

筋萎縮性側索硬化症における脊髄運動神経細胞の初期障害像

中原 亜紗

新潟大学医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻(脳病態病理学)

(主任：柿田明美教授)

Early morphologic alterations of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis

Asa NAKAHARA

Department of Neuropathology, Graduate School of Medicine Niigata University

(Director: Prof. Akiyoshi KAKITA)

別刷請求先

951-8585

新潟市中央区旭町通一番町757番地

新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学分野

中原亜紗

抄録

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位および下位運動ニューロンの変性と脱落により、進行性に筋力低下を来す神経変性疾患である。近年、病態関連蛋白 TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定され、核から細胞質内への局在変化が ALS の病態に関与していると考えられている。ALS は、病理組織学的に、TDP-43 陽性神経細胞質内封入体

がほぼ運動系に限局している type 1 と海馬を含む大脳の広い範囲にみられる type 2 に分類され、さらに type 2 は神経細胞質内封入体に加えて多数の変性神経突起を認める type 2b と、ほとんどみられない type 2a に亜分類される。Type 2b 群の患者は他の 2 群に比し下位運動ニューロンの脱落が軽度であるにもかかわらず呼吸筋麻痺を早期に生じるが、その機序は不明である。本研究では、ALS の脊髄前角の変性初期におけるこれら 3 亜群の神経細胞の形態学的変化の特徴を明らかにすることを目的に、3 つの所見：コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の発現、Golgi 体 (GA) の断片化、および核内 TDP-43 の消失を検討した。3 亜群とも、GA 断片化、核内 TDP-43 消失、ChAT 発現増強を示す細胞が高頻度に認められた。Type 2b における GA 断片化を示す神経細胞の割合は、type 1 のそれと比較し有意に高く、type 2a のそれと比較しても高い傾向があった。3 つの所見は type 1 と type 2a では互いに有意に相関した。type 2b でも、GA 断片化と ChAT 発現増強、および GA 断片化と核内 TDP-43 消失は有意に相関した。GA 断片化や ChAT 発現増強は、核内 TDP-43 消失に至っていない細胞でも認められたことから、これらの現象は、

核内 TDP-43 の消失に先行して始まっていることが示唆された。ALS の前角神経細胞変性の初期において、核内 TDP-43 の低下が生じる時期には、すでに軸索輸送障害などの細胞内変化が生じていること、また、変性過程は初期から亜群ごとに異なる可能性が示された。

キーワード：筋萎縮性側索硬化症，TDP-43，choline acetyltransferase，Golgi 体

I. 序文

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は中年期に発症し、進行性の筋萎縮と筋力低下をきたす致死的な神経変性疾患で、患者の 90%以上は孤発性である[1][2]. 病理学的には上位、下位運動ニューロンの変性、脱落を認め、残存する下位運動ニューロンの細胞質内にユビキチン陽性スケイン様封入体がみられることが特徴である[3][4]. 近年、主要原因蛋白として TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定され[5][6], ALS では中枢神経系の広範な領域の神経細胞やグリア細胞に異常リン酸化 TDP-43 の蓄積を伴い、変性をきたしうることが明らかになった[7][8].

我々は ALS 剖検脳の検索から、ALS は TDP-43 陽性構造物が主に運動系に局限して認められる type 1 と前頭葉、側頭葉、海馬を含む大脳の広い範囲にみられる type 2 の 2 群に分けられることを示した[7]. さらに、type 2 群の中には、大脳皮質や線条体に多数の顆粒状や点状の変性神経突起を認める稀な亜群 : type 2b と、そうした変性神経突起がほとんど見られない亜群 : type 2a があることを見出した. Type 2b は他の 2 群 (type 1 および type 2a) に比して、下位運動ニューロンの脱落が軽度であるにもかかわらず、呼吸筋麻痺をきたし罹病期間が短いという特徴が認められる[8]. この成因として、リン酸化 TDP-43 が神経細胞の樹状突起末端に蓄積することで、シナプスの可塑性が減じている可能性が考えられるものの、その機序は不明である.

