

筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 陽性組織像の多様性

: 臨床病理学的解析

竹内 亮子

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻 (神経内科学)

(主任: 西澤正豊教授)

Heterogeneity of cortical TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis:

Clinicopathological analysis

Ryoko TAKEUCHI

Department of Neurology, Graduate School of Medicine Niigata University

(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

別刷請求先

951-8585

新潟市中央区旭町通一番町757番地

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野

竹内亮子

## 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が侵されることにより、進行性に筋力低下を来す神経変性疾患である。近年、ALS とユビキチン陽性かつタウおよび  $\alpha$ -シヌクレイン陰性の細胞内封入体を持つ前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions: FTLD-U) に共通する疾患原因蛋白として TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定され、両疾患は TDP-43 proteinopathy という新たな疾患群としてとらえられている。FTLD-TDP は大脳皮質における TDP-43 陽性組織像に基づき 4 タイプに分類されている。しかし、ALS におけるそれは明らかでない。本研究では、孤発性 ALS 連続剖検例 96 例を対象として、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (phosphorylated TDP-43: pTDP-43) を用い、大脳皮質および皮質下諸核の pTDP-43 陽性組織像を検討した。まず、海馬歯状回顆粒細胞における pTDP-43 陽性神経細胞質内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs) の有無に注目し、それを欠く type 1 群 (n = 63) とそれを有する type 2 群 (n = 33) に分類した。さらに、type 2 群の症例の中には、側頭葉新皮質に無数の顆粒状、点状 DNs が見られる症例とそれをほとんど見ない症例が存在したため、側頭葉新皮質における DNs の出現の多寡により、type 2 群を sparse DNs 群 (n = 22) と abundant DNs 群 (n = 11) に分類した。これら 3 群について、臨床病理学的解析を行った。臨床的には、type 1 群では認知症の合併はきわめてまれであった。また、type 2/abundant DNs 群は他の 2 群に比し生命予後が不良であった。一方、組織学的には type 2/abundant DNs 群では下位運動ニューロンの脱落が軽く、大脳皮質と同様に新線条体と淡蒼球にも無数の顆粒状や点状の pTDP-43 陽性構造を高率に認めた。免疫蛍光二重染色によ

る検討では、これらは神経樹状突起棘への蓄積であると考えられた。各群の罹病期間や運動ニューロン脱落の程度を考慮すると、疾患の進行に伴い、type 1 群から type 2 群へ、あるいは type 2/sparse DN 群から type 2/abundant DN 群への移行は考え難く、むしろ、これら 3 群は pTDP-43 の脳内および細胞内局在が異なる独立した亜群であるとみなされた。

**キーワード：**筋萎縮性側索硬化症，TDP-43，前頭側頭葉変性症，変性神経突起

## I. 序文

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は中年期に発症する致死的な神経変性疾患で、患者の 90%以上は孤発例である[1][2]. 主要徴候は、上位、下位運動ニューロンの変性による進行性の筋萎縮と筋力低下であり、病理学的には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][5]. 一方、ALS 患者の一部において認知症を呈することが知られており (ALS with dementia: ALS-D), これらの患者においては、運動系を超えて、海馬など大脳の広い範囲にユビキチン陽性の神経細胞細胞質内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs) や変性神経突起 (dystrophic neurites: DNs) が認められる[5][6][7][8]. さらに、同様のユビキチン陽性構造物は運動ニューロン疾患 (motor neuron disease: MND) を伴う、あるいは伴わない、前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia: FTD) においても認められることが示され[9], ALS, ALS-D, そして FTD は一連の疾患スペクトラムであると考えられてきた[8]. 近年、ALS とユビキチン陽性かつタウ、 $\alpha$ -シヌクレイン陰性の封入体を伴う前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, tau- and  $\alpha$ -synuclein-negative inclusions: FTLD-U) の主要原因タンパク質として TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が同定され[10][11], ALS と FTD を両端とする一連の疾患群は TDP-43 proteinopathy という新たな疾患概念として捉えられるようになった[12][13].

FTLD-U は大脳皮質の NCIs, DNs, 神経細胞核内封入体 (neuronal intranuclear inclusions: NIIs) といったユビキチン陽性構造物の形態と皮質内局在により 3 群に分類され、それぞれが特徴的な臨床像を有することが示された[14][15]. その後、FTLD-U の大部分が

FTLD-TDP であることが確認され、TDP-43 陽性組織像により Type A から Type D の 4 群に整理されている[16]. この分類では、FTD を伴う MND の症例では、中等数の NCIs が皮質全層に出現し DNs がきわめて少ない Type B を呈するとされた. しかし、多数の NCIs と DNs を特徴とする Type A も少なからず見られるという報告[16]もあり、FTLD-MND や ALS-D における TDP-43 陽性の脳皮質組織像は一様ではない可能性がある.

