欠く症例の内訳

ALS160 例中、プニナ小体を認めない症例は 29 例あった (約 18% (図 2))。これらのうち、下位運動系の変性が強く残存神経細胞の数が少ないためにプニナ小体が観察されないと考えられる例は 7 例であった。これらは罹病期間が 4-14 年 (平均 9 年) と長く、6 例が人工呼吸器に接続されており、病理学的には

全例で TDP-43 陽性構造の出現を認めた。残りの 22 例については、相当数の下位運動神経細胞を観察したがプニナ小体を認めず、これらの臨床病理・遺伝学的背景についてさらに検討した。SOD1 など、TDP-43 以外の蛋白質の病的蓄積を認めた症例は 11 例であった。うち 8 例には SOD1 陽性 NCIs を認めた。既報告の SOD1 遺伝子 A4T 変異例²⁾、D101Y 変異例³⁾およびその同胞、変異未同定例⁴⁾に加え、I104F 変異例、L126S 変異例、さらに変異未同定例 2 例 (どちらも孤発例) であった。FUS 陽性構造を伴うものは 2 例であった。1 例は高齢発症の孤発性 ALS で、FUS 遺伝子異常を伴わず、transportin 陽性構造が出現する点が FTLD-FUS と共通していた⁵⁾。もう 1 例は FUS 遺伝子変異を伴う ALS として矛盾のない症例であった。また、下位運動神経細胞の胞体内に p62 単独陽性構造を伴う 1 例において、p62 をコードする SQSTM1 遺伝子に 2 つの稀な変異が認められた。TDP-43 陽性の神経細胞およびグリア胞体内封入体の出現を認める例が 9 例、既存の免疫染色では病的構造物を同定しえないが、上位・下位運動神経細胞に脱落を認め ALS と診断される例が 2 例あった。

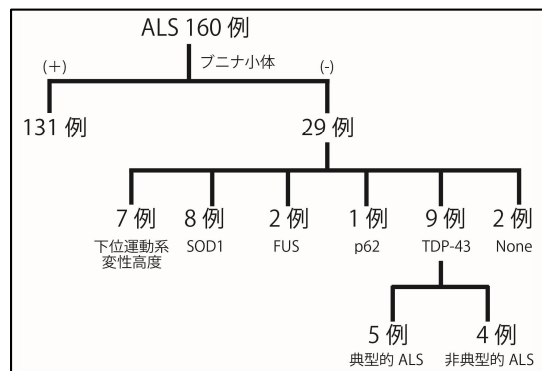


図2 ALS160 症例のうちわけ

(2) 各症例の詳細について

SOD1 遺伝子 I104F 変異例 (症例 1)

Takahashi らが、常染色体優性遺伝形式の家族性 ALS として報告した症例であり、多系統変性および conglomerate 封入体 (図 2A) の出現を認める⁶⁾。今回改めて SOD1 遺伝子解析を行い、I104F 変異が同定された。Fujita らは I104F 変異 ALS 一家系の臨床像を詳細に検討し、罹患者の発症年齢や初発症状が様々であることを報告している⁷⁾。本家系でも発症年齢は様々であり、また未発症の変異キャリアの存在も示唆された。I104F 例の病理像はこれまで報告がないが、今回 SOD1 抗体を用いた免疫染色を行い、conglomerate 封入体の出現領域を超えた広範な領域に SOD1 陽性 NCIs が認められた (図 2B)。

FUS 陽性構造出現例 (症例 2)

常染色体優性遺伝形式の家族性 ALS の一例であり、若年発症かつ進行が急速であるなど、FUS 遺伝子変異を伴う ALS として矛盾しない臨床像を呈していた。病理学的にも上位およ

び下位運動神経系、クラーク核・後脊髄小脳路系、後索、黒質、青斑核、視床下核などに変性が認められた。これらの領域には神経細胞胞体内に好塩基性封入体が認められ(図2C)、免疫染色では、FUS 陽性 NCIs およびオリゴデンドログリア胞体内封入体(GCIs)を多数認めた(図2D)。FUS 遺伝子変異の同定など、さらなる解析と報告を予定している。