ALS の脊髄前角では、残存している前角神経細胞にいくつかの形態変化が報告されており、神経細胞死に先行する変化と考えられている。まず、TDP-43 の核からの消失とリン酸化 TDP-43 の細胞質内での凝集があげられる。生理的状況では TDP-43 は主に核内に局在し RNA 代謝に関与する、不均一核内リボ核酸蛋白の一種である。ALS では核内 TDP-43 の消失は病態に密接に関与していることが示唆されている[5][6][9]。また、ALS の脊髄前角神経細胞ではゴルジ体 (Golgi apparatus: GA)の断片化が生じることが TDP-43 同定以前から知られている[10]。GA の断片化は孤発性 ALS の前角神経細胞においてだけでなく、SOD1 遺伝子変異による家族性 ALS の前角神経細胞や、Alzheimer 病の海馬や大脳皮質神経細胞においても認められる。これが生じる機序は未だ明らかではないものの、細胞変性早期に見られる変化であり、細胞死の過程で一般的に見られる非特異的な変化ではないことが示唆されている[11]。GA は翻訳後修飾や細胞内輸送に関わるため、GA の断片化によりこれらが障害され、神経細胞変性が進行する可能性がある。一方、前角神経細胞の神経伝達物質であるアセチルコリンの合成に必要なコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase: ChAT)は、ALS の前角神経細胞の細胞質内では発現が低下していることが示されている[12]。

本研究では、ALS の組織学的 3 亜群 (type 1, type 2a, type 2b)における脊髄前角神経細胞が示す変性初期の形態学的特徴を明らかにすることを目的に、剖検例の脊髄を用いた組織学

的解析を行った.

II. 対象と方法

対象

新潟大学脳研究所病理学分野において 1994 年から 2017 年までの期間に孤発性 ALS と臨床病理学的に診断された剖検例の中から、罹病期間が 24 ヶ月以内であり、かつ、第 4 腰髄前角における神経細胞脱落を半定量的に三段階評価 (軽度, 中等度, 高度) した結果 ‘軽度’ と評価される患者を抽出した. ALS の TDP-43 陽性組織像による分類[8]に基づき, ALS type 1, type 2a, type 2b の 3 群に分け, 各群から各々 5 例を対象とした. また, 対照として非神経変性疾患患者 5 例を加えた (表 1). 第 4 腰髄前角神経細胞数 (両側 5 切片の総数) の中央値 (四分位範囲)は, type 1, type 2a および type 2b で各々 226 (185-263)個, 302 (264-320)個, 268 (237-346)個 であり, 対照群のそれ 437 (365-437)個と比較すると, type 1 と type 2a では有意 (順に、 $P = 0.016$, $P = 0.032$) に減少しており, type 2b では有意差を認めなかった ($P = 0.22$). 3 亜群間には有意差を認めなかった (図 1).

組織学的解析

標本作製

第 4 腰髄前角を含むホルマリン固定, パラフィン包埋ブロックから, 10 μm 厚の連続切片を 50

枚作製し,連続した4枚をそれぞれ Klüver-Barrera (K-B) 染色と, choline acetyltransferase (ChAT), Trans-Golgi network (TGN), TDP-43 に対する免疫組織化学に用い,これを 100 µm ごとに5セット行った.

免疫組織化学

一次抗体としてモノクローナル抗 ChAT 抗体 (EPR16590; Abcam, Cambridge, UK; 1:2000), ポリクローナル抗 TGN46 抗体 (NOVUS Biologicals, Centennial, CO; 1:800), TDP-43 抗体 (Protein Tech Group Inc., Chicago, IL; 1:4000) を用いた. 免疫組織化学は Histofine Simple Stain MAX-PO kit によるポリマー法で行い, diaminobenzidine (DAB) で発色した. 対比染色にはマイヤーヘマトキシリンを用いた.

