

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500330

研究課題名（和文）

異常 TDP-43 特異抗体によるグアム島 ALS の本体と運動ニューロン変性機序の解明

研究課題名（英文）

Nature of Guam-ALS and mechanism of degeneration of the motor neurons examined by the specific anti-phosphorylated TDP-43 antibody

研究代表者

橋本 智代（HASHIMOTO TOMOYO）

信州大学・医学部・委嘱講師

研究者番号：70425685

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態解析のブレイクスルーとなった TDP-43 の発見を踏まえて、異常 TDP-43 の蓄積部位と生化学的特徴、またその他の神経病理学的所見からグアム島に多発した ALS の本体の究明および神経変性との関与を調べた。その結果、グアム島チャモロ人の ALS は、TDP-43 から見ても、日本人孤発型 ALS と同様であり、同じくグアム島に多発したパーキンソン認知症(PDC)とは異なる疾患である、ことが分かった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the nature of the amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and the parkinsonism-dementia complex (PDC) of Guam, the authors examined the biochemical features of the TDP-43(TAR-DNA binding protein-43 K dalton) and the progression pattern of the phosphorylated (p)-TDP-43 immunopositive inclusions in the brains and spinal cords of ALS, PDC and controls of Guam, and Japanese classic ALS, controls, and frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions (FTLD-TDP). The results indicated that Guam ALS and PDC are basically different diseases, and Guam ALS occurs initially as classic ALS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：TDP-43、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン認知症、神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

グアム島に多発した筋萎縮性側索硬化症 (ALS) とパーキンソン認知症 (PDC) は、同一家系内、同一地域で多発したなどの背景から、1960 年代以降、同一疾患であるといわれてきた。一方申請者らは両疾患を結びつけている神経原線維変化を詳細に解析し、これらの 2 疾患が異なる疾患であると

報告した（小柳ら,1994）。

2006 年に TDP-43 が前頭側頭型認知症 (FTLD) や ALS、認知症を伴う ALS のユビキチン化封入体コア蛋白として発見され、神経変性との関連が注目されている。私共はグアム島の PDC 脳で、初めて TDP-43 の異常蓄積を報告した（長谷川ら, 2007）。TDP-43 蛋白がグアム島の ALS と PDC の発症機構にどのような役割を果たしているの

か、神経細胞死を引き起こす蛋白なのか、は最大の疑問であり神経学のトピックとなっている。

2. 研究の目的

私共はグアム島チャモロ人の ALS に見られる神経原線維変化の数が、グアム島対照者と差が無く、PDC より明らかに少ないことを見出し、グアム島チャモロ人の ALS と PDC とは少なくとも神経病理学的には異なる疾患であると報告した(小柳ら, 1994)。グアム島チャモロ人の ALS と PDC の位置づけを知る目的で、異常 TDP-43 特異抗体を用いて、グアム島チャモロ人の ALS と PDC、また日本人孤発性 ALS との異同を解析すること、を目的の一つとした。異常 TDP-43 特異抗体は、FTLD や ALS で見いだされた異常 TDP-43 に対する抗体で正常 TDP-43 とは反応せず、患者脳に蓄積する異常リン酸化 TDP-43 と特異的に反応する新規抗体を用いた。

今回の研究では、

- (1)グアム島チャモロ人の ALS と PDC との異同、それらの発症メカニズムと原因
- (2)グアム島チャモロ人および日本人孤発性 ALS、日本人前頭側頭葉変性症 (FTLD-TDP) との異同と変性メカニズム

以上について上記新規抗体を用いて解析した。

3. 研究の方法

異常 TDP-43 特異抗体を用いて、生化学的検索と免疫組織化学的検索を行った。

(1)ヒトの組織を用いた研究

①生化学的検索

異常 TDP-43 特異抗体を用いたブロッティングを、前頭葉および脊髄の凍結組織で行った。

対象：グアム島チャモロ人 PDC 6例、グアム島チャモロ人 ALS 6例、PDC との合併 1例、孤発性日本人 ALS 6例、グアム島チャモロ人対照 4例、日本人対照 2例。

②免疫組織化学的検索

異常 TDP-43 特異抗体による免疫染色を、パラフィン切片を用いて行った。

対象：グアム島チャモロ人 PDC 13例、グアム島チャモロ人 ALS 8例、PDC との合併 5例、孤発性日本人 ALS 16例、グアム島チャモロ人対照 15例、日本人対照 12例、日本人 FTLD-TDP 3例。

検索部位17箇所：前頭葉・運動野・側頭葉の各皮質と白質、線条体、視床、海馬（歯状回顆粒細胞・CA1-2領域）、内包、中脳（被蓋部・黒質・大脳脚）、脊髄（前角・後角・白質）。同切片については、ヘマトキシリン染色、ユビキチン染色などで病理学的検索をした。

