

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300117

研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症の運動ニューロン死：リボゾーム RNA 遺伝子転写と TDP-43

研究課題名（英文） Mechanism of motor neuron death in ALS: transcription activity of ribosomal RNA gene and TDP-43

研究代表者

小柳 清光 (OYANAGI KIYOMITSU)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：00134958

研究成果の概要（和文）：

ALS の運動ニューロン死に蛋白合成系の異常が深く関連している事を明らかにした。すなわち、「転写」から「糖鎖の修飾」に至る「蛋白合成系」を、一連の「流れ」として概観した場合、その「上流域」と考えられる、リボゾーム(r)RNA 遺伝子の転写活性の減少と、その減少とヌクレオリンの減少とが相関していること、またこれらと TDP-43 のリン酸化が関連していること、を本研究で明らかにした。「下流域」では、「蛋白の折りたたみ」に關与する分子シャペロンの凝集を初めて見出した。またその分子シャペロンの凝集に際してシスタチン C (Bunina 小体の構成成分) がシードになっている可能性を見出し、分子シャペロンとシスタチン C が相互のシードである可能性も確認した。

研究成果の概要（英文）：

The present study elucidate the abnormalities in the protein synthesis system in the motor neurons in the spinal cords in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Those abnormalities are as follows: 1) decrease of ribosomal (r) RNA gene transcription activity, 2) correlation between rRNA gene activity and amount of nucleolin in the nucleus, 3) aggregation of the molecular chaperone, and 4) seeding each other in aggregation of molecular chaperone and cystatin C, which is a component of the Bunina body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：神経難病学、神経変性疾患

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：神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

ALS は大脳と脳幹、脊髄の運動ニューロンが変性脱落して手足が麻痺し寝たきりとな

り、人工呼吸器がなければ患者さんは通常数年で呼吸筋麻痺により死亡する神経難病である。ALS 患者の約 9 割が孤発性であり現在

も原因不明で根本的治療法は無い。

(a) ALS と TDP-43 :

孤発性 ALS 運動ニューロンで見られるスケイン/ユビキチン化封入体と、前頭側頭葉変性症のユビキチン化封入体の蛋白成分がリン酸化した TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43kDa) であることが、新井ら (BBRC, 2006)、Neumann ら (Science, 2006) により報告され、ALS と前頭側頭葉変性症の研究が一気に進展した。しかしリン酸化 TDP-43 封入体が「毒性」を持つのか、「核内から胞体への TDP-43 シフト」が ALS 運動ニューロンを変性させる (隅ら、J Neuropathol Exp Neurol, 2009) のか、TDP-43 の変化と運動ニューロン死との関連は明確ではない。

(b) ALS と RNA :

孤発性 ALS の脊髄や脳幹の運動ニューロンでは、細胞質 RNA と粗面小胞体の減少 (クロマトリシス) が Mann, Yates (1974)、井上、平野 (1979) ら、をはじめ多数報告されている。私共も孤発性 ALS で粗面小胞体の断片化と小胞体膜上のリボゾームの離解 (detachment) を報告した (Oyanagi, et al. J Neuropathol Appl Neurobiol, 2008)。リボゾーム (r)RNA 蛋白は、rRNA 遺伝子の転写から合成がスタートする。私共は、この **rRNA 遺伝子転写活性の減少が細胞内 RNA の減少とニューロン死に直結している**ことを ALS モデル顔面神経引き抜きラットで報告した (Nagasao, Oyanagi et al. J Neurosci Res, 2008)。

(c) TDP-43 と RNA :

TDP-43 は正常ではスプライシング調節や転写など、RNA の機能と深く関与している、と言われている。現在の世界の ALS 研究者の注目は「TDP-43 と RNA の関連による運動ニューロン変性」に向けられている。2013 年見出された家族性 ALS の一型の原因遺伝子 FUS (fused in sarcoma) も RNA に関与すると言われ、ALS における RNA 研究が加速されるのは間違い無いと思われる。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の運動ニューロン死のメカニズムを、rRNA 遺伝子転写活性、TDP-43 と RNA の関連から解明する。

