

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640029

研究課題名(和文)リン酸化TDP-43病理に準拠した「ALSからみたALSのための病型分類」の提唱

研究課題名(英文) Heterogeneity of TDP-43 pathology and clinicopathologic correlations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性筋萎縮性側索硬化症の96連続剖検例を対象に、抗リン酸化TDP-43(pTDP-43)抗体を用いて大脳皮質を免疫組織化学的に検討した。これらの症例は海馬歯状回顆粒細胞における陽性細胞質内封入体を欠く群(ALS-C: n = 63)とそれを有する群(n = 33)に二分された。さらに、後者の33例は側頭葉新皮質における顆粒状、点状の変性神経突起の多寡により2群(ALS-T/few DNs: n=22; ALS-T/many DNs: n = 11)に分類された。各群の臨床病理所見を考慮すると、これら3群は個々にpTDP-43の脳内・細胞内局在が異なる独立した亜群であるとみなされた。

研究成果の概要(英文)：A nuclear protein, TDP-43, is the major pathological protein in ALS. We attempted to clarify the cortical pathology in cases of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS: n = 96) using an antibody specific to phosphorylated TDP-43 (pTDP-43). The cases were divided into two groups: those without pTDP-43-positive neuronal cytoplasmic inclusions in the hippocampal dentate granule cells (classical ALS: ALS-C, n = 63), and those with such inclusions (ALS with temporal lesions: ALS-T, n = 33). Furthermore, the ALS-T cases were divided into two subgroups based on semi-quantitative estimation of pTDP-43-positive dystrophic neurites (DNs) in the temporal neocortex: ALS-T/few DNs (n = 22) and ALS-T/many DNs (n = 11). Considering the patient survival time and severity of motor neuron loss in each group, transition from ALS-C to ALS-T, or from ALS-T/few DNs to ALS-T/many DNs during the disease course appeared unlikely. Therefore, each of these three groups was regarded as an independent subtype.

研究分野：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 TDP-43 病型分類 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は中年期に発症する致死的な神経変性疾患で、患者の 90%以上は孤発例である。主要徴候は上位、下位運動ニューロンの変性による進行性の筋萎縮と筋力低下であり、病理学的には残存する下位運動ニューロンの細胞質内にユビキチン陽性スケイン様封入体がみられることが特徴である。一方、ALS 患者の一部において認知症を呈することが知られており (ALS with dementia: ALS-D)、これらの患者においては、運動系を超えて海馬など大脳の広い範囲にユビキチン陽性の神経細胞細胞質内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs) や変性神経突起 (dystrophic neurites: DNs) が認められる。さらに、同様のユビキチン陽性構造物は運動ニューロン疾患 (motor neuron disease: MND) を伴う、あるいは伴わない前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia: FTD) においても認められることが示されており、ALS、ALS-D、そして FTD は一連の疾患スペクトラムであると考えられてきた。近年、ALS とユビキチン陽性、かつタウ、 α -シヌクレイン陰性の神経細胞内封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, tau- and α -synuclein-negative inclusions: FTLD-U) の主要原因タンパク質として TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定され、ALS と FTD を両端とする一連の疾患群は TDP-43 proteinopathy という新たな疾患概念として捉えられる様になった。

FTLD-U は大脳皮質の NCIs, DNs、神経細胞核内封入体 (neuronal intranuclear inclusions: NIIs) といったユビキチン陽性構造物の形態と皮質内局在により 3 群に分類され、それぞれが特徴的な臨床像を有するこ

とが示された。その後、FTLD-U の大部分が FTLD-TDP であることが確認され、TDP-43 陽性組織像により Type A から Type D の 4 群に分類されている (Mackenzie et al., 2011)。この分類では、FTD を伴う MND の症例では、中等数の NCIs が皮質全層に出現し DNs がきわめて少ない Type B を呈するとされた。しかし、多数の NCIs と DNs を特徴とする Type A も少なからず見られるという報告もあり、FTLD-MND や ALS-D における TDP-43 陽性の脳皮質組織像は一様ではない可能性がある。一方、ALS について、我々はこれまで TDP-43 陽性構造物が主に運動系に限局して認められる type 1 と前頭葉、側頭葉、海馬を含む大脳の広い範囲にみられる type 2 の 2 群に分けられること、また type 2 では認知症の合併が高頻度に見られることを示してきた (Nishihira et al., 2008)。

