

平成30年6月12日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04270

研究課題名(和文) 紀伊ALS/PDCに対する最新の包括的神経科学研究によるALS治療シーズの創出

研究課題名(英文) Creation of ALS treatment seed by latest comprehensive neuroscience research for Kii ALS/PDC

研究代表者

伊東 秀文 (Ito, Hidefumi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20250061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、1970年代に剖検された過去の紀伊ALS6例と2013年以降に剖検された現在の紀伊ALS4例の病理学的特徴を比較検討した。その結果、タウタンパクの神経細胞質内凝集体である神経原線維変化とグリア細胞質内封入体、TDP-43タンパクの神経・グリア細胞質内封入体とも、過去症例と現在症例における分布はきわめて類似していた。この結果から、紀伊ALSの基本的な病理学的特徴は生活環境の変化によっても変化していないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We compared pathological features of Kii ALS among past cases and present cases. For tau pathology analysis, we examined distribution of NFT and glial cytoplasmic inclusions. In both the past and the present cases, NFT were found in motor cortex, frontal and temporal lobes, hippocampus, amygdala, and furthermore brainstem. NFT were found predominantly in superficial layer of cerebral cortex. In addition, we detected granular hazy inclusions and granular or fuzzy tau immunoreactivity in processes of astrocytes as glial cytoplasmic inclusions in both cases. In TDP-43 pathology analysis, unlike with conventional ALS, neurocytoplasmic inclusions were detected more abundant in hippocampus than basal ganglia in both cases. These features of tau pathology and TDP-43 pathology were consistent in both past and present cases. Consequently, it is supposed that the basic pathological features of Kii ALS did not change through the change of living environment.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 パーキンソン認知症複合 紀伊半島 タウタンパク TDP-43

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)は運動神経の変性脱落により発症後1-5年で死亡する、もっとも過酷な神経変性疾患である。100年以上にわたる研究にも関わらず病因は全く不明で有効な治療法はない。患者と家族の肉体的・精神的負担が大きい上、医療経済における損失も膨大であることから、ALSの原因究明と治療法の確立は社会的要請であり、研究者に課せられた使命である。

ALSの発症率は世界的にほぼ一定であるが、グアム島と紀伊半島南部にはALSの多発地域があることが、それぞれ Hiranoら、本学の木村・八瀬らによって、いずれも1961年に報告された。これらはGuam ALS、Kii ALSとして知られ、なぜこの地域に多発するのか、その理由の究明がALSの病因解明に通じるとして国際的に注目を集めてきた。これらの地域にはパーキンソン病に認知症を伴った parkinsonism-dementia complex (PDC)を呈する患者も共通して存在する。

Kii ALS/PDCは三重県穂原地区と和歌山県古座川地区の2カ所に集積があるが、最近の葛原らによる疫学調査により、穂原地区ではALSの発症が減少しPDCが増加していることが明らかとなった。一方、古座川ALSの有病率は以前より低下しているものの、いまだに一般地域の5倍を呈している(研究分担者業績: Kihira T, Hironishi M, et al. Amyotroph Lat Scl Other Motor Neuron Disord 2005)。PDCについては調査されておらず、不明である。そこでわれわれは、平成26-30年度基盤研究(C)「和歌山県ALS多発地における認知症とパーキンソン認知症複合の発症状況に関する研究」(代表: 廣西昌也)により疫学調査を行い、現在最終結果解析中である。

一方われわれは、2010年にALSの新規原因遺伝子 optineurin (OPTN)を発見し(Maruyama H, Morino H, Ito H et al. Nature 2010)、その詳細な神経病理所見を報告した(Ito H et al. Acta Neuropathol 2011)。その後もVCP、ubiquilin2、C9orf72などが報告されているが、Guam/穂原ALSではいずれの遺伝子異常も見いだされていない。一方、古座川ALSでは15例中3例でC9orf72遺伝子異常が(Ishiura H, Kihira T, et al. Arch Neurol 2012)、5例中1例でOPTN遺伝子変異が見いだされた(Naruse H, Kihira T, et al. Amyotroph Lat Scl 2012)。C9orf72変異もOPTN変異も孤発性ALSで見出されていることから、浸透率は高くないと考えられ、発症には環境因子等が関与する可能性がある。これらの解析結果から、穂原ALSと古座川ALSは遺伝因子・環境因子とも異なる可能性があるが、いずれも少数例での検討であり、より包括的・網羅的な検討が必要である。

一方、PDCの臨床像を呈する遺伝子異常としてMAPT, PGRN, SNCA, GBAなどが報告

されているが、最近報告されたCSF1R遺伝子変異を伴う hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids (HDLS)もPDCの臨床像をとりうる。われわれは最近、和歌山県で出生し50歳で認知症を発症したCSF1R変異を伴う52歳女性HDLS症例を経験した。古座川地区にはHDLS患者が潜在している可能性があり、PDC患者についても包括的な遺伝子解析が必要である。

Kii ALS/PDCはAlzheimer神経原線維変化が多発し、老人斑が乏しいという特徴がみられ、tauopathyの一型とされてきた。しかし最近の研究で、これらの症例にはTDP-43や α シヌクレインの蓄積もみられ、multiple proteinopathyであることが示されている。紀南地域でALSの発症数が減少している背景として生活環境の変化が想定されているが、生活環境の変化を経てKii ALS/PDCの病理像に変化が生じたか否かについては明らかとなっていない。

2. 研究の目的

- 1) 1960-70年代と2000年以降に剖検された古座川ALS/PDC剖検脳を、RNA代謝と蛋白分解系を制御している諸因子の発現と分布に注目して生化学的・神経病理学的に解析し、ALS多発期と減少期の所見を比較検討する。これにより、Kii ALS/PDCの病態を明らかにするとともに、ALS発症率が減少している要因を明らかにする。
- 2) 古座川ALS/PDC症例の遺伝子を網羅的に解析し、その遺伝学的背景を明らかにする。
- 3) 最近の古座川ALS/PDC症例からiPS細胞を作製し、運動神経、グリア、大脳皮質細胞に分化誘導して、その変性過程を明らかにするとともに、RNA代謝経路と蛋白分解系活性を解析し、孤発性ALSの新たな治療のシーズ候補創出をめざす。

3. 研究の方法

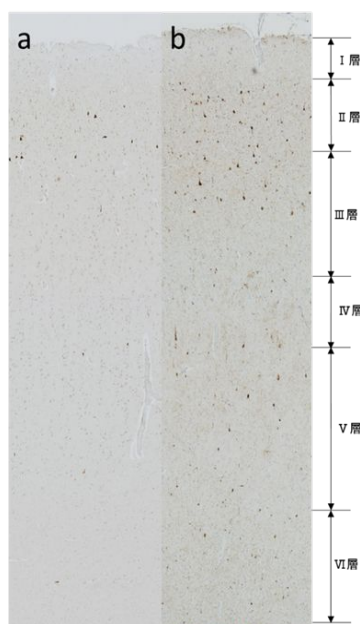
- 1) 本学で剖検され、厳重に保管されている1960-70年代および2000年以降の古座川ALS/PDC脳、連携施設にある古座川地区住民の正常対照脳、および孤発性ALSの剖検脳を、RNA代謝関連蛋白、蛋白分解系システム関連蛋白、tau/ α -synucleinなど神経変性疾患で蓄積する蛋白を中心に生化学的・免疫組織化学的に検討し、その染色性、発現量、分布を詳細に解析する。
- 2) 新規に診断した古座川ALS/PDC患者についてALS/PDC関連遺伝子を網羅的に解析する。既知変異のない患者では次世代シーケンサー等を用いて新規原因遺伝子の同定を試みる。
- 3) 新規の古座川ALS/PDC患者からiPS細胞を作製し、神経細胞・グリア細胞に分化誘導してproteasome・autophagy活性を中心に解析する。

4. 研究成果

まずわれわれは、1965-77年に剖検され、本学に保管されている過去の古座川 ALS/PDC 6例のホルマリン固定脳を整理し、病理学的に検索可能な部位がどの程度残されているか、1例1例検討した。その結果、リストアップされていた7例のうち、1例はすべての脳部位が検索され尽くされ、病理組織が残されていないことが判明した。残り6例ではホルマリン固定脳が保存されていることは確認できたが、今回われわれが検索対象とした部位がおおむね残されていたのは1例のみであった。残り5例については、重要部位が剖検時に切り出され、パラフィンブロック化されて新潟大学に保管されていることが判明した。そのため、新潟大学の柿田明美教授と共同研究契約を締結したのち、当該研究代表者が新潟に赴いて標本を検鏡し、今回の研究に必要な部位を確認したのち、薄切切片を入手した。これら6例で免疫組織化学的に TDP-43, タウ, α シヌクレイン, A β タンパクの局在を検討し、マッピングを行ったところ、いずれの症例においてもタウタンパクが広範に蓄積しており、A β タンパクの蓄積はみられなかった。TDP-43 は主として脊髄の前角細胞とグリア細胞に、 α シヌクレインは扁桃体の神経突起にわずかに蓄積がみられた。これらの分布は Guam 島 ALS/PDC における分布ときわめてよく類似していることが判明した。