3. 研究の方法

計画 1 (22 年度) : rRNA 遺伝子転写活性、ヌクレオリンと核内 TDP-43 の

co-localization の有無の確認 : rRNA 遺伝子転写活性計測。およびヌクレオリンとリン酸化非依存性またはリン酸化 TDP-43 抗体による二重免疫染色と共焦点顕微鏡観察。対象は日本人孤発性 ALS、グアム島 ALS、SOD1 遺伝子変異家族性 ALS および顔面神経引き抜きラット、SOD1Tg ラット並びに対照。

計画 2 (22 年度) : 計画 1 の症例を用いた、リン酸化非依存性およびリン酸化 TDP-43 抗体を用いた、TDP-43 の核内および胞体内の定量、rRNA 遺伝子転写活性およびヌクレオリンの定量。およびこれらの関連の検討 : 部位は脊髄運動ニューロンまたは顔面神経核ニューロン。蛍光測光による。

計画 3 (22 年度) : 計画 1 のヒト検索症例および SOD1Tg ラットにおける運動ニューロンの定量的検討 (顔面神経引き抜きラットの所見は報告済み [Nagasao, Oyanagi et al. J Neurosci Res, 2008]) : 主としてパラフィン包埋 5 ミクロン厚切片のクリューバー-バレラ染色標本を用いる。核小体を有する運動ニューロンをカウントする。

計画 4 (22 年度) : 計画 1 のヒト検索症例および SOD1Tg ラットにおける運動ニューロ胞体内 RNA の定量的検討 (顔面神経引き抜きラットの所見は報告済み [J Neurosci Res, 2008]) : 主として 5 ミクロン厚パラフィン切片のピロニン染色標本を用いて計測する。

平成 23 年度以降

計画 1 (23 年度以降) : 22 年度計画 1 の症例における、ユビキチンと TDP-43 の関連の確認 : 主としてパラフィン切片でユビキチンと TDP-43 (リン酸化または非依存性抗体) 二重免疫染色を行い共焦点顕微鏡観察して、ユビキチン化封入体がどの程度リン酸化またはリン酸化非依存性 TDP-43 から構成されているか、定量的に検討する。

計画 2 (23 年度以降) : 22 年度計画 1 の症例におけるヌクレオリンの in situ hybridization と定量的検討 : 何故 ALS 運動ニューロンでヌクレオリンが減少するか検索する。保存されている脊髄または脳幹の凍結切片または新規剖検症例の凍結切片を用いる。22 年度計画 1 のデータと比較、解析する。

計画 3 (23 年度以降) : 22 年度計画 1 の症例におけるヌクレオリンのリアルタイム PCR : 保存されている脊髄または脳幹および新規症例の凍結材料で運動ニューロン部分を用

いて定量的に検討する。上記 23 年度以降計画 1 のデータと比較、解析する。

計画 4 (23 年度以降) : 22 年度計画 1 の症例におけるストレス顆粒の描出への取り組み

み : ヒト脊髄運動ニューロンでは、これまでストレス顆粒の存在は認められていない。これが、本来存在しない物か、観察上の感度の問題か、パラフィン切片のみならず、凍結切片も使用し、免疫染色で考えられる限りの増感の工夫を盛り込んで共焦点顕微鏡観察と免疫電顕観察して、ALS とモデル動物での変化を解析する。ストレス顆粒マーカーと言われる TIA-1、TIAR、PABP-1 等と TDP-43 との二重免疫染色を行う。

計画 5 (23 年度以降) : 運動ニューロンにおける酸化ストレス、小胞体ストレスの有無を検討する。酸化ストレス (8-OHdG、8-OHG、4-HNE など)、小胞体ストレス (GRP78、カルネキシン、カルレティクリン、HSP70 など)、アポトーシス (TUNEL 染色、カスパーゼ 3)、カルシウムセンサー蛋白 (hippocalcin) の増減などを特異的免疫染色により解析する。併せて細胞小器官の電顕観察を行う。

総括 : 以上のデータをまとめ、孤発性日本人 ALS とグアム島の ALS、SOD1 遺伝子変異家族性 ALS、また ALS モデル顔面神経引き抜き損傷ラット、SOD1Tg ラットの運動ニューロン死のメカニズムを、TDP-43 蛋白の変化 (核から細胞質へのシフトとリン酸化) とリボゾーム RNA 遺伝子転写活性、その主たる関連因子ヌクレオリン、胞体内 RNA 量、ストレス顆粒との関連から明らかにする。

