

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591017

研究課題名（和文）パーキンソン病と筋萎縮性側索硬化症の病態解明に関する研究

研究課題名（英文）Pathological studies on Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

岡本 幸市 (OKAMOTO KOICHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00124652

研究成果の概要（和文）：

204例の連続剖検例の検討では、迷走神経背側核の  $\alpha$ -synuclein の病理と心交感神経におけるチロシンヒドロキシラーゼの免疫染色性の低下との間には関連性がみられた。種々の筋萎縮性側索硬化症（ALS）型における FUS の病理、新規の TDP-43 遺伝子変異 A315E を呈した1家系の臨床と病理、少数ながら peripherin 陽性 Bunina 小体が存在すること、および optineurin が ALS 以外に種々の神経変性疾患でもみられることなどを報告した。

研究成果の概要（英文）：

In our 204 consecutive autopsied cases, there were close relationship between  $\alpha$ -synuclein pathology in dorsal vagal nucleoli and the decrease of tyrosine hydroxylase immunoreactivities in cardiac sympathetic nerves. We reported FUS pathology in various amyotrophic lateral sclerosis (ALS) types, clinical and neuropathological findings of Japanese familial ALS patients with a novel TDP-43 A315E mutation, presence of several peripherin-positive Bunina bodies, and appearance of optineurin not only in ALS but also in many neurodegenerative conditions.

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 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症，パーキンソン病，前頭側頭葉変性症， $\alpha$ -synuclein, TDP-43, FUS, optineurin, peripherin

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)と筋萎縮性側索硬化症(ALS)は代表的な神経変性疾患である。PDに関する病理学研究は多数なされており、PDの主病変は中脳黒質であると信じられてきたが、最近、抗  $\alpha$ -synuclein 抗体を用いた検討などから PD は黒質のみの病変ではなく、もっと広範に障害される疾患であり、その病変は延髄や嗅球から始まるという説が注目されている。さらに腸管や心臓などの末梢神経系から始まるという考えも提唱されるようになった。

一方、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) についても近年大きな進展がみられている。認知症を伴う ALS や ALS を伴わない前頭側頭葉変性症(FTLD)の一部では、我々が初めて報告した ubiquitin 陽性 tau 陰性の神経細胞内封入体が大脳皮質にみられるが、この封入体と ALS 脊髄前角細胞でみられる ubiquitin 陽性封入体が抗 TDP-43 抗体で陽性であることが 2006 年に判明し、TDP-43 proteinopathy という用語も用いられるようになってきている。TDP-43 陽性封入体はリン酸化およびユビキチン化した状態で存在すると報告されているが、これらの疾患での TDP-43 の果たす役割は不明である。ALS は運動神経細胞に限局した病変として認識されてきたが、乏突起膠細胞内にも TDP-43 陽性封入体が見られ、その病変が広範であることが明らかになっている。最近、運動神経細胞の変性と膠細胞との関連も注目されているが、剖検例を用いて神経細胞と膠細胞との関連を検討した報告は少ない。また、研究開始当初には FUS (fused in sarcoma)や optineurin の異常を示す ALS も知られていなかった。

## 2. 研究の目的

1) PD 関連では多数の剖検例パラフィン切片を対象に、抗  $\alpha$ -synuclein 抗体を用いた免疫染色を行い、非 PD 例での  $\alpha$ -synuclein 陽性構造物の早期からの出現部位や出現頻度などを明らかにすること。

2) 多数の ALS 剖検例やラット顔面神経引き抜き損傷モデルなどを用いて、多面的に運動神経細胞の変性過程を神経病理学的に明らかにすること。

## 3. 研究の方法

### 1) PD 関連：

多数の剖検例の嗅球、延髄、橋、中脳、側頭葉、心臓、大腸のパラフィン切片を対象に、抗  $\alpha$ -synuclein 抗体を用いた免疫染色を行い、非 PD 例での  $\alpha$ -synuclein 陽性構造物の早期からの出現部位や出現頻度などを明らかにする。

### 2) ALS 関連：

①市販および当科で作成している抗 TDP-43 抗体を用いて、多数の ALS を含む剖検脳での TDP-43 の異常を検討する。②抗 TDP-43 抗体で陽性に染色される乏突起膠細胞内の構造物の微細構造を明らかにする。③ ALS 脊髄のミラー切片に対して、抗ヒト trans Golgi network 抗体 (抗 TGN46 抗体) と抗 TDP-43 抗体を用いた免疫染色を行い、Golgi 装置の微細化(fragmentation) と TDP-43 陽性構造物との関連を明らかにする。□抗 FUS 抗体を用いて検討する。□家族性 ALS の臨床と病理を検討する。□optineurin の疾患特異性について抗 optineurin 抗体を用いて、ALS および種々の神経変性疾患の剖検脳を免疫組織学的に検討する。□ラット顔面引き抜き損傷を作成し、顔面神経核神経細胞の Golgi 装置の形態異常の有無を検討する。

#### 4. 研究成果

##### PD 関連 :

連続剖検例の延髄、橋、中脳、海馬、左心室、胃のパラフィン切片を作成し検討中である。途中段階であるが、204例(平均年齢72.3歳)の迷走神経背側核(DVN)を含む延髄と左心室壁のホルマリン固定、パラフィン切片に対して、抗 $\alpha$ -synuclein抗体、抗tyrosine hydroxylase(TH)抗体、抗リン酸化neurofilament抗体を用いて免疫染色を行った。204例中の50例(25%)のDVNに $\alpha$ -synuclein陽性のLewy小体やLewy neuritesがみられ、10例(5%)の左心室壁の心交感神経(CSN)に $\alpha$ -synuclein陽性の腫大した神経がみられた。CSNに $\alpha$ -synuclein陽性の腫大した神経がみられた10例中9例では、THの免疫染色性は保たれており、2例ではDVNには $\alpha$ -synuclein陽性構造物は見られなかった。CSNのTHの免疫染色性は31例(15%)で低下しており、その中の22例(71%)ではDVNのみに $\alpha$ -synuclein陽性構造物が見られ、1例ではCSNのみに $\alpha$ -synuclein陽性構造物が見られ、1例ではDVNとCSNの両方に $\alpha$ -synuclein陽性構造物が見られた。今後さらに検討を継続する予定である。

##### ALS 関連 :

1) 今回、我々は2種類のリン酸化TDP-43(pTDP-43)抗体を作製し、ALS剖検例を免疫組織学的に検討した。本抗体は正常の核を認識せず、ALSの異常構造物のみを認識し、TDP-43 proteinopathyの病態解明に寄与する抗体であると考えられる。ALSでは、運動ニューロン以外に大脳皮質、海馬歯状回、扁桃核、基底核、視床、脳幹、小脳歯状核などの神経細胞、グリア細胞およびneuropilに広く異常構造物が蓄積している症例が認めら

れた。

2) 当科で作成したpTDP-43抗体を用いてさらに検討した。

①16例のアルツハイマー病(AD)では5例(31%)で主に海馬台と海馬傍回や前頭葉にpTDP-43陽性封入体を認めたが、海馬歯状回の顆粒細胞ではほとんどみられなかった。老人斑や神経原線維変化とpTDP-43の蓄積との間には明らかな関連はみられなかった。以上より、ADにおけるpTDP-43蓄積は、FTLD-U(ubiquitin陽性封入体を有する前頭側頭葉変性症)が合併しているためではなく、神経変性の過程で二次的に生じたのではないかと推論し報告した。②ADや高齢者の海馬領域の錐体細胞内には顆粒空胞変性(GVD)が高頻度に見られるが、AD脳を上記のpTDP-43抗体で免疫染色していたところ神経細胞内に点状の陽性構造物が見られるのに気づいた。そのような構造物はGVDの好発部位である海馬領域に多く、光顕的にはGVDと近似していた。そこでGVDの陽性マーカーである種々の抗体を用いてpTDP-43との二重免疫染色で検討したところ、pTDP-43抗体陽性の点状構造物はGVDの特徴に一致していることが確認できた。

3) 家族性ALS type 6の原因遺伝子として*fused in sarcoma* (FUS)が同定された。FUSはTDP-43と同様に核内に主に存在しDNA/RNA結合蛋白であり、機能的にはRNAの転写、輸送、スプライシング、翻訳などのRNA代謝に関与することが知られている。我々は、孤発性ALS、好塩基性封入体(BIs)を有する運動ニューロン疾患(MND)、家族性ALS例について抗FUS抗体を用いて免疫組織学的に検討した。孤発性ALS:抗pTDP-43抗体陽性の封入体は抗FUS抗体で染色されなかった。MND with BIs: 脊髄前角細胞の脱落、前角細胞内に多数の円形および不規則

な形態の BIs を認めた. 全ての BIs は抗 FUS 抗体で明瞭に染色された. 一部の BIs を有する神経細胞の核の FUS の染色性は保たれていた. また, グリア細胞内およびその核内にも少数の FUS 陽性の封入体が認められた. 家族性 ALS : FUS 遺伝子変異を有する例で神経細胞内およびグリア細胞に FUS 陽性の構造物が認められた. 以上のことから BIs の形成機序に RNA 代謝の異常が示唆される. 一方, BIs を有する細胞の核の染色性は保たれている細胞もあり, FUS の封入体形成への関与には TDP-43 とは異なる機序が存在することが示唆された. さらに家族性 ALS の一部に FUS の関与する例が存在することが明らかとなった.

4) 新規の TDP-43 遺伝子変異 (A315E) が認められた家族性 ALS 1 家系を報告した. 本家系内には運動ニューロン徴候のみの例, 運動ニューロン徴候に加えてパーキンソニズムを呈する例が存在した. 病理学的には両者とも脊髄前角細胞の脱落, Bunina 小体, および pTDP-43 陽性封入体を運動ニューロン系を中心に認めたが, 運動ニューロン徴候のみの例では後索全体および脊髄小脳路の淡明化も認めた. 一方, パーキンソニズムを合併した例では黒質の変性が目立ち, 同部位にグリオシス, pTDP-43 陽性封入体を認めた. TDP-43 遺伝子変異を有する家族性 ALS では家系内での発症年齢, 症状にばらつきがみられることが知られているが, 病理学的にも違いがあることを初めて報告した.

5) ALS に特徴的な封入体である Bunina 小体の一部で, 免疫組織学的に中間系フィラメントの一種である peripherin が陽性であることを明らかにした.

6) 近年, 家族性 ALS 患者の一部で optineurin 遺伝子変異がみられることが報告され, optineurin は ALS の特異的なマーカーとな

り得るのではないかと報告されている. 今回, ALS 以外の神経変性疾患で抗 optineurin 抗体を用いて免疫組織学的検討を行ったところ, optineurin は ALS に特徴的な封入体に陽性である以外に, 多くの神経変性疾患 (アルツハイマー病, パーキンソン病, 多系統萎縮症, ピック病, 認知症を伴う ALS) やクロイツフェルト・ヤコブ病に特徴的な構造物においても陽性であることを明らかにした.

7) ラット顔面神経の引き抜き損傷で, 顔面神経細胞には高率に Golgi 装置の微細化がみられることを明らかにした.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計31件)

以下欧文は全て査読有. 日本文は全て査読無.

1. Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K: Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 302(1-2):14-18, 2011.
2. Osawa T, Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K: Optineurin in neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, Feb 1, 2011 [Epub ahead in print]
3. Fujita Y, Fujita S, Takatama M, Ikeda M, Okamoto K: Numerous FUS-positive inclusions in an elderly woman with motor neuron disease. *Neuropathology*, July 27, 2010. [Epub ahead in print]
4. Okamoto K: Ubiquitin-positive tau-negative intraneuronal inclusions in dementia with motor neuron disease. *Neuropathology*, May 24, 2010. [Epub ahead in print]

5. Okamoto K, Fujita Y, Mizuno Y: Pathology of protein synthesis and degradation system in ALS. *Neuropathology*, 30(2):189-193, 2010.
6. Fujita Y, Watabe K, Ikeda K, Mizuno Y, Okamoto K: Morphological changes of Golgi apparatus in adult rats after facial nerve injuries. *Neuropathology*, 31(1):42-47, 2010.
7. Makioka K, Yamazaki T, Fujita Y, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K: Involvement of endoplasmic reticulum stress defined by activated unfolded protein response in multiple system atrophy. *J Neurol Sci*, 297(1-2):60-65, 2010.
8. Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Okamoto K, Fujita Y, Jackson M, Ikeda M, Nakazato Y, Ikeda Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M: A Japanese ALS6 family with mutation R521C in the FUS/TLS gene: a clinical, pathological and genetic report. *J Neurol Sci*, 296(1-2):59-63, 2010.
9. 岡本幸市: 前頭側頭型認知症の初期臨床像. *Cognition and Dementia*, 9(1):13-17, 2010.
10. 岡本幸市: 前頭側頭葉変性症と筋萎縮性側索硬化症: TDP-43 が変えた疾患概念. *最新医学*, 65 (7) : 1552-1557, 2010.
11. Kadokura A, Yamazaki T, Kakuda S, Lemewre CA, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K: Phosphorylation-dependent TDP-43 antibody detects intraneuronal dot-like structures showing morphological characters of granulovacuolar degeneration. *Neurosci Lett*, 463(1):87-92, 2009.
12. Makioka K, Yamazaki T, Kakuda S, Okamoto K: Variations in the effects on synthesis of amyloid beta protein in modulated autophagic conditions. *Neurol Res*, 31(9):959-968, 2009.
13. 岡本幸市: 前頭側頭葉変性症の概念成立の経緯と分類. *Brain and Nerve*, 61(11):1203-1208, 2009.
14. Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y: Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*, 28(2):109-115, 2008.
15. Okamoto K, Yamazaki T, Banno H, Sobue G, Yoshida M, Takatama M: Neuropathological studies of patients with possible non-herpetic acute limbic encephalitis and so-called acute juvenile female non-herpetic encephalitis. *Internal Medicine*, 47(4):231-236, 2008.
16. Fujita Y, Mizuno Y, Takatama M, Okamoto K: Anterior horn cells with abnormal TDP-43 immunoreactivities show fragmentation of the Golgi apparatus in ALS. *J Neurol Sci*, 269 : 30-34, 2008.
17. Yokoseki A, Shiga A, Tan-C-F, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O: TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 63(4):538-542, 2008.
18. 岡本幸市: ALS-D とユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (FTLD-U). *Clinical Neuroscience*, 26(3):286-288, 2008.