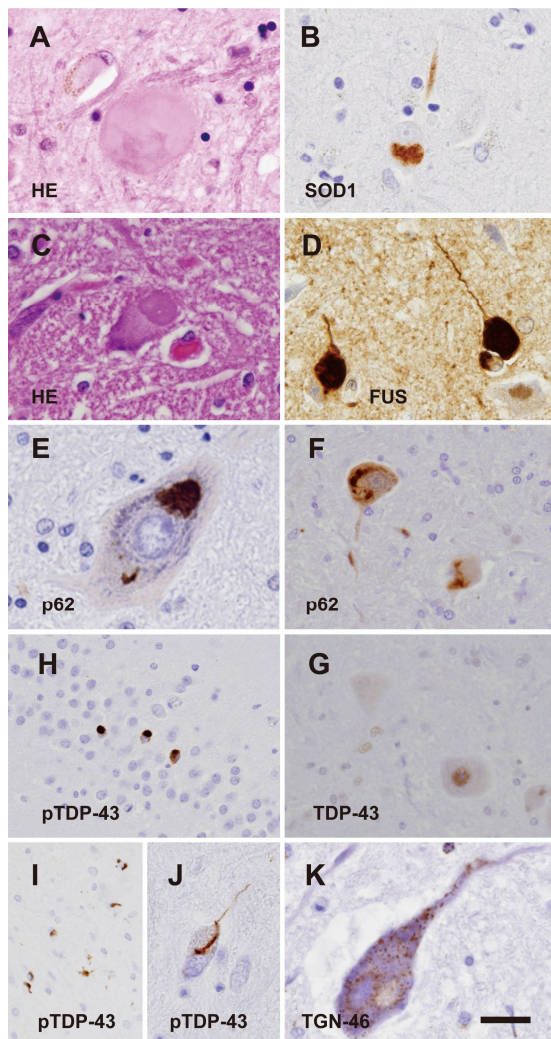


図3 プリナ小体を欠く ALS の細胞病理。

- A,B: **症例 1.**
Conglomerate 封入体(A, 視床)。
SOD1 陽性 NCIs(B, 運動野皮質第3層)。
- C,D: **症例 2.**
好塩基性封入体(C, 青斑核)。
FUS 陽性 NCIs, GCIs(D, 大脳皮質第3層)。
- E-G: **症例 3.**
p62 陽性 NCIs (E, 腰髄前角)。
p62 陽性 NCIs は TDP-43 陰性(E, F は連続切片、顔面神経核)。
- H: **症例 4.** 海馬歯状回の NCIs。
- I: **症例 5.** 延髄網様体の豊富な GCIs。
- J,K: **症例 6.**
pTDP-43 陽性 NCIs(J, 脊髄中間帯)。
下位運動神経細胞で認めたゴルジ装置の断片化(K, 腰髄)。
- Bar: 40 μm (A-F, G, J, K), 80 μm (H, I)

p62 単独陽性構造を認めた ALS (症例 3)

高齢発症、下位運動神経徴候優位で全経過30か月の孤発性 ALS において、下位運動神経細胞の胞体内に、p62 単独陽性を占めず封入体を認めた(図2E, F)。これらは TDP-43(図2G)、リン酸化 TDP-43、FUS、タウ、シヌクレインなどのいずれの蛋白質についても陰性であった。p62 をコードする SQSTM1 遺伝子を検索したところ、V90M、V153I の二つの変異を認め、これらは異なるアリルに存在していた(複合ヘテロ変異)。一方、下位運動神経系以外では、上位運動神経系、黒質、脳幹網様体などにおいて、TDP-43 およびリン酸化 TDP-43 陽性の NCIs、GCIs を認め、また本例は病理学的にパーキンソン病を合併していた。複数の研究によって、正常対照に比し ALS および FTL D 群では SQSTM1 遺伝子変異の保有率が優位に高いことが確認されており⁸⁻¹⁰⁾、現在 SQSTM1 遺伝子変異は ALS および FTL D 発症の危険因子と考えられている。本例でも稀な二つの変異が ALS の発症や臨床病理像に影響を与えた可能性が考えられる。本例を論文として報告した(5. 発表論文)。

TDP-43 陽性 NCIs, GCIs を伴う例

9 例が該当し、いずれも孤発性であった。うち 8 例では TDP-43 陽性 NCIs の出現は比較的運動系に限局し(Nishihira らの分類¹¹⁾で type 1 に相当する)海馬歯状回を含め神経系に広範に NCIs が認められた例は 1 例のみであった(**症例 4**)(図2H)。

