

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591279

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症と脊髄小脳変性症における共通結合蛋白

研究課題名(英文)Common coupling protein of amyotrophic lateral sclerosis and spinocerebellar degeneration

研究代表者

児矢野 繁(KOYANO, Shigeru)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50315818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は筋萎縮性側索硬化症(ALS)と脊髄小脳変性症(SCD)における共通蛋白を明らかにすることである。TDP-43とATXN蛋白は結合している可能性があり、病理組織学的に証明する。(1)ALSのCAGリピート数は正常範囲内。(2)ALSにおけるTDP-43とATXN蛋白は細胞質に認められ、細胞質内封入体は認められなかった。海馬歯状回における細胞質内封入体にはATXN2の抗体が発現していた。(3)SCDにおけるTDP-43蛋白はSCA2の脊髄前角細胞の核内、細胞質内、核内封入体内に発現し、SCDの神経細胞死に重要な意味を持つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is clarify the common coupling protein of amyotrophic lateral sclerosis and spinocerebellar degeneration. The ATXN protein and TDP-43 protein may be combined each other. We prove this histopathologically.

(1) We measured the number of the CAG repeat in the patient of amyotrophic lateral sclerosis, but it was in the normal range. (2) Pathological intracellular inclusions in ALS were not found by immunostaining of an anti-ATXN protein antibody. Only an ataxin-2 expressed in the intracytoplasmic inclusion body of the dentate gyrus of the part in case of ALS with dementia. (3) Immunohistochemistry for TDP-43 in an anterior horn of the spinal cord in SCA2 has demonstrated three different expression patterns: 'intranuclear' 'nuclear with inclusions' and 'cytoplasmic'. These results show that the translocation of the TDP-43 protein in a nerve cell may play an important role of the cell death of SCD.

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：臨床神経形態学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 脊髄小脳変性症 TDP-43 ATXN

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンの変性により、筋肉の萎縮と筋力低下をきたし、半数が発症後 3~5 年で呼吸麻痺により死亡する難病である。2006 年この疾患の脳病理組織の海馬や脊髄前角細胞に出現するユビキチン陽性封入体の主要構成成分として TARDNA-binding protein of 43 kD (TDP-43) が同定された。一方、遺伝性脊髄小脳変性症の中で原因遺伝子内に CAG のリピート延長を持つ 8 つの疾患をポリグルタミン病と呼び、1997 年これらのポリグルタミン病は神経細胞の核内に封入体を作ることが共通した病理組織所見であることが判明している。この全く関連性のないように思えた 2 つの疾患に最近、関連性を示唆する報告が相次いでいる (Andrew C et al. Nature 2010, Kay Seidel et al. Acta Neuropathol 2010)。特に ALS では脊髄小脳失調症 2 型(SCA2)の変異型ポリグルタミンの原因タンパク質である ATXN2 が、動物および細胞のモデルで TDP-43 の毒性に対する強力な修飾因子であることが判明している。

申請者らは 2009 年から ALS と SCA2 の関係に注目し、その関連性の解明に取り組んできた。その結果、ALS および SCA2 の病理組織の同一の神経細胞内での TDP-43 と ATXN2 の局在がいくつか確認され、予備的な研究結果を得ている(Doi H et al. Neurosci Res 2009)。これらの知見は、SCA2 のみならず、他のポリグルタミン病においても可能性があり、TDP-43 と ATXN 蛋白との相互作用が、ALS などの TDP-43 タンパク質症の治療介入で有望な標的となる可能性を示しているため、その足がかりをつかみたい。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は萎縮性側索硬化症と脊髄小脳変性症における共通する蛋白を明らかにすることである。具体的には下記の項目内容に示す。

筋萎縮性側索硬化症の患者における各ポリグルタミン遺伝子の CAG リピート数の測定：筋萎縮性側索硬化症の患者において各ポリグルタミン病疾患 (SCA1, SCA2, SCA3) の原因遺伝子の (ATXN1, ATXN2, ATXN3) の CAG リピート数を測定する。

(2) 筋萎縮性側索硬化症の剖検脳における免疫組織化学的検討：筋萎縮性側索硬化症の剖検脳において TDP-43 と各種 ATXN 蛋白 (ATXN1, ATXN2, ATXN3) が病変の同一神経細胞内に局在しているか否かを確認する。

(3) 各種ポリグルタミン病 (SCA1, SCA2, SCA3) の剖検脳における免疫組織化学的検討：各種ポリグルタミン病 (SCA1, SCA2, SCA3) の剖検脳において TDP-43 と各種 ATXN 蛋白 (ATXN1, ATXN2, ATXN3) が病変の同一神経細胞内に局在しているか否かを確認する。

未だに病態が明らかにされていない筋萎縮性側索硬化症と脊髄小脳変性症においてその共通に結合する蛋白が明らかにされることにより、病態解明に近づくことはもとより、蛋白の相互作用が、筋萎縮性側索硬化症や脊髄小脳変性症の治療介入で有望な標的となる可能性を示唆する。