半定量的・定量的評価

作製した全ての切片をバーチャルスライドスキャナー NanoZoomer S60 (浜松ホトニクス, 浜松) でデジタルイメージに変換した. K-B 染色のイメージ上で, 症例ごとに全ての前角神経細胞に連続番号を付した. 同一の細胞を連続する ChAT, TGN46, TDP-43 それぞれの免疫組織化学のイメージ上で同定し同一の番号を付し, 以下の項目について評価した. 核が確認できる細胞を評価対象とした. ChAT 免疫染色では, 前角神経細胞の細胞質の染まりを, 対照群においてほとんどの細胞が示す中等度の染色性を 1 とし, それより減弱している細胞を 0, 増強している細胞を 2

として3段階に半定量的に評価した (図 2A, B, C). TGN46 染色では, 細胞質の Golgi 体 (GA) の断片化の有無を評価した (断片化なし:-, 断片化あり:+) (図 3A, B). TDP-43 染色では, 核内の染色性の程度や形態にかかわらず, 核内の染色性が残存している細胞は‘消失なし’とし, 染色性が全く認められない状態を‘消失’と評価した (図 3D, E). 症例ごとに上記の3つの染色性について全前角神経細胞における頻度を評価し, 亜群間で比較した. また, 同一細胞における各染色性を評価し, それらの相関の有無を検討した. すべての結果は, 中央値 (四分位範囲) で表記し, 箱ひげ図で示した (図 1, 図 2D, E, 図 3C, F, 図 4E, 図 5E, 図 6E, F).

統計学的解析

対照群と ALS 各亜群との2群間比較には, Mann-Whitney の U 検定を, type 1, type 2a, type 2b の3群間比較には, Kruskal-Wallis 検定と Dunn 検定を用いた. 解析は SPSS Statistics version 20.0 (IBM, Armonk, NY)で行った. 有意水準は $P < 0.05$ とした.

III. 結果

細胞体内 choline acetyltransferase (ChAT) の変化

対象とした全前角神経細胞に対する, ChAT 発現減弱細胞の頻度 [中央値 (四分位範囲)] は, type 1, type 2a, type 2b において各々, 16.0 (9.0-20.5) %, 8.3 (8.0-10.2) %, 7.1 (6.9-9.7) %であり, いずれも対照群の 7.1 (5.8-8.5) %に比して有意差を認めず, また, 3 亜群間でも有意差を認めなかった (図 2D). 一方で, ChAT 発現増強細胞の頻度は, type 1, type 2a, type 2b において, 23.0 (18.3-25.1) %, 17.2 (14.8-17.2) %, 30.1 (15.3-33.5) %であり, 3 亜群全てにおいて対照群の 2.9 (2.3-6.6) %に比して有意に高く ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 3 亜群間では有意差を認めなかった (図 2E). また, 神経突起と考えられるニューロピルに見られる線状の ChAT 陽性像は, 対照に比して ALS では疎になる傾向があった. 特に type 2b では明らかに疎であり, 短いものが多く, 腫大している像も多数認められた (図 4B, 図 5B).

Golgi 体 (GA) 断片化

対象とした全前角神経細胞に対する, Golgi 体断片化を認める細胞の頻度は, type 1, type 2a, type 2b において各々, 60.7 (53.0-71.2) %, 58.2 (57.6-61.7) %, 92.5 (91.8-96.3) %であり, 3 群全てにおいて対照群の 4.2 (2.2-4.3) %に比して有意に高かった ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$). 3 亜群間で比較すると, 群間で有意に差が見られ ($P = 0.018$), type 2b では type 1 に比し有意に高く ($P =$

0.033), type 2a と比べると有意差はないものの高い傾向が認められた ($P = 0.059$) (図 3C).