5 例では変性は運動系に限局し、プリナ小体を欠くことを除けば臨床病理学的に典型的な ALS と区別できなかった。その一方、残りの 4 例では以下の様な特徴が認められた。約 5 年の罹病期間を通じて両上肢の筋萎縮、筋力低下が目立った、いわゆる Flail arm syndrome に属する一例(**症例 5**)では、頸髄に病変が強調され、通常の ALS と比較し GCIs が広範かつ量的にも多く出現していた(図2I)。Flail arm syndrome は ALS としては比較的予後のよい特殊な一群と考えられており、その病態機序を明らかにするために、類似症例の蓄積が重要と思われた。また、2 年間の罹病期間中ほぼ球症状のみで経過し、舌下神経核に極端に変性が強調された 1 例、ALS と多系統萎縮症という二つの稀な神経変性疾患を合併した 1 例が認められた。さらに、20 歳代発症、全経過 5 年(人工呼吸器接続なし)の 1 例(**症例 6**)において、pTDP-43 陽性 NCIs (図2J)、GCIs の数は ALS として極端に少数であった。ALS に共通して認められる下位運動神経細胞の病的変化である、ゴルジ装置の断片化が観察された(図2K)。

既存の免疫染色で病的構造を指摘できない ALS

2 例が該当し、いずれも孤発性であった。1 例は 40 歳代で上位運動神経徴候で発症し、その後四肢麻痺、眼球運動障害、認知機能低

下を来した全経過 17 年（人工呼吸器接続なし）の ALS であり、上位・下位運動神経系の明らかな神経細胞脱落に加え、淡蒼球・黒質・視床下核の変性を伴っていた。TDP-43、ユビキチン、p62、FUS、SOD1 免疫染色でも陽性構造は認められなかった。多系統変性を伴う稀な ALS の一病型と考えられた。なお本例では VCP、CHMP2B、SQSTM1 の遺伝子変異は認められなかった。もう一例は 60 歳代発症、全経過約 9 か月の ALS であり、同様に TDP-43 等の免疫染色で病的構造物を見出し得なかった。

(3)まとめ

プニナ小体を欠く ALS 症例には、臨床病理学的、また遺伝学的に特異な症例があることが確認された。これらの症例は、Optineurin などの既知、あるいは今後同定される ALS 原因遺伝子の検索対象となり得る。個々の症例の臨床病理像は多様であり、何らかの共通項を見出すことは困難であった。今後さらに類似症例を蓄積することにより、プニナ小体の形成を経ずに下位運動神経細胞の脱落を来す ALS の疾患機序が明らかにされることが期待される。

<引用文献>

- 1) Piao YS et al. Brain Pathol 12:10-22, 2003.
- 2) Takahashi H et al. Acta Neuropathol 88:185-188, 1994.
- 3) Tan CF et al. Acta Neuropathol 108:332-336, 2004.
- 4) 巻淵隆夫、生田房弘. 脳と神経 29: 1332-1334, 1977.
- 5) Takeuchi R et al. Neuropathol Appl Neurobiol 39:580-584, 2013.
- 6) Takahashi H et al. J Neurol Sci 120:15-21, 1993.
- 7) Ikeda M et al. Neurology 45:2038-2042, 1995.
- 8) Le Ber I et al. JAMA Neurol 70: 1403-1410, 2013.
- 9) Kwok CT et al. Eur J Hum Genet 22: 492-496, 2014.
- 10) van der Zee J et al. Acta Neuropathol 128:397-410, 2014.
- 11) Nishihira Y et al. Acta Neuropathol 116: 169-182, 2008.

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 1 件)

Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, Yokoseki A, Arakawa K, Sekine Y, Shimohata T, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Onodera O, Takahashi H. Sporadic ALS with compound

heterozygous mutations in the SQSTM1 gene. Acta Neuropathol (査読あり) 126:453-459, 2013. DOI 10.1007/s00401-013-1150-5

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 清水宏、田中英智、松崎紗矢香、黒羽泰子、金澤雅人、小池亮子、堀川楊、小柳清光、小野寺理、西澤正豊、柿田明美、高橋均。TDP-43 陽性封入体の出現を認めた家族性 ALS の姉妹剖検例。第 56 回日本神経病理学会総合学術研究会、2015 年 6 月 3-5 日、九州大学医学部百年講堂（福岡市）
- 2) 他田真理、中尾洋子、清水宏、小野寺理、伊藤聡、辻畑光宏、高橋均、柿田明美。小脳失調で発症し conglomerate 封入体と神経細胞胞体内空胞を伴う多系統変性を認めた ALS の 1 例。第 55 回日本神経病理学会総合学術研究会、2014 年 6 月 5-7 日、学術総合センター（東京都）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 宏（SHIMIZU HIROSHI）
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：40608767

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし