

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18367

研究課題名(和文) ALS/FTLDにおけるポリグルタミン凝集タンパク質の解析

研究課題名(英文) Analysis of polyglutamine aggregation protein in ALS/FTLD

研究代表者

多田 美紀子(TADA, Mikiko)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30722467

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)：ポリグルタミン(polyQ)凝集体蛋白質(PAIP)の一部は筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性症(FTLD)の責任遺伝子やタンパク質凝集に関与する因子であることが判明してきている。このことはALS/FTLDとpolyQ病の変性過程に共通メカニズムが働いている可能性を示している。剖検組織の病理学的検討で新規ALS病態関連分子同定を目的とした。我々はPAIPの一つであるMatrin3が孤発性ALSにおいて細胞質内封入体の構成成分であることを示した。Matrin3はその遺伝子変異が家族性ALSの責任遺伝子であることが判明したが、孤発性ALSの病態にも広く関わっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Some of polyglutamine aggregate protein also has been shown to be a pathological gene or aggregation protein of amyotrophic lateral sclerosis(ALS)/frontotemporal lobar degeneration(FTLD). These facts indicated the possibility that shared pathway may exist in the degenerative process of polyglutamine diseases and ALS/FTLD. We aimed to identify novel ALS pathologically relevant molecules by pathological examination in autopsy tissue and to analysis of the pathological form and the characteristics of clinical course. We showed matrin 3 which is one of polyglutamine aggregate protein was a component of intracytoplasmic inclusion bodies in sporadic ALS. Additionally, mutation of MATR3 was reported as familial ALS responsible gene in 2015. Our results indicated that the broader involvement of matrin3 in ALS/FTLD and polyQ diseases.

研究分野：神経内科

キーワード：matrin3 ALS polyglutamine

1. 研究開始当初の背景

我々がポリグルタミン凝集体蛋白質 (PAIP) として世界に先駆けて同定してきた FUS/TLS、EWS、TAF15、ubiquilin2 などが、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD) の責任遺伝子またはタンパク質凝集に関与する因子であることが次々に判明してきている。このことは ALS/FTLD とポリグルタミン病に RNA 結合タンパク質凝集を介した細胞障害機構や凝集体の処理過程に共通のメカニズムが働いている可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究は研究代表者らが同定してきた未発表の PAIP について、ポリグルタミン病、ALS、FTLD の剖検組織における免疫組織学的検討により、新規 ALS 病態関連分子を同定し、その封入体の病理学的形態や臨床経過の特徴をとらえるものである。さらにこれら PAIP の ALS 患者における遺伝子変異検索を通じ、新規 ALS 病因・易罹患性遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

凝集体プロテオーム解析により、未発表 PAIP として我々が独自に同定してきた hnRNP H1/H2、hnRNP F、Matrin3、DDX5、DDX17 に対する抗体を用いてポリグルタミン病、ALS 病理組織の検索を行った。抗体の指摘条件の検討に引き続き、各種ポリグルタミン病ヒト剖検脳 (SCA1、SCA2、SCA3、DRPLA) および ALS 剖検脳を用いて免疫組織学的検討を行い、病理学的評価を行った。

ALS15 例、ポリグルタミン病 SCA1、SCA2、SCA3、DRPLA それぞれ 1 例ずつ、さらに神経疾患の既往のない剖検例 7 例をコントロールとして準備し、それぞれの神経病理学的評価を行った。ALS 全例で主要病理学的所見である脊髄前角細胞のコピキチン陽性、リン酸化 TDP-43 陽性の細胞質内封入体を認め、腰髄、海馬のサンプルを用いることとした。ポリグルタミン病 4 例は抗ポリグルタミン抗体陽性核内封入体が認められ、橋のサンプルを用いることとした。コントロール例においては、標準的な神経病理学的評価を行い、神経病理変化がないことを確認している。

4. 研究成果

ヒト剖検例のサンプルを用い、未発表 PAIP (hnRNP H1/H2、hnRNP F、Matrin3、DDX5、DDX17) の関与に関してそれぞれの抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。PAIP のうち、Matrin3 は nuclear matrix protein で核局在シグナルを持ち、正常細胞では主に核内に存在している。ALS とコントロール例で抗 Matrin3 抗体を用いて免疫組織学的検討を行ったところ、SALS15 例中 7 例で Matrin3 陽性の細胞質内封入体を認めた。形態としては、リン酸化 TDP-43 陽性抗体と同様に round や skein-like であった。(図 1)

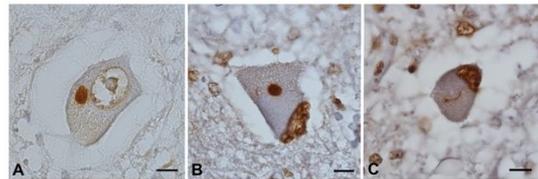


図 1. SALS 前角細胞の抗 Matrin3 抗体陽性細胞質内封入体。

AB:Round inclusion,C:Skein like inclusion

次に TDP-43 との関連を確認するため、蛍光顕微鏡を用いて ALS 脊髄前角の Matrin3 とリン酸化 TDP-43 の二重染色を行った。Matrin3 陽性の細胞質内封入体リン酸化 TDP-43 も陽性で共局在していた。しかし一方で TDP-43 陽性であるが Matrin3 は陰性の封入体を多数認めた。(図 2)