2. 研究の目的

ALS の大脳皮質において pTDP-43 陽性組織像の詳細な検討はこれまでなされておらず、これを解析し臨床像との関連を検討することで、ALS の新たな病型分類を提唱することを目的とした。従って、本研究では、正常核内 TDP-43 を標識しないため異常構造物の認識が容易である抗リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) 抗体を用い、ALS 患者脳における大脳皮質の pTDP-43 陽性組織像について検討し、それと臨床病理像や生化学的特徴との相関の有無について検討した。

3. 研究の方法

(1) 対象

新潟大学脳研究所病理学分野において 1975 年から 2003 年までの期間に孤発性 ALS と臨床病理学的に診断された連続剖検例 126 例を抽出した。これらは、病理学的に脊髄前角細胞の細胞質内にプニナ小体またはユビキチン陽性スケイン様封入体を有し、かつ上

位、下位運動ニューロンの脱落を認め、臨床的には孤発例で、運動障害で発症もしくは認知症発症から1年以内に運動障害を呈した症例群である。他の変性疾患の合併が認められた4例（アルツハイマー病2例、進行性核上性麻痺1例、多系統萎縮症1例）および十分な病理検索が困難であった26例を除き、96例を対象とした。

(2) 組織学的解析

運動野皮質、前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬、大脳基底核、舌下神経核、頸髄および腰髄前角を含むホルマリン固定、パラフィン包埋ブロックから、4 μm 厚の切片を作製した。Hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い、各部位について神経細胞脱落の程度を半定量的に4段階で評価した(0, なし; 1, 軽度; 2, 中等度; 3, 重度)。また、前頭側頭葉の萎縮または同部位の神経細胞脱落とグリオーシスを認める場合に前頭側頭葉変性症を有すると判断した。

(3) 免疫組織化学

前頭葉、側頭葉、運動野、および大脳基底核の切片について、一次抗体としてモノクローナル抗 pTDP-43 抗体 (phospho Ser409/410; Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan; 1:5000) を用いて免疫組織化学を行った。さらに一部の症例では、リン酸化の有無に関わらず TDP-43 を認識するポリクローナル抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech Group Inc., Chicago, IL; 1:4000) を追加した。免疫組織化学は Histofine Simple Stain MAX-PO kit によるポリマー法で行い、diaminobenzidine (DAB) で発色した。

(4) 統計学的解析

3 群間の臨床像および組織像の比較には、Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 検定を、また罹病期間の比較には Kaplan-Meier 法と

log-rank 検定を用いた。比率の検定には、Fisher の正確検定および Bonferroni 補正による多重比較検定あるいは Ryan の多重比較検定を用いた。解析は GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA)、SPSS Statistics version 12.0 (IBM, Armonk, NY) および R version 3.1.2 (<http://www.r-project.org/>) で行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

(5) 生化学的解析

凍結患者脳の前頭葉皮質より Hasegawa らの既報(2008)に従いサルコシル不溶性画分を調整し、それを電気泳動し、モノクローナル抗 pTDP-43 抗体 (1:2000) を用いたイムノブロット解析を行い、pTDP-43 の C 末端側断片のバンドパターンを検討した。

4. 研究成果

(1) pTDP-43 陽性大脳皮質組織像による分類

対象となる 96 例をまず海馬歯状回顆粒細胞における pTDP-43 陽性 NCIs を認めない例 ALS-classic (ALS-C: $n = 63$) と認める例 ALS with temporal lesion (ALS-T: $n = 33$) とに分類した(図 1)。

