

学 位 論 文 要 旨

氏 名 川 浪 文



論 文 題 目

「Clinicopathological examination of optineurin-immunoreactive
inclusions in patients with sporadic ALS」

(孤発性 ALS 剖検脊髄における Optineurin 陽性封入体の臨床病理学的検討)

指 導 教 授 承 認 印

西山 和利



Clinicopathological examination of optineurin-immunoreactive inclusions in patients with sporadic ALS

(孤発性 ALS 剖検脊髄における Optineurin 陽性封入体の臨床 病理学的検討)

氏 名 川 浪 文

<イントロダクション>

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; 以下 ALS) は慢性進行性に全身の運動ニューロンが障害される神経難病である。四肢筋力低下、球麻痺、呼吸筋麻痺を来し、発症から 3-5 年以内に死亡する。原因の解明は未だ不十分であり、根治療法はない。ALS の約 10% が家族性発症といわれている。家族性 ALS の 20-30% に *SOD1* 遺伝子変異がみられ、*TDP-43*、*FUS*、*optineurin (OPTN)*、*C9ORF72* といった家族性 ALS の原因遺伝子が報告されている。

孤発性 ALS の病理所見として、脊髄前角細胞内にグニナ小体とユビキチン陽性封入体が見られることが知られている。2006 年にユビキチン陽性封入体の主な構成成分が TDP-43 であることが分かり、ALS 病態理解の大きな発展がみられた。

2010 年、家族性 ALS の原因遺伝子の一つとして *OPTN* 遺伝子変異が報告された (Maruyama 2010)。*OPTN* 変異 ALS は常染色体優性遺伝・劣性遺伝のどちらでも発症すると考えられ、孤発例でも変異が見つかった。本邦において、家族性 ALS の 3.4%、孤発性 ALS の 0.23% が *OPTN* 変異をもつと報告されており、*SOD-1* 変異や *FUS* 変異に比べ、その頻度は低い。*OPTN* は 577 アミノ酸から構成される蛋白である。複数のロイシンジッパーや、C 末端付近にユビキチン結合部位を含む coiled-coil 構造をとっている。*OPTN* は原発性開放隅角緑内障 (POAG) の原因遺伝子としても知られているが、*OPTN* 変異による細胞障害機序は、gain of toxic function とともに loss of function とも言われている。

OPTN 変異を持つ家族性 ALS 患者の病理において、明らかな *OPTN* 陽性封入体は証明されていない。しかし、孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンに *OPTN* 陽性封入体が見られること、凝集体中で *OPTN* が *SOD-1*、*TDP-43*、ユビキチンといった ALS の関連蛋白と共存するという点から、*OPTN* が孤発性・家族性 ALS の病態生理に広く関わっている可能性が示唆された (Maruyama 2010)。しかし、後続の研究では孤発性 ALS における脊髄 *OPTN* 陽性封入体の出現頻度や、*SOD-1* や *TDP-43* との共存性についての定説はない。

本研究では、*OPTN* 陽性封入体に注目し、孤発性 ALS 患者の臨床情報、病理像を比較し、ALS の病態への関連性について考察した。

<方法>

(1) 脳、脊髄組織の収集

1999年から2011年の間に北里大学東病院神経内科でALSと診断され、同院病理部で剖検を受けたALS患者を研究対象とした。家族歴のあるALS症例は研究対象から除外した。臨床経過に関する情報は病歴から収集した。経過中に認知機能低下の記載があった症例はALS-Dと考えた。

正常対照（コントロール）は、ALS以外の神経疾患、7症例を用いた。

(2) 組織学的手技

孤発性ALSとコントロール症例から採取した海馬、頸膨大、腰膨大を、10%ホルマリン溶液中で固定し、パラフィン包埋後、薄切切片を作成した。切片はH&E染色と免疫染色を行った。免疫染色用の一次抗体は、ウサギ抗OPTN抗体、ウサギ抗TDP-43(403/404)リン酸化抗体、ウサギ抗TARDBP抗体、ウサギ抗ユビキチン抗体を用いた。DAB染色で可視化させた。