一方、ALS について、我々はこれまで 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、海馬を含む脳の広い範囲にみられる type 2 の 2 群に分けられること、また type 2 では認知症の合併が高頻度に見られることを示してきた[17]. 本研究では、正常核内 TDP-43 を標識しないため異常構造物の認識が容易である抗リン酸化 TDP-43 (pTDP-43) 抗体を用い、ALS 患者脳における皮質、および皮質下の pTDP-43 陽性組織像について検討し、それと臨床病理像や生化学的特徴との相関の有無について検討した.

## 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 1975 年から 2003 年までの期間に孤発性 ALS と臨床病理学的に診断された連続剖検例 126 例を抽出した. 病理学的に、脊髄前角細胞の細胞質内にグニナ小体またはユビキチン陽性スケイン様封入体を有し、かつ上位、下位運動ニューロンの脱落を認め、臨床的には孤発例で、運動障害で発症もしくは認知症発症から 1 年以内に運動障害を呈した症例群である. 他の変性疾患の合併が認められた 4 例 (アルツハイマー病 2 例、進行性核上性麻痺 1 例、多系統萎縮症 1 例) および十分な病理検索が困難であった 26

例を除き，96例を対象とした．

### 組織学的解析

運動野皮質，前頭葉皮質，側頭葉皮質，海馬，大脳基底核，舌下神経核，頸髄および腰髄前

角を含むホルマリン固定，パラフィン包埋ブロックから，4  $\mu\text{m}$  厚の切片を作製した．

hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い，各部位について，神経細胞脱落の程度を半定量的に

4段階で評価した (0, なし; 1, 軽度; 2, 中等度; 3, 重度)．また，前頭側頭葉の萎縮または同

部位の神経細胞脱落とグリオシスを認める場合に，前頭側頭葉変性症を有すると判断した．

### 免疫組織化学及び免疫蛍光二重染色

前頭葉，側頭葉，運動野，および大脳基底核の切片について，一次抗体としてモノクローナ

ル抗 pTDP-43 抗体 (phospho Ser409/410; Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan; 1:5000) を用いて

免疫組織化学を行った．さらに一部の症例では，リン酸化の有無に関わらず TDP-43 を認識

するポリクローナル抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech Group Inc., Chicago, IL; 1:4000) を追加した．

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．また，大脳基底核を含む切片について免疫蛍光二重染色を行った．一次

抗体としてポリクローナル抗 pTDP-43 抗体 (phospho Ser409/410; Cosmo Bio Co., Ltd.; 1:2000)

とモノクローナル抗非リン酸化 neurofilament 抗体 (SMI-32; Calbiochem, San Diego, CA;

1:500), もしくはモノクローナル抗 synaptophysin 抗体 (Leica Biosystems; Newcastle-upon-Tyne,

UK; 1:50) の組み合わせで使用し，二次抗体には Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 抗体と

Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR; 1:1000) を用いた。核を 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で標識した。共焦点画像撮影にはレーザ走査型顕微鏡 (LSM700; Carl Zeiss Co., Ltd.) を用いた。

### 統計学的解析

3 群間の臨床像および組織像の比較には、Kruskal-Wallis 検定と Steel-Dwass 検定を、また罹病期間の比較には Kaplan-Meier 法と log-rank 検定を用いた。比率の検定には、Fisher の正確検定および Bonferroni 補正による多重比較検定あるいは Ryan の多重比較検定を用いた。解析は GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA), SPSS Statistics version 12.0 (IBM, Armonk, NY) および R version 3.1.2 (<http://www.r-project.org/>) で行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

### 生化学的解析

凍結患者脳の前頭葉皮質より Hasegawa らの既報[18][19]に従いサルコシル不溶性画分を調整し、それを電気泳動し、モノクローナル抗 pTDP-43 抗体 (1:2000) を用いたイムノブロット解析を行い、pTDP-43 の C 末端側断片のバンドパターンを検討した。

## III. 結果

### pTDP-43 陽性の脳皮質組織像による分類

我々はこれまでのリン酸化非特異的な抗 TDP-43 抗体を用いた研究により、孤発性 ALS が

TDP-43 陽性構造物の広がり異なる type 1 と type 2 に分類されること、そして、その 2 群は海馬歯状回顆粒細胞における TDP-43 陽性 NCIs の有無でほぼ分けられることを報告した [17]. これを踏まえて、本研究では、対象となる 96 例をまず海馬歯状回顆粒細胞における pTDP-43 陽性 NCIs を認めない type 1 (n = 63) と認める type 2 (n = 33) とに分類した (図 1). さらに、type 2 群の症例の中には、側頭葉新皮質に無数の顆粒状もしくは点状 DNs が見られる症例とそれをほとんど見ない症例が存在した. そのため、側頭葉新皮質における DNs の出現の多寡により、type 2 群を sparse DNs 群 (n = 22) と abundant DNs 群 (n = 11) に分類した (図 1, 図 2). type 1 群については側頭葉新皮質に DNs を認める症例はなかったため同様の分類は不能であった. この 3 群 (type 1 群, type 2/sparse DNs 群, type 2/abundant DNs 群) について、臨床病理学的に比較検討を行った.