評価方法：光顕観察(200倍)を用いて各検索部位を計2.5mm²の面積内で陽性所見をカウントし、その個数をマイナスから3+表示した。

4. 研究成果

異常 TDP-43 特異抗体によるイムノブロット解析では、正常な TDP43 の 43kDa バンドはみられず、特異的にリン酸化 TDP-43 に相当する 45kDa バンド、レーン全体に広がるスメア様染色像、18-26kDa の C 末端断片が観察された。グアム島チャモロ人 PDC および PDC-ALS 合併例では全症例で、グアム島 ALS と日本人 ALS では、どちらも約半数に異常 TDP-43 蛋白の蓄積がみられました。対照ではいずれのバンドもみられなかった。

免疫組織化学的検索では、グアム島チャモロ人 PDC、PDC-ALS、日本人 FTLD-TDP では大脳で大量に異常 TDP-43 が蓄積されていた。特に FTLD-TDP では前頭葉皮質で PDC より著名にみられ海馬歯状回にも目立った。この点は PDC と明瞭に区別された。日本人孤発性 ALS とグアム島チャモロ人 ALS との相違はみられず、グアム島チャモロ人 ALS での大脳の蓄積は少量であった。また、FTLD-TDP と比較し、グアム島チャモロ人 PDC は中脳への拡がり強くみられることがわかり、症状との相関がみられた。PDC-ALS 合併例での異常 TDP-43 出現様態は、グアム島チャモロ人の ALS と PDC の合併として理解可能でした。一方で、神経細胞脱落を来さないと言われる部位での陽性所見も判明した（表 1、2）。

表 1 グアム島チャモロ人における異常 TDP-43 の蓄積の程度 (-~3+)

	グアム島チャモロ人			
	PDC	S	ALS	対照
前頭葉皮質	+	+	-/+	-
側頭葉皮質	2+	3+	-	-/+
線条体	2+	2+	-/+	-
内包	2+	3+/+	-/+	-
歯状回	+	2+	-/+	-/+
中脳	2+/+	2+/+	-/+	-/+
脊髄前角	+/-	+	+	-

表2 日本人における異常 TDP-43 の蓄積の程度 (-~3+)

	日本人		
	FTLD-TDP	ALS	対照
前頭葉皮質	3+	-/+	-
側頭葉皮質	2+	-/+	-
線条体	NA	+/-	-
内包	+	+	-
齒状回	3+	+/-	-
中脳	+	-/+	-
脊髄前角	+/-	+	-

異常 TDP-43 特異抗体の陽性所見の詳細は、グアム島チャモロ人 PDC、PDC-ALS の大脳は神経細胞質内封入体、変性神経突起が主体で核内封入体やグリア細胞質内封入体はごくわずかであった。グアム島チャモロ人 ALS、日本人 ALS の大脳皮質では神経細胞質内封入体が主体で、これらの所見は FTLD-TDP のうち運動ニューロン障害を合併するタイプと類似していた。

これらの結果は、グアム島チャモロ人 ALS が PDC と異なる疾患である可能性だけでなく、孤発性 ALS と同一疾患である可能性とともに、TDP-43 プロテインパチーと考えられる FTLD-TDP と異なる疾患であることが考えられた。

TDP-43 はいわゆる古典型 ALS と FTLD の神経細胞脱落部位にほぼ一致して出現し、その遺伝子異常が家族性や孤発性 ALS の一部で発見された。そのため、TDP-43 の異常蓄積が、神経細胞障害性の原因蛋白と報告されている。しかし、今回の異常 TDP-43 を用いた神経病理学的解析からは、異常 TDP-43 蓄積を伴う神経細胞が全て神経細胞死をもたらすかという点では、生じる細胞種によっては細胞死を引き起こさない、部位があった。

今後は FTLD-TDP 以外の TDP-43 蓄積を伴う変性疾患と考えられている認知症を伴う ALS (ALS-D) との異同も検討していくなど他種神経変性疾患への関連性を検討する必要があると考えられた。TDP-43 の病的役割を解明していくことで、神経細胞脱落を来す変性疾患の発症機序の解明、ひいては新規治療へつながることが期待される。

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 9 件)

