

筑波大学

博士（医学）学位論文

TDP-43 proteinopathy における
Ataxin-2 の病理生化学的検討

2 0 2 0

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科
渡 辺 亮 平

目次

序章	1
1. 前頭側頭葉変性症とは	2
2. 前頭側頭葉変性症の概念の変遷	2
3. 前頭側頭葉変性症の疫学	4
4. 前頭側頭葉変性症の症候	5
5. 前頭側頭葉変性症の臨床・病理・遺伝的多様性および筋萎縮性側索硬化症との連続性	6
6. 前頭側頭葉変性症における TDP-43 の異常	7
7. Ataxin-2 の神経変性疾患への関与	9
引用文献	14
図表	18
本章	26
1. 目的	27
2. 対象と方法	27
3. 結果	33
4. 考察	38
5. 結論	41
引用文献	43
図表	46
謝辞	64
出典	65

略称一覧

本論文では、以下の略称を用いる。

ABC: avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex
AD: Alzheimer's dementia
AGD: argyrophilic grain dementia
ALS: amyotrophic lateral sclerosis
ATXN2: Ataxin-2
A260: RNA absorption curve at 260 nm
BIBD: basophilic inclusion body disease
bvFTD: behavioral variant of frontotemporal dementia
C9orf72: Chromosome 9 open reading frame 72
CBD: corticobasal degeneration
CBS: corticobasal syndrome
CHAMP2B: Charged multivesicular body protein 2B
CTCF: corrected total cell fluorescence
DLB: dementia with Lewy bodies
DLDH: dementia lacking distinctive histology
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DNs: dystrophic neurites
ER: endoplasmic reticulum
FA: formaldehyde
FTD: frontotemporal dementia
FTDP-17: familial FTD with mutations on the MAPT gene on chromosome 17
FTLD: Frontotemporal lobar degeneration
FTLD-U: FTLD, ubiquitinated type
FUS: fused-in-sarcoma
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCIs: glial cytoplasmic inclusions
GGT: globular glial tauopathy
GLG1: Golgi Glycoprotein 1
GRN: granulin
GWAS: genome-wide association study
hnRNPs: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
IBM: inclusion body myopathy
IBMPFD: inclusion body myopathy with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia
IF: immunofluorescence
IPL: immunoperoxidase labeling
LAMP1: Lysosome associated membrane protein 1

LATE: limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy
LLPS: liquid-liquid phase separation
LSm protein: like-Sm protein
MAPT: microtubule-associated protein tau
MND: motor neuron disease
MSP: multisystem proteinopathy
mTORC: mammalian Target of Rapamycin complex
naPPA: non-fluent/agrammatic variant primary progressive aphasia
NCIs: neuronal cytoplasmic inclusions
NIFID: neuronal intermediate filament inclusion disease
NIIs: neuronal intranuclear inclusions
NOS: not otherwise specified
OPTN: optineurin
PABP1: poly-A binding protein 1
PBS: phosphate-buffered saline
PCC: Pearson's correlation coefficient above threshold
PDB: Paget's disease of bone
PFA: paraformaldehyde
PGRN: progranulin
PiD: Pick's disease
PNFA: progressive non-fluent aphasia
polyQ: polyglutamine
PPA: primary progressive aphasia
PSP: progressive supranuclear palsy
pTDP-43: phosphorylated TDP-43
RBPs: RNA-binding proteins
ROIs: regions-of-interest
RPS6: ribosomal protein S6
SCA2: spinocerebellar ataxia type 2
SD: semantic dementia
SD-NFT: senile dementia of the neurofibrillary tangle type
SG: stress granule
svPPA: semantic variant primary progressive aphasia
TBK1: TANK binding kinase 1
TDP-43: TAR DNA-binding protein of 43 kDa
tM: Manders' colocalization coefficient above threshold
TMEM106B: transmembrane protein 106B
UPS: ubiquitin-proteasome system
VCP: Valosin-containing protein
WB: western blotting

序章

1. 前頭側頭葉変性症とは

前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLN)は、主に初老期に発症し、前頭・側頭葉が萎縮することにより特有の認知機能障害や行動障害、言語症状を呈する神経変性疾患の総称である。近年、本症の分子病理基盤および運動ニューロン病 (motor neuron disease: MND)である筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS)との関連が解明されつつある。本章では、FTLD の概念の変遷、疫学、症候等の臨床的事項および同症の病態における TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)と本研究の主要な対象である Ataxin-2 (ATXN2)の関与に関するこれまでの知見を概説する。

2. 前頭側頭葉変性症の概念の変遷

FTLD は、1892 年の Pick による初めての報告以降、その概念や用語が変遷を重ねてきているので、まずその歴史について整理する。

Pick が記載した第 1 例 (71 歳の男性)は、単語の理解および呼称などの言語能力の障害と人格変化を呈し、死後脳の検索で左側頭葉を中心とした萎縮が認められた [43]。現在の臨床診断分類では、後述する意味性認知症 (semantic dementia: SD)に相当すると考えられている。Pick は、その後精神症状・言語症状と前頭・側頭葉の限局性萎縮を呈する症例を計 8 例報告したが [33]、脳の検索は肉眼的観察に留まっていた。1911 年、Alzheimer は、患者脳の神経細胞内に球形もしくは楕円形の嗜銀性凝集体を発見し、Pick 球と命名した[2]。1926 年、Onari と Spatz は、前頭・側頭葉の限局性萎縮と呈する 5 例について報告し、これらを Pick 病と呼ぶことを提唱した [40]。ただし、この 5 例中 Pick 球が認められたのは 2 例であった。Onari らは Pick 球の有無は臨床像に影響しないとして重視しなかったが、このことにより Pick 球を有する Pick 病と有しない Pick 病との異同について以後長く議論が続くこととなった。

1970 年代、Constantinidis らにより、Pick 球および腫脹神経細胞の有無による Pick 病の分類が提唱された [10]。これは、Pick 球と腫脹神経細胞をともに有し主に側頭葉が萎縮する A 群、腫脹神経細胞のみを有し主に前頭・頭頂葉が萎縮して錐体路・錐体外路の変性が併存する B 群、どちらもない C 群の 3 群を分けるもので、各々異なる臨床症状との相関も報告された。これにより、Pick 球の有無が臨床・病理像全般に関連しており、Pick 病が不均一な疾患群からなるとの見解が強まったが、それらをどのように臨床・病理学的に下位分類するのが適切であるかはなお不明であった。

1980年代後半、Lund 大学と Manchester 大学が各々独立して前頭・側頭葉が萎縮する疾患の臨床病理分類を提案した後、1994年に共同でこれらを前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia: FTD)と総称することを提唱した。そして、その下位分類として、前頭葉変性型、Pick 型、MND 型の3型を提唱し、その診断基準を示した [61]。この FTD には失語症状を呈する一群が含まれていなかったため、1996年、Manchester 大学のグループが FTLD という上位概念を提唱し、1998年にその臨床診断基準を発表した [38]。この分類には、従来の FTD に並列して、進行性非流暢性失語 (progressive nonfluent aphasia: PNFA)と SD が加えられた。これらの臨床サブタイプはそれぞれ異なる脳部位の萎縮パターンを呈し、萎縮脳部位における機能障害に基づいた特徴的な臨床症状が出現するとされる (図 1) [67]。これらの診断基準の整備により、組織学的な Pick 球の有無にとらわれることなく、臨床的に FTLD を診断することが可能となった。

2011年に FTLD の臨床診断基準が改定され、3つの下位分類の総称に FTD という用語を用い、従来の FTD は行動異常型 FTD (behavioral variant FTD: bvFTD) と呼ぶことが提案された [49]。ただし、本稿では、Manchester 大学のグループによる原著に従い、FTLD という用語で統一する。また、SD と PNFA は、1982年に Mesulam によって提唱された原発性進行性失語 (primary progressive aphasia: PPA)の下位分類である意味型 PPA (semantic variant PPA: svPPA)と非流暢/失文法型 PPA (non-fluent/agrammatic variant PPA: naPPA)に各々相当し、本稿では用語として svPPA と naPPA を用いる [20]。

FTLD の病理学的分類については、2001年に McKhann らが、神経細胞内封入体 (neuronal cytoplasmic inclusion: NCI) の有無とその構成蛋白質による3群の分類を提唱した。すなわち、Pick 病を中心とした tau 陽性 NCI を有する群、ubiquitin 陽性 tau 陰性 NCI を有する群 (FTLD, ubiquitinated type: FTLD-U)、NCI を認めない群 (dementia lacking distinctive histology: DLDH) である。ただし、DLDH については、その後の検討で高感度の ubiquitin 免疫染色を行うとかなりの症例で NCI が発見されることから実は FTLD-U であることが判明した。さらに、2000年代に、ubiquitin 陽性 tau 陰性 NCI の主要構成成分として TDP-43 と fused in sarcoma (FUS)が同定されたことにより、FTLD の主要な原因蛋白質は、tau、TDP-43、FUS の3つであることが明らかとなり、原因蛋白質に従ってそれぞれ FTLD-tau、FTLD-TDP、FTLD-FUS と分類されるようになった (表 1) [3, 44]。FTLD の臨床診断と病理診断との関係については、svPPA はほとんどが FTLD-TDP、MND が

併存する FTLD (FTLD-MND)の多くは FTLD-TDP、naPPA の多くは FTLD-tau であるが、bvFTD はいずれの病理型でも生じるため臨床像から病理診断を類推することは困難である (図 2)。

FTLD の病態を解明する上で、細胞内凝集体の形成過程を明らかにすることは重要である。細胞内凝集体内に蓄積する蛋白質の多くには、立体構造の折り畳みの失敗 (ミスフォールディング)が存在する。このミスフォールディング蛋白質には重合能があり、まず少数が重合してオリゴマーになり、その後近接する正常な蛋白質の立体構造も異常構造に変化させつつ重合し、不溶性となり凝集する。オリゴマーは、近接する細胞同士でもシナプスなどを通じて伝播する [45]。このように一旦凝集体を形成した蛋白質は、正常構造を維持した蛋白質の量を減らすため、本来の蛋白機能が喪失される loss-of-function を引き起こし、神経変性が誘導されるという仮説がある。一方で、異常な凝集体は細胞毒性を有するという toxic gain-of-function 仮説もある。恒常性の保たれた正常環境下では、ミスフォールディング蛋白質は ubiquitin-proteasome system (UPS)もしくは autophagy-lysosomal system において適切に分解されているが [9]、この恒常性の破綻が凝集体形成の契機となっている可能性が指摘されている [59]。凝集体形成は FTLD を含めた多くの神経変性疾患に共通の現象であり、その背景に蛋白質の構造変化があると想定されることから、これらはコンフォメーション病とも総称される。なお、凝集体内の蛋白質は、ubiquitin 化、リン酸化、断片化などの異常な翻訳後修飾を受けており、これらも蛋白質機能の低下、細胞内局在の異常、凝集などに影響するとされている [45]。

3. 前頭側頭葉変性症の疫学

FTLD は、変性性認知症のうち Alzheimer 型認知症 (Alzheimer's dementia: AD) とレビー小体型認知症 (dementia with Lewy bodies: DLB)について 3 番目に多い。有病率は 15~22/10 万人で、認知症全体に占める比率は約 1~10%と報告されており [26, 50, 57, 58]、病理学的に診断された認知症症例では約 5%を占める [13, 46]。また、FTLD 患者の約 8 割は 65 歳未満に発症するとされ、システマティックレビューによれば、65 歳以上の老年期認知症に占める比率が 2.7% (0~9.1%) であるのに対し、65 歳未満の初老期認知症では 10.2% (2.8~15.7%)とより高い比率を占めている [26]。さらに、初老期に発症した FTLD の病理診断確定例における臨床診断および病理診断の内訳も報告されており、臨床診断の内訳は、bvFTD 34.7%、PPA 28.7%、および PSP 19.4%、皮質基底核症候群 (corticobasal

syndrome: CBS) 11.1%、FTD-MND 8.3%、AD 2.1%であった [56]。また、病理診断の内訳は、FTLD-tau 45.1% (Pick 病 8.3%、CBD 13.9%、PSP 16.7%)、FTLD-TDP 50.0% (タイプ A 10.4%、タイプ B 18.1%、タイプ C 12.5%)、FTLD-FUS 4.9%であった [56]。また、アジア圏の FTLD 症例はほぼ全てが孤発例であるが、欧米では 30~50%の症例に家族歴が存在するという地域差が認められる [44]。FTLD の予後は 7~13 年である [41]。

4. 前頭側頭葉変性症の症候

bvFTD は、2011 年に改訂された臨床診断基準 (表 2)では、脱抑制、無関心・無気力、共感性低下、常同、食行動異常、遂行機能障害等の 6 つの主要症状のうち 3 つを満たす場合に possible bvFTD と診断される [49]。さらに、bvFTD に合致する前頭・側頭葉の萎縮や機能低下を示す画像検査結果を認める場合は probable bvFTD となる。改訂によって診断感度は高くなったが、他の神経変性疾患および精神疾患による偽陽性が生じうることに注意を要する。bvFTD は、病初期に脱抑制もしくは無関心で発症することが多く、いずれの症状も約 8 割の症例で認められる。認知機能障害としては遂行機能や注意力の低下が目立ち、物事を適切に計画して手順通りに行えず、また注意の保持や切り替えを状況に応じて柔軟に行えなくなる。一方、初期には AD 様のエピソード記憶障害が目立たないのも特徴である。他に、共感性が喪失してその場にそぐわない感情を示し、常同性により同じ会話を繰り返したり決まった経路を連日歩き続けたりする。さらに、被影響性の亢進が生じて相手の言葉をオウム返しするようになり、また同じ菓子ばかり大量に食べ続けるといった食行動の変化も現れる。主な検査所見として、MRI などの頭部形態画像および SPECT や PET などの脳機能画像における前頭・側頭葉皮質、前部帯状回皮質、前部島回皮質、海馬体、扁桃核、線条体、視床、視床下部の萎縮および血流・代謝の低下があり、本症に典型的である顕著な前頭・側頭葉の萎縮は、ナイフの刃状(knife-blade)と呼ばれる (図 1)。

PPA では、発語失行、失文法、語義失語といった言語障害が病初期より目立って緩徐に進行する。Mesulam らによる診断基準 (表 3)を示す [20]。svPPA では、左頭葉前方部の神経変性によって物品・人物の呼称と単語の理解の障害が出現する。例えば、鋏を適切に用いられるが鋏という名称が浮かばず、また鋏を持ってくるよう頼まれても鋏が何であるか分からず対応出来なくなる。頻繁に用いない語の呼称がより障害されやすく、病状が進展につれて呼称できない

単語が多くなる。また、英語話者ではアルファベットの不規則綴り語のような非典型的な読みをする単語を規則綴り語のように音読してしまい、日本人では非典型的な読み方をする漢字の読み書きができなくなる (表層性失読/失書) [31]。なお、復唱および言語産出は一般に障害されず会話量は保持されるが、具体的な呼称が浮かばずに代名詞の使用が増える。naPPA では、ブローカ野および中心前回下部の神経変性により、語産出において話したい文章を思い浮かべることができず、それを口から発する段階が障害される。その結果、努力性の会話、音の歪み、欠損、挿入、置き換えが生じる (発語失行)。言語音の誤りは不規則に出現するのが特徴であり (失調性の構音障害)、麻痺により生じる持続的な構音障害とは区別される。また、助詞、前置詞、助動詞などを使わず文が構造化されなくなる (失文法)。発語失行と失文法のいずれかが存在すれば naPPA と診断される。この他、複雑な構文を用いた文章の理解力も低下するが、一方で呼称や単語の理解は保たれる。頭部形態画像検査の所見として、svPPA では初期に前部側頭葉が萎縮し、進行につれて扁桃核、嗅内皮質、海馬も萎縮する (図 1)。萎縮は左右差を伴い、右優位であると相貌失認、左優位であると単語の理解の障害を呈しやすい。naPPA では Broca 領域が存在する左下前頭回から島回にかけての脳萎縮を呈する (図 1)。

5. 前頭側頭葉変性症の臨床・病理・遺伝的多様性および筋萎縮性側索硬化症との連続性

FTLD 症例の 5~10%には、ALS の併存が早くから判明しており、これらの症例は FTL D-MND や ALS with dementia として報告されてきた。さらに、ALS 患者に詳細な認知機能検査を行うと、約半数で遂行機能障害や軽度の記憶力障害が認められ、さらに 15%の症例では FTL D に一致する行動障害や言語障害が出現する [51]。このことから、FTL D と ALS には臨床的近縁性が指摘されてきた。FTL D における蓄積蛋白質である TDP-43 と FUS は、ALS の凝集体の主要構成成分ともなっており、前述した FTL D と ALS の両方の臨床症状を重複している患者の多くは、TDP-43 もしくは FUS いずれかの凝集体を有している。さらに、TDP-43 と FUS をコードする遺伝子の変異は家族性 ALS あるいは家族性 FTL D の原因となる。このように、TDP-43 と FUS は、臨床病理学的にも遺伝学的にも両疾患の重畳を引き起こすことから、FTL D と ALS は共通の機序によって生じる疾患スペクトラム (FTL D-ALS)の両極として捉えられている。

遺伝因子に関しては、前述のようにアジア圏の FTL D 症例はほとんどが孤発

性発症であるが、欧米では 30~50%に家族歴があり、これらの家系研究により、いくつかの原因遺伝子が同定されている (表 4) [19, 50]。このうち、*granulin (GRN)*、*Chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72)*、*optineurin (OPTN)*、*Valosin-containing protein (VCP)*、*TANK binding kinase 1 (TBK1)*は FTLD-TDP の原因遺伝子であり、これらの蛋白質は TDP-43 の凝集体形成に何らかの形で関連すると考えられる [44]。さらに、近年ではゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS)を用いた研究により、FTLD の感受性遺伝子も解明されつつある [44]。感受性遺伝子とは、原因遺伝子よりも高頻度に認められ、疾患の表現型に比較的弱い影響を与える遺伝因子であり、明らかな家族性を欠く孤発性 FTLD 症例も遺伝的因子により影響を受ける可能性が示唆されている。この FTLD-TDP の感受性遺伝子として、*transmembrane protein 106B (TMEM106B)* と並んで本研究の主要テーマである *ATXN2* が報告されている。

6. 前頭側頭葉変性症における TDP-43 の異常

TDP-43 は、2 個の RNA 認識モチーフと 1 個の glycine-rich ドメインをもつ不均一核内リボ核酸蛋白質 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein: hnRNP)の一種であり [45]、mRNA のスプライシングを制御し、遺伝子の発現を調整し、神経分化などに関与している。

TDP-43 は正常では核内にびまん性に局在するが、FTLD-TDP 患者脳ではこの正常の局在が失われ、核内の一部や細胞質、神経突起などに異常なリン酸化および断片化を受けた TDP-43 が凝集体を形成し、それぞれ神経細胞核内封入体 (neuronal intranuclear inclusions: NIIs)、NCIs、変性神経突起 (dystrophic neurites: DNs)と呼ばれる。さらに神経細胞のみならずオリゴデンドログリアの細胞質内にも凝集体を形成し、グリア細胞質内封入体 (glial cytoplasmic inclusions: GCIs) と呼ばれ、その出現部位は多様である (図 3A、B)。この 4 種類の TDP-43 陽性構造は無作為に出現するのではなく、患者ごとにある程度の出現パターンが存在し、NCIs と短い DNs が主に皮質第 II 層に混在して蓄積するタイプ A、NCIs が皮質全層に認められるタイプ B、長い DNs が皮質第 II 層に蓄積するタイプ C、短い DNs と NIIs が全層に蓄積するタイプ D の 4 型に主に分類される [32]。この TDP-43 凝集体の出現部位パターンによる病理サブタイプは FTLD の臨床型とある程度相関しており、タイプ A は PNFA、タイプ B は FTLD-MND、タイプ C は SD となることが多い。これらの病理型は、生化学的解析において蓄積した TDP-43 が呈する特徴とも相関しており、患者脳抽出物から調整した界面活性剤

(サルコシル) 不溶性画分のウェスタンブロット解析において、TDP-43 の C 末端断片のパターンは病理学的サブタイプごとに異なっている [23]。このように、凝集体を構成する TDP-43 の構造には臨床型と相関する疾患特異性が存在する [3, 62]。なお近年、新たな病理サブタイプとしてタイプ E が報告された。タイプ E は bvFTD の臨床像を呈するが生命予後が 3 年以内とより不良であり、病理学的に *granulofilamentous neuronal inclusions*、*curvilinear inclusions*、*grains* と記載される TDP-43 陽性構造の広汎な分布が特徴である [36]。