### 臨床的特徴

3 群における臨床的特徴を表 1 に示した. 3 群間で性別と死因には有意差を認めなかった. 一方、type 2/abundant DNs 群の発症年齢は type 1 群に比し有意に高く ( $P = 0.024$ ), 同群の罹病期間は、type 1 群 ( $P < 0.0001$ ) および type 2/sparse DNs 群 ( $P = 0.003$ ) に比し有意に短かった. 初発症状は type 1 では他の 2 群に比べ、四肢の症状で発症した割合が高かった. 経過中に認知症を呈した例は、type 1 群では 62 例中 1 例と、type 2/sparse DNs 群 ( $P < 0.001$ ) および type 2/abundant DNs 群 ( $P < 0.00001$ ) に比し明らかに少なかった.

### 組織学的特徴



組織学的特徴を表 2 に示した。運動野皮質における神経細胞脱落の程度は、3 群間で有意差を認めなかった。一方、頸髄および腰髄の前角細胞と舌下神経核における神経細胞脱落の程度は、type 2/abundant DNs 群で type 1 群 ( $P < 0.001$  および  $P = 0.001$ ) と type 2/sparse DNs 群 ( $P = 0.018$  および  $P = 0.022$ ) におけるそれに比し軽度であった。組織学的に前頭側頭葉変性症を合併している割合は、type 1 群では 10%のみであり、type 2/sparse DNs 群 (41%,  $P < 0.001$ ), type 2/abundant DNs 群 (64%,  $P < 0.0001$ ) のそれに比し有意に低かった。また、運動野と側頭葉皮質を比較すると、type 2 の 2 亜群では、それぞれ約半数の症例で運動野皮質に比し、側頭葉皮質における pTDP-43 陽性 NCIs の出現が多かった。

#### 新線条体および淡蒼球における pTDP-43 陽性変性神経突起像

大脳基底核の切片では、type 2/abundant DNs 群の 82%の症例で、線条体と淡蒼球に顆粒状あるいは点状の pTDP-43 陽性 DNs が観察された (表 2, 図 3A-D)。この所見は、type 1 群では 2%, type 2/sparse DNs 群では 9%にしか認められず、本群に特徴的な所見と考えられた。抗 pTDP-43 抗体と抗 SMI-32 抗体、および、抗 pTDP-43 抗体とシナプス前終末のマーカーである抗 synaptophysin 抗体による免疫蛍光二重染色では、pTDP-43 陽性 DNs の分布は、synaptophysin の分布に類似し、近接しているものの共局在はまれであり (図 3E-G), SMI-32 で標識される樹状突起に沿っていた (図 3H-J)。これらの所見から、pTDP-43 陽性 DNs は樹状突起棘への蓄積であることが示唆された。

#### 生化学的解析

サルコシル不溶性画分の抗 pTDP-43 抗体によるイムノブロット解析の結果を図 4 に示した。20-kDa 付近にみられる C 末端側断片のバンドに注目すると、今回イムノブロット解析を行ったすべての症例において、既報の FTLD-TDP Type B と同様のバンドパターンを示しており、各群間でのバンドパターンの違いは明らかでなかった。

#### IV. 考察

本研究では、孤発性 ALS 連続剖検例 96 例を対象として、大脳における pTDP-43 陽性構造物の分布と形態を検討し、その結果、対象例を 3 群に分類した (図 1)。まず、海馬歯状回における pTDP-43 陽性 NCIs の有無により、NCIs が主に運動系に限局して見られる type 1 群と大脳に広範に分布する type 2 群に分類した。さらに type 2 群には側頭葉皮質に NCIs に加えて多数の顆粒状や点状の DNs が見られる症例と、そうした DNs がほとんど見られない症例があったことから、type 2 群を DNs の多寡によりそれぞれ type 2/abundant DNs 群と type 2/sparse DNs 群に分類した。興味深いことに、type 1, type 2/sparse DNs, そして type 2/abundant DNs 群の 3 群間で比較検討を行ったところ、各群はいくつかの臨床病理学的に異なる特徴を示していることが明らかになった (表 1, 2)。

本研究における type 2/sparse DNs 群の pTDP-43 陽性の皮質組織像は、Mackenzie らの提唱した FTLD-TDP における TDP 組織像分類の Type B に合致するものであった[16]。一方で、type 2/abundant DNs 群のそれは、無数の顆粒状、点状の DNs の出現により特徴づけられ (図 2)、前述の FTLD-TDP の分類における Type A と類似する点もあるが、DNs の大部分が非常に小さく点状であることから同一ではないと考える。さらに、FTLD-TDP においては、

免疫ブロット法による pTDP-43 の C 末端側断片のバンドパターンが組織分類のタイプごとに異なることが示されているのに対し[20], type 2/sparse DNs 群と type 2/abundant DNs 群におけるそれに明らかな相違はなく, FTLD-TDP の Type B におけるバンドパターン[20]と同様であった (図 4). これは, 我々の自験例で, Type A の組織像を有し, 生化学的にも FTLD-TDP Type A と同様のバンドパターンを呈した primary lateral sclerosis 2 症例[19]とは対照的である. したがって, 本研究における type 2/abundant DNs 群は, これまで提唱されている, FTLD-U あるいは FTLD-TDP の組織分類で見られる像とは一線を画すものと考えた.