- ① 橋本智代, 小柳清光, 基本的な脳標本の作製法, 臨床検査学雑誌, 印刷中, 2011, 査読無
- ② Piao Y, Hashimoto T, Takahama S, Kakita A, Komori T, Morita T, Takahashi H, Mizutani T, Oyanagi K, Survival motor (SMN) protein in the spinal anterior horn cells of patient with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Brain Research, 1372: 152-159, 2011, 査読有
- ③ 小柳清光, 橋本智代, 異常 TDP-43 蓄積と神経細胞死: 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と前頭側頭葉変性症 (FTLD) における観察と考察, 信州医学雑誌, 59(2): 63-73, 2011, 査読無
- ④ 小柳清光, 橋本智代, 山崎峰雄, グアム島の筋萎縮側索硬化症 (ALS)-TDP-43 と神経原線維変化から見るパーキンソン認知症、古典型 ALS、前頭側頭葉変性症との異同-, 最新医学, 65(7): 1632-1641, 2010, 査読無
- ⑤ Sun L, Kosugi Y, Kawakami E, Piao YS, Hashimoto T, Oyanagi K, Magnesium concentration in the cerebrospinal fluid of mice and its response to changes in serum magnesium concentration, Magnesium Research, 22(4): 266-272, 2009, 査読有
- ⑥ Sieh W, Oyanagi K, et al., Identification of novel susceptible loci of Guam neurodegenerative disease: challenge of genome scans in genetic isolate, Human Molecular Genetics, 18: 3725-3738, 2009, 査読有
- ⑦ Ito U, Hakamata Y, Kawakami E, Oyanagi K, Degeneration of astrocytic processes and their mitochondria in cerebral cortical regions peripheral to the cortical infarction, Stroke, 40: 2173-2181, 2009, 査読有
- ⑧ Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, et al., Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study, Acta Neuropathologica, 115: 561-575, 2008, 査読有
- ⑨ Suzuki M, Irie T, Watanabe T, Oyanagi K, Ono S, et al., Familial amyotrophic lateral sclerosis with Gly93Ser mutation in Cu/Zn superoxide dismutase: A clinical and neuropathological study, J Neurological Sciences, 268: 140-144, 2008, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 山崎峰雄, 橋本智代, 片山泰朗, 小柳清光, グアム島パーキンソン認知症における FUS 陽性構造物, 第 51 回日本神経

学会, 2010年5月20日, 東京都, 東京国際
フォーラム

- ② 山崎峰雄, 橋本智代, 片山泰朗, 小柳清光, グアム島パーキンソン認知症におけるFUS陽性構造物, 第51回日本神経病理学会総会学術研究会, 2010年4月24日, 東京都, シェーンバツハ-サボー
- ③ 渡辺武士, 入江東吾, 小柳清光ら, 人工呼吸器装着4年、全経過12年の多系統萎縮症 (MSA-P) の1剖検例におけるalpha-synucleinの免疫組織学的検討, 2010年4月24日, 東京都, シェーンバツハ-サボー
- ④ 橋本智代, 小柳清光ら, リン酸化TDP43と神経原線維変化からみるグアム島の筋萎縮性側索硬化症(ALS)の本体について, 第50回日本神経病理学会総会学術研究会, 2009年6月5日, 香川, サンポート高松
- ⑤ 小柳清光, 山崎峰雄, 橋本智代, 若林孝一ら, TDP-43と神経細胞脱落: グアム島パーキンソン認知症における観察, 第50回日本神経病理学会総会学術研究会, 2009年6月5日, 香川県, サンポート高松
- ⑥ 小出隆司, 坂口 隆, 小柳清光ら, 遠位部ほど明瞭な脊髄上下行路変性を呈した肺大細胞癌の71歳女性例, 第50回日本神経病理学会総会学術研究会, 2009年6月5日, 香川県, サンポート高松
- ⑦ 渡辺武士, 入江東吾, 小柳清光ら, 人工呼吸器装着4年、全経過12年の多系統萎縮症 (MSA-P) の1剖検例, 第50回日本神経病理学会総会学術研究会, 2009年6月5日, 香川県, サンポート高松
- ⑧ 望月葉子, 橋本智代, 小柳清光ら, 若年性家族性ALS: 広汎型病変に好塩基性封入体を伴った1剖検例, 第50回日本神経病理学会総会学術研究会, 2009年6月5日, 香川県, サンポート高松

[図書] (計2件)

- ① Oyanagi K, Hashimoto T, University of Adelaide Press, Magnesium in Parkinson's disease: an update in clinical and basic aspects. In: Magnesium in the Central Nervous System (Eds: Vink B, Nechifor M), 2011 in press
- ② Oyanagi K, Hashimoto T, Yamazaki M., Springer, Oxford, Parkinsonism-dementia complex, In: Neurodegeneration: The molecular pathology of dementia and Movement disorder (Eds: Weller RO, Dickson DW), 2011 in press

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 智代 (HASHIMOTO TOMOYO)

信州大学・医学部・委嘱講師

研究者番号: 70425685

(2) 研究分担者

小柳 清光 (OYANAGI KIYOMITSU)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 00134958