次に、家族性 FTLN-TDP の原因遺伝子と感受性遺伝子について整理する。まず、*GRN* は *progranulin (PGRN)* 蛋白質をコードする遺伝子であり [44]、*PGRN* は切断を受けて *GRN* になり、神経炎症やストレス反応などに関わる。*GRN* の変異は家族性 FTLN 全体の 5~20% を占める [47]。臨床像は bvFTD や PNFA が多いが、記憶障害やパーキンソンニズムを呈する例もあり多様である。病理型はほとんどが FTLN-TDP タイプ A となる [37]。変異例では、*PGRN* 発現の減少に伴うリソソーム機能異常が TDP-43 蓄積に関連する可能性が示唆されている。次の *C9orf72* は、家族性 FTLN のみでなく、ALS や FTLN-ALS においても変異が同定されている [63]。*C9orf72* の intron 1 には GGGGCC リピート配列があり、健常者ではリピート数が 20 以下であるが、変異例では 100 から 1,000 リピートへの伸長がみられる。本変異は、欧米での家族性の FTLN および FTLN-ALS の原因として最多であり各々 25% と 50% を占めるが、本邦における報告は紀伊半島における家族性 ALS 症例に限られる。臨床型は bvFTD が多く、PNFA や SD を呈する症例もある。病理型は主に FTLN-TDP タイプ A もしくはタイプ B である。TDP-43 の他、伸長した GGGGCC リピートに由来する蛋白質である poly GP、poly GA、poly GR も神経変性に影響するとされる。リピート伸長と TDP-43 蓄積との関係については、近年液-液相分離 (*liquid-liquid phase separation: LLPS*) を介した機序が報告されている。3 つ目の VCP は、ATP のエネルギーを利用して蛋白質の構造を修飾する AAA-ATPase に含まれる酵素蛋白質である。リング構造の 6 量体を形成して ubiquitin 化された基質を通過させる際にその立体構造を解消させ、その後の蛋白質分解に寄与する。臨床的には、FTLN、封入体ミオパチー (*inclusion body myopathy: IBM*)、骨パジェット病 (*Paget's disease of bone: PDB*) が併存しており [66]、当初は *inclusion body myopathy with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia (IBMPFD)* と呼ばれた。神経細胞核内にはレンズ状の TDP-43 陽性 NIIs が認められ、病理型は FTLN-TDP タイプ D となる。最近では、

臨床的に IBM や PDB ではなくパーキンソニズム、ALS、末梢神経障害を呈する症例も IBMPFD と同様の病理型を呈することが判明したため、IBMPFD よりも包括的な多系統蛋白質症 (multisystem proteinopathy: MSP) という疾患概念が提唱されている [60]。また、同じく蛋白質の分解に重要である p62 を発現する *p62/SQSTM1* の変異によっても ALS や bvFTD が引き起こされ、FTLD-TDP タイプ A またはタイプ B の病理型を呈することが報告されている。*TBK1* は、オートファジー関連蛋白質 *TBK1* をコードし、他のオートファジー関連蛋白質である p62 および *OPTN* のリン酸化を調整する。近年、孤発性 ALS、家族性 ALS、FTLD-TDP と *TBK1* 変異との関連が報告された [17]。本変異は、初老期以降に bvFTD、PPA、FTLD-ALS を引き起こし、FTLD-TDP タイプ A もしくはタイプ B の病理型を呈する。本変異により *TBK1* は減少して *OPTN* への結合能の低下が生じる。さらに、*OPTN* の複数の変異を持つ FTLD-TDP タイプ A 症例も報告されている。

FTLD-TDP の感受性遺伝子として近年報告された *TMEM106B* は、リソソーム膜蛋白質 *TMEM106B* を発現する。*TMEM106B* 内の複数の SNP に FTLD-TDP との関連が判明し、同変異は *GRN* 変異保因者の FTLD 発症ととくに強く関連していた [12]。一方、*GRN* 変異や *C9orf72* 変異保因者がノンリスクアレルを有すると FTLD-TDP 発症の予防に寄与するという [8]。リスクアレルを有する FTLD 症例の脳では *TMEM106B* の発現が増加するため、過剰な *TMEM106B* が蛋白分解を障害することで TDP-43 の蓄積に関与する可能性がある。なお、同じく FTLD-TDP の感受性遺伝子として近年報告された *ATXN2* については、次項で詳述する。

このように、FTLD 関連遺伝子の多くが蛋白質分解経路に関連する蛋白質をコードしており、その遺伝子変異の多くは FTLD-TDP と ALS のどちらの原因にもなりえるという事実は、TDP-43 の凝集体形成の解明は FTLD と ALS の新規治療法の開発に欠かせないことを示唆している。*ATXN2* もその病態経路に関与していると考えられるが、その詳細について次の項で述べる。

7. Ataxin-2 の神経変性疾患への関与

ATXN2 は 12q24 に存在し、25 の exon を有し約 147 kb を占める遺伝子である [53]。転写産物である *ATXN2* 蛋白質は 1311 アミノ酸からなり、分子量は約 140 kDa である。*ATXN2* は Like-Sm (LSm) protein ファミリーの一つであり [68]、N 末端側に存在する LSm domain および Lsm-associated domain において RNA との

結合能を持つ。また、C末端側に存在する PAM2 domain は poly-A binding protein 1 (PABP1)と相互作用し、ともに後述する ATXN2 の RNA 結合蛋白質 (RNA-binding protein: RBP)としての生理的機能に重要となる [48, 69]。また、ATXN2 の exon 1 内には正常では 22 もしくは 23 の CAG/CAA リピート配列が存在し、ATXN2 の N 末端にはポリグルタミン (polyglutamine: polyQ)鎖が存在する。ATXN2 は進化的に高度に保存されており、多くの生物種で相同蛋白質の発現が認められる [42]。ATXN2 はヒトの中枢神経系を含む多くの臓器に発現している [30, 54]。ヒト脳を用いた免疫組織化学的検討では、ATXN2 は大脳新皮質、大脳辺縁系、大脳基底核、中脳、延髄、脊髄、小脳に広範に分布し、とくに小脳 Purkinje 細胞に強く発現すると報告されている [27]。ATXN2 は神経細胞内に主に存在しており、グリア細胞や白質にはほとんど存在しない [27]。神経細胞内の ATXN2 は、主に細胞質内の顆粒状またはびまん性の免疫反応として認められる。培養細胞および動物モデルを用いた細胞内局在の検討では、リボソーム、ゴルジ装置、粗面小胞体といった細胞質内のオルガネラにおける ATXN2 の存在が判明しているが、ヒト脳組織における ATXN2 の詳細な細胞内局在についての知見は乏しい [6, 11, 29, 39, 48, 55, 64]。

ATXN2 の主要な生理的機能としては、mRNA の安定化、翻訳機構の調整、RNA を含む輸送顆粒やストレス顆粒形成の調整などが、培養細胞および動物モデルを用いた研究により報告されている [42]。ATXN2 は、LSm domain を介して多数の RNA 分子の 3'領域内にある AU-rich 領域と直接結合する他 [69]、PAM2 domain を介して mRNA の 3'末端にポリアデニル (poly-A)鎖を付加する RBP である PABP1 とも結合する [11, 48]。poly-A 鎖の長さは RNA が分解されるまでの間隔を規定するため、その適切な付加は mRNA を安定化させて mRNA の核外輸送や翻訳に重要となる。ATXN2 は、RNA との直接的もしくは PABP1 を介した相互作用により poly-A 鎖の付加を円滑化し、mRNA 代謝過程に寄与すると考えられる。さらに、ATXN2 が安定化させる mRNA には RNA スプライシング、ポリアデニル化、3'末端処理に関連する蛋白質をコードするものが多く含まれ、ATXN2 は RNA 代謝に関わる蛋白質の発現を増加させるとされる [69]。なお、蛋白質発現に対する効果は、ATXN2 内の polyQ リピートが異常に伸長もしくは欠失することで減弱するという [69]。また、ATXN2 は翻訳機構に作用して蛋白質の発現をより直接的に調整するとの報告もある。すなわち、ATXN2 ノックアウトマウスを用いた研究では、ATXN2 遺伝子の欠失により、リボソームサブユ

ニットである ribosomal protein S6 (RPS6)のリン酸化を介した翻訳機構の亢進、およびマウスの体重増加が示されている [15, 34]。また、培養細胞を用いた飢餓実験では ATXN2 の発現増加が報告されている [6]。これらの結果の背景には、細胞の栄養状態に応じて転写や翻訳を調整する蛋白複合体である mammalian Target of Rapamycin complex (mTORC)に対する ATXN2 の抑制的作用があると考えられ、ATXN2 が蛋白質代謝の恒常性に寄与する可能性が指摘されている。さらに ATXN2 には、RBP や RNA を含む輸送小胞の生成 [4]、およびストレス環境下の培養細胞で観察されるストレス顆粒 (stress granule: SG)の生成などのストレス反応への関与 [39]も報告されており、ATXN2 には神経変性疾患における蛋白質の凝集を助長する可能性も示唆されている。なお、ATXN2 は TDP-43 とも RNA を介して生理的に相互作用することが知られるが、その意義は不明である [14]。

ヒトの神経変性疾患における ATXN2 の関与は、遺伝性のトリプレットリピート病である家族性脊髄小脳性運動失調症 2 型 (spinocerebellar ataxia type 2: SCA2) において初めて報告された。SCA2 は、常染色体優性遺伝パターンを呈する家族性 SCA の約 13%を占める [18]。本症の患者の多くは中年期に小脳失調、錐体路症状、パーキンソン症状、認知機能障害などで発症し、患者脳では病理学的に中脳、橋、延髄、小脳、脊髄前角などの脳領域の神経細胞が脱落する [5]。1996 年、SCA2 患者の遺伝子解析において、ATXN2 の exon 1 内にある CAG/CAA リピートの高度伸長変異 (> 34)が発見された [30]。本変異が陽性である患者脳の免疫組織化学的検討では ATXN2 による免疫反応の増強が認められ、また患者脳抽出物の生化学的解析では、分子量が通常よりも大きい ATXN2 蛋白質が検出された [27, 28]。変異 ATXN2 から発現した ATXN2 蛋白質はヘアピン様の構造を持ち、本来の RNA 安定化機能を喪失するとされる [1]。異常な ATXN2 から切断された polyQ 鎖は不溶化して細胞質に蓄積し、polyQ 鎖を標識する 1C2 抗体でびまん性の陽性像を呈する [28]。培養細胞実験では、異常な ATXN2 によるゴルジ装置や小胞体に対する細胞毒性が神経変性に関与すると示唆されている [1, 29]。

さらに、2010 年、Elden らにより、ATXN2 の変異が ALS による病態を修飾するとの可能性を示す報告がなされた [14]。この報告では、TDP-43 を発現する酵母株に多数の酵母遺伝子のうち一種類を無作為に過剰発現させて TDP-43 による細胞毒性が修飾されるかが検討された。その結果、ヒト ATXN2 の相同遺伝子にあたる *PBP1* (Poly-A binding protein-Binding-Protein 1)の過剰発現により

TDP-43 の毒性が促進され、またその欠失変異により TDP-43 の毒性が抑制されることが判明した。また、TDP-43 を発現するショウジョウバエにおいても、ヒト *ATXN2* の相同遺伝子である *dATX2* の過剰発現もしくは発現抑制により、TDP-43 による神経毒性が同様に修飾された。さらに、ヒトの健常例および ALS 症例のゲノム DNA 解析により、*ATXN2* における CAG リピートの中等度伸長 (27~33) が ALS の有病率を 2.8 倍程度増加させ、また発症年齢を若年化させる修飾因子となることも解明された [14]。ALS 症例の脊髄前角細胞の病理学的検討では *ATXN2* 陽性となる細胞質内凝集体が一部の症例に認められた他、FTLD-TDP 症例の脳皮質でも、NCIs における TDP-43 と *ATXN2* の共局在が認められた [14]。また、正常な *ATXN2* を有する ALS 症例と比較して、中等度伸長変異 *ATXN2* を有する ALS 症例の脊髄では、TDP-43 陽性となる round inclusion の数が少なく、また蛋白質分解酵素の一種である caspase 3 の活性が強いとの特徴が報告された [22, 23]。

TDP-43 proteinopathy への *ATXN2* の寄与を検討するためのヒト脳を用いた研究は、これまで主に ALS 症例で行われてきたが、最近の研究では FTLD においても中等度伸長変異を有する *ATXN2* が臨床的表現型を修飾する可能性があることが報告されている。Rubino らは、同変異を有する *ATXN2* の保因者はより若年で FTLD を発症し、また病初期にパーキンソン症状や精神病症状をより多く認めるとの関連を報告した [52]。また Lattante らは、*ATXN2* の中等度伸長変異が ALS だけでなく FTLD-ALS の表現型を修飾し、とくに *C9orf72* リピート伸長を有する FTLD 患者において MND の併存率を高める可能性を報告した [35]。Fournier らは、*ATXN2* の中等度伸長変異を有し、他の FTLD 原因遺伝子には変異を認めない FTLD-TDP の剖検例を報告している [16]。これらの知見は、*ATXN2* が ALS と FTLD 双方の TDP-43 病態に幅広く関与していることを示唆している。

さらに、*ATXN2* が TDP-43 proteinopathy の新しい治療ターゲット候補となりうることを示す報告がある。*TDP-43* トランスジェニックマウスは脳内に TDP-43 凝集体が出現し、神経変性をきたすが、これに *ATXN2* ノックアウトマウスを交配させて内在性 *ATXN2* を欠如させると、*TDP-43* トランスジェニックマウスの生存率が著しく向上し、運動機能の改善、TDP-43 凝集体の減少がみられる。また *ATXN2* を標的としたアンチセンスヌクレオチドの投与でも、TDP-43 トランスジェニックマウスの生命予後が顕著に改善される [7]。以上の結果から、*ATXN2* の発現量の減弱は、TDP-43 proteinopathy の治療効果があると考えられている。

以上のように、ATXN2は、その polyQ 鎖の異なる伸長変異、すなわち高度伸長と中等度伸長が、それぞれトリプレットリピート病と TDP-43 proteinopathy という 2 つの異なる神経変性疾患に関連する稀な蛋白質であり、その機序を知ることが、現在最も注目されている研究課題である。しかし、ヒトの患者脳組織を用いた ATXN2 の生化学的・免疫組織化学的検討は未だ少数に留まる。SCA2 患者脳における高度伸長 polyQ 鎖を持つ ATXN2 の特徴、および ALS 患者脳における正常もしくは中等度伸長 polyQ 鎖を持つ ATXN2 の特徴について免疫組織化学的に検討した少数の先行研究では、いずれも抗原の検出感度が比較的低いホルムアルデヒド (formaldehyde: FA) 固定されたパラフィン包埋標本が使用されている。さらに、FTLD-TDP 患者脳における ATXN2 の特徴に関する病理学的知見はほとんどなく、ATXN2 の polyQ 鎖長の違いがどのような機序によりそれぞれ異なる脳領域に影響を及ぼすかの機序は未だ不明である。TDP-43 proteinopathy における蛋白質の異常蓄積に対する新規治療として ATXN2 の抑制による疾患修飾療法が期待されており、今後の治療開発および治験における効果判定のためにも、ヒト脳組織での ATXN2 の特徴に関する知見のさらなる集積が求められている。

引用文献

1. Alves-Cruzeiro JM, Mendonça L, Almeida LP, Nóbrega C (2016) Motor Dysfunctions and Neuropathology in Mouse Models of Spinocerebellar Ataxia Type 2: A Comprehensive Review *Front Neurosci* 10: 572.
2. Alzheimer A (1911) Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z ges Neurol Psychiat* 4: 356-385.
3. Arai T (2014) Significance and limitation of the pathological classification of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology* 34:578-588.
4. Bakthavachalu B, Huelsmeier J, Sudhakaran IP, Hillebrand J, Singh A, Petrauskas A, et al (2018) RNP-Granule Assembly via Ataxin-2 Disordered Domains Is Required for Long-Term Memory and Neurodegeneration. *Neuron* 98 (4):754-766.
5. Becker IL, RUB U, Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) (2008) *The Cerebellum*: 1-10.
6. Becker IL, Nonis D, Eich F, Klinkenberg M, Gorospe M, Kötter P, et al (2016) Mammalian ataxin-2 modulates translation control at the pre-initiation complex via PI3K/mTOR and is induced by starvation. *Biochim Biophys Acta* 1862 (9):1558-1569.
7. Becker IL, Huang B, Bieri G, Ma R, Knowles DA (2017) Therapeutic Reduction of ataxin-2 Extends Lifespan and Reduces Pathology in TDP-43 Mice. *Nature* 544(7650):367-371.
8. Blitterswijk M, Mullen B, Nicholson AM, Bieniek KF, Heckman MG, Baker MC, et al (2014) TMEM106B protects C9ORF72 expansion carriers against frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol* 127(3):397-406.
9. Chen RH, Chen YH, Huang TY (2019) Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *J Biomed Sci* 21; 26(1):80.
10. Constantinidis J, Richard J, Tissot R (1974) Pick's Disease. *Histological and Clinical Correlations*. *Eur Neurol* 11(4):208-217.
11. Damrath E, Heck MV, Gispert S, Azizov M, Nowock J, Seifried C, et al (2012) ATXN2-CAG42 Sequesters PABPC1 into Insolubility and Induces FBXW8 in Cerebellum of Old Ataxic Knock-In Mice. *PLoS Genet* 8 (8): e1002920.
12. Deerlin VM, Sleiman PM, Martinez-Lage M, Plotkin AC, Wang LS, Graff-R Ford NR, et al (2010) Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet* 42(3):234-239.
13. Ducharme S, Price BH, Larvie M, Dougherty DD, Dickerson BC (2015) Clinical Approach to the Differential Diagnosis Between Behavioral Variant Frontotemporal Dementia and Primary Psychiatric Disorders. *Am J Psychiatry*. 172(9):827-837.
14. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466 (7310):1069-1075.
15. Fittschen M, Becker IL, Halbach MV, Damrath E, Gispert S, Azizov M, et al (2015) Genetic ablation of ataxin-2 increases several global translation factors in their transcript abundance but decreases translation rate. *Neurogenetics* 16 (3):181-192.
16. Fournier C, Anquetil V, Camuzat A, Stirati-Buron S, Sazdovitch V, Molina-Porcel L, et al (2018) Interrupted CAG expansions in ATXN2 gene expand the genetic spectrum of frontotemporal dementias. *Acta Neuropathol Commun* 6:41.

17. Freischmidt A, Wieland T, Richter B, et al (2015) Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci* 18: 631-636.
18. Geschwind DH, Perlman S, Figueroa CP, Treiman LJ, Pulst SM (1997) The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 60(4):842-850.
19. Goldman JS, Farmer JM, Wood EM, Johnson JK, Boxer A, Neuhaus J, et al (2005) Comparison of family histories in FTL D subtypes and related tauopathies. *Neurology* 13; 65(11): 1817-1819.
20. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al (2011) Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 76(11):1006-1014.
21. Hart MP, Brettschneider J, Lee VM, Trojanowski JQ, Gitler AD (2012) Distinct TDP-43 pathology in ALS patients with ataxin 2 intermediate-length polyQ expansions. *Acta Neuropathol* 124(2):221-230.
22. Hart MP, Gitler AD (2012) ALS-associated ataxin 2 polyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications. *J Neurosci* 32 (27):9133-9142.
23. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, et al (2008) Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64 (1):60-70.
24. 東晋二、新井哲明 (2015) 前頭側頭葉変性症. *診断と治療* 103(7):935-938.
25. Hofmann JW, Seeley WW, Huang EJ (2018) RNA Binding Proteins and the Pathogenesis of Frontotemporal Lobar Degeneration. *Annu Rev Pathol* 14:469-495.
26. Hogan DB, Jetté N, Fiest KM, Roberts JI, Pearson D, Smith EE, et al (2016) The Prevalence and Incidence of Frontotemporal Dementia: a Systematic Review. *Can J Neurol Sci* 43 Suppl 1:S96-109.
27. Huynh DP, Del Bigio MR, Ho DH, Pulst SM (1999) Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann Neurol* 45 (2):232-241.
28. Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM (2000) Nuclear Localization or Inclusion Body Formation of ataxin-2 Are Not Necessary for SCA2 Pathogenesis in Mouse or Human. *Nat Genet* 26 (1):44-50.
29. Huynh DP, Yang HT, Vakharia H, Nguyen D, Pulst SM (2003) Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet* 12 (13):1485-1496.
30. Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, et al (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 14 (3):285-291.
31. 井村恒郎 (1943) 失語-日本語における特性. *精神神経誌* 47: 196-218.
32. Irwin DJ, Cairns NJ, Grossman M, McMillan CT, Lee EB, Deerlin VM, et al (2015) Frontotemporal Lobar Degeneration: Defining Phenotypic Diversity Through Personalized Medicine. *Acta Neuropathol* 129(4): 469-491.
33. Karenberg A (2001) Early history of Pick's disease. *Fortschr Neurol Psychiatr* 69(11):545-550.
34. Kiehl TR, Nechiporuk A, Figueroa KP, Keating MT, Huynh DP, Pulst SM (2006)

- Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 339(1):17-24.
35. Lattante S, Millecamps S, Stevanin G, Rivaud-Péchoux S, Moigneu C, Camuzat A, et al (2014) Contribution of ATXN2 intermediary polyQ expansions in a spectrum of neurodegenerative disorders. *Neurology* 83 (11):990-995.
 36. Lee EB, Porta S, Baer GM, Xu Y, Suh ER, Kwong LK, et al (2017) Expansion of the Classification of FTLN2-TDP: Distinct Pathology Associated With Rapidly Progressive Frontotemporal Degeneration. *Acta Neuropathol* 134 (1): 65-78.
 37. Mackenzie IR, Baker M, Pickering-Brown S, Hsiung GY, Lindholm C, Dwosh E, et al (2006) The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. *Brain* 129: 3081-3090.
 38. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, et al (1998) Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 51: 1546-1554.
 39. Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, et al (2007) Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell* 18 (4):1385-1396.
 40. Onari K, Spatz H (1926) Anatomische beitrage zur lehre von der pickischen umschriebenen grosshirnrinden-atrophie ("Pickische Krankheit"). *Z Ges Neurol Psychia*. 101: 470-511.
 41. Onyike CU (2011) What Is the Life Expectancy in Frontotemporal Lobar Degeneration? *Neuroepidemiology* 37(3-4):166-167.
 42. Ostrowski LA, Hall AC, Mekhail K (2017) Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease. *Genes (Basel)* 8(6):157.
 43. Pick A (1892) Über die beziehungen der senilen hirnatrophie zur aphasie. *Prager Medicinische Wochenschrift* 17:165-167.
 44. Pottier C, Ravenscroft TA, Sanchez-Contreras M, Rademakers R (2016) Genetics of FTLN2: overview and what else we can expect from genetic studies. *J Neurochem* 138 Suppl 1: 32-53.
 45. Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK (2019) Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci* 14; 12: 25.
 46. Rabinovici GD, Miller BL (2010) Frontotemporal Lobar Degeneration Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs* 24(5): 375-398.
 47. Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR (2012) Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol* 8: 423-434.
 48. Ralser M, Albrecht M, Nonhoff U, Lengauer T, Lehrach H, Krobatsch S (2005) An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2. *J Mol Biol* 346 (1):203-214.
 49. Raskovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al (2011) Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* 134(9): 2456-2477.
 50. Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR (2002) The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 11; 58(11): 1615-21.
 51. Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE (2005) Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* 65:586-590.

52. Rubino E, Mancini C, Boschi S, Ferrero P, Ferrone M, Bianca S, et al (2019) ATXN2 intermediate repeat expansions influence the clinical phenotype in frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging* 73: 231.e7-231.e9.
53. Sahba S, Nechiporuk A, Figueroa KP, Nechiporuk T, Pulst S.M. Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1. *Genomics* 1998;47:359-364.
54. Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, et al (1996) Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet* 14:277-284.
55. Satterfield TF, Pallanck LJ (2006) Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 15 (16):2523-2532.
56. Seo SW, Thibodeau MP, Perry DC, Hua A, Sidhu M, Sible I, et al (2018) Early vs late age at onset frontotemporal dementia and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 90(12): e1047-e1056.
57. Snowden JS, Neary D, Mann DMA (2002) Frontotemporal dementia. *Br J Psychiatry* 180:140-143.
58. Stevens T, Livingston G, Kitchen G, Manela M, Walker Z, Katona C (2002) Islington study of dementia subtypes in the community. *Br J Psychiatry* 180:270-276.
59. 田中 啓二, 村田 茂穂 (2003) 蛋白質の品質管理と神経変性疾患. *日本薬理学雑誌* 122(1): 30-36.
60. Taylor JP (2015) Multisystem proteinopathy: intersecting genetics in muscle, bone, and brain degeneration. *Neurology* 85: 658-660.
61. The Lund and Manchester groups (1994) Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57:416-418.
62. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, et al (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135(Pt 11): 3380-3391.
63. van Blitterswijk M, DeJesus-Hernandez M, Rademakers R (2012) How do C9ORF72 repeat expansions cause amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: can we learn from other noncoding repeat expansion disorders? *Curr Opin Neurol* 25: 689-700.
64. van de Loo S, Eich F, Nonis D, Auburger G, Nowock J (2009) Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum. *Exp Neurol* 215 (1):110-118.
65. 渡辺亮平, 新井哲明 (2020) 前頭側頭葉変性症の臨床-病理-遺伝子相関. *BRAIN and NERVE* 72(6):575-583.
66. Watts GDJ, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D et al (2004) Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosincontaining protein. *Nat Genet* 36:377-381.
67. Whitwell JL (2019) FTD spectrum: Neuroimaging across the FTD spectrum. *Prog Mol Biol Transl Sci* 165:187-223.
68. Wilusz C, Wilusz J (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nat Struct Mol Biol* 12(12):1031-1036.
69. Yokoshi M, Li Q, Yamamoto M, Okada H, Suzuki Y, Kawahara Y (2014) Direct binding of Ataxin-2 to distinct elements in 3'UTRs promotes mRNA stability and protein expression. *Mol Cell* 55(2):186-198.

表 1. 前頭側頭葉変性症の病理学的分類 (文献 65 より改変引用)

FTLD-tau	Pick 病 (Pick's disease: PiD) 皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration: CBD) 進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP) 嗜銀顆粒性認知症 (argyrophilic grain dementia: AGD) 神経原線維変化型老年期認知症 (senile dementia of the neurofibrillary tangle type: SD-NFT) globular glial tauopathy: GGT 家族性 FTLD-tau (<i>MAPT</i> 変異陽性)
FTLD-TDP	孤発性 FTLD-TDP FTLD-motor neuron disease (FTLD-MND) 家族性 FTLD-TDP (<i>GRN</i> 変異陽性、 <i>VCP</i> 変異陽性、 <i>C9ORF72</i> 変異陽性)
FTLD-FUS	非定型 FTLD-U (aFTLD-U) 好塩基性封入体病 (basophilic inclusion body disease: BIBD) 神経細胞性中間径線維封入体病 (neuronal intermediate filament inclusion disease: NIFID)
FTLD-UPS	FTLD linked to chromosome 3 (<i>CHMP2B</i> 変異陽性)
FTLD-ni	Dementia lacking distinctive histology: DLDH

上の各疾患はいずれも前頭・側頭葉の神経変性に伴う精神・神経症状を呈することから、前頭側頭葉変性症に分類される。なお、皮質基底核変性症および進行性核上性麻痺においては、臨床的に各々特徴的な錐体外路症状が前景となることも多く、両疾患は臨床的にはパーキンソン症候群としても分類される。

表 2. 行動異常型前頭側頭型認知症 (bvFTD)の診断基準 (文献 24 および文献 49 より改変引用)

診断に必須である項目:

A. 本人をよく知る人から提供された見解および病歴により、行動および/または認知における進行性の機能低下が示されること

possible bvFTD: 下記の A-F の行動/認知症状のうち 3 つが持続的または反復して生じること

A. 病初期から(3 年以内)の行動の脱抑制 (社会的に不適切な行動、マナーや礼儀作法の欠如、衝動性、無分別または不注意な行動)

B. 病初期から(3 年以内)の無関心または無気力

C. 病初期から(3 年以内)の同情や共感の喪失 (他者のニーズや感情への応答の減少、社会的な関心、相互関係や人間的な温かみの減少)

D. 病初期から(3 年以内)の保続的、常同的、または強迫的/儀式的な行動 (単純な反復動作、恐怖、強迫または儀式的な行動、会話の常同性)

E. 口唇傾向と食嗜好の変化 (過食症、アルコールやタバコの消費の増加、食べられない物を口にする)

F. 実行課題の障害がみられるが、エピソード記憶や視空間認知機能は比較的保たれるとの神経心理学的特徴

probable bvFTD: 下記の A-C を全て満たすこと

A. possible bvFTD の診断基準を満たす

B. 介護者による報告か、Clinical Dementia Rating Scale または Functional Activities Questionnaire scores で示される重要な機能障害が存在する

C. 下記のいずれか 1 つで、bvFTD に一致した画像所見が示される

C.1. MRI または CT での前頭葉および/または側頭葉前方部の萎縮

C.2. SPECT または PET での前頭葉および/または側頭葉前方部の血流低下または代謝低下

bvFTD の除外診断基準: 下記の A および B は否定される必要があり、C は possible bvFTD では陽性でもよいが probable bvFTD では陰性である必要がある

A. 障害のパターンが他の非変性性神経疾患または身体疾患により説明できる

B. 行動障害が精神疾患により説明できる

C. バイオマーカーが Alzheimer 病または他の神経変性過程を強く示唆する

表 3. 原発性進行性失語 (PPA)の臨床診断基準 (文献 20 および文献 24 より改変引用)

選択基準: 下記の 1-3 を満たすこと

1. 主要な臨床的特徴は言語障害である
2. 言語症状が日常生活活動の障害の主な原因である
3. 病初期において失語症が主要症状である

除外基準: 下記の 1-4 が否定されること

1. 症状を他の非変性性の神経疾患または身体疾患で説明できる
2. 認知障害を精神疾患で説明できる
3. 初期に顕著なエピソード記憶、視覚的記憶、視知覚の障害が存在する
4. 初期に顕著な行動障害が存在する

語義型原発性進行性失語 (svPPA)の診断基準

主要症状: 以下の両者を満たすこと

1. 呼称の障害
2. 単語の理解の障害

他の症状: 以下のうち少なくとも3つが存在すること

1. 物品 (とくに使用頻度の低い見慣れない物)に関する知識の障害
2. 表層性失読/失書の存在
3. 復唱能力の保持
4. 発話能力(文法と発語)の保持

画像所見: 以下の両者が存在すること

1. 上記の臨床診断を満たす
2. 頭部画像検査において下記の特徴を1つ以上示す
 - a. MRI もしくは CT による前部側頭葉の著明な萎縮
 - b. SPECT または PET による前部側頭葉の著明な血流低下または代謝低下

非流暢/失文法型原発性進行性失語 (naPPA)の診断基準

主要症状: 以下のうち少なくとも1つが存在すること:

1. 言語産出における失文法
2. 一貫性の乏しい語音の誤りや歪みを伴った努力性のたどたどしい発話 (発語失行)

他の症状: 以下の少なくとも2つが存在すること:

1. 構文的に複雑な文章の理解の障害
-

2. 単語の理解の保持

3. 物品の知識の保持

画像所見: 以下の両者が存在すること:

1. 上記臨床診断を満たす

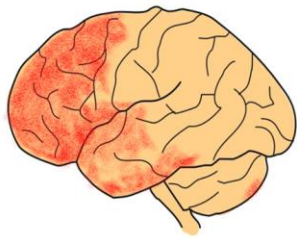
2. 頭部画像検査において下記の特徴を 1 つ以上示す

a. MRI または CT での左側の後部前頭葉-島回の著明な萎縮

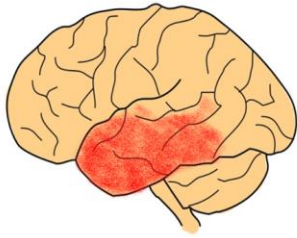
b. SPECT または PET での左側の後部前頭葉-島回の著明な血流低下または代謝低下

表 4. 前頭側頭葉変性症の原因となる主な遺伝子 (文献 65 より改変引用)

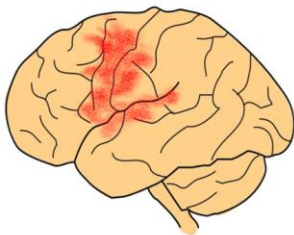
遺伝子名	遺 伝 子 座	比 率 (家 族 性 FTLD)	比 率 (孤 発 性 FTLD)	主 な 臨 床 的 表 現 型	主 に 蓄 積 す る 蛋 白 質
<i>CHAMP2B</i>	3p11.2	<1%	NA	FTLD	ubiquitin、 p62
<i>GRN</i>	17q21.32	5~20%	1~5%	FTLD	TDP-43
<i>MAPT</i>	17q21.32	5~20%	0~3%	FTLD	tau
<i>C9orf72</i>	9p21.2	25%	~5%	FTLD 、 ALS、 FTL D -ALS	TDP-43、 ジペプチ ドリピート蛋白質
<i>TBK1</i>	12q14.2	1~3%	NA	ALS、 FTL D	TDP-43
<i>OPTN</i>	10p13	<1%	NA	ALS、 FTL D	TDP-43、 OPTN
<i>VCP</i>	9p13.3	<1%	NA	ALS 、 FTLD、 MSP	VCP



行動異常型前頭側頭型認知症
(bvFTD)



意味性認知症 (SD) ・
意味型原発性進行性失語 (svPPA)



進行性非流暢性失語 (PNFA) ・
非流暢/失文法型原発性進行性失語
(naPPA)

図 1. 前頭側頭葉変性症で萎縮を呈する脳部位 (文献 67 を元に作成)
前頭側頭葉変性症の臨床サブタイプ別に、患者脳灰白質における主な萎縮部位のイメージ図を示す。行動異常型前頭側頭型認知症 (bvFTD)では前頭・側頭葉皮質、前部帯状回皮質、前部島回皮質、意味性認知症 (SD)・意味型原発性進行性失語 (svPPA)では前部側頭葉、進行性非流暢性失語 (PNFA)・非流暢/失文法型原発性進行性失語 (naPPA)では Broca 野を含む左下前頭回から島回にかけての領域の萎縮を認める。萎縮脳部位の機能障害に基づいて各臨床サブタイプに特徴的な症状が出現するとされる。

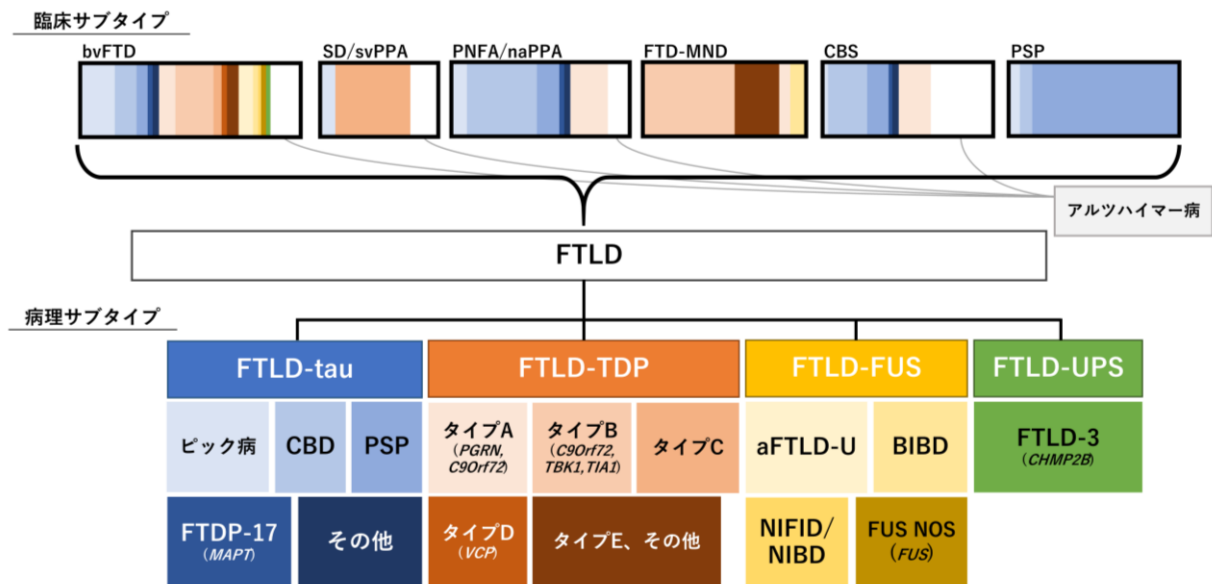


図 2. 前頭側頭葉変性症の各臨床型と病理型の相関 (文献 25 を元に作成)

前頭側頭葉変性症 (FTLD)の各臨床サブタイプと病理サブタイプとの相関を示す。行動異常型前頭側頭型認知症 (bvFTD)を呈する症例の背景にある病理サブタイプは多様である。意味性認知症 (SD)・意味型原発性進行性失語 (svPPA)を呈する症例の病理サブタイプは FTLD-TDP type C が多く、進行性非流暢性失語 (PNFA)・非流暢/失文法型原発性進行性失語 (naPPA)を呈する症例の病理サブタイプは FTLD-tau が多い。運動症状が前景となる皮質基底核症候群 (CBS)および進行性核上性麻痺 (PSP)の多くの症例では、病理学的にそれぞれ特徴的なタウ陽性構造の蓄積が認められる。なお、FTLD と臨床診断される症例の一部では、病理学的にアルツハイマー病が認められる。各病理サブタイプとの関連が報告される主な遺伝子名を斜体で併記する。

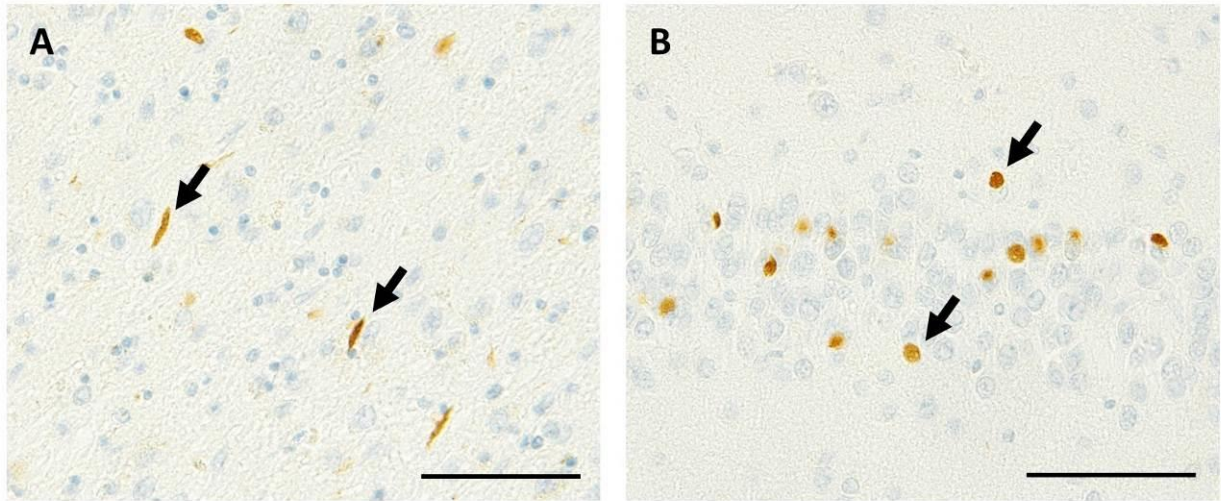


図 3. FTLD-TDP 患者脳において認められる病理学的所見

抗リン酸化 TDP-43 抗体による免疫組織化学染色を示す。A: FTLD-TDP タイプ C 症例の
大脳皮質に蓄積した変性神経突起 (矢印)。B: FTLD-TDP タイプ A 症例の海馬歯状回
に蓄積した神経細胞質内封入体 (矢印)。Scale bar: 50 μ m.