pTDP-43 陽性組織像と臨床像との関連については, 我々がこれまでに示してきたとおり[17], 認知症の合併は type 1 群ではきわめてまれであることが確認された. すなわち, 孤発性 ALS 患者に認知症を認めた場合, 病理学的には大脳に広範に pTDP-43 の蓄積を示す type 2 群であることが強く示唆される. さらには, ALS の疾患スペクトラムの中では少数派である type 2/abundant DNs 群は, 高齢発症で, 球麻痺で発症することが多く, 他の 2 群に比し生命予後が悪いといった臨床的特徴を有する一群であることが示された (表 1). 一方, 病理学的には, この群では下位運動ニューロンの脱落の程度が軽く, 新線条体や淡蒼球において無数の顆粒状あるいは点状の pTDP-43 陽性構造を高率に認めることが特徴であった (表 2). この顆粒状, 点状構造物は, 抗 pTDP-43 抗体と樹状突起あるいはシナプス前終末を標識する抗体を用いた免疫蛍光二重染色の結果から, 神経細胞の樹状突起棘における pTDP-43 の蓄積であることが示唆され (図 3E-J), 大脳皮質で観察される DNs についてもこれらと類似の形態を示すことから, 同様の局在が推測された.

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。加えて、近年の研究により、樹状突起および樹状突起棘における TDP-43 の役割も明らかにされつつある[21][22][23]。培養神経細胞での観察では、TDP-43 は主に RNA 顆粒の形で樹状突起に局在しており、神経活動に伴い TDP-43 含有顆粒が樹状突起棘へ輸送されることが確認されている。このことから TDP-43 は神経活動に応じ、シナプスの可塑性を制御している因子ではないかと提唱されている[21]。さらに、TDP-43 の病的変異を導入することにより、神経樹状突起分枝での RNA 顆粒の動態が変化し、神経活動に対する TDP-43 の反応が減じたり遅延することも報告されている[23]。これらの知見から、type 2/abundant DNs 症例の脳皮質や新線条体、淡蒼球では、病的タンパクである pTDP-43 が神経樹状突起棘に蓄積することでシナプス可塑性が減じ、このことが他の 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、同群の生命予後が不良であることの一因となっているのではないかと推測される。

我々は、本研究で示された孤発性 ALS の 3 群は互いに独立した病態であると考えている。これまで我々は、TDP-43 陽性 NCI の分布による type 1 群および type 2 群の別に人工呼吸管理による長期生存が影響しないこと[17]、また、人工呼吸器を装着せずに発症後 10 以上生存した 6 症例中 5 症例が、type 1 群の TDP-43 組織像を呈していたことを報告してきた[24]。さらに、今回、type 2/abundant DNs 群の罹病期間が他の 2 群より短いという事実は、同群の病理像が type 1 群や type 2/sparse DNs 群の患者が長期生存したことにより生じたものではないことを示している。すなわち、疾患の進行により type 1 から type 2 へ、あるいは type 2/sparse DNs から type 2/abundant DNs へ移行しているとは考え難いのである。

## V. 結語

本研究により孤発性 ALS の大脳皮質における pTDP-43 陽性組織像は多様であることが示された。対象例は pTDP-43 陽性像の広がり，および DNs の多寡により type 1 群，type 2/sparse DNs 群，type 2/abundant DNs 群の 3 群に分類が可能であり，各群はそれぞれ特徴的な臨床像や病理像を有していた。臨床的にも多様である孤発性 ALS において，異常リン酸化 TDP-43 蓄積像の多様性を知り，それに基づいて適切に評価，分類することは孤発性 ALS の病態を理解し，将来の治療や予防につなげるために重要であると考えられた。

## 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神経内科学分野の西澤正豊先生，同病理学分野の高橋均先生，柿田明美先生，他田真理先生，同脳疾患リソース研究部門分子神経疾患資源解析学分野の小野寺理先生，志賀篤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) Leigh PN, Anderton BH, Dodson A, Gallo J-M, Swash M, Power DM: Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neurosci Lett* 93: 197–203, 1988.
- 4) 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.
- 5) 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.

- 6) Okamoto K, Hirai S, Yamazaki T, Sun X, Nakazato Y: New ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in the extra-motor cortices in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 129: 233–236, 1991.
- 7) Nakano I: Frontotemporal dementia with motor neuron disease (amyotrophic lateral sclerosis with dementia). *Neuropathology* 20: 68-75, 2000.
- 8) Mackenzie IRA, Feldman HH: Ubiquitin immunohistochemistry suggests classic motor neuron disease, motor neuron disease with dementia, and frontotemporal dementia of the motor neuron disease type represent a clinicopathologic spectrum. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 730-739, 2005.
- 9) McKhann GM: Clinical and Pathological Diagnosis of Frontotemporal Dementia. *Arch Neurol* 58: 1803, 2001.
- 10) 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.