19. 岡本幸市 : FTLD の概念と分類.  
Dementia Japan, 22(3):231-237, 2008.
20. 岡本幸市 : TDP-43 proteinopathy.  
Current Insights in Neurological  
Science, 16(2):8-9, 2008.
21. 岡本幸市 : FTD・FTLD の初期臨床像.  
臨床神経, 48(11) : 999-1001, 2008.

[学会発表] (計 42 件)

1. Okamoto K, Fujita Y. Current Know-  
ledge of inclusion bodies in ALS. BRI  
International Symposium 2010.  
Current Understandings and Future  
Directions For ALS, 2010.11-22-23,  
(Niigata, Japan)
2. 岡本幸市 : ALSで見られる封入体 : 何が  
分かって何が分からないか. 厚生労働科  
学研究費補助金難治性疾患克服事業. 神  
経変性疾患に関する調査研究班. 平成22  
年度ワークショップ, 2010.7.23, 都市  
センター (東京都)
3. Fujita Y, Takatama M, Okamoto K :  
Relationship of alpha-synuclein  
pathology between epicardium and  
dorsal vagal nuclei. 19th IAGG World  
Congress of Gerontology and Geria-  
trics, 2009.7.5-9, (Paris, France)
4. 岡本幸市 : 認知症を伴う ALS の大脳で  
みられた ubiquitin 陽性 tau 陰性神経細  
胞内封入体. 50 周年記念標本展示「日  
本が世界に発信したあの疾患」. 第 50  
回日本神経病理学会総会, 2009.6.4-6,  
サンポートホール高松 (香川県)
5. 岡本幸市, 藤田行雄, 水野裕司 : ALS  
の蛋白合成・分解系の病理. シンポジ  
ウム「孤発性 ALS をめぐる最新の知見」.  
第 50 回日本神経病理学会総会, 2009.  
6.4 -6, サンポートホール高松 (香川県)

6. 岡本幸市 : FTLD の概念, 分類,  
ubiquitin 陽性・tau 陰性封入体. 第 27  
回日本認知症学会, 2008.10.10-12, 前  
橋テルサ (群馬県)
7. 岡本幸市 : 前頭側頭型認知症 : 総論, 第  
2 回 MDSJ 学術集会シンポジウム 1 前  
頭側頭型認知症の今日的な問題点,  
2008.10.2-4, 国立京都国際会館 (京都  
府)
8. 岡本幸市 : FTD(FTLD)の初期臨床像.  
第 49 回日本神経学会総会シンポジウム,  
2008.5.15-17, パシフィコ横浜 (神奈川  
県)

[図書] (計 4 件)

1. 岡本幸市 : 前頭側頭型認知症(FTD). 認  
知症疾患治療ガイドライン 2010. 認知  
症疾患治療ガイドライン作成合同委員  
会編, 医学書院, 東京, 2010, pp316-325.
2. 岡本幸市 : 前頭側頭型認知症. EBM に  
基づく脳神経疾患の基本治療指針. 田村  
晃・松谷雅生・清水輝夫編, 改訂第 3  
版, メジカルビュー社, 東京, 2010,  
pp 438-440.
3. 岡本幸市 : 前頭側頭葉変性症の治療法は.  
EBM 神経疾患の治療 2009-2010. 岡本  
幸市・棚橋紀夫・水澤英洋編, 中外医学  
社, 東京, 2009, pp282-287.

[その他]

ホームページ :

<http://neurology.dept.med.gunma-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 幸市 (OKAMOTO KOICHI)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 0 0 1 2 4 6 5 2