本章

1. 目的

FTLD と ALS は、それぞれ前頭・側頭葉と錐体路を障害の主領域とする神経変性疾患であるが [8, 38]、どちらも脳の神経細胞内やグリア細胞内に TDP-43 や FUS などの凝集体が蓄積し [1, 24, 29]、臨床的、病理学的、遺伝学的な重畳がみられる疾患スペクトラム (FTLD-ALS)として捉えられている [34, 40]。

特に TDP-43 は、ALS と FTLD のどちらにおいても最も主要な凝集蛋白質であり、TDP-43 の蓄積がみられる神経変性疾患は TDP-43 proteinopathy と総称される [1, 27, 29]。ALS-FTLD の患者脳の神経細胞では、TDP-43 は健常な核内局在を喪失し、細胞質や神経突起内などに局在を移して凝集する。TDP-43 陽性凝集体は神経細胞間を伝播し、その細胞毒性が神経変性に関与するとされる [30]。

ATXN2 は RBP の一種である ATXN2 をコードし、その exon 1 内に存在する CAG/CAA リピートの高度伸長変異 (>34)が、遺伝性のトリプレットリピート病である SCA2 の原因として知られてきた [18, 19, 21]。近年、このリピートの中程度伸長変異 (27~33)が、ALS における臨床的表現型の修飾因子としても判明し [12, 26]、また同変異が FTLD における臨床的表現型も修飾することが報告された [14, 25, 36]。培養細胞やモデル動物による実験では、ATXN2 が TDP-43 の異常な修飾や蓄積を促進すると報告されており [5, 12]、ATXN2 が ALS と FTLD のいずれにおいても TDP-43 の蓄積に関与する可能性が示唆されている。さらに、ATXN2 の発現量の減弱が TDP-43 の細胞毒性を減らすことが *in vivo* で示されたことで、ATXN2 は TDP-43 proteinopathy に対する新たな治療法開発の標的として注目されている [5]。しかしながら、ATXN2 に関するこれまでの知見は、培養細胞や動物を用いた研究によるものが多く、ヒト脳における ATXN2 の局在や機能については不明な点が多い。さらに、患者脳組織を用いた病理・生化学的研究は限られ、実際の患者脳内での変化などの詳細は未だ明らかでない。

本研究の目的は、このような背景を踏まえ、TDP-43 の蓄積を伴う FTLD (FTLD-TDP)の病態に ATXN2 が及ぼす影響を明らかにすることであり、そのために健常例と FTLD-TDP 症例各々の脳における ATXN2 の細胞内動態を、免疫組織化学的および生化学的手法を用いて解析した。

2. 対象と方法

2.1. Halo-ATXN2 および Flag-ATXN2 ベクターの作成

本研究のため、Halo-ATXN2 発現コンストラクト (pFN21A-Halo-ATXN2)を取得

した (Promega、WI、米国)。また、PrimeSTAR Max DNA Polymerase および In-Fusion HD Cloning Kit (TaKaRa bio、滋賀、日本)を用いたサブクローニングにより、pcDNA3-Flag-ATXN2 コンストラクトを作成した。

2.2. 培養細胞の維持およびトランスフェクション

ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SH5Y 細胞 (ATCC、MD、米国)を、10% (v/v)子牛胎児血清、ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミン (Gibco、CA、米国)、MEM 非必須アミノ酸溶液 (Gibco、CA、米国)が添加された Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 培地 (Sigma-Aldrich、ダルムシュタット、ドイツ)中で培養した。培養細胞は 5% (v/v) CO₂ を含む加湿環境下において 37°Cで維持した。6 ウェルプレート内で 50%コンフルエントまで増殖させた後、製造元の指示に従って X-tremeGENE9 (Roche、バーゼル、スイス)または FuGENE6 (Roche、バーゼル、スイス)を用いてプラスミド (通常 1 µg)をトランスフェクトした。

2.3. 培養細胞からのサルコシル可溶性画分の調製およびウェスタンブロット解析

プラスミドがトランスフェクトされた SH-SY5Y 細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS)で洗浄した。細胞は 1% (w/v)サルコシルを含む 1 ml の A68 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.8 M NaCl, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10% (w/v)スクロース)にソニケーションにより溶解した。細胞溶解液を 37°Cで 30 分間インキュベートした後、150,000 ×g、25°Cで 20 分間超遠心し、上清をサルコシル可溶性画分として回収した。この画分の蛋白質濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher、MA、米国)を用いて測定した後、SDS サンプルバッファーに加えて 5 分間煮沸し、マウスモノクローナル抗 ATXN2 抗体 (1:1,000)およびウサギポリクローナル抗 ATXN2 抗体 (1:2,000) (表 1)を用いてウェスタンブロット解析した。バンドのシグナルは、画像解析装置 LAS-4000 (富士フイルム、東京、日本)により検出された。

2.4. 免疫組織化学染色および共焦点顕微鏡による観察

本研究の免疫組織化学的解析および生化学的解析のために、東京都立松沢病院、愛知医科大学、Manchester Brain Bank よりヒト死後脳組織の提供を受けた。各症例の詳細について表 2 に示し、個々の解析において用いたヒト脳標本の内訳を表 3 に示した。神経病理学的検討のため、以下の 2 種類の固定・保存法に

よって処理した切片を使用した:

- ①10% (w/v) FA 中で 72 時間固定後パラフィンに包埋したヒト脳組織ブロックを、ミクロトーム (大和工機、埼玉、日本)を用いて 10 μm 厚に薄切し、スライドガラスにマウントした切片。
- ②4% (w/v)パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) 中で 72 時間固定後 20% (w/v)スクロース/PBS 中に 4°Cで保存したヒト脳組織ブロックを、凍結マイクロトーム (Leica, Wetzlar、ドイツ)を用いて 30 μm 厚に薄切し、FRONTIER コーティングスライドガラス (Matsunami、大阪、日本)にマウントして乾燥させた切片。

切片は、先行研究における手法を一部修正して 10 mM pH 6.0 クエン酸ナトリウム緩衝液中でのオートクレーブによる 121°C、20 分間の加熱、もしくは 1 mM pH 9.0 EDTA を添加した 10 mM Tris-base 緩衝液中での圧力鍋 (Groupe SEB、Écully、フランス)による 120°C、10 分間の加熱により処理された [23]。切片を 1.5% (v/v) H_2O_2 を加えた 70% (v/v)エタノール中で 30 分間インキュベートして内在性ペルオキシダーゼを不活化し、0.3% (v/v)Triton X-100 と 5% (v/v)健常ヤギ血清を加えた PBS 中で 1 時間ブロッキングした後、適切な一次抗体を含む溶液中で 3 日間インキュベートした。本実験で使用した一次抗体について表 1 にまとめた。

ペルオキシダーゼ標識には、2 種類の抗 ATXN2 抗体 (モノクローナル (611378; BD Biosciences)またはポリクローナル (#PA5-78845; Thermofisher))のいずれかを含む溶液でインキュベートした後、切片をビオチン標識二次抗体で 2 時間インキュベートし、アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex: ABC)法 (Vecstain Elite Kit、Vector Laboratories、CA、米国)で検出し、ジアミノベンジジン (和光、東京、日本)で発色した。切片はヘマトキシリンで対比染色した。

単染色または二重染色による蛍光標識には、脳切片に前述のように加熱処理、内在性ペルオキシダーゼの不活化、ブロッキングを行った後、以下の一次抗体のうちの 1 種類または 2 種類を含む溶液中で 3 日間インキュベートした: 前述した 2 種類の抗 ATXN2 抗体、抗 PABP1 抗体 (ポリクローナル、#4992、CST)、抗 TDP-43 抗体 (モノクローナル、H0023435-M01、AVNOVA)、抗リン酸化 TDP-43 (pTDP-43)抗体 (ポリクローナル、Made by Dr. M. Hasegawa [17])、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER)マーカー (抗 Calnexin、モノクローナル、#2679、CST)、

リボソームマーカー (抗 RPS6、モノクローナル、#2217、CST)、リソソームマーカー (抗 Lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1)、ポリクローナル、ab24170、abcam)、ゴルジ装置マーカー (抗 Golgi Glycoprotein 1 (GLG1)、ポリクローナル、ab103439、abcam)。切片を洗浄し、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (Proteintech、IL、米国)および TRITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG (Proteintech、IL、米国)のうち一方もしくは両方を含む溶液中でインキュベートした。自家蛍光の低減のため、切片を TrueBlack (Biotium、CA、米国)で後処理した。さらに洗浄した後、切片を ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (ThermoFisher、MA、米国)を用いて封入した。TCS-SP8 共焦点顕微鏡 (Leica、Wetzlar、ドイツ)および LAS X ソフトウェア (Leica、Wetzlar、ドイツ)を用いて、241 nm の分解能の蛍光画像を、2 μm 間隔で連続した 2 枚のスタック画像として取得した。

2.5. 蛍光画像の定量的解析

健常例 (表 2 の case 1、2、3)および FTLD-TDP 症例 (case 15、16、17)、各 3 例から得られた蛍光画像を、Fiji ソフトウェア (国立衛生研究所、MD、米国)を用いて画像処理し、定量的に解析した。

細胞質における生体分子の蛍光強度を定量的に解析するため、前述した 6 例の PFA 固定脳切片を同様の手順で免疫染色した。細胞質内に自動で設定された 50 箇所以上の関心領域 (Region of interest: ROI)について、integrated density および corrected total cell fluorescence (CTCF)を、先行研究と同様の手法により算出した [33]。Integrated density は、単位面積 (μm^2)あたりの ROI 内の平均蛍光強度を表す。また、CTCF は、integrated density からバックグラウンドの蛍光強度を減じた補正值を表しており、(Integrated density - (ROI の面積 \times バックグラウンド蛍光の平均値))の式に基づいて算出される。両群から得られた integrated density と CTCF の平均値を統計的に比較した。

ATXN2 と、細胞質内のオルガネラマーカーや ATXN2 の関連分子である PABP1 と TDP-43 との共局在解析のためには、前述した 6 例から得られた蛍光画像にバックグラウンド蛍光の低減および二次元デコンボリューションによる標準化を行った後、ピアソン相関係数 (Pearson's correlation coefficients above threshold: PCC) とマンダース共局在係数 (Manders' colocalization coefficients above threshold: tM) 1 および 2 (tM₁ および tM₂)を算出した。PCC は-1 (完全な逆相関)から 1 (完全な相関)までの値をとり、2つのプローブの全般的な線形相関の程度を示す。本研究では、過去の文献を参考として、PCC 値が-0.5 より大きく 0.5 未

満である場合には 2 つのプロープの相関が弱いと便宜的に判断した [7]。Green と Red の蛍光二重染色画像から、PCC は次のように求められる：

$$PCC = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

ここで、 G_i と R_i は画像内のピクセル i における Green と Red のチャンネルの蛍光強度をそれぞれ表し、 \bar{G} と \bar{R} は Green と Red のチャンネルの平均蛍光強度を表す。2 つの tM 値のうち、 tM_1 は、自動で設定された閾値以上の Red の蛍光を含む区域内での Green の蛍光を含む区域の割合を 0 から 1 までの範囲で示し、同様に tM_2 は、閾値以上の Green の蛍光を含む区域内での Red の蛍光を含む区域の割合を示す。tM には、有意な共局在を示す閾値が確立していないため、便宜上、tM の値を high ($0.8 \leq tM$)、moderate ($0.65 \leq tM < 0.8$)、low ($tM < 0.65$) と暫定的に分類した。 tM_1 および tM_2 の計算式は以下の通りである：

$$tM_1 = \frac{\sum_i G_{i,colocal}}{\sum_i G_i} \quad tM_2 = \frac{\sum_i R_{i,colocal}}{\sum_i R_i}$$

ここで、 $R_i >$ 閾値であれば $G_{i,colocal} = G_i$ 、 $R_i \leq$ 閾値であれば $G_{i,colocal} = 0$ であり、また $G_i >$ 閾値であれば $R_{i,colocal} = R_i$ 、 $G_i \leq$ 閾値であれば $R_{i,colocal} = 0$ である。 tM_1 および tM_2 は、それぞれ前述したモノクローナルおよびポリクローナル ATXN2 抗体を用いた共局在解析において算出され、各々 15 箇所以上の ROI における相関係数の平均値を算出した。また Green と Red の信号強度をそれぞれ x 軸と y 軸にプロットした二次元散布図を作成した。

2.6. 培養細胞とマウス脳を用いたポリソームプロファイル解析

SH-SY5Y 細胞とマウス脳を用いたポリソームプロファイル解析を、先行研究における手法を一部修正して実施した [32, 39]。SH-SY5Y 細胞を 4 枚の 10 cm ディッシュ内で約 90% コンフルエントとなるまで増殖させた。その後、0.1 mg/ml シクロヘキシミド (和光化学、東京、日本) を添加した培地中で 37°C、15 分間培養し、0.1 mg/ml シクロヘキシミドを添加した氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、1 ml のポリソーム溶解緩衝液 (25 mM Tris-HCl、pH 7.5、100 mM KCl、5 mM MgCl₂、0.2 mg/ml ヘパリン、0.3% (w/v) Triton X-100、1 mM ジチオスレイトール) に溶解した。細胞溶解液を遠心チューブに移し、2 分ごとに転倒混和しながら氷上で 10 分間インキュベートした。10,000 ×g、4°C で 10 分間遠心分離してポストミトコンドリア上清を取得して新しい遠心チューブに移した後、ポリソーム溶解緩衝液をもとに作成した 10 ml の 10-50% (w/v) 濃度勾配スクロース溶液に慎重に

上乘せした。スイングローターを用いて 259,000 ×g、4°Cで 90 分間遠心分離した。遠心後のスクロース溶液を、チューブの底部より 260 nm の波長における吸光度を測定しながら 0.75ml ずつの画分として回収した。各画分に同量の 20% (v/v) トリクロロ酢酸溶液を加えて氷上で 30 分間インキュベートした後、15,000 ×g、4°Cで 10 分間遠心した。上清を捨て、沈殿を氷冷アセトンで洗浄し、再度 15,000 ×g、4°Cで 10 分間遠心した。上清を除去して乾燥させた沈殿をソニケーションにより SDS サンプルバッファー 80 μl に溶解して 5 分間煮沸した。これらのサンプルを等量ずつ使用し、マウスモノクローナル抗 ATXN2 抗体 (1:250) およびウサギモノクローナル RPS6 抗体 (1:3,000) を用いたウェスタンブロットにより解析した。本実験で使用した抗体について表 1 にまとめた。

マウス脳のポリソームプロファイル解析には、東京都医学総合研究所動物研究部門で飼育された 6 週齢の雄マウス (個体認識番号 C57BL/6JmsSlc、2019 年 7 月 22 日生) を用いた。6 週齢のマウスをペントバルビタール麻酔で安楽死させて断頭し、脳を摘出した。全脳あたり 4 ml の氷冷されたポリソーム溶解緩衝液中に摘出した脳を入れ、直ちにモーター駆動ガラステフロンホモジナイザーで破碎した。ホモジナイズした組織を新しいチューブに移し、10,000 ×g、4°Cで 20 分間遠心分離した。その上清を前述した濃度勾配スクロース溶液に上乘せし、以降は SH-SY5Y 細胞においてと同様に作業した。ポリリボソームを EDTA により解離させる実験においては、ポリソーム溶解緩衝液中の MgCl₂ を 25 mM EDTA で置換して同様に作業した。

本研究でのマウス実験は、東京都医学総合研究所動物実験倫理委員会 (第 19082 号) により承認を受けて実施され、また 3R (reduce, reuse, recycle) の原則に基づき動物愛護の観点から使用する動物の数が最小限となるよう慎重に設計された。

2.7. 定量的ウェスタンブロット解析

ヒト脳を用いた定量的ウェスタンブロット解析のため、RIPA 可溶性画分、粒子画分、サルコシル不溶性画分を、先行研究における手法を一部修正して調製した [6, 11, 18]。凍結脳組織 0.2 g を、氷冷された 1% (w/v) Nonidet P-40 を含む RIPA 緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.5% (w/v) デオキシコール酸ナトリウム、0.5% (w/v) SDS、1 mM PMSF、プロテアーゼ阻害剤 (Roche、バーゼル、スイス)) に入れ、直ちにモーター駆動ガラステフロンホモジナイザーで破碎し、氷上で 15 分間インキュベートしてから

16,000 ×g、4°Cで 20 分間遠心分離した。上清の一部を SDS-サンプルバッファーに添加して 5 分間煮沸処理した (RIPA 可溶性画分)。残った 900 μl の上清を新しいチューブに移し、さらに 150,000 ×g、4°Cで 20 分間超遠心した。上清を除去し、沈殿を SDS-サンプルバッファーに可溶化して 5 分間煮沸処理した (粒子画分)。前述した 16,000 ×g の遠心分離で生じた沈殿を、2% (w/v)サルコシルを含む A68 緩衝液 4 ml に溶解し、37°Cで 30 分間インキュベートしてから 15,000 ×g、25°Cで 10 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、さらに 150,000 ×g、25°Cで 20 分間遠心した。沈殿をソニケーションにより SDS-サンプルバッファーに溶解し、5 分間煮沸処理した (サルコシル不溶性画分)。各 RIPA 可溶性画分の蛋白質濃度を、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher、MA、米国)を用いて測定した。各標本中の蛋白質量が等しくなるようにウェスタンブロット解析を行い、モノクローナル抗 ATXN2 抗体 (1:500)、モノクローナル RPS6 抗体 (1:3,000)、ポリクローナル pTDP-43 抗体 (1:1,000)を用いてバンドを検出した。また、ローディングコントロールとして、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)抗体によるウェスタンブロット解析を行った。本実験で使用した抗体を表 1 にまとめた。各バンドのシグナル強度を Fiji ソフトウェア (米国国立衛生研究所、MD、米国)を用いて定量化し、健常例 (case 2、3、4、5、6、7)と FTLD-TDP 症例 (case 16、18、19、20、21、22)、各 6 例から得られた解析値の平均値を統計学的に比較した。

2.8. 統計学的解析

蛍光画像の定量的解析における有意差の判定には、対応のないスチューデントの t 検定を用いた。有意水準は $P \leq 0.05$ ($*P \leq 0.05$ 、 $ns = P > 0.05$)とした。ヒト脳を用いた定量的ウェスタンブロット解析では、Mann-Whitney U 検定を用いて有意差を判定した。有意水準は $P < 0.01$ ($*P < 0.01$ 、 $ns = P \geq 0.01$)とした。図表内のデータは全て平均値±標準偏差を示している。

2.9. 倫理的配慮

本研究は、東京都立松沢病院倫理委員会 (第 2019-28 号)、愛知医科大学医学部倫理委員会 (第 2019-M019 号)、筑波大学医学医療系医の倫理委員会 (第 1271 号)の承認を受けて行われた。

3. 結果

3.1. ヒト健常脳および FTLD-TDP 患者脳における ATXN2 の分布

本研究では、モノクローナル(611378; BD Biosciences)とポリクローナル(#PA5-78845; Thermofisher)の2種類の市販 ATXN2 抗体を使用した。これらの抗体の ATXN2 に対する抗原特異性は、異なる ATXN2 発現プラスミドを形質導入した培養細胞のウェスタンブロット解析によって確認した(補足図 1)。次に、ヒト脳切片を用いた免疫染色法で、免疫反応が最も高まる手技を確立するため、固定・保存法の異なる2種類の検体を用いて2種類の抗原賦活法を行い、比較検討した(補足図 2)。固定・保存法の違いに関しては、ATXN2 の免疫反応性は FA 固定してパラフィン包埋処理を行った切片では著しく減弱していた一方で、PFA 固定して 20% (w/v)スクロース/PBS 中に 4°C で保存した切片では強い免疫陽性像が得られ、この切片では神経細胞の核周部および近位樹状突起での局在が認められた。2種類の抗原賦活法を比較すると、Tris-EDTA 緩衝液 (pH 9.0) による抗原賦活により神経細胞内の ATXN2 による免疫反応性はさらに増強された。さらに、双方の抗体は概ね同等の免疫染色像を示したものの、モノクローナル抗体ではポリクローナル抗体に比べてバックグラウンドにおける非特異的免疫反応がより弱かった。このため、以降の実験においてはモノクローナル抗体を使用し、また PFA 固定後にスクロース/PBS 中に保存した切片を Tris-EDTA 緩衝液 (pH 9.0) により加熱処理する手法により免疫組織化学的検討を行うこととした。

次に、健常ヒト脳における ATXN2 陽性神経細胞の分布を検討した(図 1)。ATXN2 による免疫反応性は、大脳新皮質(図 1A、B)、海馬 CA1-4 領域および歯状回(図 1C、D)、線条体(図 1E)、Purkinje 細胞(図 1F、矢印)、黒質緻密部(図 1G)、脊髄前角細胞(図 1H)を含む全ての評価部位で観察された。ATXN2 は核周部においてびまん性もしくは顆粒状の染色像として免疫標識され、とくに大脳新皮質、海馬 CA2-4、黒質緻密部の神経細胞では、先端樹状突起および基底樹状突起の近位部も免疫標識された(図 1B、D、G)。グリア細胞および軸索はほとんどが免疫陰性であった。大脳新皮質では、ATXN2 による免疫反応は第 II-VI 層に存在し、特に III および V 層の比較的大きな錐体細胞に認められた(図 1A)。一方、ATXN2 は第 II 層および第 IV 層に存在する小型の有棘星状細胞では観察されなかった。なお、ATXN2 による免疫反応性は前頭葉皮質と側頭葉皮質ではほぼ同等であった。海馬では、ATXN2 による免疫反応性は CA1 領域において他の領域よりも弱かった(図 1C)。一方で、CA2-4 では、ニューロピルにおいても線

状や点状の免疫反応を認め、これは黒質緻密部でも認められた (図 1D、G)。線条体では、ATXN2 による免疫反応性は、中型の有棘神経細胞よりも大型介在ニューロン (図 1E、矢印およびインセット) でより強く認められた。これらの結果により、健常ヒト健常脳では、海馬と線条体などの一部の神経細胞群を除き、ATXN2 が広汎かつ同程度に発現していることが明らかとなった。

次に、FTLD-TDP 症例 3 例を健常例と同様の方法により同時に免疫染色して比較したところ、全ての FTLD-TDP 例において、大脳新皮質の神経細胞における ATXN2 の免疫反応性の低下が認められた (図 1I、J)。しかしながら、FTLD-TDP 症例の脳内で残存する神経細胞内の ATXN2 は、健常例と同様に核周部細胞質および近位樹状突起内に局在し、細胞内局在に大きな変化は認められなかった (図 1J)。