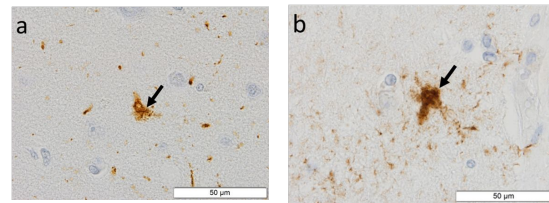
一方、最近の古座川 ALS/PDC 症例として、2013年に本学で剖検された1例に加え、分担研究者の廣西らによる紀南地域での診療活動によって、当該研究期間である2015-2017年に剖検が得られた古座川 ALS/PDC 3例について、詳細な神経病理学的解析を行い、過去と現在の症例の所見を比較検討した。

その結果、タウ免疫染色では、過去、現在の症例ともに神経原線維変化が運動野、前頭葉、側頭葉、扁桃体、海馬で多数認められ、脳幹、脊髄まで認められたが、後頭葉、基底核では比較的少数であった。大脳皮質では浅層優位に出現していた。



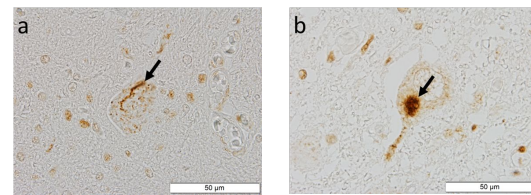
a. 過去例 b. 現在例

また、グアム島 ALS に特徴的とされる granular hazy inclusions が全例に見られた。



a. 過去例 b. 現在例

TDP-43 陽性神経細胞質内封入体は全例の脊髄にみられ、大脳では基底核よりも海馬に多数認められた。TDP-43 病変は、Mackenzie 分類 Type B と一致した。



a. 過去例 b. 現在例

以上から、タウ病理、TDP-43 病理とも、過去と現在の古座川 ALS/PDC の基本的な神経病理所見は 40 年以上を経ても類似しており、最近の古座川 ALS/PDC 4 例のうち、古典的 ALS との中間的な病理像を示す症例は認められなかった。この結果は、環境因子が変化しても病理像に変化がみられないことを示しており、古座川 ALS/PDC の病因には環境因子よりも遺伝因子の関与が大きいことが示唆された。

さらにこれら 10 例において、SOD1, FUS, C9RANT, ubiquilin-2 染色を行ったところ、有意な構造物は認められず、いずれの症例も SOD, FUS, C9ORF72, UBQLN2 の変異による遺伝性 ALS ではないと考えられた。

一方、われわれは OPTN 変異を伴う ALS の剖検例において、polyubiquitin family のうち直鎖状ユビキチンが神経細胞質内封入体の形成に関与していることを見出し報告したが、古典的 ALS および古座川 ALS/PDC の神経細胞質内封入体の形成にも直鎖状ユビキチンが関与していることを見出し、古座川 ALS/PDC における神経細胞死に直鎖状ユビキチンが関与していることを明らかにした。