- 11) 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.
- 12) Geser F, Martinez-Lage M, Kwong LK, Lee VM-Y, Trojanowski JQ: Amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia and beyond: the TDP-43 diseases. *J Neurol* 256: 1205-1214, 2009.
- 13) Geser F, Lee VM-Y, Trojanowski JQ: Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: a spectrum of TDP-43 proteinopathies. *Neuropathology* 30: 103-112, 2010.
- 14) Sampathu DM, Neumann M, Kwong LK, Chou TT, Micsenyi M, Truax A, Bruce J, Grossman M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y: Pathological heterogeneity of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions delineated by ubiquitin immunohistochemistry and novel monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 169: 1343-1352, 2006.
- 15) Mackenzie IRA, Baborie A, Pickering-Brown S, Du Plessis D, Jaros E, Perry RH, Neary D, Snowden JS, Mann DMA: Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar



- degeneration: classification and relation to clinical phenotype. *Acta Neuropathol* 112: 539-549, 2006.
- 16) Mackenzie IRA, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, Perry RH, Trojanowski JQ, Mann DMA, Lee VMY: A harmonized classification system for FTL-D-TDP pathology. *Acta Neuropathol* 122: 111-113, 2011.
- 17) 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.
- 18) Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H: Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64: 60-70, 2008.
- 19) 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* 32: 373-384, 2012.
- 20) Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A: Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135: 3380-3391, 2012.
- 21) Wang I-F, Wu L-S, Chang H-Y, Shen C-KJ: TDP-43, the signature protein of FTL-D, is a neuronal activity-responsive factor. *J Neurochem* 105: 797-806, 2008.
- 22) Dammer EB, Fallini C, Gozal YM, Duong DM, Rossoll W, Xu P, Lah JJ, Levey AI, Peng J, Bassell GJ, Seyfried NT: Coaggregation of RNA-binding proteins in a model of TDP-43 proteinopathy with selective RGG motif methylation and a role for RRM1 ubiquitination. *PLoS One* 7: e38658, 2012.
- 23) Liu-Yesucevitz L, Lin AY, Ebata A, Boon JY, Reid W, Xu Y-F, Kobrin K, Murphy GJ, Petrucelli L, Wolozin B: ALS-linked mutations enlarge TDP-43-enriched neuronal RNA granules in the dendritic arbor. *J Neurosci* 34: 4167-4174, 2014.

- 24) Nishihira Y, Tan CF, Hoshi Y, Iwanaga K, Yamada M, Kawachi I, Tsujihata M, Hozumi I, Morita T, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H: Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration is associated with relatively mild TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* 117: 45-53, 2009.

## 図表説明文

### 図 1. pTDP-43 陽性組織像による孤発性 ALS の分類過程

孤発性 ALS 症例 96 例の側頭葉皮質におけるリン酸化 TDP-43 (phosphorylated TDP-43: pTDP-43) 陽性像による分類過程を示す。

### 図 2. ALS type 2 群の側頭葉新皮質における代表的な pTDP-43 陽性組織像

側頭葉新皮質において, type 2/sparse DN 群では陽性構造物のほとんどが神経細胞細胞質内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusions: NCIs) であり, 変性神経突起 (dystrophic neurites: DN) はあってもわずかである (A: NCIs が多い例, B: NCIs が少ない例). 一方, type 2/abundant DN 群では顆粒状, 点状あるいは糸屑状の DN を多数認める (C: NCIs が多い例, D: NCIs が少ない例). 両群ともに, NCIs の出現量は様々である. A-D: 抗 pTDP-43 抗体による免疫組織化学. Bar 20  $\mu\text{m}$ .

### 図 3. 新線条体と淡蒼球における pTDP-43 陽性神経突起像

ALS type 2/abundant DN 群症例の脳基底核における pTDP-43 免疫組織化学のルーペ像 (A), 被殻 (B), 淡蒼球外節 (C), および内節 (D) の強拡大では, 顆粒状あるいは点状の構造を無数に認める. 淡蒼球における免疫蛍光二重染色像 (E-J): pTDP-43 陽性点状構造 (E: green) は, synaptophysin の陽性像 (F: red) に近接して分布しているが共局在 (G: merged) はまれである. これら pTDP-43 陽性像 (H: green) は SMI-32 (I: red) で標識される樹状突起に沿って認められる (J: merged). Bars A 500  $\mu\text{m}$ ; B-D 20  $\mu\text{m}$ ; E-J 10  $\mu\text{m}$ . GPe = external segment of globus

pallidus; GPi = internal segment of globus pallidus.

#### 図 4. サルコシル不溶性画分の pTDP-43 イムノプロット解析

患者凍結脳から調整したサルコシル不溶性画分の、抗 pTDP-43 抗体を用いたイムノプロット解析. FTLD-TDP *Type A*, *Type B*, *Type C* に属する症例はそれぞれタイプごとに異なるバンドパターンを示している (各タイプにつき 2 症例ずつ; 上段). ALS type 2/sparse DNs 群と type 2/abundant DNs 群の症例では (各群につき 4 症例ずつ; 下段), 24-kDa および 23-kDa に出現する C 末端側断片のバンドパターンに明らかな違いは見られず, いずれも FTLD-TDP *Type B* 症例におけるバンドパターンと類似し, *Type A* とは異なっている.