核内 TDP-43 消失

対象とした全前角神経細胞に対する, 核内 TDP-43 消失細胞の頻度は, type 1, type 2a, type 2b において各々, 34.6 (24.7-36.2)%, 38.3 (30.5-40.2)%, 42.9 (37.9-52.8)%であり, 3 亜群全てにおいて対照群の 2.6 (1.8-2.7)%に比して有意に高かった($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$). 3 亜群間では有意差を認めなかった (図 3F).

細胞体内の ChAT 増強と GA 断片化および核内 TDP-43 消失との関連

ChAT 発現の評価において, 発現減弱細胞 (0) の頻度は全ての亜群において対照群に比して有意差を認めなかった. 一方で, 発現増強細胞 (2) の頻度は有意に高くなっていたことから, ChAT 染色性の増強を変性初期の変化と考え, 増強細胞 (2) と減弱または中等度発現細胞 (0+1) に区別し, 他の要素との関連を比較した.

全ての亜群 type 1, type 2a, type 2b で ChAT 増強細胞 (2) における GA 断片化の頻度は, 減弱または中等度発現細胞 (0+1) におけるそれに比して有意に高かった ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P = 0.016$) (図 4A-E). また, type 1 および type 2a では, ChAT 増強細胞 (2) における核内 TDP-43 消失の頻度が有意に高く ($P = 0.016$, $P = 0.032$), type 2b のそれでは有意差は見られなかった ($P = 0.15$) (図 5A-E).

GA 断片化と核内 TDP-43 消失との関連

全ての亜群 type 1, type 2a, type 2b において, GA 断片化を認める細胞ではそれを認めない細胞に比して, 有意に高い頻度で核内 TDP-43 消失を認めた ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P = 0.016$) (図 6A-E).

また, 全ての亜群 type 1, type 2a, type 2b において, 全前角神経細胞に対する GA 断片化を認めかつ核内 TDP-43 消失を認めない細胞の頻度は, GA 断片化を認めずかつ核内 TDP-43 消失細胞の頻度に比し, 有意に高かった ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$) (図 6F).

IV. 考察

本研究では、脊髄前角における運動神経細胞の初期変性像を検討するため、罹病期間が短く、脊髄前角の変性の軽い孤発性 ALS 患者を対象として、前角神経細胞の形態学的変化を検討し、TDP-43 陽性組織像により区別される ALS の 3 つの亜群間でそれを比較した。その結果、全ての亜群に共通して、前角神経細胞において、(1) 細胞体内の ChAT 発現増強、(2) GA 断片化、そして (3) 核内 TDP-43 消失が対照群に比し有意に高頻度に認められた (図 2E, 図 3C, F)。さらに亜群間における比較では、GA 断片化の頻度は type 2b において他の 2 群に比し高い傾向を認めた (図 3C)。また、これらの 3 つの形態学的変化は type 1 と type 2a では互いに有意に相関し、type 2b でも GA 断片化と細胞体内の ChAT 発現増強、および GA 断片化と核内 TDP-43 消失は有意に相関した (図 4E, 図 5E, 図 6E)。興味深いことに、GA 断片化や ChAT 発現増強は必ずしも核内 TDP-43 消失に遅れて出現するのではなく、核内 TDP-43 の消失に至っていない細胞でも認められた。

本研究では、細胞体内の ChAT 発現減弱細胞の出現頻度はいずれの亜群でも対照群に比し有意な増加は認められず、一方、ChAT 発現増強している細胞の頻度は全ての亜群において対照群に比し増加していた (図 2)。さらに、ChAT 発現増強細胞では他の細胞に比して、全亜群で、有意に高頻度に GA 断片化を、また type 1 と type 2a で核内 TDP-43 消失を認めたため (図

