

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23659184

研究課題名（和文）：神経細胞内に変異蛋白質凝集体を形成する神経変性疾患  
における核内小体の動態解析

研究課題名（英文）：An immunohistochemical study on nuclear bodies in neurodegenerative  
diseases with abnormal protein aggregates

研究代表者

高橋 均 (TAKAHASHI HITOSHI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：90206839

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経変性疾患である $\alpha$ -synuclein を病的蛋白とする多系統萎縮症 (multiple system atrophy: MSA) および TDP-43 を病的蛋白とする筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) について検討した。(1) MSA 橋核神経細胞 (5 例) では、核内小体である PML 小体は  $\alpha$ -synuclein 陽性の核内封入体の存在により、類円形(対照 5 例) から混紡状や線状に変化し、それら封入体と共局在する所見をはじめとする多様な形態権を呈して認められた。また、統計学的には、MSA 神経細胞の核の体積に占める PML body の総体積は正常群に比し有意に減少していた。(2) ALS 脊髄前核細胞では、核内小体である Cajal 小体数の平均値は対象 5 例：17.19 $\pm$ 4.09、孤発性 ALS 5 例：8.06 $\pm$ 4.41 であり、その数の有意な減少がみられた。PML 小体および Cajal 小体は神経細胞の生命維持に関与する核内分子とされており、これらの減少は、それぞれ $\alpha$ -synuclein、TDP-43 の異常に関連して神経細胞死に関与しているものと推測された。

研究成果の概要（英文）：The kinetics of two nuclear bodies, PML and Cajal bodies, were studied in multiple system atrophy (MSA) and sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS), respectively. In MSA, in the nuclei of the pontine nuclei neurons, PML bodies were found to be deformed in the presence of  $\alpha$ -synuclein-positive intranuclear inclusions: the round structures changed to rod-like or linear abnormal ones. Statistically, the entire volume of PML bodies was significantly decreased in MSA group (n=5) than in control group (n=5). In ALS, in the nuclei of the lumbar anterior horn cells, the number of Cajal bodies was significantly decreased in ALS group (n=5: 8.06 $\pm$ 4.41) than in control group (n=5: 17.19 $\pm$ 4.09). It is tempting to speculate that in MSA and ALS, these decreases of PML and Cajal bodies, which are associated with neuronal viability, play an important role in neuronal cell death in relation to abnormalities of  $\alpha$ -synuclein and TDP-43, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：脳・神経

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の病態として、蛋白質のミ

スフォールディングにより神経細胞内(胞体内 and/or 核内)に変異蛋白質が凝集、蓄積することが知られている。変異蛋白質の産生凝集体(封入体)形成がどのように神経細胞死を引き起こすかは未だ不明であるが、そのことが細胞の生命維持に不可欠な役割を担っている核の内部環境にネガティブな影響を与える悪循環を形成している可能性は否定できない。これまで、我々の知る限り、神経変性疾患における神経細胞の核内環境に関する研究は、我々のポリグルタミン病(Yamada M *et al. Am J Pathol* 159: 1785-1795, 2001)など、遺伝性に関するものを嚆矢として、少数の報告があるのみであり、孤発性神経変性疾患においては、“神経細胞内変異蛋白質の産生凝集体形成と核内環境の動態変化”は、その多くの病態解明を指向した研究の中、全く扱われてこなかった領域といえる。

本研究で扱う多系統萎縮症(Multiple System Atrophy; MSA)および筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)についてであるが、前者は、脊髄小脳変性症のなかで最も頻度が高い疾患であり、オリゴデンドログリア胞体内に出現する $\alpha$ -synuclein陽性封入体が一次的な病変と考えられているが、これら封入体は神経細胞の核内、胞体内にも早期から出現することから、神経細胞死のプロセスの起点がその核内にあるとの指摘もある;一方、後者では、神経細胞内のコピキチン化細胞質内封入体の構成タンパクが核内タンパクのひとつであるTDP-43であることが明らかになって以降、TDP-43の機能解析が進んでいるが、その神経細胞死の機序はいまだ明確となっていない。

## 2. 研究の目的

神経変性疾患の多くは、コピキチン化された変異蛋白質の神経細胞内凝集体形成をその病理組織学的特徴としている。MSAおよびALSにおけるその病的構成タンパクはそれぞれリン酸化された $\alpha$ -SynucleinとTDP-43である。この変異蛋白質の産生凝集が神経細胞死にどのように関わっているのか。これまでの研究は、凝集体形成そのものは細胞死に防御的に働くことを強く示唆している。それでは、変異蛋白質の凝集という自己防御機構が内在しているにも拘わらず、何故、早晚、神経細胞死が帰結されるのか。死に至る神経細胞ではその生命維持に不可欠な役割を担う核の内部環境に何らかの異常はないのか?本研究では、MSAおよびALSについて、その細胞死の問題を、細胞内変異蛋白質の産生凝集と核内環境の動態変化という観点から検討した。