今回の結果で筋萎縮性側索硬化症に他の疾患 (脊髄小脳変性症) の遺伝子異常が確認されるかは重要な意味を持ち合わせている。つまり、今まで単一の遺伝子異常と考えられてきた各種の神経難病が遺伝子に影響を与える強力な修飾因子として新たな遺伝子が他の疾患の遺伝子に存在することを考えさせられたことである。また、異なる変性疾患に共通する蛋白質が互いに結合している可能性を示すことは、関連性のない疾患と誤っていた他の疾患の蛋白が相互に影響しあっている関連する可能性を示す基盤となる重要な結果であると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 筋萎縮性側索硬化症の患者において各

種ポリグルタミン病 (SCA1, SCA2, SCA3) の原因遺伝子の CAG リピート数を測定する。入院・外来患者の筋萎縮性側索硬化症患者 30 例の血液から各種ポリグルタミン病 (SCA1, SCA2, SCA3) の原因遺伝子 (ATXN1, ATXN2, ATXN3) の CAG リピート数をそれぞれの領域に対する flanking primer にて PCR 後、シーケンサー解析で測定し、リピート数の延長の頻度、程度を確認する。また、この結果と臨床的な経過や所見との関連性を調べる。

(2) 筋萎縮性側索硬化症の剖検脳の病変における TDP-43 と ATXN 蛋白 (ATXN1, ATXN2, ATXN3) の同一神経細胞内の局在を免疫組織化学的に確認する。筋萎縮性側索硬化症の剖検脳 12 例においてその主体である病変 (脊髄前角細胞、延髄運動神経核、疑核) およびユビキチン陽性封入体の出現する箇所 (海馬や大脳皮質) において下記の各種抗体による免疫組織化学的手法 (ABC 法、蛍光抗体法、Western blotting 法) で神経細胞内の局在を確認する。同一内の蛋白局在の確認には Confocal laser 顕微鏡によってこれを証明する。

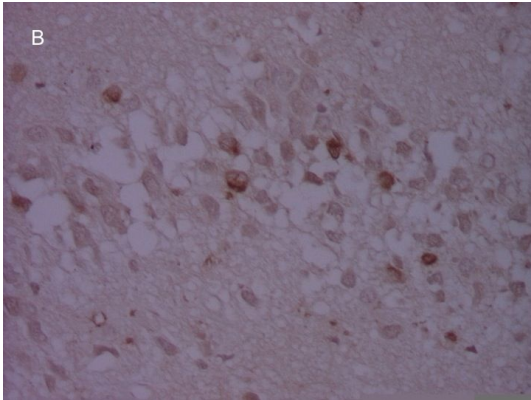
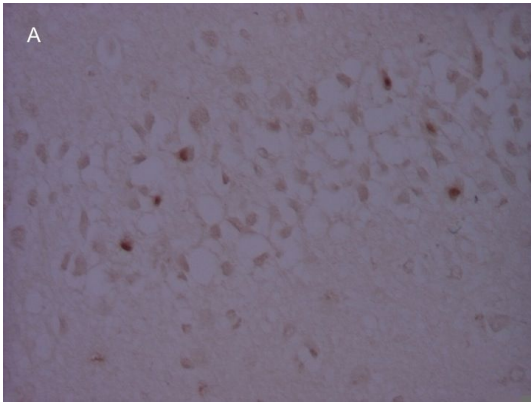
(3) 脊髄小脳変性症 (各種ポリグルタミン病: SCA1, SCA2, SCA3) の剖検脳における TDP-43 と ATXN 蛋白の同一神経細胞内の局在を免疫組織化学的に確認する。脊髄小脳変性症各種ポリグルタミン病剖検脳においてその主体であり、封入体の出現する箇所 (小脳、中脳、橋、延髄、大脳基底核、脊髄前角細胞) において下記の各種抗体による免疫組織化学的手法 (ABC 法、蛍光抗体法、Western blotting 法) で神経細胞内の局在を確認する。同一内の蛋白局在の確認には Confocal laser 顕微鏡によってこれを証明する。

#### 4. 研究成果

(1) 筋萎縮性側索硬化症の患者における各種ポリグルタミン病 (SCA1, SCA2, SCA3) の原因遺伝子の CAG リピート数の測定: 筋萎縮性側索硬化症の患者 12 例において各原因タ

ンパク遺伝子 (ATXN1, ATXN2, ATXN3) の CAG リピート数を測定したが、いずれも正常範囲内で今までの報告のように中等度の延長も認められなかった。この理由としては最近 ATXN2 の異常と C9orf12 との関係が示唆された報告 (van Blitterswijk *et al.* Neurobiol Aging 2014) があり、本邦で C9orf12 異常を持った ALS が極めて少ない現状を考え合わせると本邦の ALS には CAG リピート数が中等度に延長する症例はほとんどいない可能性がある。