3.2. ATXN2 の細胞内局在に関する免疫組織化学的検討

ヒト脳内で ATXN2 が局在する細胞内小器官を特定するために、ER、リボソーム、ゴルジ体、リソソームのマーカー抗体である Calnexin、RPS6、GLG1、LAMP1 に対する抗体を用いた蛍光免疫二重染色を施行し、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP8、Leica、Wetzlar、ドイツ) 観察による共局在解析を行った。また、ATXN2 との相互作用が報告されている関連蛋白質の PABP1 と TDP-43 も同様に解析した [4, 11, 12, 31]。健常例 3 例の脳から側頭葉皮質浅層、海馬 CA1、海馬支脚、海馬傍回における神経細胞の蛍光二重染色画像をそれぞれ取得し、相関係数の平均値を算出した。なお、遠赤波長の蛍光画像を同時に取得し、自家蛍光が結果に影響していないことを確認した。健常例の側頭葉皮質から取得した蛍光画像および各プローブによる蛍光強度をプロットした 2 次元散布図を図 2 に示した。また、得られた相関係数の値を表 4 にまとめた。

ATXN2 は、ER マーカーである Calnexin と peripheral ER において部分的に共局在したが、nuclear envelope では共局在しなかった (図 2A)。これらの蛋白質の部分的な重畳を反映して、PCC は有意な値を示さなかった ($0.40 < PCC < 0.46$) もの、ATXN2 による免疫反応と Calnexin による免疫反応の重畳率を示す tM は中等度の値 (0.75 前後) を示した。これらの結果により、ATXN2 は peripheral ER に存在するが、他の細胞内領域にもより広範に分布することが示唆された。対照的に、ATXN2 は細胞質内のほとんどの部分でリボソーム蛋白質 RPS6 と重畳もしくは隣接していた (図 2B)。ATXN2 と RPS6 との相関係数は両者の有意な線形相関と重畳を示し ($0.60 < PCC < 0.75$ 、 $tM > 0.9$)、これらの蛋白質が強く共局

在することを示唆していた。一方、ATXN2 はゴルジ体マーカーGLG1 やリソソームマーカーLAMP1 とはほとんど重畳せず (図 2C、D)、それらの相関係数値も有意な共局在を示さなかった ($-0.5 < PCC < 0.5$ 、 $tM < 0.65$)。PABP1 による免疫反応は ATXN2 と同様の細胞質内局在を呈し、ATXN2 と PABP1 との重畳が細胞質内全体で観察された (図 2E)。PABP1 は、ATXN2 との間に RPS6 と類似した強い線形相関を示し ($0.70 < PCC < 0.78$)、両者の tM も 90%以上であった。一方、ATXN2 と主に核内に局在する TDP-43 との間には共局在が認められず (図 2F)、有意な相関係数値は得られなかった。

次に、FTLD-TDP 症例 3 例についても同様に蛍光二重染色画像の取得と相関係数の解析を行って健常例と比較した。FTLD-TDP 症例の脳において、ATXN2 による免疫反応性は健常例よりも弱い傾向がみられたが、その神経細胞質内での局在パターンは健常例から変化しておらず(図 3A-F)、図 3G-J にグラフで示したように PCC および tM の値も顕著な差を示さないことが確認された。FTLD-TDP 症例の解析により得られた相関係数の値は表 5 にまとめた。なお、本研究で評価したマーカー蛋白質のうち、LAMP1 による免疫反応は FTLD-TDP 症例の全ての評価部位において顕著に低下しており、これは以前の報告における結果 [2]とも一致した。ただし、LAMP1 と ATXN2 との相関係数値は健常例からの変化を示さなかった ($-0.26 < PCC < 0.17$ 、 $tM < 0.50$)。また、ポリクローナル ATXN2 抗体を用いた免疫組織染色において、FTLD-TDP 症例の変性神経突起内に集積する TDP-43 (図 3F、アスタリスク)は陽性像を示さなかった。FTLD-TDP で特徴的に認められる pTDP-43 陽性構造に ATXN2 が局在するかをさらに検討するため、FTLD-TDP 症例の海馬傍回および海馬歯状回の標本を用いて、ポリクローナル ATXN2 抗体よりも非特異的免疫反応が少ないモノクローナル ATXN2 抗体と pTDP-43 抗体による蛍光免疫二重染色を行った。その結果、pTDP-43 に陽性となる変性神経突起および神経細胞質内封入体は、モノクローナル ATXN2 抗体によっても陽性となり、双方の蛍光シグナルはオーバーレイ画像において共局在した (図 4A、C)。この結果を踏まえて、モノクローナル ATXN2 抗体を用いてペルオキシダーゼ標識免疫組織染色された同領域の切片を注意深く観察したところ、pTDP-43 陽性の変性神経突起および神経細胞質内封入体にそれぞれ類似した陽性像 (図 4B および図 4D、矢印)が、蛍光染色においてと同様に確認された。

3.3. ATXN2 の細胞内局在に関する生化学的検討

ATXN2 とリボソームとの関連を生化学的な手法によっても検討するため、SH-SY5Y 細胞 (補足図 3) または動物脳 (図 5) の抽出物を使用し、密度勾配スクロース溶液によりポリソームプロファイルを解析した。ヒト組織標本は死後剖検までの間に RNA が分解するために本実験の結果に影響しうるため、マウス脳を使用した。各標本の解析により得られた RNA 吸光度曲線およびウェスタンブロット解析の結果を、図 5A および補足図 3A に示す。培養細胞およびマウス脳を用いた解析の双方で、モノソーム画分およびポリソーム画分における ATXN2 と RPS6 の存在を確認した。さらに同じ検体を、 $MgCl_2$ の代わりに EDTA を含むポリソーム溶解緩衝液に溶解して同様の実験を行った。EDTA は Mg^{2+} イオンをキレートすることでリボソームの大小のサブユニットを解離させる [10]。EDTA 処理を行った結果、ポリソームおよび 80S モノソームは解離し、それらは RNA 吸光度曲線で示されているように濃度勾配スクロース溶液中でより低比重の画分に移動した。また、ウェスタンブロット解析によっても、ポリソーム画分中の ATXN2 および RPS6 によるバンドの顕著な減少が検出された (図 5B、補足図 3B)。こうした RNA 吸光度曲線やウェスタンブロット結果の変化は、ATXN2 やリボソームに結合する別の RBP に関する類似実験とも一致していた [37, 39]。これらの結果から、内在性 ATXN2 が *in vitro* および *in vivo* の双方でポリソームとの結合を介して哺乳類の翻訳機構に関わることが確認された。

3.4. 健常脳および FTLN-TDP 患者脳における ATXN2 の細胞内局在および発現の比較

図 1I、J に示したように、FTLN-TDP 症例では健常例と比較して ATXN2 の免疫組織化学染色における免疫反応が減弱していた。この所見を確認するため、健常群と FTLN-TDP 症例、各 3 例の側頭葉皮質において、ATXN2 とその関連蛋白質である RPS6 および PABP1 の免疫反応を、蛍光免疫強度により定量化して比較した。神経細胞質に設定した ROI 内の integrated density と CTCF を算出したところ、ATXN2 による蛍光強度は健常群と比較して FTLN-TDP 症例で有意に低く、一方で RPS6 と PABP1 による蛍光強度は健常群と疾患群の間で有意な差を示さなかった (図 6)。

さらに、健常群と FTLN-TDP 症例、各 6 例の脳ホモジネートを用いた生化学的解析を行い、ATXN2 の蛋白質発現量を比較した (図 7)。ATXN2、RPS6、pTDP-43、GAPDH に対する抗体を用いた各標本のウェスタンブロット解析結果を図 7A に

示す。これらのバンドのシグナル強度を定量化し、両群で比較した結果を図 7B に示す。ATXN2 の蛋白発現量は、FTLD-TDP 症例で健常例と比べて有意に低下していた。比較のために RPS6 の蛋白発現量を同様に解析したところ、両群間に有意な差は認められなかった。なお、サルコシル不溶性画分中の pTDP-43 のバンドは、FTLD-TDP 症例でのみ認められた。

4. 考察

ATXN2 に関する先行研究は、ほとんどが *in vitro* 実験や動物実験によるものであり [4, 11, 20, 31, 35, 37, 42]、ヒト脳に関する研究は乏しい。そして少数存在するヒト脳を用いた免疫組織化学的検索による報告も、FA 固定パラフィン包埋切片という検出感度の低い手法によるものであることから、ATXN2 の詳細な脳内分布や細胞内局在については未だ不明な点が多い [12, 18]。本研究は、剖検脳の固定・保存法、切片の作成法、抗原賦活法、使用する抗体の感度および特異性等についてあらかじめ詳細に検討し、ATXN2 の検出感度が最も高い方法を見いだした上で検討していることがこれまでの研究にない特色の一つである。

まず、本研究では、ヒト健常脳における ATXN2 の分布および細胞内局在を詳細に明らかにした。すなわち、ATXN2 の免疫反応は神経細胞に認められ、ATXN2 陽性神経細胞は、前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬、線条体、小脳 Purkinje 細胞、中脳黒質、脊髄前角など検索した全ての脳領域に広汎に分布していた。この ATXN2 陽性神経細胞の脳内分布は、Huynh らによる FA 固定パラフィン包埋切片を用いた低感度の免疫染色による結果と概ね一致していたが、次のようないくつかの相違点が認められた。①彼らは Purkinje 細胞の ATXN2 染色性が他の部位の神経細胞よりも強いと指摘しているが、本研究の結果では同程度であった。②本研究では、線条体の大型神経細胞の ATXN2 染色性が同部位の小型神経細胞や他の部位の神経細胞より強い傾向が認められた。③彼らの結果では、神経細胞内の ATXN2 免疫反応性は核周部細胞質にほぼ限局して認められるが、本研究の結果では、多くの領域で神経細胞体のみならず先端樹状突起および基底樹状突起の近位部にも認められた。また、海馬や黒質などの一部の領域では、neuropil に dot 状の ATXN2 免疫反応が認められた。

これらの結果を考察すると、まず①に関しては、ATXN2 が SCA2 の原因遺伝子として同定されたことから、ヒト脳における ATXN2 は小脳における高発現が目撃されてきた経緯があるが、本研究の結果から、ATXN2 は小脳 Purkinje 細胞に高発現しているというわけではなく、全脳の神経細胞に広汎かつ概ね同程度

に発現していることが明らかになった。大脳皮質においても、前頭葉と側頭葉における ATXN2 の染色性は同程度であったが、これも両領域において ATXN2 遺伝子が同等に発現しているとする過去の報告と一致している [21]。ただし、本研究では、②の線条体における大型神経細胞と小型神経細胞間の ATXN2 染色性の差が認められていることから、細胞種によってその発現が異なる可能性はあり、mRNA の発現を含めてさらなる検討が必要である。さらに、③の新知見に関して、ATXN2 が細胞体だけでなくより末梢の領域にも存在することが示されたことは、ATXN2 が RNP 顆粒の生成に関与して細胞内輸送に寄与するとの近年の報告 [3]と一致しており、興味深い。以上の結果から、ATXN2 は細胞内の多くの領域において多様な機能に関連している可能性が示唆された。

さらに、健常ヒト脳における ATXN2 のより詳細な細胞内局在について、蛍光二重染色により検討した結果、リボソームマーカーである RPS6、および ATXN2 とポリリボソームとの結合の促進因子と考えられている PABP1 が、ATXN2 と強く共局在していたことから、ATXN2 がリボソームに局在していることが示唆された。このことは、培養細胞とマウス脳を用いたポリソームプロファイルの解析において、ATXN2 とリボソームとの直接的な結合が示されたことからさらに支持された。以上の結果は、*in vitro* 実験および動物実験でこれまでに示された ATXN2 のリボソームへの局在や翻訳機構への関与[4, 13, 37]に一致するとともに、ATXN2 がヒト脳においても同様の役割を有する可能性を示唆している。さらに、PABP1 は mRNA の polyA tail に結合して pre-mRNA のスプライシングや mRNA 安定化といった mRNA 代謝プロセスを制御することから [35]、ATXN2 はヒトの脳内で PABP1 と協働してこうした機能に関与している可能性が示唆される。次に、ER およびゴルジ装置への ATXN2 の局在が培養細胞、マウス脳、ヒト脳ホモジネートを用いたいくつかの先行研究で報告されているため、ヒト脳における ATXN2 とこれらのオルガネラマーカーとの共局在について検討した。その結果、ATXN2 は部分的に ER に局在するが、ゴルジ装置には局在しないことが判明した。これらの結果から、ATXN2 はリボソームが存在する細胞内領域に広く局在すること、および ATXN2 が分泌蛋白質を生成する膜結合型リボソームだけでなく、細胞内で利用される蛋白質を生成する遊離型リボソームにも結合していることが示唆された。

次に、FTLD-TDP の患者脳における ATXN2 の局在を免疫組織化学染色および生化学的解析により検討し、健常脳の結果と比較したところ、ATXN2 は患者脳

の神経細胞において健常脳と同様の局在パターンを示し、さらに FTLD-TDP に特徴的な病理構造である pTDP-43 陽性の変性神経突起および神経細胞質内封入体にも共局在した。Elden らは、FTLD-TDP 症例の側頭葉皮質内に、ATXN2 陽性の「Thread 様封入体」と記載した免疫陽性構造物が核膜周囲や神経突起内に出現し、さらに細胞質内の「round 状封入体」は TDP-43 と共局在すると報告しているが [12]、変性神経突起における pTDP-43 と ATXN2 の共局在は本研究で初めて確認された。この発見から ATXN2 は、FTLD-TDP における TDP-43 陽性凝集体の形成過程に少なくとも部分的に関与することにより、神経変性を促進している可能性が示唆された。

また、FTLD-TDP 患者脳において、ATXN2 の発現が低下している可能性が本研究によって初めて明らかになった。近年の培養細胞および複数のモデル動物を用いた実験 [5, 12]においては、ATXN2 が TDP-43 の凝集・蓄積過程を促進することで TDP-43 による神経毒性を増強しており、また ATXN2 の発現抑制が TDP-43 による毒性を減衰させることで TDP-43 proteinopathy に対する治療標的となりうる可能性が示されてきた。Elden らは、TDP-43 を発現する酵母およびショウジョウバエモデルにおいて、ヒト ATXN2 の相同遺伝子を過剰発現させることにより TDP-43 による毒性が増強され、またその発現抑制により TDP-43 の毒性が抑制されることを見出した [12]。また、Becker らによる報告 [5]では、ATXN2 ノックアウトマウスと、TDP-43 陽性構造が脳内に蓄積する TDP-43 トランスジェニックマウスを交配させたところ、ATXN2 の欠失によりマウスの生存期間や運動機能の改善と TDP-43 陽性凝集体の減少が認められた。さらに、ATXN2 を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与によっても、TDP-43 トランスジェニックマウスの生存期間が顕著に改善した。これらの知見を踏まえると、本研究で認められた ATXN2 発現量の低下は、ATXN2 による TDP-43 凝集・蓄積の促進作用を減衰させ、TDP-43 による細胞毒性の緩和を図るための神経保護的な代償機転として二次的に生じたダウンレギュレーションである可能性が考えられる (補足図 4)。

もう一つの仮説としては、ATXN2 の発現減少が TDP-43 病理の上流に存在し、その機能喪失によって TDP-43 蓄積が引き起こされる可能性が考えられるが、この仮説は上述の Elden らや Becker らの結果とは合致しない。しかし、何らかの理由で ATXN2 の発現が減少した場合、それが TDP-43 蓄積との関わりとは別に、生体に悪影響を及ぼす可能性は否定できない。FTLD-ALS では、いくつかの疾

患関連 RBP の正常な細胞内局在の喪失が報告されており [22, 41]、このことから RNA 代謝異常が生じ、神経変性が誘導されるという loss-of-function 仮説が提唱されている [9, 15, 28]。ATXN2 も RBP の一種であるが、主要な局在部位がリボソームであることから、その発現低下は RNA 代謝異常よりは翻訳機構の異常を呈し、loss-of-function による神経変性を誘導する可能性が考えられる。実際に、ATXN2 ノックアウトマウスでは、RPS6 のリン酸化によって翻訳機構が亢進するものの、全般的な蛋白質の生成率は低下することが報告されている [13]。ヒト脳でも、ATXN2 の発現低下により神経機能に重要である蛋白質の生成量が不足する可能性は否定できない。その場合、TDP-43 蓄積による毒性を緩和するための ATXN2 の発現量低下が、ある段階から神経変性を促進する病的なものに変わっていく可能性がある。ただし、本研究で観察された ATXN2 の発現低下が、神経変性につながるほどの loss-of-function をもたらすのに十分であるかは今後の課題である。

なお、本研究で認められた ATXN2 の TDP-43 陽性構造における共局在および発現低下が、FTLD-TDP に特異的な変化であるか、もしくは ALS や大脳辺縁系優位型老年期 TDP-43 脳症 (limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy: LATE) といった他の TDP-43 proteinopathy においても生じるかは未だ検討されていない。さらに、タウや α シヌクレインなどが蓄積する他の神経変性疾患の患者脳における ATXN2 の病理・生化学的変化に関する研究もほとんどない。今後、これらの神経変性疾患における ATXN2 の関与が解明されれば、現在 ALS の新たな治療法として期待されている ATXN2 アンチセンス治療が、より多様な神経変性疾患に対して有効である可能性があり、さらなる検討が必要である。

5. 結論

本研究は、ヒト脳における ATXN2 の詳細な分布と細胞内局在を初めて明らかにした。この結果から、ATXN2 は、これまで *in vitro* 実験や動物実験で示唆されたように、ヒト脳においても翻訳機構や RNA 代謝に関与する可能性が示された。さらに本研究は、FTLD-TDP 患者脳における ATXN2 の低下および FTLD-TDP の特徴的な TDP-43 陽性構造における ATXN2 の共局在を初めて明らかにした。これらの結果から、ATXN2 の低下が、翻訳機構や RNA 代謝の異常によって神経変性を引き起こす誘因となっている可能性と、TDP-43 凝集による神経毒性を軽減させ神経細胞を保護するための代償機転である可能性が考えられた。これ

らの解明は今後の課題であるが、本研究の結果は、ATXN2 が ALS だけでなく FTLN-TDP の病理過程においても重要な役割を果たしており、今後の同疾患の治療標的の重要な候補の一つとなり得ることを示唆している。今後は、より多くの FTLN-TDP 症例を用いるとともに、ALS 等の他の TDP-43 proteinopathy 症例も用いた検討を行い、ATXN2 の神経変性における役割を解明し、治療法の開発につなげていきたい。

引用文献

1. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351 (3):602-611.
2. Bain HDC, Davidson YS, Robinson AC, Ryan S, Rollinson S, Richardson A, et al (2019) The role of lysosomes and autophagosomes in frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 45 (3):244-261.
3. Bakthavachalu B, Huelsmeier J, Sudhakaran IP, Hillebrand J, Singh A, Petrauskas A, et al (2018) RNP-Granule Assembly via Ataxin-2 Disordered Domains Is Required for Long-Term Memory and Neurodegeneration. *Neuron* 98 (4):754-766.
4. Becker IL, Nonis D, Eich F, Klinkenberg M, Gorospe M, Kötter P, et al (2016) Mammalian ataxin-2 modulates translation control at the pre-initiation complex via PI3K/mTOR and is induced by starvation. *Biochim Biophys Acta* 1862 (9):1558-1569.
5. Becker LA, Huang B, Bieri G, Ma R, Knowles DA, Jafar-Nejad P, et al (2017) Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature* 544 (7650):367-371.
6. Becker IL, Nonis D, Nowock J, Auburger G (2019) New alternative splicing variants of the ATXN2 transcript. *Neurol Res Pract* 1:22.
7. Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224(3):213-232.
8. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases (2000) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1 (5):293-299.
9. Buratti E, Baralle FE (2012) TDP-43: gumming up neurons through protein-protein and protein-RNA interactions. *Trends Biochem Sci* 37 (6):237-247.
10. Chassé H, Boulben S, Costache V, Cormier P, Morales J (2017) Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Res* 45 (3):e15.
11. Damrath E, Heck MV, Gispert S, Azizov M, Nowock J, Seifried C, et al (2012) ATXN2-CAG42 Sequesters PABPC1 into Insolubility and Induces FBXW8 in Cerebellum of Old Ataxic Knock-In Mice. *PLoS Genet* 8 (8): e1002920.
12. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al (2010) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 466 (7310):1069-1075.
13. Fittschen M, Becker IL, Halbach MV, Damrath E, Gispert S, Azizov M, et al (2015) Genetic ablation of ataxin-2 increases several global translation factors in their transcript abundance but decreases translation rate. *Neurogenetics* 16 (3):181-192.
14. Fournier C, Anquetil V, Camuzat A, Stirati-Buron S, Sazdovitch V, Molina-Porcel L, et al (2018) Interrupted CAG expansions in ATXN2 gene expand the genetic spectrum of frontotemporal dementias. *Acta Neuropathol Commun* 6:41.
15. Guerrero EN, Wang H, Mitra J, Hegde PM, Stowell SE, Liachko NF, et al (2016) TDP-43/FUS in Motor Neuron Disease: Complexity and Challenges. *Prog Neurobiol* 145-146:78-97.
16. Hart MP, Gitler AD (2012) ALS-associated ataxin 2 polyQ expansions enhance stress-induced caspase 3 activation and increase TDP-43 pathological modifications.