遺伝子解析については、研究協力者である広島大学の川上教授らにより紀南地域出身者を含む 55 例の ALS 患者について網羅的に遺伝子解析が実施されたが、既知の ALS 遺伝子異常は見出されず、タンパク分解系に關する未知の原因遺伝子が存在する可能性が示唆された。古座川 ALS/PDC 患者の iPS 細胞を用いた病態研究については、1 例で承諾が得られ、血液細胞から iPS 細胞を樹立し、運動神経への分化誘導を行い解析したが、新規知見は得られなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- 1) Ayaki T, Ito H, Komure O, Kamada M, Nakamura M, Wate R, Kusaka H, Yamaguchi Y, Li F, Kawakami H, Urushitani M, Takahashi R. Multiple Proteinopathies in Familial ALS Cases With Optineurin Mutations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018 Feb 1;77(2):128-138. doi: 10.1093/jnen/nlx109. 査読有
- 2) Honjo Y, Ayaki T, Horibe T, Ito H, Takahashi R, Kawakami K. FKBP12-immunopositive inclusions in patients with α -synucleinopathies. *Brain Res*. 2018 Feb 1;1680:39-45. doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.012. Epub 2017 Dec 12. 査読有
- 3) Takeshima K, Ariyasu H, Ishibashi T, Kawai S, Uraki S, Koh J, Ito H, Akamizu T. Myotonic dystrophy type 1 with diabetes mellitus, mixed hypogonadism and adrenal insufficiency. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*. 2018 Jan 18;2018. pii: 17-0143. doi: 10.1530/EDM-17-0143. eCollection 2018. PMID: 29367875. 査読有
- 4) Kinboshi M, Mukai T, Nagao Y, Matsuba Y, Tsuji Y, Tanaka S, Tokudome K, Shimizu, Ito H, Ikeda A, Inanobe A, Kurachi Y, Inoue S, Ohno Y. Inhibition of Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels Facilitates Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression in Astrocytes. *Front Mol Neurosci*. 2017 Dec 7;10:408. doi: 10.3389/fnmol.2017.00408. eCollection 2017. 査読有
- 5) Imamura K, Izumi Y, Watanabe A, Tsukita K, Woltjen K, Yamamoto T, Hotta A, Kondo T, Kitaoka S, Ohta A, Tanaka A, Watanabe D, Morita M, Takuma H, Tamaoka A, Kunath T, Wray S, Furuya H, Era T, Makioka K, Okamoto K, Fujisawa T, Nishitoh H, Homma K, Ichijo H, Julien JP, Obata N, Hosokawa M, Akiyama H, Kaneko S, Ayaki T, Ito H, Kaji R, Takahashi R, Yamanaka S, Inoue H. The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med*. 2017 May 24;9(391). pii: eaaf3962. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf3962. PMID: 28539470. 査読有
- 6) Mitsui J, Koguchi K, Momose T, Takahashi M, Matsukawa T, Yasuda T, Tokushige SI, Ishiura H, Goto J, Nakazaki S, Kondo T, Ito H, Yamamoto Y, Tsuji S. Three-Year Follow-Up of High-Dose Ubiquinol Supplementation in a Case of Familial Multiple System Atrophy with Compound Heterozygous COQ2 Mutations. *Cerebellum*. 2017 Jun;16(3):664-672. doi: 10.1007/s12311-017-0846-9. PMID: 28150130. 査読有
- 7) Honjo Y, Ayaki T, Tomiyama T, Horibe T, Ito H, Mori H, Takahashi R, Kawakami K. Decreased levels of PDI and P5 in oligodendrocytes in Alzheimer's disease. *Neuropathology*. 2017 Dec;37(6):495-501. doi: 10.1111/neup.12395. Epub 2017 Jul 21. 査読有
- 8) Iha HA, Kunisawa N, Shimizu S, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Ikeda A, Ito H, Serikawa T, Ohno Y. Nicotine Elicits Convulsive Seizures by Activating Amygdalar Neurons. *Front Pharmacol*. 2017 Feb 9;8:57. doi: 10.3389/fphar.2017.00057. eCollection 2017. 査読有
- 9) Koh J, Yamamoto K, Sakata M, Murata KY, Ito H. Quantitative reference value of dopamine transporter single-photon emission computed tomography in healthy Japanese older adults. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2016 November;4(6):215-219. DOI: 10.1111/ncn3.12082. 査読有
- 10) Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K, Takeyoshi I, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, Tokunaga F. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Commun*. 2016 Aug 24;7:12547. doi: 10.1038/ncomms12547. 査読有
- 11) Kawamoto Y, Ayaki T, Urushitani M, Ito H, Takahashi R. Activated caspase-9 immunoreactivity in glial and neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett*. 2016 Aug 15;628:207-12. doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.036. Epub 2016 Jun 21. 査読有
- 12) Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T, Shodai A, Kaji S, Morimura T, Banno Y, Nishitsuji K, Sakashita N, Maki T, Yamashita H, Ito H, Takahashi R, Urushitani M. CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. *Sci Rep*. 2016 Jan 11;6:19118. doi: 10.1038/srep19118.