4. 研究成果

ALS の運動ニューロン死に蛋白合成系の異常が深く関連している事を明らかにした。それはすなわち、「転写」から「糖鎖の修飾」に至る「蛋白合成系」を、一連の「流れ」として概観した場合、その「上流域」と考えられる、rRNA 遺伝子転写活性の減少を見出し、rRNA 遺伝子の転写活性に関連するヌクレオリンの減少も見出した。これらと TDP-43 のリン酸化が深く関連していることも明らかにした。「下流域」では、蛋白の折りたたみに関与する分子シャペロンの凝集を初めて見出した。また分子シャペロンの凝集とシスタチン C の凝集 (Bunina 小体の形成) に際して、相互的にシードになっていることを見出した。

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 14 件)

- ①Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Tateyama M, Yaginuma C, Sato H, Hayasaka M, Sugawara H, Ito M, Abe-Kondo E, Shimakura N, Ibi T, Kuru S, Wakayama T, Sobue G, Fujii N, Saito T, Matsumura T, Funakawa I, Mukai E, Kawanami T, Morita M, Yamazaki M, Hasegawa T, Shimizu J, Tsuji S, Kuzuhara S, Tanaka H, Yoshioka M, Konno H, Onodera H, Itoyama Y: Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:433-440, 2013. <査読有り> doi: 10.1136/jnnp-2011-301339.
- ②Takeda T, Uchihara T, Mochizuki Y, Ishihara A, Nakamura A, Sasaki S, Uchiyama S, Iwata M, Mizutani T: Supranuclear ophthalmoparesis and vacuolar degeneration of the cerebral white matter in amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. *Amyotrophic lateral sclerosis* 13:74-83, 2012, <査読有り> doi:10.3109/17482968.2011.603731
- ③橋本智代, 小柳清光: 中枢神経の所見の取り方 1. 一般的な見方、切り出し. *病理と臨床* 30:149-157, 2012<査読無し>
- ④Kinoshita M, Yoshida K, Oyanagi K, Hashimoto T, Ikeda S: Hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids caused by R782H mutation in CSF1R: Case report. *Journal of the Neurological Sciences* 318:115-118, 2012, <査読有り> doi:10.1016/j.jns.2012.03.012.
- ⑤Hineno A, Nakamura A, Shimojima Y, Yoshida K, Oyanagi K, Ikeda S: Distinctive clinicopathological features of 2 large families with amyotrophic lateral sclerosis having L106V mutation in *SOD1* gene. *Journal of the Neurological Sciences* 319: 63-74, 2012, <査読有り> doi: 10.1016/j.jns.2012.05.014.

- ⑥Mochizuki Y, Isozaki E, Takao M, Hashimoto T, Shibuya M, Arai M, Hosokawa M, Kawata A, Oyanagi K, Mihara B, Mizutani T: Familial ALS with *FUS* P525L mutation: two Japanese sisters with multiple system involvement. *Journal of the Neurological Sciences* 323: 85-92, 2012, <査読有り>
doi: 10.1016/j.jns.2012.08.016.
- ⑦小柳清光、橋本智代: TDP-43 と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) ・前頭側頭葉変性症 (FTLD) の神経細胞死. *信州医学雑誌* 59:63-73, 2011<査読無し>
- ⑧Sunami Y, Koide R, Ara, N, Yamada M, Mizutani T, Oyanagi K: Radiologic and neuropathologic findings in patients in a pedigree with dentatorubralpallidoluysian atrophy. *American Journal of Neuroradiology* 32:109-114, 2011, <査読有り>
doi: 10.3174/ajnr.A2252.
- ⑨Ito U, Hakamata Y, Kawakami E, Oyanagi K: Temporary focal cerebral ischemia results in swollen astrocytic end-feet that compress microvessels and lead to focal cortical infarction. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31:328-338, 2011, <査読有り>
doi: 10.1038/jcbfm.2010.97.
- ⑩Piao Y, Hashimoto T, Takahama S, Kakita A, Komori T, Morita T, Takahashi H, Mizutani T, Oyanagi K: Survival motor neuron (SMN) protein in the spinal anterior horn cells of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research* 1372: 152-159, 2011, <査読有り>
doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.070.
- ⑪橋本智代、小柳清光: 神経病理入門. I. 基本的な脳標本の作製法. *Medical Technology* 39: 939-946, 2011 <査読無し>
- ⑫佐藤俊一、星 研一、渡辺正秀、日根野晃代、小柳清光、矢彦沢裕之: 先行感染後に発症した抗 AQP4 抗体陽性の視神経脊髄炎 84 歳男性剖検例. *臨床神経* 51: 583-589, 2011<査読有り>
- ⑬Shimizu T, Komori T, Kugio Y, Fujimaki Y, Oyanagi K, Hayashi H:

Electrophysiological assessment of corticorespiratory pathway function in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 11:57-62, 2010, <査読有り>
doi: 10.1080/17482960903207385.

- ⑭小柳清光、橋本智代、山崎峰雄: グアム島の筋萎縮性側索硬化症 (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: 1632-1641, 2010<査読無し>

[学会発表] (計 9 件)

- ① Nakayama Y, Matsuda C, Oyanagi K, et al.: Usability of biosignal communication devices for patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using tracheostomy ventilation. The 24th Annual International Symposium on ALS/MND. 2012 年 12 月 5 日. 米国 Chicago
- ② 小柳清光、吉田邦広、他: 構音障害、運動失調、認知症状を呈し、クラーク柱神経細胞脱落とレビー小体とを呈したポリグルタミン封入体陽性 85 歳例. 第 53 回日本神経病理学会. 2012 年 6 月 30 日. 新潟市
- ③ 他田真理、小柳清光、高橋均、他: 上位運動ニューロンの組織変性が下位のそれに比し高度であった ALS 剖検例の検討. 第 53 回日本神経病理学会. 2012 年 6 月 30 日. 新潟市
- ④ 日根野晃代、小柳清光、他: SOD1 遺伝子 L106V 変異家族性筋萎縮性側索硬化症におけるユビキチン関連蛋白の免疫組織学的検討. 第 53 回日本神経病理学会. 2012 年 6 月 29 日. 新潟市
- ⑤ 三上裕嗣、尾野精一、小柳清光、他: 口咽頭部・頸部・上肢近位部に限局する筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の 1 剖検例. 第 53 回日本神経病理学会. 2012 年 6 月 29 日. 新潟市
- ⑥ 安井香奈子、尾野精一、小柳清光、他: 孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の初期病変-全経過 6 ヶ月の 1 剖検例. 第 53 回日本神経病理学会. 2012 年 6 月 29 日. 新潟市

- ⑦ 日根野晃代、小柳清光、他：ALS の神経因性膀胱：頻発する SOD1 遺伝子 L106V 変異家系における責任病巣. 第 53 回日本神経学会. 2012 年 5 月 23 日. 東京都
- ⑧ 小柳清光、矢彦沢裕之、他：認知症を呈した成人発症常染色体優性遺伝性の神経軸索ジストロフィーの脳生検例. 第 52 回日本神経病理学会. 2011/6/4. 京都市
- ⑨ Hineno A, Nakamura A, Shimojima Y, Yoshida K, Oyanagai K, Ikeda S: Distinct clinicopathological features in two large families with familial amyotrophic lateral sclerosis having L106V mutation in the copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene. 第 2 回アジア神経病理学会. 2011/11/5. 北京. 中国

[図書] (計 2 件)

- ① Oyanagai K, Hashimoto T: Magnesium in Parkinson's Disease: an update in clinical and basic aspects. In: *Magnesium in the Central Nervous System* (Eds: Vink B, Nechifor M) University of Adelaide Press, Adelaide, 2011, pp229-236
- ② Oyanagai K, Hashimoto T, Yamazaki M: Parkinsonism-dementia complex. In: *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders* (Eds: Weller RO, Dickson DW) Springer, Oxford, 2011, pp171-178

[その他]

ホームページ等

http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/medical_science/course/course35.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 清光 (OYANAGI KIYOMITSU)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：00134958

(2) 研究分担者

水谷 俊雄 (MIZUTANI TOSHIO)
公益財団法人東京都医学総合研究所・東京
京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：40124416

山崎 峰雄 (YAMAZAKI MINEO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10277577

(3) 連携研究者

()

研究者番号：