(2) 筋萎縮性側索硬化症の剖検脳の病変における TDP-43 と ATXN 蛋白 (ATXN1, ATXN2, ATXN3) の同一神経細胞内局在の免疫組織化学的確認: 筋萎縮性側索硬化症の患者 12 例において各原因タンパクの抗体 (ataxin-1, ataxin-2, ataxin-3) およびポリグルタミンを認識する抗体 (1C2) で免疫染色した結果、これらのタンパクは ALS で病変が認められる脊髄前角や舌下神経核、疑核などの神経細胞の細胞質に認められた。ただし、脊髄前角や舌下神経核、疑核の神経細胞では ALS の TDP-43 病変として知られている細胞質内封入体 (skein-like inclusion, round inclusion) のような所見は各原因タンパクによる免疫染色では認められなかった。筋萎縮性側索硬化症の患者 12 例の中で認知症を合併した例あるいは合併しなくても神経病理学的に海馬歯状回における細胞質内封入体を持っていた 3 例においては同部位の封入体に ATXN2 の抗体が発現していた (図 1)。この結果から筋萎縮性側索硬化症の海馬歯状回における神経細胞内の細胞質内封入体の形成には ATXN2 が何らかの関連性もっていることを示唆する所見であると考えられた。図 1. 筋萎縮性側索硬化症の海馬歯状回における神経細胞内の細胞質内封入体

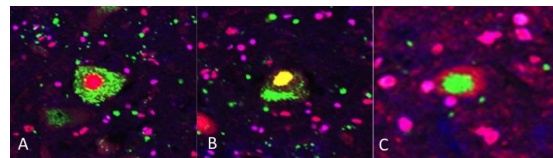


(A: TDP-43 陽性の細胞質内封入体. B: ATXN2 陽性の細胞質内封入体. Scale : X100)

(3) 脊髄小脳変性症(各種ポリグルタミン病: SCA1, SCA2, SCA3)の剖検脳におけるTDP-43とATXN蛋白の同一神経細胞内局在の免疫組織化学的確認: 脊髄小脳変性症(各種ポリグルタミン病: SCA1 4例, SCA2 3例, SCA3 5例)の剖検脳12例それぞれにおけるTDP-43とATXNタンパクの同一神経細胞内の局在を免疫組織化学的に確認した。第一に脊髄小脳変性症各種ポリグルタミン病(SCA1, SCA2, SCA3)剖検脳においてその主体であり、封入体の出現する箇所(小脳、中脳、橋、延髄、大脳基底核、脊髄前角細胞)において下記の各種抗体(ataxin-1, ataxin-2, ataxin-3)およびポリグルタミンを認識する抗体(1C2)による免疫組織化学的手法で神経細胞内の局在を確認したところ、以前の報告のように神経細胞脱落が重度であり、グリオシスを認めていた部位に選択的に核内封入体が存在していることがわかった。ただし、必ずしも程度を含めて全て一致するとは限らず、たとえばSCA2

においてはポリグルタミンの抗体(1C2)で詳細にその分布を調べてみると病期とともに病的なStagingを明らかにした(Koyano S et al. Brain Pathol 2014)。脊髄小脳変性症各種ポリグルタミン病(SCA1, SCA2, SCA3)剖検脳におけるTDP-43タンパクの発現は脊髄前角細胞において細胞内の分布が核内、細胞質内、核内封入体内の3通りに分けられることが分かった。

この同一内の蛋白局在の確認にはConfocal laser 顕微鏡によって証明した。もともとTDP-43タンパクは神経細胞の核内に存在しているが、このSCA2の脊髄前角細胞ではまるでポリグルタミンタンパクが病期をきっかけに核内に入って封入体を形成するときに同時に局在している姿とさらにTDP-43タンパクが細胞質に認めているのは封入体から押し出された形となっている様子をとらえている(図2)。図2. SCA2の脊髄前角細胞におけるTDP-43とポリグルタミンタンパクの変化(蛍光染色)



(緑: ポリグルタミン(1C2)赤: TDP-43, A: 核内にTDP-43、細胞質にポリグルタミンを認める. B: 核内封入体にTDP-43とポリグルタミンが同時に局在する. C: 核内にポリグルタミン、細胞質にTDP-43を認める. Scale : X400)

このような1つの神経細胞内におけるタンパクの移動は脊髄小脳変性症各種ポリグルタミン病がどのような障害過程で神経細胞死へ向かっていくのかという病態生理を考える上で重要な意味を持つものと思われる。

##### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Koyano S, Yagishita S, Kuroiwa Y, Tanaka F, Uchihara T. Neuropathological

Staging of Spinocerebellar Ataxia Type 2  
by Semiquantitative 1C2-Positive Neuron  
Typing. Nuclear Translocation of  
Cytoplasmic 1C2 Underlies Disease  
Progression of Spinocerebellar Ataxia Type  
2. Brain Pathol 2014 ; 26  
DOI: 10.1111/bpa.12146

〔学会発表〕(計 1件)

児矢野繁、黒岩義之、柳下三郎、内原俊  
記：SCA2 と ALS における共通結合蛋白  
(TDP-43 と ATXN2) 第 52 回日本神経学会  
総会、2011.5.18., 名古屋

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

児矢野 繁 (KOYANO, Shigeru)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50315818

### (2)研究分担者

黒岩 義之 (KUROIWA, Yoshiyuki)

帝京大学・医学部・客員教授

研究者番号：40135249

(平成 23 年度)