#### 表 1. 孤発性 ALS の 3 群の臨床像

ALS = amyotrophic lateral sclerosis.

<sup>1)</sup>中央値 (範囲). <sup>2)</sup>3 例で, 運動症状より先に認知症や性格変化を認めた. このうち type 2/sparse DNs 群の 1 例では, 発症後 7 か月で運動症状が出現し, その他の 2 例では, 発症後 1 か月以内に運動症状を認めた. <sup>3)</sup>感染症, 消化管出血, 突然死. <sup>4)</sup>3 群間の有意差検定における *P* 値.

\**P* = 0.024 vs. type 1 群 (Kruskal-Wallis 検定および post-hoc Steel-Dwass 検定), \*\**P* < 0.0001 vs. type 1 群, *P* = 0.003 vs. type 2/sparse DNs 群 (Kaplan-Meier 法および log-rank 検定), \*\*\**P* < 0.0001 vs. type 2/sparse DNs 群, *P* < 0.01 vs. type 2/abundant DNs 群 (Fisher の正確検定および Bonferroni 補正による多重比較検定), \*\*\*\**P* < 0.001 vs. type 2/sparse DNs 群, *P* < 0.00001 vs. type 2/abundant DNs 群 (Fisher の正確検定および Ryan の多重比較検定).

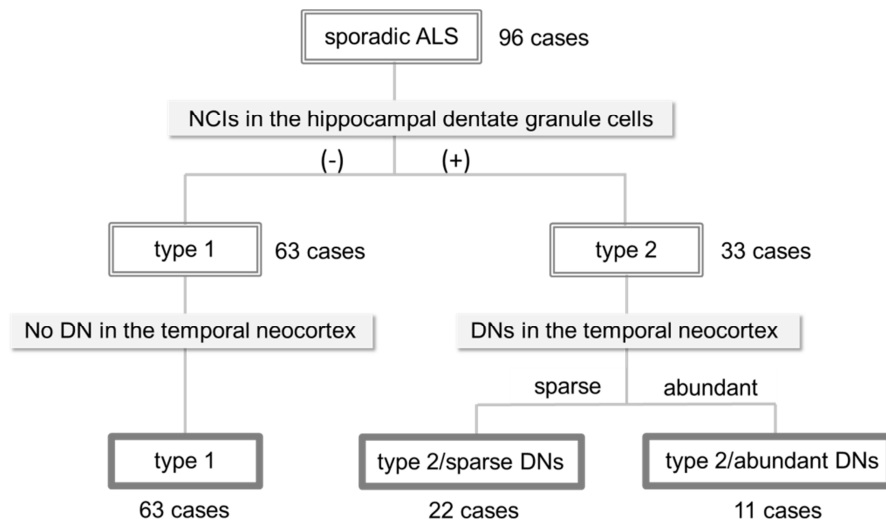
**表 2. 孤発性 ALS の 3 群の病理組織像とリン酸化 TDP-43 陽性所見**

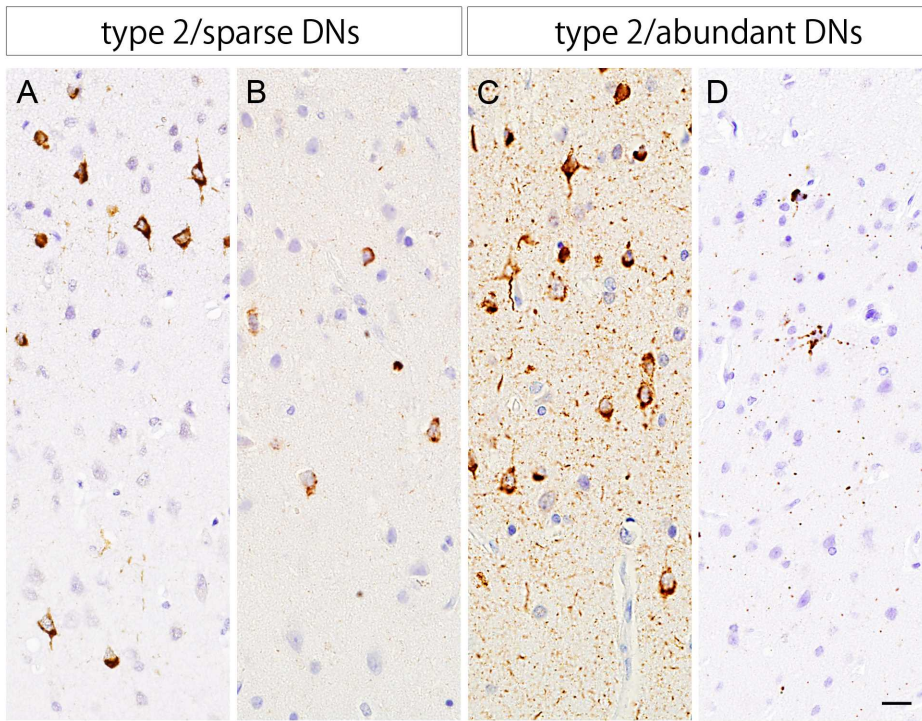
ALS = amyotrophic lateral sclerosis, pTDP-43 = phosphorylated TDP-43, DN = dystrophic neurites,

NA = non-applicable.