4E, 図 5E), ChAT 発現増強は前角神経細胞変性過程における現象の一つであると考えられた。

ChAT は神経伝達物質であるアセチルコリンの合成に必須の酵素であり, コリン作動性神経細胞の活動性を示す特異的な指標である[13]. ALS 患者の脊髄前角の ChAT を検討した既報では, 対照群に比し発現が低下している細胞が増加していることが報告されており[12], 本研究の結果とは相反する. これは使用抗体や方法の違いである可能性を否定できないものの, 本研究では神経細胞脱落の極めて軽い, 変性初期の腰髄前角を検索対象とし, より初期の変化をとらえたためであると推察される. SOD1 変異マウスの腰髄前角神経細胞における ChAT の検討では, 発症前の 1 ヶ月齢では細胞体内の ChAT 発現は低下し, 発症する 3 ヶ月齢では, 細胞体では対照群と同等の染色性を示し, 樹状突起や軸索末端では低下していることが報告されており, 初期の ChAT 産生の低下と, それに引き続き生じる細胞内の ChAT 輸送障害による局在変化が推測されている[13]. 本研究でも, ALS 群ではニューロピルの ChAT 陽性神経突起は疎であり, 特に type 2b では短く腫大した突起も多数観察されたことから (図 4B, 図 5B), 樹状突起や軸索内の輸送障害が疑われた. これらを考え合わせると, 細胞体内の ChAT 発現増強は細胞体遠位への輸送障害による蓄積を反映した現象であると考えられる.

本研究では, 既報と同様に, 脊髄前角神経細胞に高頻度に GA 断片化[10][11] (図 3C)

と核内 TDP-43 消失[5][6](図 3F)を認めた. さらに, type 2b の GA 断片化は type 1 のそれに比較

して有意に高頻度であり、type 2a のそれと比較しても、有意差はないものの高頻度である傾向が認められた (図 3C). 神経細胞数や、細胞質内の ChAT 発現、核内 TDP-43 消失の頻度は亜群間で有意差は認められないことから、脊髄前角の変性の進行程度に明らかな差はないと考えられる。それにもかかわらず type 2b において GA の断片化が高頻度で認められたことは、変性のステージの違いよりも、むしろ、変性の過程が異なる可能性が疑われた。GA は小胞体で合成された蛋白や脂質をエンドソームや、細胞外分泌顆粒、細胞膜へ輸送するための役割を担っており、また、オートファジーを介して、小胞体や軸索の恒常性の維持にも関与している[11]. シナプス小胞前駆体の軸索輸送にも関与しているため、その障害はシナプスの変性を引き起こす[14]. Type 2b で GA 断片化が早期から極めて高頻度であることから、GA の障害が引き起こすシナプスの障害が、神経細胞脱落が軽いにも関わらず、呼吸筋麻痺で早期に死に至るという臨床像に影響している可能性も考えられる。

現在、生理的 TDP-43 の核からの消失と細胞質内凝集という細胞内局在変化は、ALS の病態の本質に関わる現象であると考えられている[9] [15]. さらに近年、核内の生理的 TDP-43 が細胞内の TDP-43 の量的制御に重要な役割を担っており、ALS における核内 TDP-43 の消失が細胞質内の TDP-43 の mRNA 量の増加を引き起こし、結果として細胞質内の TDP-43 が過剰となり凝集するということが示され、核内 TDP-43 消失が病態の起点として重要視されている[15].

TDP-43 と GA 断片化の関連については、TDP-43 の核内染色性が正常に比し低下し、細胞質にわずかな凝集を認める神経細胞で既に GA 断片化が高頻度に生じていることが報告されている[16]. 本研究においても、核内 TDP-43 の完全消失に先行して始まる早期の現象であることが確認された。さらに、本研究では、細胞体内の ChAT 発現増強も GA 断片化と同様に変性早期の現象であることが明らかになった。これらの結果から、核内 TDP-43 の低下が生じる時期には、すでに軸索輸送障害が始まっている可能性が示唆された。

本研究は細胞形態の変化について半定量的評価法を用いて解析したものであり、また対象患者数も限られている。今後、それぞれの形態学的変化を定量化できる方法を用いて、さらに多数例を検討することにより確認が必要であると考えられる。