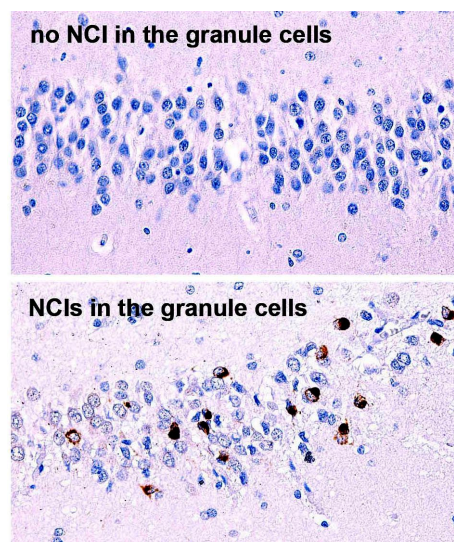


図 1. ALS-C と ALS-T

さらに、ALS-Tの33例の中には、側頭葉新皮質に無数の顆粒状もしくは点状DNsが見られる症例とそれをほとんど見ない症例が存在した。そのため、側頭葉新皮質におけるDNsの出現の多寡により、これらの症例を few DNs 群 (ALS-T/ few DNs: n = 22) と many DNs 群 (ALS-T/many DNs: n = 11) に分類した(図2)。ALS-Cについては側頭葉新皮質DNsを認める症例はなかったため同様の分類は不可能であった。

引き続き、ALS-C、ALS-T/few DNs および ALS-T/ many DNs の3群について、臨床病理学的に比較検討を行った。

(2) 臨床的特徴

3群間で性別と死因には有意差を認めなかった。一方、ALS-T/many DNs の発症年齢はALS-Cに比し有意に高く ($P = 0.024$)、その罹病期間はALS-C ($P < 0.0001$) および ALS-T/few DNs ($P = 0.003$) に比し有意に短かった。初発症状はALS-Cでは他の2群に比べ四肢の症状で発症した割合が高かった。経過中に認知症を呈した例はALS-Cでは63例中1例(2%)と、ALS-T/few DNs ($P < 0.001$) および ALS-T/many DNs ($P < 0.00001$) に比し明らかに少なかった。

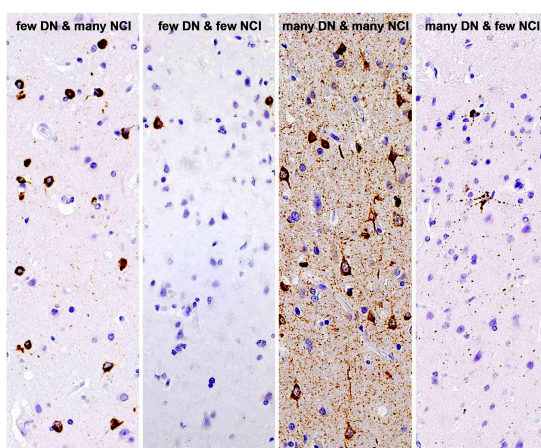


図2. ALS-T/few DNs と ALS-T/many DNs

(3) 組織学的特徴

運動野皮質における神経細胞脱落の程度は3群間で有意差を認めなかった。一方、頸髄および腰髄の前角細胞と舌下神経核における神経細胞脱落の程度はALS-T/many DNsでALS-C(それぞれ $P < 0.001$ および $P = 0.001$)とALS-T/few DNs(それぞれ $P = 0.018$ および $P = 0.022$)におけるそれに比し軽度であった。組織学的に前頭側頭葉変性症を合併している割合はALS-Cでは6%であり、ALS-T/few DNs(36%、 $P < 0.001$)、ALS-T/many DNs(64%、 $P < 0.0001$)のそれに比し有意に低かった。また、運動野と側頭葉皮質を比較すると、ALS-T/few DNs および ALS-T/many DNsでは、それぞれ約半数の症例で運動野皮質に比し側頭葉皮質におけるpTDP-43陽性NCIsの出現が多かった。

(4) 生化学的解析

サルコシル不溶性画分の抗pTDP-43抗体によるイムノプロット解析では、20-kDa付近にみられるC末端側断片のバンドに注目すると、今回イムノプロット解析を行ったすべての症例において、既報のFTLD-TDP Type Bと同様のバンドパターンを示しており、各群間でのバンドパターンの違いは明らかでなかった。

(5) 総括

以上を纏めると、孤発性ALSの大脳皮質におけるpTDP-43陽性組織像は多様であることが示された。対象例はpTDP-43陽性像の広がりおよびDNsの多寡によりALS-C、ALS-T/few DNs、およびALS-T/many DNsの3群に分類が可能であり、各群はそれぞれ特徴的な臨床像や病理像を有していた。臨床的にも多様である孤発性ALSにおいて、異常リン酸化TDP-43蓄積像の多様性を知り、それに基づいて適切に評価、分類することは孤発性ALSの病態を理解し、将来の治療や予防につなげるために重要であると考えられた。