## 3. 研究の方法

症例選択及び標本作製:本研究では、age-matchedの正常対照症例群5例(CNS病変を有さない症例)・対象疾患群MSAおよびALSの各々5例。検索部位は、MSAは橋核、ALSは腰髄前角とした。フォルマリン固定、6ミクロン厚のパラフィン包埋切片を作製した。

免疫染色・統計解析:MSA群においてはhamonoclonal抗リン酸化 $\alpha$ -synuclein抗体およびpolyclonal抗PML body抗体を用いて、ALS群においては抗リン酸化TDP-43抗体およびpolyclonal抗coilin抗体を用いて二重蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。得られた数値を統計的に解析した。

## 4. 研究成果

(1)本研究で選出、対象としたMSA剖検例の罹病期間は全例において3.5年以内である。この罹病期間を超えて長期生存し得たMSA剖検例では、本症でもっとも強く侵される部位のひとつである橋核における神経細胞脱落が高度であり、検索部の選定に解剖学的正確性を欠く恐れのあること、さらに、より早期の病態を反映した神経細胞の病理学を検討するには長期生存例は相応しくないと判断した。

MSA神経細胞では、PML bodyは核内封入体の存在により、類円系から棍棒状や線状に変化し、封入体と共同在する所見をはじめとし、多様な形態変化を呈していた。また、統計学的には、MSA神経細胞の核の体積に占めるPML bodyの総体積は正常群に比し有意に減少していた。PML bodyのこれらの変化は、MSAの病態において、神経細胞核内の代謝機構の異常(減弱)が深く関わっていることを示唆するものと考えられた。

(2)TDP-43はCajal小体(構成タンパクはcoilin)、PML小体など各種核内タンパクと共同在することが知られている。そこで、TDP-43とCajal小体の関連について検討した。

脊髄前角細胞中のCajal小体数の平均値は、コントロール5例:17.19 $\pm$ 4.09、孤発性ALS5例:8.06 $\pm$ 4.41であり、ALS例ではCajal小体数は減少していた。多重ロジスティック解析では、ALSの有無(odds ratio=0.212, P=0.001)と前角細胞面積(odds ratio=1.001, P<0.001)が独立変数として有意であった。

孤発性ALSの脊髄前角細胞でCajal小体数が減少していた理由は(1)核内TDP-43の減少による一次的な可能性、(2)神経細胞の転写活性や活動性低下による二次的可能性があるが、今回の研究では十分に検討できなかった。Cajal小体は多機能なタンパク複合体であるが、主な機能はsmall nuclear RNAやsmall nucleolar

RNAの成熟の場と考えられており、Cajal小体の減少はタンパク発現に影響を与えると推測される。また、神経細胞のviabilityとCajal小体数との関係も報告されており、Cajal小体の減少は運動神経細胞死に関与していると推測される。

#### 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 6件)

- (1) Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. Acta Neuropathol, 査読有, 124: 149-151, 2012  
DOI: 10.1007/s00401-012-0999-z
- (2) Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Optineurin immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions of polyglutamine diseases (Huntington's, DRPLA, SCA2, SCA3) and intranuclear inclusion body disease. Acta Neuropathol, 査読有, 123: 747-749, 2012  
DOI: 10.1007/s00401-012-0956-x
- (3) Kosaka T, Fu Y-J, Shiga A, Ishidaira H, Tan C-F, Tani T, Koike R, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Primary lateral sclerosis: upper-motor-predominant amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobar degeneration - immunohistochemical and biochemical analyses of TDP-43. Neuropathology, 査読有, 32: 373-384, 2012  
DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01271.x
- (4) Soma K, Fu Y-J, Wakabayashi K, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathol Appl Neurobiol, 査読有, 38: 54-60, 2012  
DOI: 10.1111/j.1365-2990.2011.01175.x
- (5) Ince PG, Highley JR, Kirby J, Wharton SB, Takahashi H, Strong MJ, Shaw PJ. Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular

pathway and the significance of glial pathology. Acta Neuropathol, 査読有, 122: 675-671, 2011

DOI: 10.1007/s00401-011-0913-0

- (6) Toyoshima Y, Tanaka H, Shimohata M, Kimura K, Morita T, Kakita A, Takahashi H. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is associated with TDP-43 pathology. Acta Neuropathol, 査読有, 122: 375-378, 2011  
DOI: 10.1007/s00401-011-0862-7

[学会発表](計 2件)

- (1) Takahashi H. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis -Discovery of TDP-43 and after that -. Seoul Neuropathology Forum - The Neuropathology Study Group of the Korean Society of Pathologists (招待講演) December 8, 2012, Seoul
- (2) Takahashi H. Amyotrophic lateral sclerosis: a multisystem neuro-glial proteinopathy of TDP-43. The 7th Asia Pacific IAP Congress (招待講演) May 24, 2011, Taipei.

[図書](計 0件)

[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

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 均 (TAKAHASHI HITOSHI)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 90206839

##### (2) 研究分担者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA YASUKO)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号: 20334675

##### (3) 連携研究者

小野寺 理 (ONODERA OSAMU)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 20303167