V. 結語

本研究により孤発性 ALS の脊髄前角神経細胞における変性初期の形態学的変化が示された。ALS の神経細胞変性の初期において、核内 TDP-43 の低下が生じる時期にはすでに軸索輸送障害など様々な細胞内変化が生じていること、また、変性過程が亜群間で異なる可能性があることが示された。

謝辞

本研究に際しご指導を賜りました新潟大学脳研究所病理学分野の柿田明美先生，他田真理先生，

同神経内科学分野の小野寺理先生に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, Ince PG, Lin C, Miller RG, Mitsumoto H, Nicholson G, Ravits J, Shaw PJ, Swash M, Talbot K, Traynor BJ, Van den Berg LH, Veldink JH, Vucic S, Kiernan MC: Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 12: 310-322, 2013.
- 2) Renton AE, Chiò A, Traynor BJ: State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 17: 17-23, 2014.
- 3) Lowe J, Lennox G, Jefferson D, Morrell K, McQuire D, Gray T, Landon M, Doherty FJ, Mayer RJ: A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neurosci Lett* 94: 203-210, 1988.
- 4) Piao Y-S, Wakabayashi K, Kakita A, Yamada M, Hayashi S, Morita T, Ikuta F, Oyanagi K, Takahashi H: Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain Pathol* 13: 10-22, 2003.
- 5) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in

frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res*

Commun 351: 602-611, 2006.

6) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T,

Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden

W, Kretschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM-Y: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar

degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314: 130-133, 2006.

7) Nishihira Y, Tan C-F, Onodera O, Toyoshima Y, Yamada M, Morita T, Nishizawa M, Kakita A,

Takahashi H: Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of

distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta*

Neuropathol 116: 169-182, 2008.

8) Takeuchi R, Tada M, Shiga A, Toyoshima Y, Konno T, Sato T, Nozaki H, Kato T, Horie M,

Shimizu H, Takebayashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Heterogeneity of

cerebral TDP-43 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for

clinico-pathologic subtypes. *Acta Neuropathol Commun* 4: 61, 2016.

9) Lee EB, Lee VM, Trojanowski JQ. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated

neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13: 38-50, 2011.

- 10) Mourelatos Z, Adler H, Hirano A, Donnenfeld H, Gonatas JO, Gonatas NK. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis revealed by organelle-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4393-4395, 1990.
- 11) Sundaramoorthy V, Sultana JM, Atkin JD. Golgi fragmentation in amyotrophic lateral sclerosis, an overview of possible triggers and consequences. *Front Neurosci* 9: 400, 2015.
- 12) Oda Y, Imai S, Nakanishi I, Ichikawa T, Deguchi T. Immunohistochemical study on choline acetyltransferase in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Pathol Int* 45: 933-939, 1995.
- 13) Casas C, Herrando-Grabulosa M, Manzano R, Mancuso R, Osta R, Navarro X. Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav* 3: 145-158, 2013.
- 14) Maas C, Torres VI, Altrock WD, Leal-Ortiz S, Wagh D, Terry-Lorenzo RT, Fejtova A, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC. Formation of Golgi-derived active zone precursor vesicles. *J Neurosci* 32: 11095-11108, 2012.
- 15) Koyama A, Sugai A, Kato T, Ishihara T, Shiga A, Toyoshima Y, Koyama M, Konno T, Hirokawa S, Yokoseki A, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H, Onodera O. Increased cytoplasmic TARDBP

mRNA in affected spinal motor neurons in ALS caused by abnormal autoregulation of TDP-43.

Nucleic Acids Res 44: 5820-5836, 2016.

- 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.