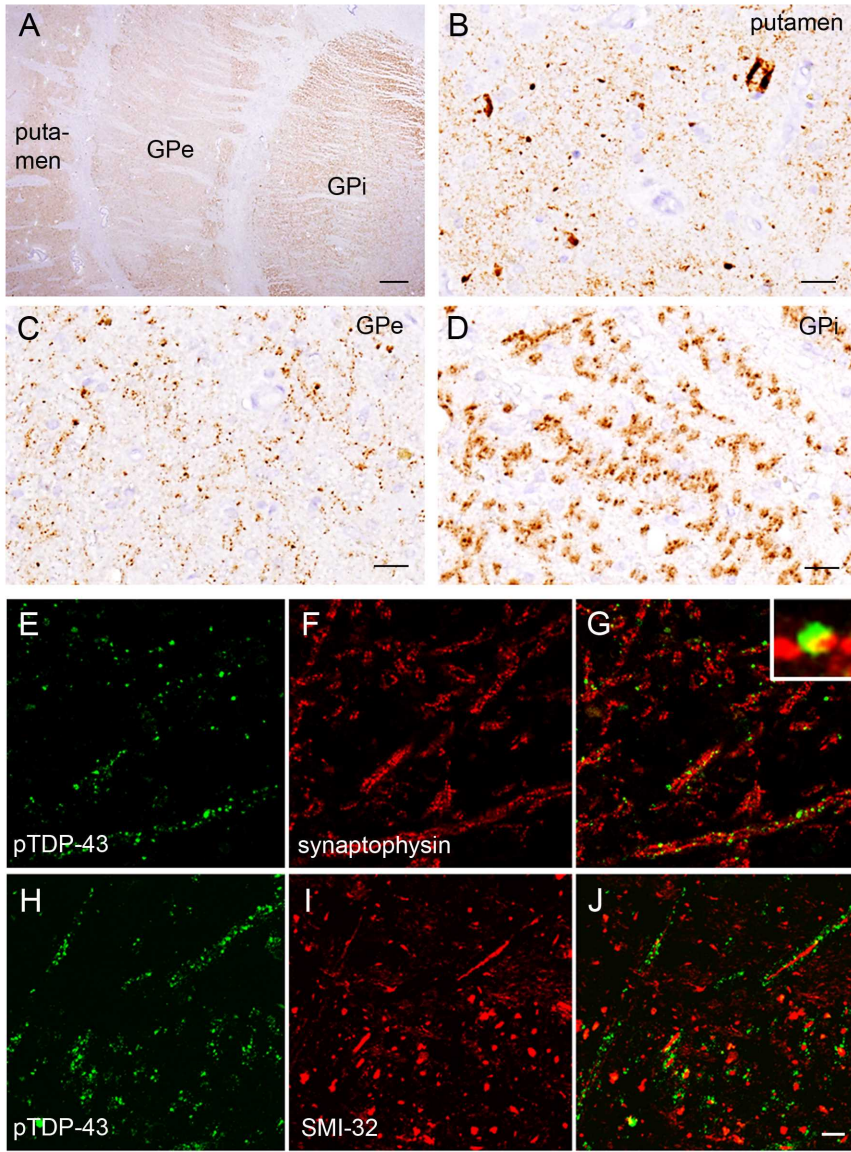
<sup>1)</sup>0 = なし, 1 = 軽度, 2 = 中等度, 3 = 重度. 平均値±標準偏差. <sup>2)</sup>3 群間の有意差検定における *P* 値.

\**P* < 0.001 vs. type 1 群, *P* = 0.018 vs. type 2/sparse DNs 群, \*\**P* = 0.001 vs. type 1 群, *P* = 0.022 vs. type 2/sparse DNs 群 (Kruskal-Wallis 検定および post-hoc Steel-Dwass 検定), \*\*\**P* < 0.001 vs. type 2/sparse DNs 群, *P* < 0.0001 vs. type 2/abundant DNs 群 (Fisher の正確検定および Ryan の多重比較検定), \*\*\*\**P* < 0.00001 vs. type 1 群, *P* < 0.0001 vs. type 2/sparse DNs 群 (Fisher の正確検定および Ryan の多重比較検定).