- J Neurosci 32 (27):9133-9142.
17. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, et al (2008) Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64 (1):60-70.
 18. Huynh DP, Del Bigio MR, Ho DH, Pulst SM (1999) Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann Neurol* 45 (2):232-241.
 19. Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM (2000) Nuclear Localization or Inclusion Body Formation of ataxin-2 Are Not Necessary for SCA2 Pathogenesis in Mouse or Human. *Nat Genet* 26 (1):44-50.
 20. Huynh DP, Yang HT, Vakharia H, Nguyen D, Pulst SM (2003) Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet* 12 (13):1485-1496.
 21. Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, et al (1996) Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* 14 (3):285-291.
 22. Izumi R, Warita H, Niihori T, Takahashi T, Tateyama M, Suzuki N, et al (2015) Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked hnRNPA1 mutation. *Neurol Genet* 1 (3): e23.
 23. Kim SH, Kook MC, Shin YK, Park SH, Song HG (2004) Evaluation of Antigen Retrieval Buffer Systems. *J Mol Histol* 35:409-416.
 24. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323 (5918):1205-1208.
 25. Lattante S, Millecamps S, Stevanin G, Rivaud-Péchoux S, Moigneu C, Camuzat A, et al (2014) Contribution of ATXN2 intermediary polyQ expansions in a spectrum of neurodegenerative disorders. *Neurology* 83 (11):990-995.
 26. Lee T, Li YR, Ingre C, Weber M, Grehl T, Gredal O, et al (2011) Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum Mol Genet* 20 (9):1697-1700.
 27. Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW (2013) Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 79 (3):416-438.
 28. Liu EY, Cali CP, Lee EB. RNA metabolism in neurodegenerative disease (2017) *Dis Model Mech* 10:509-518.
 29. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314 (5796):130-133.
 30. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, et al (2013) Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep* 4 (1):124-134.
 31. Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, et al (2007) Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell* 18 (4):1385-1396.
 32. Panda AC, Martindale JL, Gorospe M (2017) Polysome Fractionation to Analyze mRNA Distribution Profiles. *Bio Protoc* 7 (3): e2126.
 33. Parker SS, Krantz J, Kwak EA, Barker NK, Deer CG, Lee NY, et al (2019) Insulin Induces Microtubule Stabilization and Regulates the Microtubule Plus-End Tracking

- Protein Network in Adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 18 (7):1363-1381.
34. Pottier C, Ravenscroft TA, Sanchez-Contreras M, Rademakers R (2016) Genetics of FTLD: overview and what else we can expect from genetic studies. *J Neurochem* 138 Suppl 1:32-53.
 35. Ralser M, Albrecht M, Nonhoff U, Lengauer T, Lehrach H, Krobitch S (2005) An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2. *J Mol Biol* 346 (1):203-214.
 36. Rubino E, Mancini C, Boschi S, Ferrero P, Ferrone M, Bianca S, et al (2019) ATXN2 intermediate repeat expansions influence the clinical phenotype in frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging* 73: 231.e7-231.e9.
 37. Satterfield TF, Pallanck LJ (2006) Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 15 (16):2523-2532.
 38. Seltman RE, Matthews BR (2012) Frontotemporal Lobar Degeneration: Epidemiology, Pathology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs* 26 (10):841-870.
 39. Stefani G, Fraser CE, Darnell JC, Darnell RB (2004) Fragile X Mental Retardation Protein Is Associated with Translating Polyribosomes in Neuronal Cells. *J Neurosci* 24 (33):7272-7276.
 40. Turner MR (2016) Motor neuron disease: biomarker development for an expanding cerebral syndrome. *Clin Med (Lond)* 16 Suppl 6:s60-s65.
 41. Tyzack GE, Luisier R, Taha DM, Neeves J, Modic M, Mitchell JS, et al (2019) Widespread FUS mislocalization is a molecular hallmark of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 142 (9):2572-2580.
 42. van de Loo S, Eich F, Nonis D, Auburger G, Nowock J (2009) Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum. *Exp Neurol* 215 (1):110-118.

表 1. 本研究で使用した一次抗体

一次抗体	タイプ	販売元	希釈率
Human Ataxin-2, 713-904	mouse, monoclonal	BD biosciences (611378)	1:1000 (IPL), 1:500 (IF), 1:250~1000 (WB)
Human Ataxin-2, 1293-1313	rabbit, polyclonal	Thermofisher (#PA5-78845)	1:2000 (IF), 1:2000 (WB)
Human ribosomal protein S6 (5G10)	rabbit, monoclonal	CST (#2217)	1:500 (IF), 1:3000 (WB)
Human PolyA-binding protein 1	rabbit, polyclonal	CST (#4992)	1:500 (IF)
Human Calnexin (C5C9)	rabbit, monoclonal	CST (#2679)	1:500 (IF)
Human Lysosome associated membrane protein 1	rabbit, polyclonal	abcam (ab24170)	1:1000 (IF)
Human Golgi Glycoprotein 1	rabbit, polyclonal	abcam (ab103439)	1:500 (IF)
Human TDP-43 (2E2-D3)	mouse, monoclonal	Abnova (H00023435-M01)	1:500 (IF)
Phosphorylate TDP-43 (pS409/410)	rabbit, polyclonal	Made by Dr. M. Hasegawa [17]	1:1000 (IF), 1:1000 (WB)
Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Antibody (6C5)	mouse, monoclonal	Chemicon (MAB374)	1:3000 (WB)

略称: ペルオキシダーゼ標識 (immunoperoxidase labeling: IPL)、蛍光免疫染色 (immunofluorescence: IF)、ウェスタンブロット法 (western blotting: WB)

表 2. 本研究で用いられた症例

Case no.	死亡年齢	性別	脳重 (g)	死亡から解剖までの間隔 (時間)	脳部位	標本の状態	神経病理学的診断
1	72	M	1350	6	前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬、大脳基底核、中脳	PFA	脳梗塞
2	71	M	1180	35	前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬	PFA、新鮮凍結脳	著変のない脳
3	77	F	1145	9	前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬	PFA、新鮮凍結脳	著変のない脳
4	72	M	N/A	3.3	前頭葉皮質	新鮮凍結脳	脳塞栓症
5	75	M	1295	24	前頭葉皮質	新鮮凍結脳	脳梗塞
6	81	M	1240	4.5	前頭葉皮質	新鮮凍結脳	著変のない脳
7	79	M	N/A	3.35	前頭葉皮質	新鮮凍結脳	著変のない脳
8	79	M	N/A	N/A	側頭葉皮質	FA	著変のない脳
9	75	M	1280	6.57	小脳	PFA	著変のない脳
10	69	F	1145	5	大脳基底核、中脳	PFA	著変のない脳
11	68	F	1200	37	大脳基底核	PFA	著変のない脳
12	68	M	1220	7	大脳基底核	PFA	著変のない脳
13	73	M	1400	N/A	小脳	PFA	著変のない脳
14	68	F	1160	24	脊髄	PFA	著変のない脳
15	68	M	N/A	N/A	側頭葉皮質、海馬	PFA	FTLD-TDP タイプ C
16	66	M	N/A	N/A	側頭葉皮質、海馬	PFA、新鮮凍結脳	FTLD-TDP タイプ C
17	81	M	950	N/A	側頭葉皮質、海馬	PFA	FTLD-TDP タイプ C
18	59	M	N/A	N/A	側頭葉皮質	新鮮凍結脳	FTLD-TDP タイプ C
19	83	M	1415	19.8	側頭葉皮質	新鮮凍結脳	FTLD-TDP タイプ C

20	75	M	1174	N/A	前頭葉皮質	新鮮凍結 脳	FTLD-TDP タイプ C
21	66	F	1035	N/A	前頭葉皮質	新鮮凍結 脳	FTLD-TDP タイプ C
22	71	F	955	N/A	前頭葉皮質	新鮮凍結 脳	FTLD-TDP タイプ A

略称:ホルマリン固定脳標本 (formaldehyde-fixed brain sections: FA)、パラホルムアルデヒド固定脳標本 (paraformaldehyde-fixed brain sections:PFA)、前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD)

表 3. 各解析で用いたヒト脳検体の対応表

検体を使用した解析	Case no.	脳部位	標本の状態
健常例と FTLN-TDP 症例の脳における ATXN2 の分布と細胞内局在の解析 (図 1)	1	前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬、大脳基底核、中脳	PFA
	2	前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬	PFA
	3	前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬	PFA
	9	小脳	PFA
	10	大脳基底核、中脳	PFA
	11	大脳基底核	PFA
	12	大脳基底核	PFA
	13	小脳	PFA
	14	脊髄	PFA
	15	側頭葉皮質、海馬	PFA
	16	側頭葉皮質、海馬	PFA
	17	側頭葉皮質、海馬	PFA
健常例および FTLN-TDP の脳における ATXN2 と細胞質オルガネラおよび関連分子との共局在解析 (図 2、図 3、表 4、表 5)	1	側頭葉皮質、海馬	PFA
	2	側頭葉皮質、海馬	PFA
	3	側頭葉皮質、海馬	PFA
	15	側頭葉皮質、海馬	PFA
	16	側頭葉皮質、海馬	PFA
	17	側頭葉皮質、海馬	PFA
FTLN-TDP の特徴的病理構造における pTDP-43 と ATXN2 の共局在解析 (図 4)	16	海馬	PFA
	17	海馬	PFA
ヒト神経細胞内における ATXN2 および関連分子の定量的な免疫組織化学的解析 (図 6)	1	側頭葉皮質	PFA
	2	側頭葉皮質	PFA
	3	側頭葉皮質	PFA
	15	側頭葉皮質	PFA
	16	側頭葉皮質	PFA
	17	側頭葉皮質	PFA
ヒト凍結脳を用いた ATXN2 の定量的ウェスタンブロット解析 (図 7)	2	側頭葉皮質	新鮮凍結脳
	3	側頭葉皮質	新鮮凍結脳
	4	前頭葉皮質	新鮮凍結脳

	5	前頭葉皮質	新鮮凍結脳
	6	前頭葉皮質	新鮮凍結脳
	7	前頭葉皮質	新鮮凍結脳
	16	側頭葉皮質	新鮮凍結脳
	18	側頭葉皮質	新鮮凍結脳
	19	側頭葉皮質	新鮮凍結脳
	20	前頭葉皮質	新鮮凍結脳
	21	前頭葉皮質	新鮮凍結脳
	22	前頭葉皮質	新鮮凍結脳
神経細胞内 ATXN2 の検出に適切な免疫組織化学的手法の検討 (補足図 2)	1	側頭葉皮質	PFA
	8	側頭葉皮質	FA

略称:ホルマリン固定脳標本 (formaldehyde-fixed brain sections: FA)、パラホルムアルデヒド固定脳標本 (paraformaldehyde-fixed brain sections:PFA)

表 4. 健常例の脳を用いた共局在解析により得られた相関係数

脳領域	相関係数	ATXN2 とともに免疫標識された蛋白質					
		Calnexin	RPS6	LAMP1	GLG1	PABP1	TDP-43
側頭葉皮質	PCC	0.4024	# 0.7520	0.0683	0.0717	# 0.7388	-0.3033
	(SD)	0.0761	0.1161	0.0719	0.0544	0.0867	0.0232
	tM	* 0.7261	** 0.9399	0.4245	0.5203	** 0.897	0.1353
	(SD)	0.0788	0.0486	0.1004	0.0501	0.0969	0.0601
海馬 CA1	PCC	0.4050	# 0.6021	-0.0423	-0.1191	# 0.7289	-0.0024
	(SD)	0.1060	0.1817	0.1583	0.1720	0.0969	0.2114
	tM	* 0.7310	** 0.8833	0.4607	0.4284	** 0.9324	0.4782
	(SD)	0.0340	0.0719	0.0277	0.1983	0.0239	0.0303
海馬支脚	PCC	0.4559	# 0.6872	-0.0366	-0.2399	# 0.7087	-0.1173
	(SD)	0.1315	0.0998	0.0265	0.1177	0.1319	0.2762
	tM	** 0.8064	** 0.9257	0.5100	0.3347	** 0.9237	0.4434
	(SD)	0.0846	0.0178	0.0842	0.0958	0.0392	0.0625
海馬傍回	PCC	0.4421	# 0.6875	0.1103	-0.1156	# 0.7730	-0.1112
	(SD)	0.0727	0.0360	0.1564	0.1005	0.1309	0.1103
	tM	* 0.7512	** 0.9218	0.6145	0.4643	** 0.9627	0.4236
	(SD)	0.1079	0.0243	0.0624	0.0704	0.0219	0.0355

健常例のピアソン相関係数 (Pearson's correlation coefficients above threshold: PCC) とマンダースの共局在係数 (Manders' colocalization coefficients above threshold: tM)を、神経細胞の細胞質において算出し、少なくとも 15 以上の神経細胞から得られた解析値の平均値を標準偏差とともに掲載した。PCC は、2 種類の分子間の線形的な相関を-1 (完全な逆相関)から 1 (完全な相関)までの間の数値により示す。PCC 値が-0.5 より大きく 0.5 未満である場合は、便宜的に 2 つのプローブの相関が弱いと解釈した。有意な値を示す PCC には表中で # を付して太文字で表記した。tM は、ATXN2 とともに免疫標識された分子の蛍光が存在する区画のうち、ATXN2 の蛍光が存在する区画の比率を 0 から 1 で示している。本研究では、tM 値を high ($0.8 \leq tM$ 、表中で **を付して太文字で表記)、moderate ($0.65 \leq tM < 0.8$ 、*を付して太文字で表記)、low ($tM < 0.65$ 、強調なし)に分類した。

表 5. FTLD-TDP 疾患脳 の 共局在解析 により 得られた 相関係数

脳領域	相関係数	ATXN2 とともに免疫標識された蛋白質					
		Calnexin	RPS6	LAMP1	GLG1	PABP1	TDP-43
側頭葉皮質	PCC	0.4075	# 0.7336	-0.2568	0.1767	# 0.6783	0.0027
	(SD)	0.1026	0.0293	0.0715	0.1448	0.1207	0.2457
	tM	* 0.7545	** 0.9126	0.3935	0.5475	** 0.872	0.4817
	(SD)	0.1427	0.0640	0.0560	0.2057	0.0209	0.1394
海馬 CA1	PCC	0.4421	# 0.6949	0.1620	0.0542	# 0.7327	0.2516
	(SD)	0.0080	0.0752	0.1907	0.0824	0.0854	0.1221
	tM	* 0.7582	** 0.8505	0.3861	0.5867	** 0.9128	0.5021
	(SD)	0.1067	0.0591	0.2732	0.0952	0.0793	0.0309
海馬支脚	PCC	# 0.582	# 0.6819	-0.0167	-0.0019	# 0.7626	0.1219
	(SD)	0.0942	0.0556	0.0811	0.0989	0.1431	0.0774
	tM	0.6010	* 0.7563	0.4915	0.6462	** 0.9436	0.4522
	(SD)	0.1824	0.1796	0.1059	0.1177	0.0330	0.1347
海馬傍回	PCC	0.4842	# 0.7329	-0.0699	0.1045	# 0.8244	0.1056
	(SD)	0.0405	0.0413	0.0495	0.1657	0.0281	0.1676
	tM	* 0.7506	** 0.8092	0.4537	0.5529	** 0.9393	0.3906
	(SD)	0.0738	0.1445	0.1079	0.0878	0.0410	0.1287

FTLD-TDP 症例のピアソン相関係数 (Pearson's correlation coefficients above threshold: PCC) とマンダースの共局在係数 (Manders' colocalization coefficients above threshold: tM) の平均値を健常例と同様に算出して掲載した。得られた解析値は、健常例における値 (表 4) から大きく変化しなかった。表中のシンボルについては表 4 を参照。

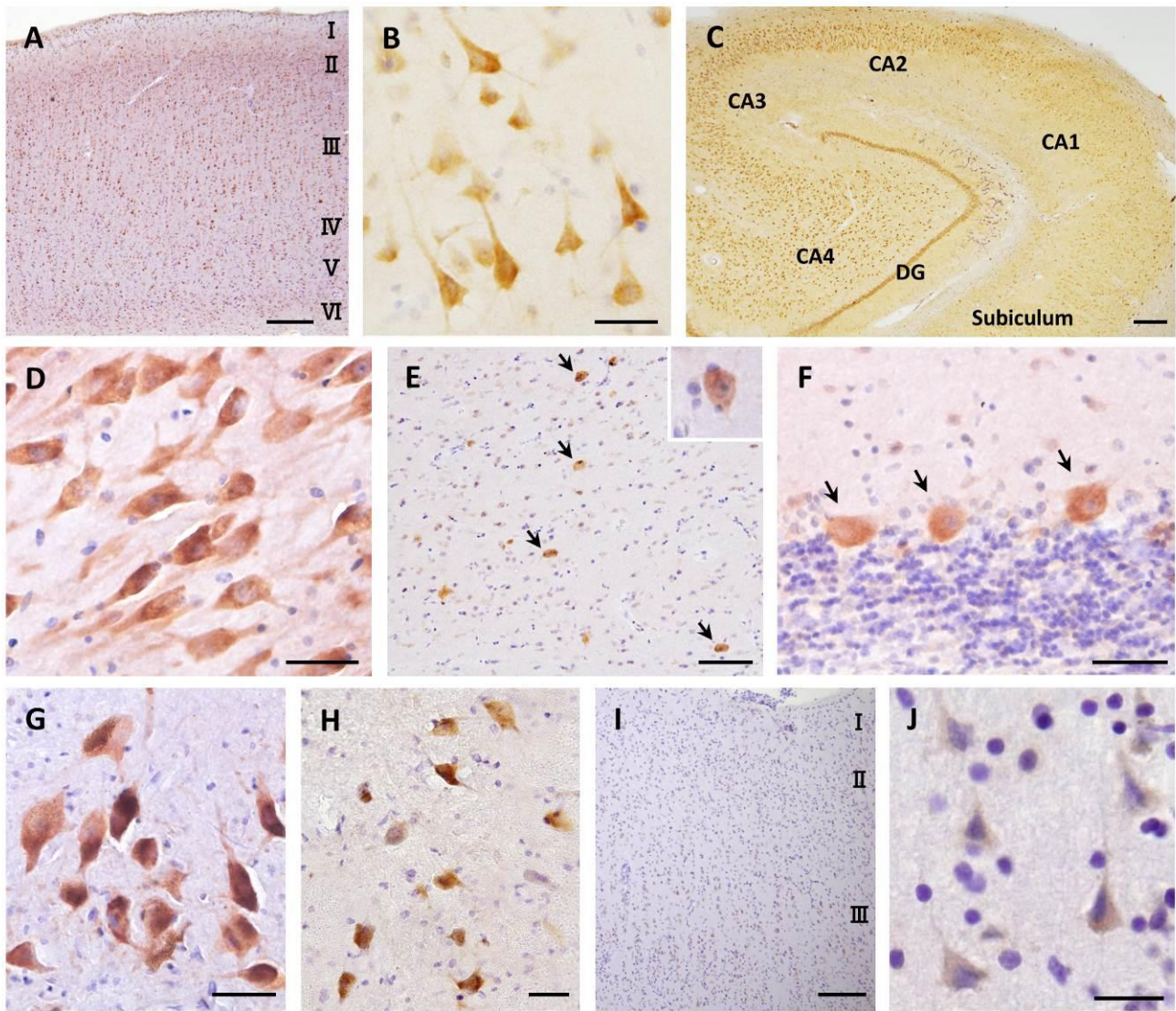


図 1. 健常例と FTLN-TDP 症例の脳における ATXN2 の分布と細胞内局在

ヒトの健常例の脳を用いた ATXN2 抗体による免疫組織化学染色により、大脳新皮質、大脳辺縁系、大脳基底核、小脳、中脳、脊髄の神経細胞における ATXN2 の広範な分布が判明した。A: 側頭葉皮質の弱拡大画像。第 II-VI 層の神経細胞に ATXN2 による免疫反応を認めた。B: 側頭葉皮質第 III 層の強拡大画像。ATXN2 は、神経細胞の核周部細胞質と近位樹状突起内の双方においてびまん性または顆粒状の染色像を呈した。神経細胞核は概ね免疫陰性であった。C: 海馬 CA 領域と歯状回の弱拡大画像。ATXN2 は海馬体に広範に分布したが、CA1 領域では発現が少なかった。D: 海馬 CA3 の強拡大画像。ATXN2 による強い免疫反応を神経細胞内に認めた他、ニューロピルも線状または点状の染色像として陽性となった。E: 線条体の中拡大画像。ATXN2 による免疫反応は、大型介在神経細胞 (矢印およびインセット) において中型有棘神経細胞よりも強く認められた。F: 小脳 Purkinje 細胞の強拡大画像。ATXN2 による強い免疫反応を認めた。G: 黒質緻密部の強拡大画像。神経細胞は ATXN2 による強い免疫反応を示した。また、ニューロピルにも線状もしくは点状の染色像を認めた。H: 脊髄前角の強拡大画像。前角細胞は ATXN2 による強い免疫反応性を示した。なお、FTLN-TDP 疾患脳では ATXN2 による免疫反応が著しく低下していた (I, J)。I: 側頭葉皮質第 I~III 層の弱拡大画像。J: 第 III 層に残存する神経細胞の強拡大画像。ATXN2 の核周部細胞質および近位樹状突起における分布には変化を認めなかった。スケールバー: 50 μm (B, D, F, G, H, J)、100 μm (E)、200 μm (A, C, I)。