<引用文献>

- 1 Mackenzie IRA, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, Perry RH, Trojanowski JQ, Mann DMA, Lee VMY. A harmonized classification system for FTLD-TDP pathology. *Acta Neuropathol* 122: 111-113, 2011
- 2 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* 116: 169-182, 2008
- 3 Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64: 60-70, 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 4 件)

- 1 Yokoyama Y, Toyoshima Y, Shiga A, Tada M, Kitamura H, Hasegawa K, Onodera O, Ikeuchi T, Someya T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Pathological and clinical spectrum of progressive surpranuclear palsy: with special reference to astrocytic tau pathology. *Brain Pathol* 26: 155-166, 2016 (査読有)

DOI: 10.1111/bpa.12265

- 2 Takeuchi R, Toyoshima A, Tada M, Tanaka H, Shimizu H, Shiga A, Miura T, Aoki K, Aikawa A, Ishizawa S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Globular glial mixed four repeat tau and TDP-43 proteinopathy with motor neuron disease and frontotemporal dementia. *Brain Pathol* 26: 82-94, 2016 (査読有)

DOI: 10.1111/bpa.12262

- 3 Mori F, Miki Y, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K. Sortilin-related receptor CNS expressed 2 (SorCS2) is localized to Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 608: 6-11, 2015 (査読有)

DOI: 10.1016/j.neulet.2015.09.030

- 4 Kaneko M, Noguchi T, Ikegami S, Sakurai T, Kakita A, Toyoshima Y, Kambe T, Yamada M, Inden M, Hara H, Oyanagi K, Inuzuka T, Takahashi H, Hozumi I. Zinc transporters ZnT3 and 6 are downregulated in the spinal cords of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 93: 370-379, 2015 (査読有)

DOI: 10.1002/jnr.23491

[学会発表](計 7 件)

- 1 Takahashi H. Amyotrophic lateral sclerosis: discovery of TDP-43 and subsequent development. First Annual Conference of Neuropathology Society of India (招待講演), 19 December 2015, Hyderabad (India)
- 2 Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Shiga

A, Miura T, Aoki K, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Globular glial mixed four repeat tau and TDP-43 proteinopathy with motor neuron disease and frontotemporal dementia. 26th International Symposium on ALS/MND, 11 December 2015, Orlando (USA)

3 Takeuchi R, Tada M, Toyoshima Y, Shiga A, Sato T, Horie M, Takebayashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takahashi H, Kakita A. Distinct pattern of neuronal and glial TDP-43 inclusions in motor cortex. 第 56 回日本神経学会, 2015 年 5 月 20 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

4 Takahashi H. Amyotrophic lateral sclerosis: discovery of TDP-43 and subsequent development. 3rd Congress of Asian Society of Neuropathology (招待講演). 7 November 2014, Seoul (Korea)

5 Takahashi H. A novel motor neuron disease and frontotemporal lobar degeneration with globular astrocyte-predominant tau and TDP-43 inclusions. 18th International Congress of Neuropathology(招待講演), 17 September 2014, Reo de Janeiro (Brazil)

6 竹内亮子, 他田真理, 志賀 篤, 今野卓也, 豊島靖子, 小野寺 理, 西沢正豊, 柿田明美, 高橋 均. 筋萎縮性側索硬化症の TDP-43 皮質組織像の多様性: 臨床病理および生化学的解析. 第 55 回日本神経病理学会, 2014 年 6 月 6 日, 学術総合センター(一橋講堂: 東京都・千代田区)

7 Takeuchi R, Tada M, Shiga KA, Konno T, Toyoshima Y, Onodera O, Nishizawa M,

Kakita A, Takahashi H. Clinicopathologic analysis of TDP-43 expression in the cerebral cortex in ALS. 66th Annual Meeting of American Academy of Neurology, 28 April 2014, Philadelphia (USA)

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: 9 0 2 0 6 8 3 9

(2) 研究分担者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA, Yasuko)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 2 0 3 3 4 6 7 5

他田 真理 (TADA, Mari)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 3 0 6 4 6 3 9 4

(3) 連携研究者

小野寺 理 (ONODERA, Osamu)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 2 0 3 0 3 1 6 7