査読有

- 13) Nagashima Y, Kondo T, Sakata M, Koh J, Ito H. Effects of soybean ingestion on pharmacokinetics of levodopa and motor symptoms of Parkinson's disease - In relation to the effects of *Mucuna pruriens*. *J Neurol Sci.* 2016 Feb 15;361:229-34. doi: 10.1016/j.jns.2016.01.005. Epub 2016 Jan 6. 査読有
- 14) Honjo Y, Ayaki T, Tomiyama T, Horibe T, Ito H, Mori H, Takahashi R, Kawakami K. Increased GADD34 in oligodendrocytes in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 2015;602:50-55. doi: 10.1016/j.neulet.2015.06.052. 査読有
- 15) Murata KY, Maeba A, Yamanegi M, Nakanishi I, Ito H. Methotrexate myelopathy after intrathecal chemotherapy: a case report. *J Med Case Rep.* 2015 Jun 9;9(1):135. doi: 10.1186/s13256-015-0597-5. 査読有
- 16) 辻郁在, 中山宜昭, 綾木孝, 廣西昌也, 伊東秀文 紀伊 ALS における免疫組織化学的検討 和歌山医学 2018;69:14-19. 査読有

〔学会発表〕(計 43 件)

- 1) Tsuji K, Ito H, et al. Comparative immunohistochemical study on the past and the recent Kii amyotrophic lateral sclerosis patients. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 2) Hironishi M, Ito H, et al. Updated epidemiological assessment of amyotrophic lateral sclerosis in Wakayama Prefecture, Japan, using data from the Japanese specified disease treatment research program. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 3) Yasui M, Ito H, et al. Assessment of the motor cortex using susceptibility-weighted imaging in patients with amyotrophic lateral sclerosis. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 4) Nakayama Y, Ito H, et al. A subset of ubiquitin-positive pathologic structures in the brain of Alzheimer's disease patients also shows linear ubiquitin chain immunoreactivity. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 5) Kajimoto Y, Ito H, et al. A comparison of striatal dopamine transporter function in dementia with Lewy bodies and Parkinson disease with dementia. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 6) Koh J, Ito H, et al. Altered functional connectivity of right temporal cortex in Parkinson's disease with high impulsivity. XXIII World Congress of Neurology 2017.

- 7) Takahashi M, Ito H, et al. Validation of the Questionnaire for impulsive-compulsive disorders in Parkinson's disease-rating scale (QUIP-RS) in Japanese. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 8) Sakata M, Ito H, et al. Efficacy of levodopa-carbidopa intestinal gel infusion in advanced Parkinson's disease patients in our hospital. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 9) Nakanishi I, Ito H, et al. Subjective evaluation of the coaching in patients with Parkinson's disease. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 10) Ishiguchi H, Ito H, et al. Recall of vegetable names in Alzheimer's disease. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 11) Mori M, Ito H et al. Clinical and pathological features in patients with Nakajo-Nishimura syndrome and inclusion body myositis. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 12) Ayaki T, Ito H, et al. Myositis and muscular inclusions in Nakajo-Nishimura syndrome. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 13) Murata K, Ito H, et al. Analysis of transient receptor potential channel in a cardiotoxin injury muscle model. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 14) Hosokawa M, Ito H, et al. Superficial siderosis associated with duplicated dura mater. XXIII World Congress of Neurology 2017.
- 15) Nakatani K, Ito H, et al. MRI and MR Spectroscopy are useful to evaluate patients with hypoglycemic encephalopathy. XXIII World Congress of Neurology 2017.

〔図書〕(計 5 件)

- 1) 伊東秀文 アルコール中毒 内科学 第 11 版 朝倉書店 2016, pp2228-2231
- 2) 伊東秀文 薬物中毒 内科学 第 11 版 朝倉書店 2016, pp2231-2234
- 3) 伊東秀文 変性疾患 江藤文夫、飯島節編 神経内科学テキスト改訂第 4 版 南江堂 2017, pp161-181
- 4) 伊東秀文 ハンチントン病 今日の治療指針 2016, pp955-956
- 5) 伊東秀文 成人の化膿性髄膜炎 今日の治療指針 2018, pp916-917

〔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

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/neurology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 秀文 (ITO, Hidefumi)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20250061

(2) 研究分担者

綾木 孝 (AYAKI, Takashi)
京都大学・医学部・助教
研究者番号：60749555

紀平 為子 (KIHIRA, Tameko)
関西医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：30225015

廣西 昌也 (HIRONISHI, Masaya)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80316116

中山 宜昭 (NAKAYAMA, Yoshiaki)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：50590436

(3) 連携研究者

石口 宏 (ISHIGUCHI, Hiroshi)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：70389443

川上 秀史 (KAWAKAMI, Hideshi)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：70253060

高橋 良輔 (TAKAHASHI, Ryosuke)
京都大学・医学部・教授
研究者番号：90216771

井上 治久 (INOUE, Haruhisa)
京都大学・医学部・教授
研究者番号：70332327