Type control (FTLD-TDP)

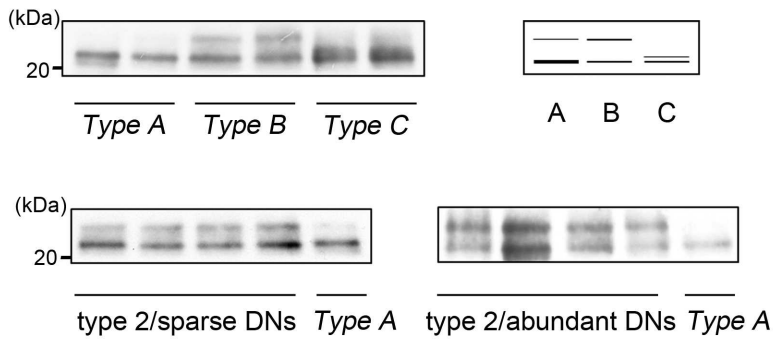


表 1. 孤発性 ALS の 3 群の臨床像

	全症例 (n = 96)	type 1 (n = 63)	type 2 /sparse DNs (n = 22)	type 2 /abundant DNs (n = 11)	P 値 <sup>4)</sup>
性別(男:女)	58 : 38	38 : 25	13 : 9	7 : 4	0.968
発症年齢 <sup>1)</sup> (歳)	64.5 (32-86)	62.0 (32-86)	65.5 (50-79)	72.0* (59-82)	0.023
罹病期間 <sup>1)</sup> (月)	22 (6-204)	33 (7-204)	20 (6-64)	12** (9-24)	<0.0001
初発症状					<0.0001
四肢	61	50*** (79%)	7 (32%)	4 (36%)	
球	32	13 (21%)	13 (59%)	6 (55%)	
その他 <sup>2)</sup>	3	0	2 (9%)	1 (9%)	
認知症合併	15	1**** (2%)	7 (32%)	7 (64%)	<0.0001
死因					0.793
呼吸不全	67	45 (71%)	14 (64%)	8 (73%)	
その他 <sup>3)</sup>	29	18 (29%)	8 (36%)	3 (27%)	

ALS = amyotrophic lateral sclerosis.

<sup>1)</sup>中央値 (範囲). <sup>2)</sup>3 例で, 運動症状より先に認知症や性格変化を認めた. このうち type 2/sparse DNs 群の 1 例では, 発症後 7 か月で運動症状が出現し, その他の 2 例では, 発症後 1 か月以内に運動症状を認めた. <sup>3)</sup>感染症, 消化管出血, 突然死. <sup>4)</sup>3 群間の有意差検定における P 値.

\* $P = 0.024$  vs. type 1 群 (Kruskal-Wallis 検定および post-hoc Steel-Dwass 検定), \*\* $P < 0.0001$  vs. type 1 群,  $P = 0.003$  vs. type 2/sparse DNs 群 (Kaplan-Meier 法および log-rank 検定), \*\*\* $P < 0.0001$  vs. type 2/sparse DNs 群,  $P < 0.01$  vs. type 2/abundant DNs 群 (Fisher の正確検定および Bonferroni 補正による多重比較検定), \*\*\*\* $P < 0.001$  vs. type 2/sparse DNs 群,  $P < 0.00001$  vs. type 2/abundant DNs 群 (Fisher の正確検定および Ryan の多重比較検定).

表 2. 孤発性 ALS の 3 群の病理組織像とリン酸化 TDP-43 陽性所見

	type 1 (n = 63)	type 2 /sparse DNs (n = 22)	type 2 /abundant DNs (n = 11)	P 値 <sup>2)</sup>
<b>神経細胞脱落<sup>1)</sup></b>				
運動野皮質	2.1 ± 0.7	2.1 ± 0.7	2.5 ± 0.7	0.073
脊髄前角 (頸・腰髄)	2.2 ± 0.5	2.1 ± 0.6	1.5 ± 0.4*	0.002
舌下神経核	2.3 ± 0.7	2.1 ± 0.7	1.4 ± 0.5**	<0.001
前頭側頭葉変性症	6 (10%)***	9 (41%)	7 (64%)	<0.0001
<b>pTDP-43 陽性組織像</b>				
側頭葉優位 > 運動野	NA	13 (59%)	5 (45%)	NA
新線条体と淡蒼球の DNs	1 (2%)	2 (9%)	9 (82%)****	<0.0001

ALS = amyotrophic lateral sclerosis, pTDP-43 = phosphorylated TDP-43, DN = dystrophic neurites, NA = non-applicable.

<sup>1)</sup>0 = なし, 1 = 軽度, 2 = 中等度, 3 = 重度. 平均値 ± 標準偏差. <sup>2)</sup>3 群間の有意差検定における P 値.

\* $P < 0.001$  vs. type 1 群,  $P = 0.018$  vs. type 2/sparse DNs 群, \*\* $P = 0.001$  vs. type 1 群,  $P = 0.022$  vs. type 2/sparse DNs 群 (Kruskal-Wallis 検定および post-hoc Steel-Dwass 検定), \*\*\* $P < 0.001$  vs. type 2/sparse DNs 群,  $P < 0.0001$  vs. type 2/abundant DNs 群 (Fisher の正確検定および Ryan の多重比較検定), \*\*\*\* $P < 0.00001$  vs. type 1 群,  $P < 0.0001$  vs. type 2/sparse DNs 群 (Fisher の正確検定および Ryan の多重比較検定).