表 1. 対象患者の臨床像

組織学的亜群	年齢(歳) [§]	経過(月) [§]	初発症状 (球麻痺/四肢/他)	認知症
ALS type 1	71.2 (67-78)	16.8 (12-23)	0/4/1*	1/5
ALS type 2a	67.8 (57-78)	15.4 (10-24)	3/1/1**	2/5
ALS type 2b	73.8 (60-84)	15.0 (8-24)	4/0/1**	3/5
対照 [#]	65.6 (51-76)	-	-	-

[§] 平均値(範囲), *呼吸不全, **認知症, #肺炎, 脳梗塞, くも膜下出血, 突然死

図表説明文

図 1. ALS および正常対照における腰髄前角神経細胞数

対照群, type 1, type 2a および type 2b の第 4 腰髄前角神経細胞数. 箱ひげ図の下端と上端は第一四分位数と第三四分位数, 箱中の水平線は中央値, 箱より上下に位置する水平線はそれぞれ最大値および最小値を示す. グラフ上部に, 対照群と各亜群の比較の Mann-Whitney の U 検定による P 値と, 亜群間の比較の Dunn 検定による P 値を, 有意差のあるもののみ記載. グラフ下部の下線は 3 亜群間の Kruskal-Wallis 検定の結果を示す.

図 2. 細胞体内のコリンアセチルトランスフェラーゼの発現

細胞体内のコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の発現が減弱している (評価 0) (A), 中等度 (評価 1) (B), および増強している (評価 2) (C) 前角神経細胞. 抗 ChAT 抗体による免疫組織化学. 全評価前角神経細胞における ChAT 減弱前角神経細胞 (0) の頻度 (D) と, ChAT 増強前角神経細胞 (2) の頻度 (E). 箱ひげ図の下端と上端は第一四分位数と第三四分位数, 箱中の水平線は中央値, 箱より上下に位置する水平線はそれぞれ最大値および最小値を示す. グラフ上部に, 対照群と各亜群の比較の Mann-Whitney の U 検定による P 値と, 亜群間の比較の Dunn 検定による P 値を, 有意差のあるもののみ記載. グラフ下部の下線は 3 亜群間の Kruskal-Wallis

検定の結果を示す。Bar=10 μ m (A, B, C).

図 3. Golgi 体の断片化および核内 TDP-43 の消失

Golgi 体 (GA) 断片化を認めない前角神経細胞 (A) と、それを認める前角神経細胞 (B). 抗 TGN46 抗体による免疫組織化学. 全評価前角神経細胞における GA 断片化を認める細胞の頻度 (C). 核内 TDP-43 消失を認めない前角神経細胞 (D) と、それを認める前角神経細胞 (E). 抗 TDP-43 抗体による免疫組織化学. 全評価前角神経細胞における核内 TDP-43 消失を認める細胞の頻度 (F). 箱ひげ図の下端と上端は第一四分位数と第三四分位数, 箱中の水平線は中央値, 箱より上下に位置する水平線はそれぞれ最大値および最小値を示す. グラフ上部に, 対照群と各亜群の比較の Mann-Whitney の U 検定による P 値と, 亜群間の比較の Dunn 検定による P 値を, 有意差のあるもののみ記載. グラフ下部の下線は 3 亜群間の Kruskal-Wallis 検定の結果を示す.

Bar = 10 μ m (A, B, D, E).

図 4. 細胞体内のコリンアセチルトランスフェラーゼの発現程度と Golgi 体の断片化

Type 1 および type 2b の脊髄前角の抗コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 抗体による免疫組織化学 (A: type 1, B: type 2b) および抗 TGN46 抗体による免疫組織化学 (C: type 1, D: type

2b). ChAT の発現程度ごとの GA 断片化前角神経細胞の頻度 (E). 左から順に type 1, type 2a, type

2b. 箱ひげ図の下端と上端は第一四分位数と第三四分位数, 箱中の水平線は中央値, 箱より上

下に位置する水平線はそれぞれ最大値および最小値を示す. P 値は Mann-Whitney の U 検定に

より, 有意差のあるもののみ記載. *0+1: ChAT の発現が減弱している細胞 (0) と中等度であ

る細胞 (1) を合わせた群. Bar = 100 μm (A, B, C, D).