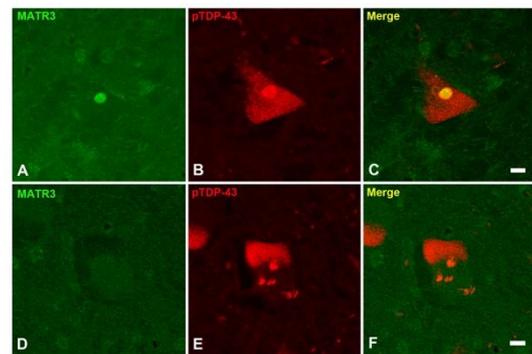


図 2. SALS 前角細胞の抗 Matrin3 抗体とリン酸化 TDP-43 抗体の二重染色

ABC:Matrin3、pTDP-43 が共局在している封入体を認める

CDE:Matrin3 は陰性、pTDP-43 のみ存在する封入体

Matrin3 の核の染色性については、ALS 例、コントロール例ともに淡いもの、濃染するものが混在しており、それぞれに有意差はみられなかった。(図 3)

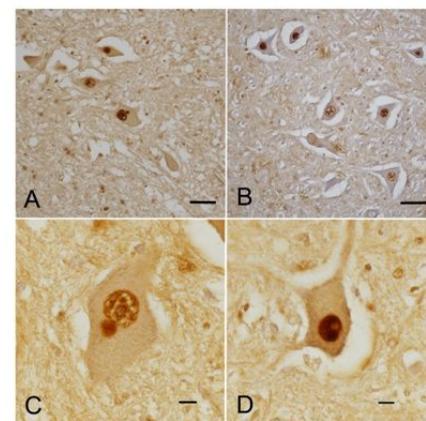


図 3. SALS とコントロール例の Matrin3 抗体の染色性

A:SALS 前角

B:コントロール前角、C:核の染色性が淡い二

ューロン、D:核が濃染されるニューロン

しかし、Matrin3 陽性の細胞質内封入体を持つ細胞の核は淡く染まる傾向があった。(図4)

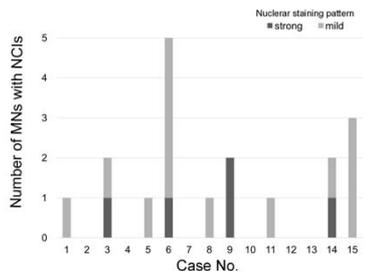


図4:Matrin3 陽性細胞質内封入体を持つ神経細胞の核の染色性パターン

これは TDP-43 で示されているのと同様に、Matrin3 に関しても通常は核に存在しているが、ALS で障害された細胞では核から細胞質へ局在が変わり封入体を形成する過程を見ている可能性が示唆された。

また、SALS 症例のうち、Matrin3 陽性封入体を認める症例、認めない症例に関して、臨床経過、病理像を比較した。(表1)臨床、病理学的特徴はほとんど有意差がなかったが、罹病期間のみ Matrin3 封入体陽性例で短い傾向が示された。これは、罹患してからの時間が短いほうが比較的多くの前角細胞が残存しているため封入体数が多かったためか、Matrin3 が病気の進行を促進する因子であるという二つの機序が考えられた。

表1 .SALS例のMarin3陽性封入体の有無における比較

	MATR3-positive NCIs		P value
	Positive Cases (n = 9)	Negative Cases (n = 6)	
Age at death (years)	70.33 ± 17.32	70.67 ± 13.65	0.8130
Clinical phenotype (U/L/B)	5/2/2	3/1/2	0.7974
Gender (male/female)	7/2	5/1	0.8662
Disease duration (months)	14.22 ± 10.28	36.83 ± 21.22	0.0291*
Brain weight (g)	1328 ± 94.80	1325 ± 180.19	0.6070
Stage of pTDP-43 (stage1/2/3/4)	2/2/1/4	1/1/0/4	0.5932

以上の結果より Matrin3 は TDP-43 と相互作用し、SALS の病態生理に関与している可能性があるかと推測した。さらに、我々が研究を始めた直後に Matrin3 をコードする遺伝子である MATR3 の変異が家族性 ALS (FLAS) の病因遺伝子であることが報告され、ALS 発症に関係

のある分子であることが明らかとなっている。()我々の検討の結果、matrin3 は孤発性 ALS におけるタンパク凝集にも関連する分子であることが判明した。

その他、hnRNP H1/H2、hnRNP F、DDX5、についても孤発性 ALS、ポリグルタミン病の剖検組織を用いて検討したが、明らかな封入体形成はみられなかった。

引用文献

Johnson J et al, Mutations in the Matrin3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci 17, 2015, 664-666.

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)

Hashiguchi S, Momoo T, Murohashi Y, Endo M, Shimamura M, Kawasaki T, Kanada S, Nozawa A, Tada M, Koyano S, Tanaka F Interleukin 10 Level in the Cerebrospinal Fluid as a Possible Biomarker for Lymphomatosis Cerebri. Intern Med.54, 1547-1552

〔学会発表〕(計 2 件)

Tada M, Doi H, Koyano S, Tanaka F, Matrin3 is a component of neuron cytoplasmic inclusion of motor neuron in SALS. 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology 2015 5/20-23, Toki Messe, Niigata

多田美紀子、土井宏、児矢野繁、田中章景、孤発性筋萎縮性側索硬化症における Matrin3 の病理学的検討、第 56 回日本神経病理学会総会学術研究会、2016 年 6 月 3 日-6 月 5 日、九州大学医学部百年講堂

〔図書〕(計 1 件)

1. 多田美紀子、田中章景、中外医学社、神経内科 Clinical Question & Pearls 認知症 2017 年、P344-348

〔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

多田 美紀子 (TADA, Mikiko)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号: 30722467

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

土井 宏(DOI, Hiroshi)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 10326035

児矢野 繁(KOYANO, Shigeru)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号:50315818

田中 章景(TANAKA, Fumiaki)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号:30378012