(3) 評価方法

脊髄前角にある長径 $>30\mu\text{m}$ の細胞を運動ニューロンと定義し、H&E染色切片で運動ニューロンの数を数えた。次にOPTN染色を行った近隣の切片で、OPTN陽性封入体を持つ細胞を数えた。運動ニューロン数に対して、OPTN陽性封入体をもつ細胞が $>30\%$ の場合にOPTN(++), 10-30%ならOPTN(+), $<10\%$ ならOPTN(-), と判定した。さらに、頸髄または腰髄のうちどちらかがOPTN(++)であった孤発性ALSをグループA、頸髄、腰髄切片ともにOPTN(-)であった孤発性ALSをグループC、それ以外の孤発性ALSをグループBに分類した。

TDP-43染色を行った近隣の切片を、TDP-43陽性封入体が多い切片をTDP(++), 中等度の切片をTDP(+), 認められなかった切片をTDP(-)とした。

海馬歯状回顆粒細胞内のOPTN陽性封入体、TDP-43陽性封入体の有無を、(+)(-)で判定した。

(4) 統計処理

コントロールと孤発性ALSの各グループ間におけるデータの比較は一元配置分散分析(ANOVA)で検討した。SPSS15.0Jのソフトを用いた。有意差は $p<0.05$ とした。

<結果>

(1) 孤発性ALSの臨床所見

孤発性ALS 28例の臨床所見を検討した。ALS-Dは7例含まれていた。7例のコントロールの内訳は、重症筋無力症2例、筋ジストロフィー症1例、パーキンソン病1例、家族性パーキンソン病3例であった。＜方法-(3)＞で述べた方法で孤発性ALSを3グループに分けたところ、グループAが8例、グループBが10例、グループCが10例となった。孤発性ALSにおける平均発症年齢は 63 ± 8.5 歳、平均死亡年齢は 65 ± 8.7 歳、平均罹病期間は 28 ± 12 か月であり、3グループ間で有意差はみられなかった。初発症状を比較すると、球麻痺や四肢麻痺発症はどのグループでも見られたが、体重減少で発症した4症例は全例がグループCであった。さらに、グループCではALS-Dが10例中5例とグループA, Bに比べて高率にみられた。

(2) 孤発性ALSの脊髄における運動ニューロン

孤発性ALSの頸髄26例、腰髄25例、およびコントロールの頸髄6例、腰髄5例について組織入手が可能であった。頸髄の運動ニューロン数は孤発性ALSで 19 ± 15.1 /切片、コント

コントロールで 56 ± 22.2 /切片と、孤発性 ALS で著明に減少していた。頸髄の運動ニューロンはコントロールと比較して、グループ A、B で著明に減少していた ($p < 0.05$)。腰髄の運動ニューロンは孤発性 ALS で 50 ± 20.8 /切片、コントロールで 68 ± 14.4 /切片であった。しかし、いずれのグループもコントロールと比較して、有意な細胞数の減少はみられなかった。脊髄 OPTN 陽性封入体は、孤発性 ALS の脊髄において (+) から (++) 認められ、陽性率は 64.3% であった。脊髄前角の神経線維とスフェロイドも強い OPTN 免疫染色性を示した。

脊髄 TDP-43 陽性封入体が (+) から (++) 認められた症例は、孤発性 ALS の 96.4% であった。脊髄 TDP-43 陽性封入体の出現頻度はグループ A、B で高く、グループ C でやや低い傾向が認められた。

連続切片による解析では、OPTN 陽性封入体の 80% 以上が TDP-43 染色に陽性を示した。OPTN と TDP-43 陽性封入体の一部はユビキチン染色にも陽性を示したが、陰性を示す封入体もみられた。

(3) 孤発性 ALS の海馬歯状回顆粒細胞

孤発性 ALS の海馬 25 例、コントロールの海馬 7 例において組織の入手が可能であった。OPTN 染色と TDP-43 染色を行って検討した。孤発性 ALS 25 例中 14 例 (28%) で海馬歯状回顆粒細胞に OPTN 陽性封入体が認められた。海馬歯状回顆粒細胞に OPTN 陽性封入体をもつ 7 例中 2 例 (28.6%) が ALS-D であった。反対に、ALS-D 7 例中 2 例 (28.7%) に海馬歯状回顆粒細胞の OPTN 陽性封入体が認められた。

一方、TDP-43 陽性封入体が海馬歯状回顆粒細胞に見られた孤発性 ALS は 25 例中 14 例 (56%) であった。海馬歯状回顆粒細胞に TDP-43 陽性封入体をもつ 14 例中 6 例 (42.8%) が ALS-D であった。ALS-D 7 人中 6 人 (85.7%) と高率に海馬歯状回顆粒細胞に TDP-43 陽性封入体が認められた。