図 5. 細胞質内コリンアセチルトランスフェラーゼの染色性と核内 TDP-43 消失

対照および type 2b の脊髄前角の抗コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 抗体による免疫

組織化学 (A:対照, B: type 2b) および抗 TDP-43 抗体による免疫組織化学 (C: 対照, D: type 2b).

ChAT の発現程度ごとの核内 TDP-43 消失を認める前角神経細胞の頻度 (E). 左から順に type 1,

type 2a, type 2b. 箱ひげ図の下端と上端は第一四分位数と第三四分位数, 箱中の水平線は中央値,

箱より上下に位置する水平線はそれぞれ最大値および最小値を示す. P 値は Mann-Whitney の U

検定により, 有意差のあるもののみ記載. *0+1: ChAT の発現が減弱している細胞 (0) と中等

度である細胞 (1) を合わせた群. Bar = 50 μm (A, B, C, D).

図 6. Golgi 体の断片化と核内 TDP-43 の消失

Type 1 および type 2b の脊髄前角の抗 TGN46 抗体による免疫組織化学(A: type 1, B: type 2b) およ

び抗 TDP-43 抗体による免疫組織化学 (C: type 1, D: type 2b). Golgi 体 (GA) 断片化の有無による核内 TDP-43 消失を認める前角神経細胞の頻度 (E). 評価した全前角神経細胞に対する GA 断片化を認めかつ核内 TDP-43 消失を認めない細胞の頻度と, 核内 TDP-43 消失を認めかつ GA 断片化を認めない細胞の頻度の比較 (図 6F). 左から順に type 1, type 2a, type 2b. 箱ひげ図の下端と上端は第一四分位数と第三四分位数, 箱中の水平線は中央値, 箱より上下に位置する水平線はそれぞれ最大値および最小値を示す. +: 有り, -: 無し. P 値は Mann-Whitney の U 検定により, 有意差のあるもののみ記載. Bar = 50 μ m (A, B, C, D).

☒ 1

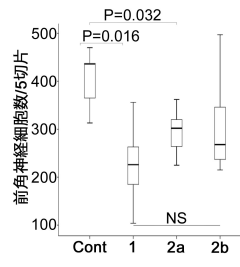
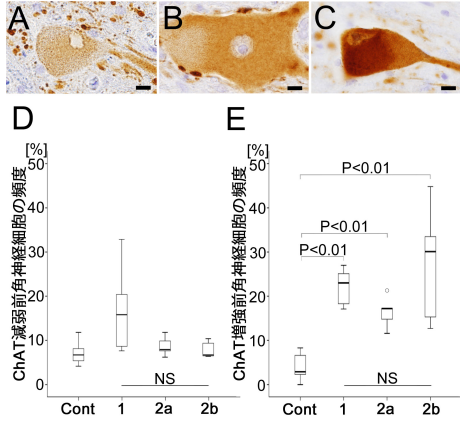


図 2



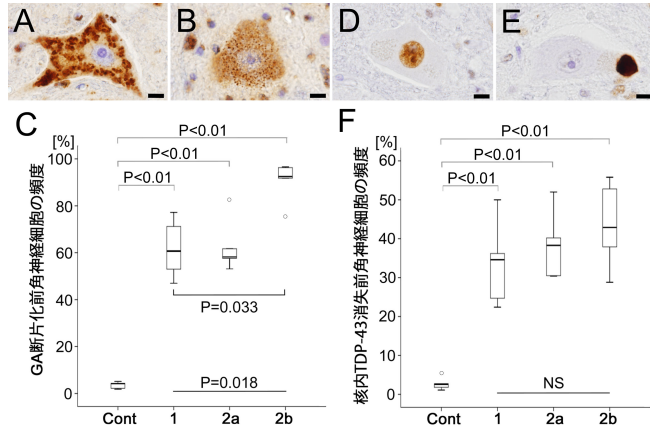


図 4