Upper layer of the cerebral temporal cortex

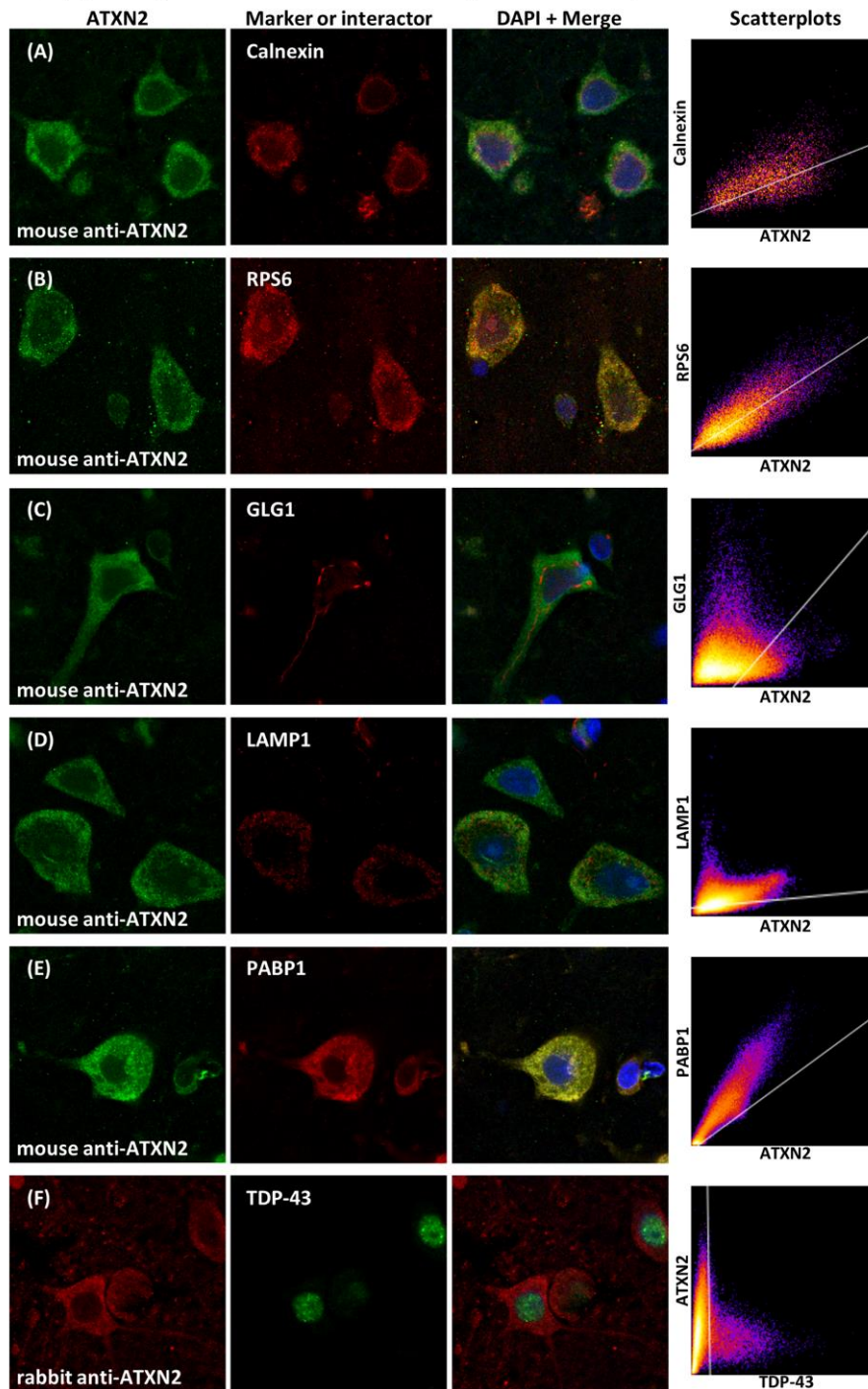


図2. 健常例の脳におけるATXN2と細胞質オルガネラおよび関連分子との蛍光二重染色画像

健常例の脳の神経細胞質における、ATXN2と小胞体マーカーCalnexin、リボソームマーカーRPS6、ゴルジ装置マーカーGLG1、リソソームマーカーLAMP1といったオルガネラマーカー、およびATXN2の関連蛋白質であるPABP1 やTDP-43との共局在解析のために蛍光二重免疫染色を行い、共焦点顕微鏡画像を取得した。(A)-(F): 側頭葉皮質浅層における蛍光二重染色画像を、DAPIによる核染色を加えたオーバーレイ画像および二次元散布図とともに提示した。ATXN2は、小胞体 (A)にはその一部に局在し、リボソーム (B)およびPABP1 (E)には強く局在したが、ゴルジ装置 (C)およびリソソーム (D)には局在しなかった。ATXN2とTDP-43との間に共局在は認められなかった (F)。

Upper layer of the cerebral temporal cortex

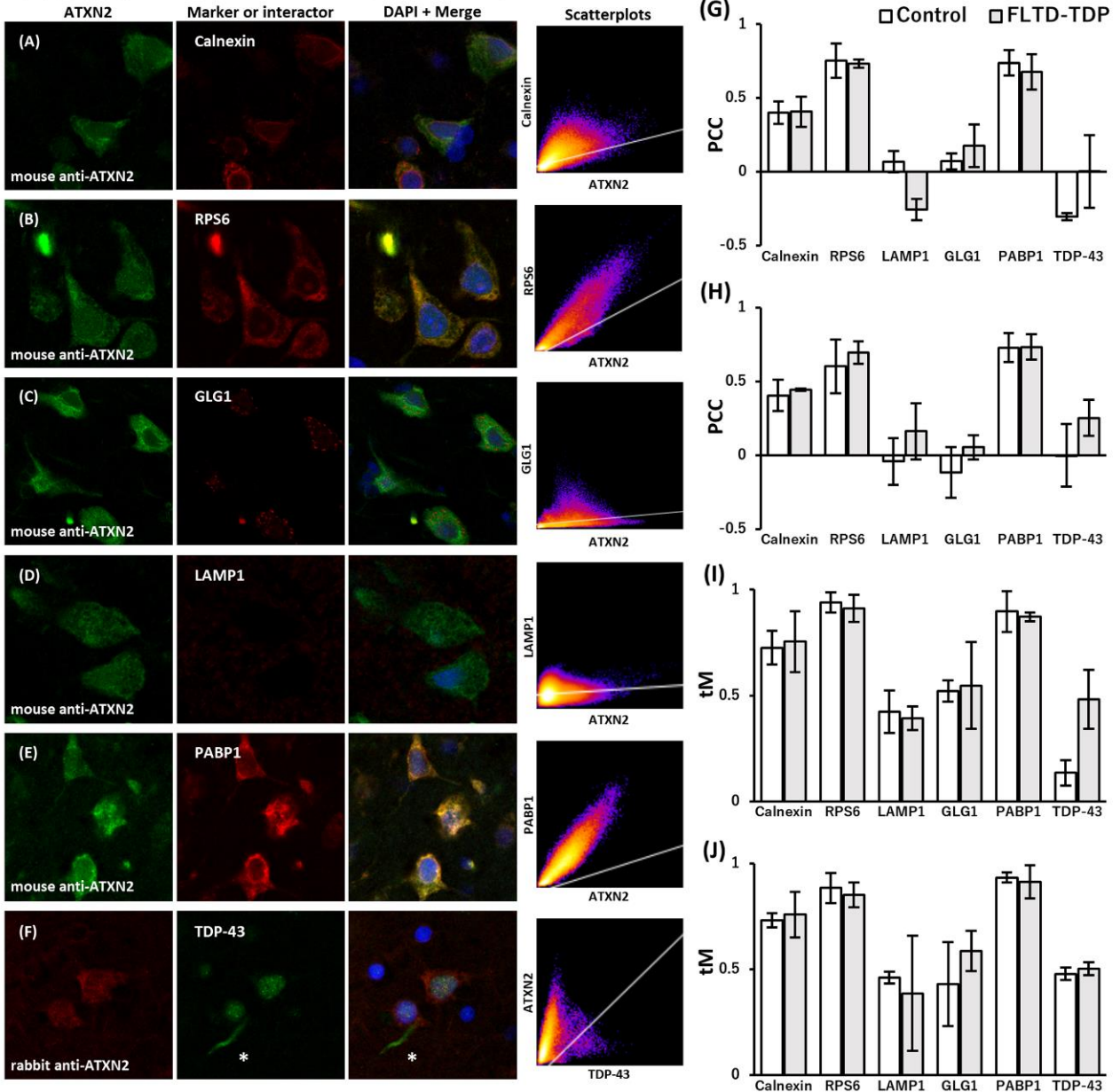


図3. 健常例とFTLN-TDP症例の脳におけるATXN2の神経細胞質内局在の比較

(A)-(F): FTLN-TDP症例の脳神経細胞質におけるATXN2と細胞内小器官マーカーおよび関連蛋白質の蛍光免疫二重染色を行い、健常例においてと同様に共焦点顕微鏡画像を取得した。側頭葉皮質浅層の蛍光画像を示す。神経細胞質におけるATXN2局在の特徴は、図2で示した健常例から明らかな変化を示さなかった。なお、LAMP1による免疫反応は顕著に低下していた (D)。また、ATXN2はTDP-43に陽性となる変性神経突起内には局在しなかった (F)。(G)-(J): 健常例およびFTLN-TDP症例の側頭葉皮質 (G, I)および海馬CA1 (H, J)の共局在解析により得られた相関係数を示す。ピアソン相関係数 (Pearson's correlation coefficients above threshold: PCC) (G, H)およびマンダース共局在係数 (Manders' colocalization coefficients above threshold: tM) (I, J)の平均値を図に示した。ATXN2とCalnexinによる解析では有意でないPCC値と中程度のtM値が得られ、両者の部分的な共局在が示された。RPS6およびPABP1とATXN2による解析では有意なPCC値と高いtM値が得られ、両者の線形的な相関と強い共局在が示された。LAMP1、GLG1、TDP-43はいずれも、ATXN2との間で非有意なPCC値と低いtM値を示した。いずれの相関係数値も、健常例とFTLN-TDP症例の間で明らかな差異を示さなかった。

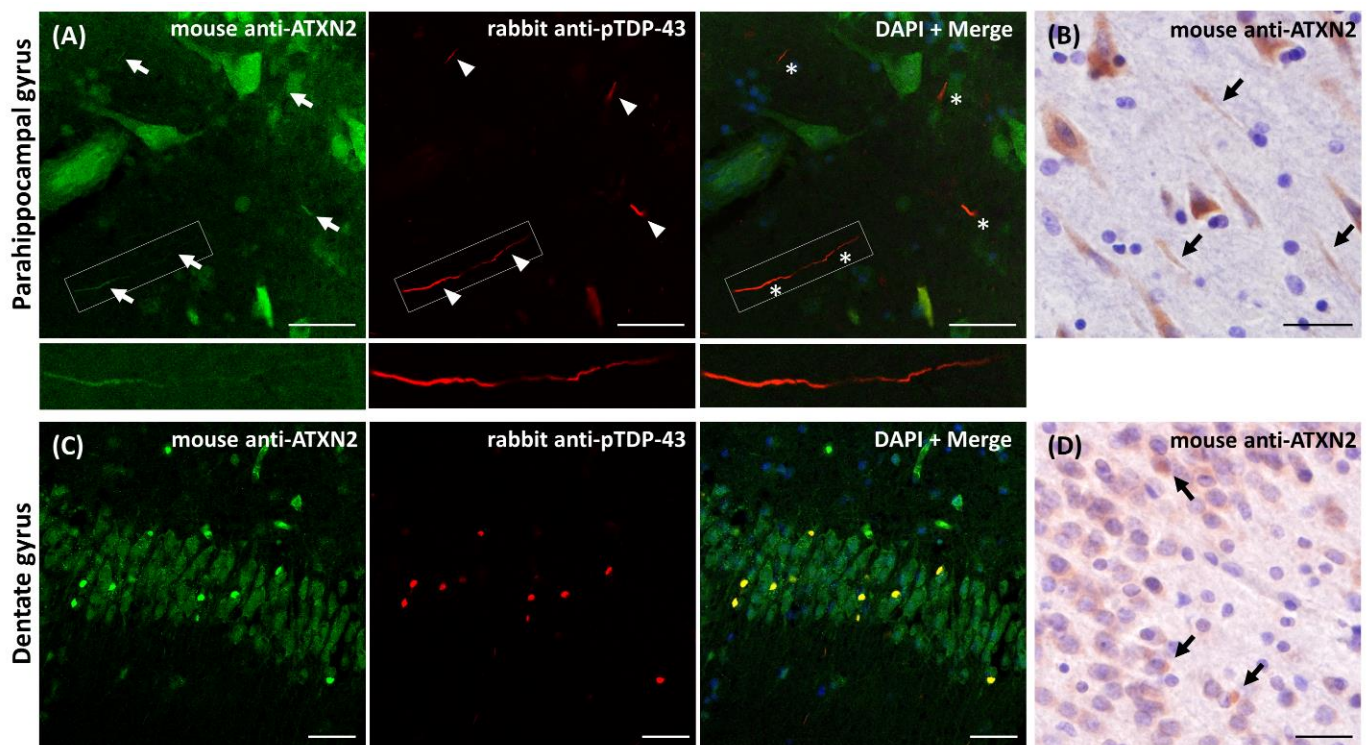


図4. FTLD-TDPの特徴的病理構造におけるリン酸化TDP-43とATXN2の共局在解析

(A), (C): FTLD-TDP症例の海馬傍回 (A)および海馬歯状回 (C)の標本を用いて、マウスモノクローナルATXN2抗体とラビットポリクローナルpTDP-43抗体による蛍光免疫二重染色を行い、FTLD-TDPの特徴的な病理構造におけるpTDP-43とATXN2の共局在について検討した。各々の共焦点顕微鏡画像を、DAPIによる核染色を加えたオーバーレイ画像とともに示す。(A) 海馬傍回の蛍光二重染色画像。pTDP-43に陽性である変性神経突起 (矢頭)は、マウスモノクローナルATXN2抗体による免疫組織染色によっても陽性となり (矢印)、双方の蛍光シグナルはオーバーレイ画像において共局在した (アスタリスク)。(C) 海馬歯状回顆粒細胞層においてpTDP-43に陽性となる神経細胞質内封入体は、マウスモノクローナルATXN2抗体による免疫組織染色によっても陽性となり、双方の蛍光シグナルはオーバーレイ画像において共局在した。(B), (D): FTLD-TDP症例の海馬傍回 (B)および海馬歯状回 (D)の標本を用いた、マウスモノクローナルATXN2抗体によるペロオキシダーゼ標識免疫組織染色においても、pTDP-43陽性凝集体に類似した染色像が認められた。変性神経突起様 (B、矢印)および神経細胞質内封入体様 (D、矢印)のATXN2による免疫反応をそれぞれ示す。スケールバー: 30 μ m。

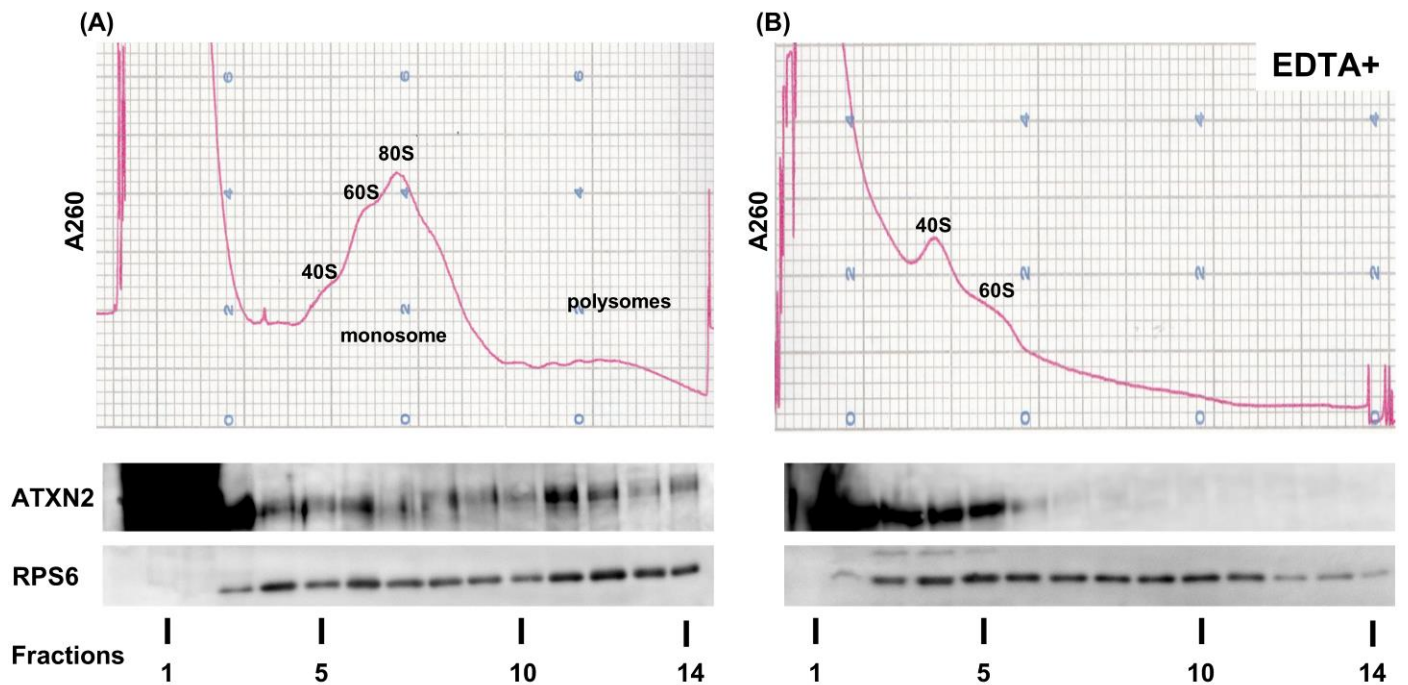


図5. マウス脳ホモジネートを用いたATXN2のポリソームプロファイル解析

マウス全脳ホモジネートを10-50% (w/v)濃度勾配スクロース溶液中での超遠心により分画した後にRNA吸光度曲線 (波長260 nmにおける吸光度: A260)を計測しながら採取して分注し、ウェスタンブロット法で解析した。(A)マウスの全脳抽出物の解析において、ATXN2とリボソームサブユニットRPS6はともにモノソーム画分とポリソーム画分の双方に沈降した。(B) EDTA処理により、ATXN2およびRPS6のポリソーム画分における沈降が阻害された。