< 考察 >

孤発性 ALS の OPTN 病理についてはこれまでに 2 つの報告がある。孤発性 ALS 症例では 100% で OPTN 陽性封入体が認められた (Deng 2011)、というものと、約 30% の症例にしか認められず、稀な所見である (Hortobagyi 2011) というものである。本研究では、孤発性 ALS の 64.3% に脊髄 OPTN 陽性封入体を認め、比較的頻度の高い所見と考えられた。脊髄運動ニューロンの数は、OPTN 陽性封入体の多かったグループ A、B で減少している傾向が見られたため、OPTN 陽性封入体を多く認める脊髄組織は障害が強い傾向があると考えられた。つまり、OPTN は孤発性 ALS の病態機序に関与している可能性がある。

既存の報告によると非運動領野 (基底核や海馬) のユビキチン陽性封入体や TDP-43 陽性封入体は ALS-D と関連していることが示唆されている (Piao 2003, Nishihira 2008)。いままでに OPTN 陽性封入体と認知症の関連性についての明らかな傾向は指摘されていない。本研究では、脊髄 OPTN 陽性封入体が陰性であった孤発性 ALS のグループでは高頻度に認知症を合併し、体重減少での発症例が多く含まれていた。OPTN 陽性封入体と臨床データに相関の傾向がみられると考えた。しかし、ALS-D で海馬歯状回顆粒細胞に OPTN 陽性封入体が認められたのはわずか 28.6% で、ALS-D のごく一部のみであった。よって、海馬歯状回顆粒細胞の OPTN 陽性封入体と ALS-D の関連性は高くはないと考えられた。これに対し、我々の ALS-D 症例において、海馬歯状回顆粒細胞に TDP-43 陽性封入体が認められたのは 85.7% と、より高率であった。海馬歯状回顆粒細胞の TDP-43 陽性封入体は、脊髄に OPTN 陽性封入体をもたない孤発性 ALS グループに多く認められた。Nishihira らは、孤発性 ALS を 2 つのタイプに分類した。タイプ 1 は前頭葉や海馬の TDP-43 陽性封入体を持ち、ALS-D との関連性がみられる広汎型 ALS である。タイプ 2 は、大脳皮質の運動野や、脊髄運動ニューロンに TDP-43 陽性封入体が限局し、長期

人工呼吸器の補助を受けてもその病変の広がりには運動系に留まる、いわゆる古典的な ALS である (Nishihira 2008)。本研究において、脊髄 OPTN 陽性封入体が陰性の孤発性 ALS では、体重減少や認知症の合併といった非典型的な症状を呈し、海馬歯状回顆粒細胞に TDP-43 陽性封入体が出現するという臨床像であった。これは、Nishihira らの広汎型の ALS (タイプ 1) に類似していると考えた。それに対して、脊髄 OPTN 陽性封入体が陽性の孤発性 ALS は、球麻痺や四肢麻痺で発症し、頸髄や腰髄において運動ニューロンが減少していた。認知症の合併も少なく、運動神経障害が中心の古典的 ALS (タイプ 2) との類似が疑われた。脊髄 OPTN 陽性封入体の出現頻度が ALS の臨床像に影響する可能性が示唆された。

OPTN が ALS 関連蛋白と共局在するかどうかは、これまでの研究では議論が分かれている。本研究では、脊髄 TDP-43 陽性封入体は孤発性 ALS 患者のほぼ全例で認められ、脊髄 OPTN 陽性封入体は、孤発性 ALS の 64.3% に認められた。脊髄連続切片においても大多数の OPTN 陽性封入体は運動ニューロンにおいて TDP-43 と共存していた。したがって、OPTN と TDP-43 が凝集する経路が共通している可能性がある。OPTN の凝集と細胞死の機序に関しては、さらなる研究が望まれる。

< 結語 >

本研究は、孤発性 ALS の臨床症状と OPTN 病理に注目した詳細な検討である。脊髄 OPTN 陽性封入体は、孤発性 ALS において比較的高頻度に見られる所見であり、脊髄 OPTN 陽性封入体の出現頻度が ALS の臨床的サブタイプと関連しえることを示した点において学問的意義がある。