(A) Temporal neocortex

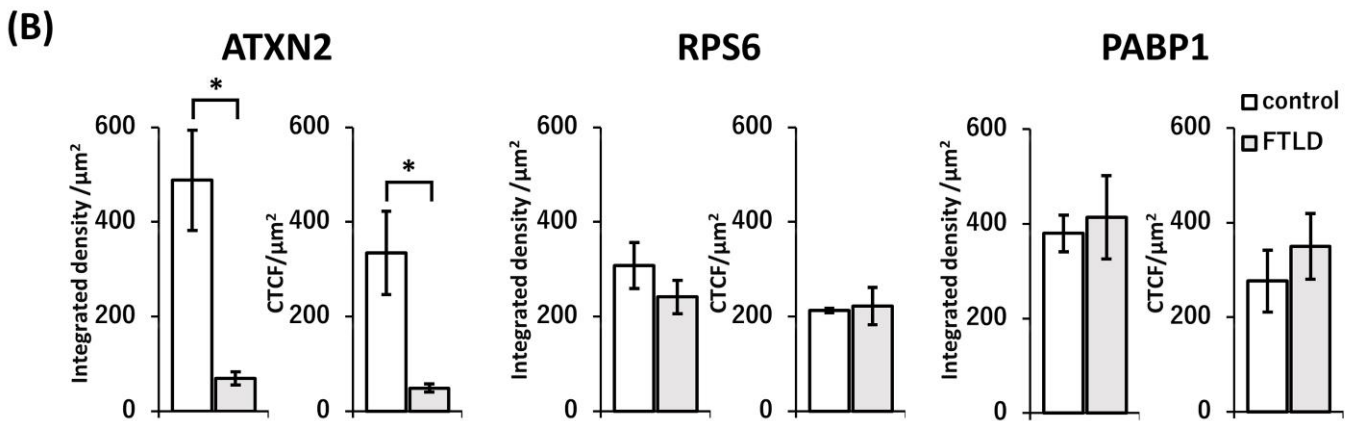
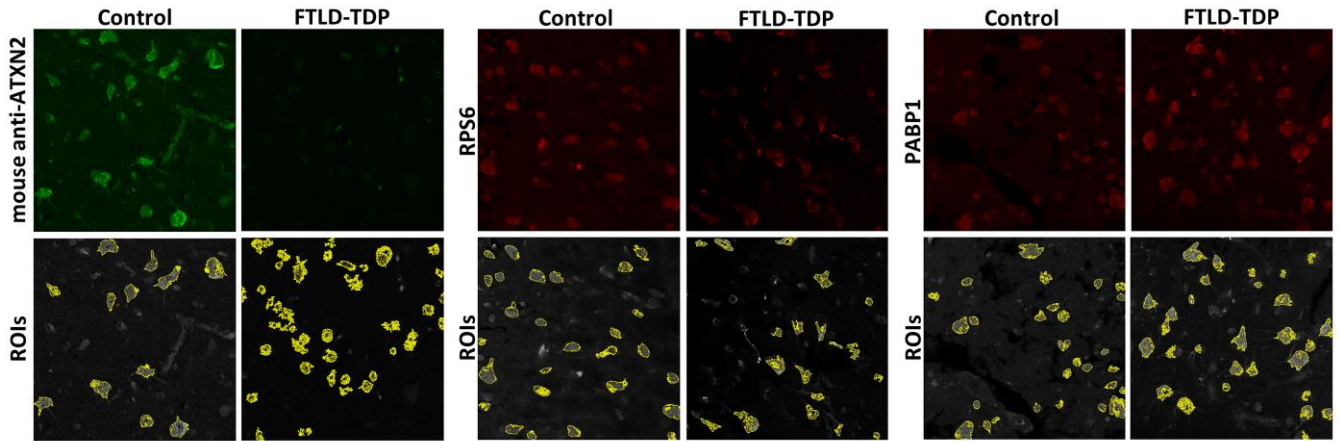


図6. ヒト神経細胞内におけるATXN2および関連分子の定量的な免疫組織化学的解析

健常例とFTLD-TDP症例、各3例の側頭葉皮質の脳切片を、ATXN2、RPS6、PABP1のいずれかに対する抗体を用いて、同一の方法により同時に蛍光免疫染色した。得られた蛍光画像から神経細胞質における各々の分子による蛍光強度を定量化し、統計的に比較した。(A) 蛍光画像と、神経細胞質内に設定したROIを示す。(B) ATXN2、RPS6、PABP1の各々について単位面積 (μm^2)あたりのintegrated densityおよびcorrected total cell fluorescence (CTCF)値を、50箇所以上のROIから算出して図示した。データは平均値±標準偏差であり、対応がない学生t検定により統計的比較を行った。FTLD-TDP疾患脳において、ATXN2による蛍光強度は健常例と比べて有意に低下していたが (* $P \leq 0.05$)、ATXN2の関連分子であるRPS6やPABP1には同様の有意な低下を認めなかった。

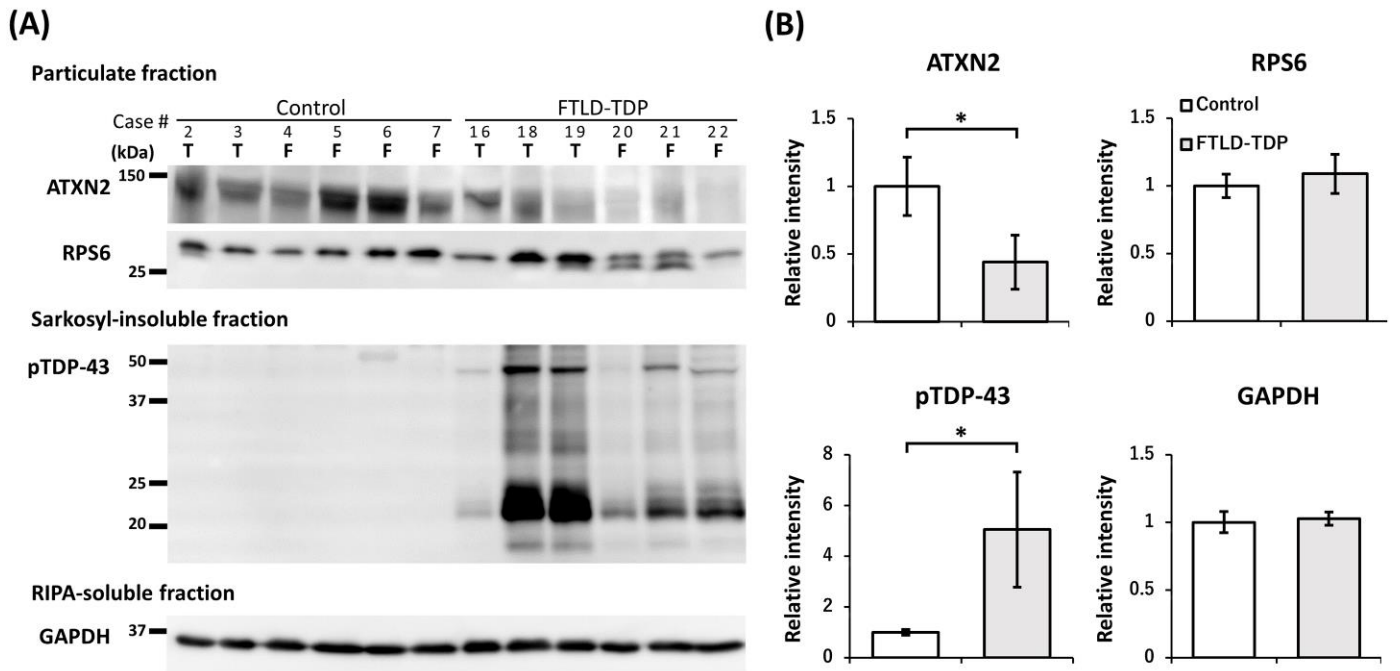
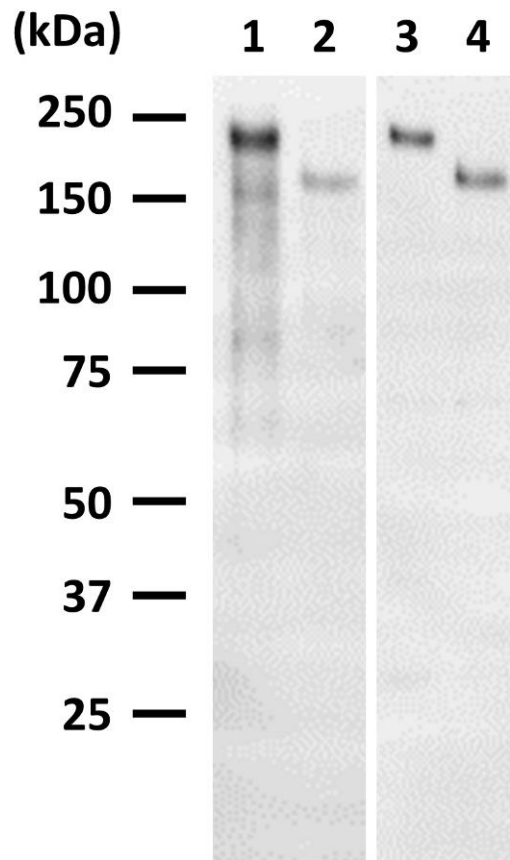


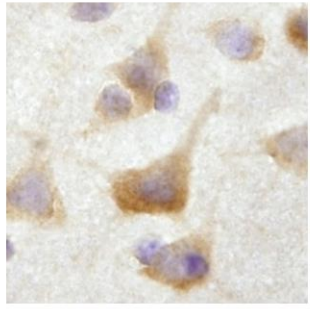
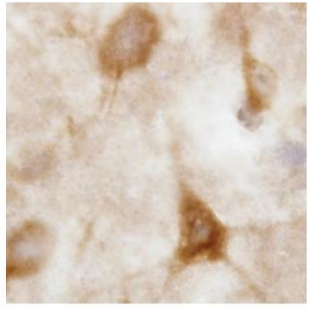
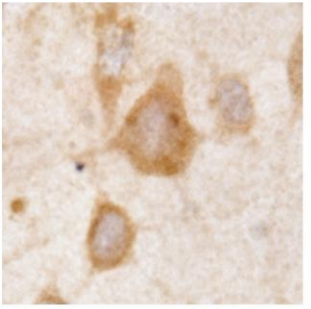
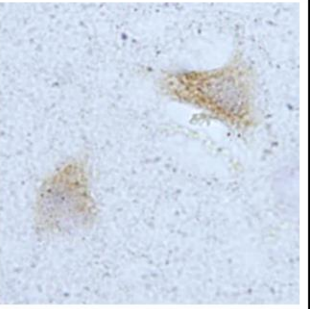
図7. ヒト凍結脳を用いたATXN2の定量的ウェスタンブロット解析

健常例とFTLD-TDP症例、各6例の前頭葉皮質もしくは側頭葉皮質のホモジネートをウェスタンブロット法で解析し、バンドのシグナル強度を定量化して統計的に比較した。(A) ATXN2、RPS6、pTDP-43、GAPDHに対する抗体によって検出された各標本によるウェスタンブロットを示す。各症例の脳部位について、F(前頭葉)もしくはT(側頭葉)と表記した。(B) 各群のバンドのシグナル強度を解析した。データは平均値±標準偏差であり、統計的比較はMann-Whitney U検定で行った。FTLD-TDP症例において、ATXN2のレベルは健常例と比較して有意に低下していた(* $P < 0.01$)。一方、RPS6とGAPDHのレベルは両群間で有意な変化を示さなかった。なお、サルコシル不溶性画分におけるpTDP-43のバンドは、FTLD-TDP症例のみで認められた。



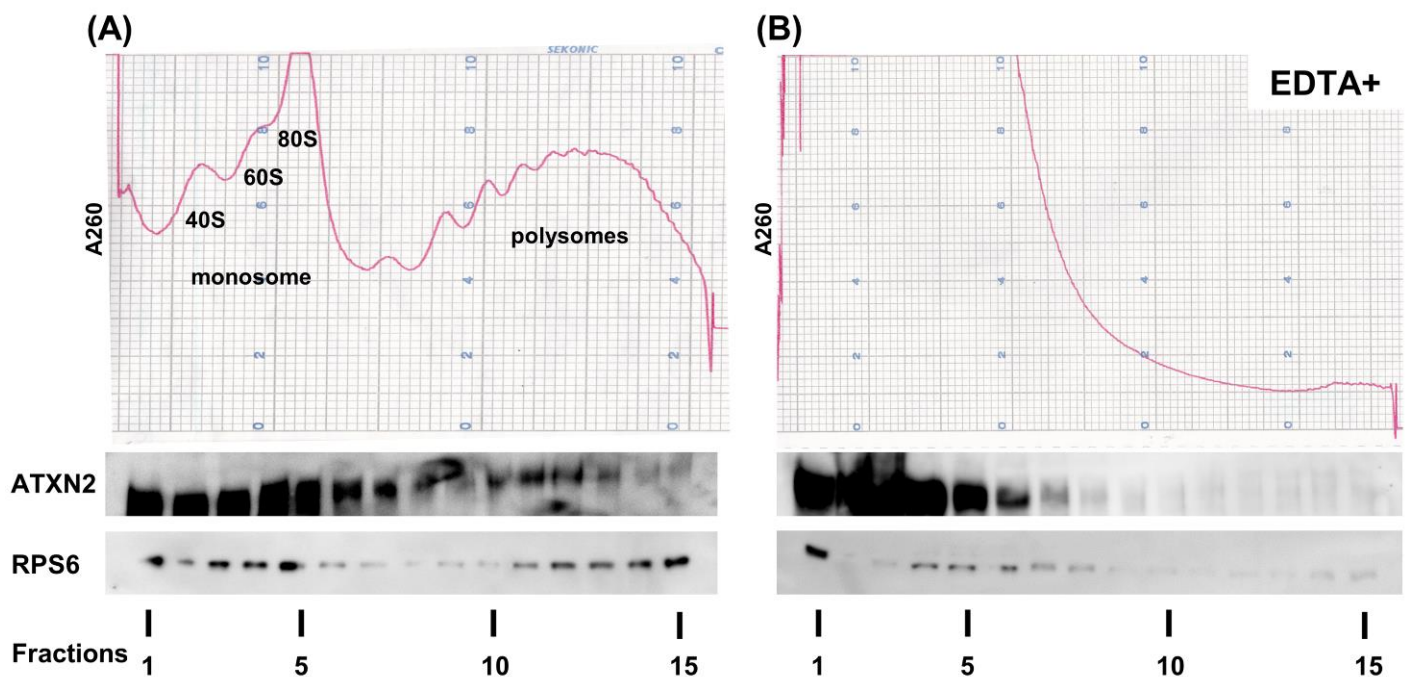
補足図 1. 本研究で使用した ATXN2 抗体の検証

本研究では、2 種類の異なる ATXN2 抗体を使用した。それらの抗原特異性を検証するため、異なるタグにより標識された ATXN2 発現プラスミド (pFN21A-Halo-ATXN2 および pcDNA3-Flag-ATXN2) をトランスフェクトした培養細胞によるウェスタンブロット解析を行った。左側のブロット (レーン 1、2) および右側のブロット (レーン 3、4) を、それぞれマウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences, aa713-904) およびウサギポリクローナル抗体 (Thermofisher, aa1293-1313) でインキュベートした。Halo タグ (レーン 1、3) および Flag タグ付き ATXN2 (レーン 2、4) は、いずれの抗体を用いた場合にもそれぞれ約 220 kDa および約 160 kDa のバンドとして検出された。

ATXN2 (x1000), Hematoxylin				
	Fixiation / preservation method			
	4% PFA-fixed, frozen floating			formalin-fixed, paraffin-embedded.
	Heating preparation			
	No preparation	Autoclaving (121°C, 20 min) in Citrate buffer, pH 6	Pressure cooking (120°C, 10 min) in Tris-EDTA buffer, pH 9	

補足図 2. 神経細胞内 ATXN2 の検出に適切な免疫組織化学的手法の検討

側頭葉皮質の脳切片を用いたペルオキシダーゼ標識を行い、ATXN2 の検出に最適である組織固定・保存法と抗原賦活法を決定した。神経細胞内の ATXN2 による免疫反応の検出感度は、パラホルムアルデヒド固定され、20% (w/v)スクロース/PBS 中に 4°Cで保存された浮遊脳切片を用いた場合に最も良好であった。また、Tris-EDTA 緩衝液 (pH 9.0)を用いた加熱処理では、クエン酸緩衝液 (pH 6.0)を用いた加熱処理よりも高感度な結果が得られた。

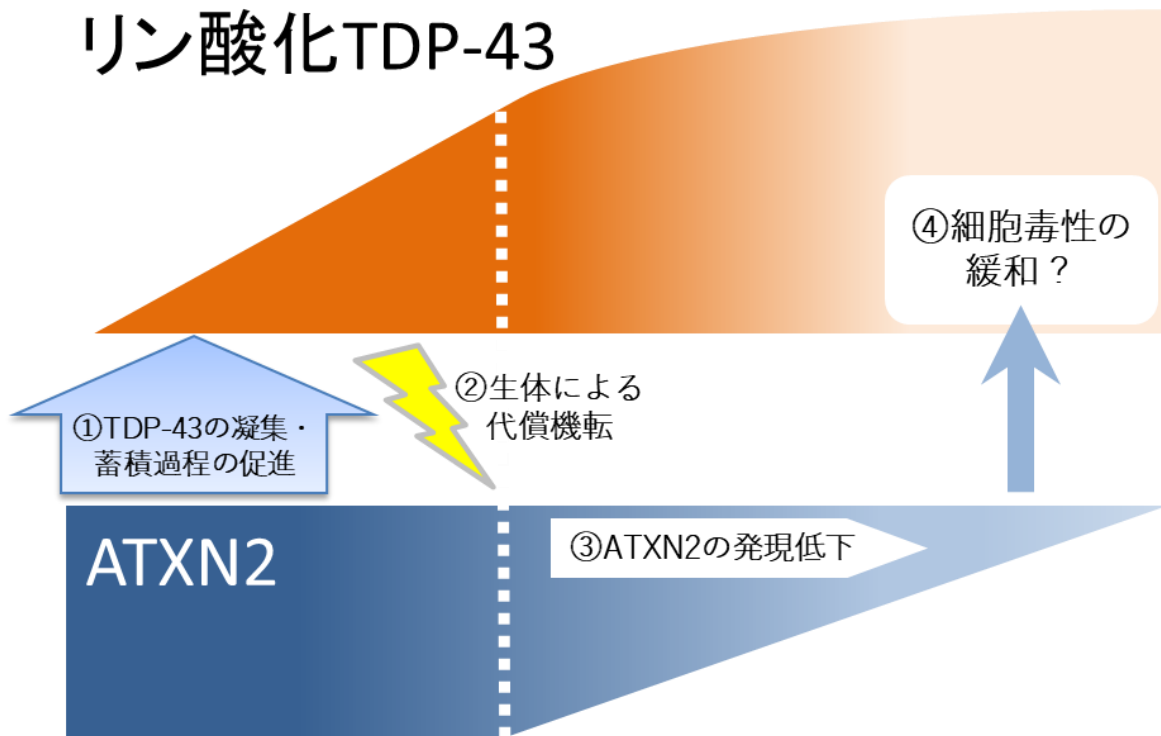


補足図 3. SH-SY5Y ライセートを用いた ATXN2 のポリソームプロファイル解析

SH-SY5Y細胞のライセートを10-50% (w/v)濃度勾配スクロース溶液中での超遠心により分画した後、RNA吸光度曲線（波長 260 nm における吸光度: A260）を計測しながら採取し、ウェスタンブロット法で解析した。(A) EDTA を含まないバッファーを用いたライセートの解析において、ATXN2 とリボソームサブユニット RPS6 がともにモノソーム画分とポリソーム画分の双方で沈降した。(B) EDTA 処理により、ポリソーム画分における ATXN2 と RPS6 の沈降が阻害された。



リン酸化TDP-43



補足図 4. FTLD-TDP 患者脳における ATXN2 発現低下の機序仮説

近年の培養細胞およびモデル動物を用いた研究報告 (文献 5, 12)では、神経細胞内の ATXN2 が TDP-43 の病的な凝集・蓄積過程を促進するとの可能性が示されてきた。この知見を踏まえると、本研究で認められた FTLD-TDP 患者脳における ATXN2 発現量の低下は、ATXN2 による TDP-43 の凝集・蓄積作用を減衰させることにより、TDP-43 による細胞毒性の緩和を図る神経保護的な代償機転として二次的に生じたものである可能性が考えられた。

謝辞

終わりに臨み、本研究の達成と論文作成において、御指導と御教示を賜りました筑波大学臨床医学系精神医学 新井哲明教授、東京医科大学茨城医療センターメンタルヘルス科 東晋二教授、東京都医学総合研究所認知症プロジェクト長谷川成人参事研究員、野中隆副参事研究員に心から深謝いたします。また、本研究の遂行に多大な御指導と御協力を賜りました筑波大学臨床医学系 加藤奈津子技術職員に御礼申し上げます。

出典

本学位論文では、Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)の規定に従い、以下の論文の内容を一部改変して再利用している。

Ryohei Watanabe, Shinji Higashi, Takashi Nonaka, Ito Kawakami, Kenichi Oshima, Kazuhiro Niizato, Haruhiko Akiyama, Mari Yoshida, Masato Hasegawa, and Tetsuaki Arai (2020) Intracellular dynamics of Ataxin-2 in the human brains with normal and frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Acta Neuropathol Commun.* 8:176. (doi.org/10.1186/s40478-020-01055-9)