

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

( 古田 夏海 ) 印

(学位論文のタイトル)

Reduced expression of BTBD10 in anterior horn cells with Golgi fragmentation and pTDP-43-positive inclusions in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis (孤発性筋萎縮性側索硬化症患者の脊髄前角細胞におけるBTBD10蛋白発現減少・ゴルジ装置微細化・リン酸化TDP43蛋白陽性封入体集積についての病理学的検討)

(学位論文の要旨)

**A. 研究目的**

最近の研究で、孤発性ALS患者の脊髄前角細胞におけるBTBD10蛋白 (BTB/POZ domain containing protein10) 発現減少が報告されている (Nawa et al, 2012). セリン/スレオニンキナーゼであるAktは、標的となる蛋白をリン酸化することで、細胞の生存に必要なシグナルを伝達する。BTBD10はAktを不活化させるprotein phosphatase 2A (PP2A)を阻害することで、Aktを活性化すること (Nawa et al, 2008) . ALS2遺伝子がコードするalsin蛋白は、Rac1/PI3K/Akt3経路を活性化することで、SOD1変異体の誘導する神経細胞毒性を抑制することが知られており、BTBD10蛋白を高発現させたG93A-SOD1変異マウスで運動ニューロン死が減少したとの報告もある (Nawa et al, 2008) . BTBD10蛋白発現と運動ニューロン変性は密接な関係があると考えられる。しかしながら、ヒトのALSにおいてBTBD10蛋白の発現減少が神経細胞の変性と関連するかは依然として不明である。我々は、ALSの脊髄前角細胞においてBTBD10, Golgi装置, リン酸化TDP-43 (pTDP-43) に対する免疫染色を行い、病理学的に検討した。

**B. 研究方法**

ALS13例と非ALS 10例の腰髄前角細胞におけるホルマリン固定パラフィン包埋切片を、免疫組織学的方法を用いて検討した。一次抗体として当教室で作成したBTBD10に対するウサギポリクローナル抗体である抗BTBD10抗体を用いた。

次に、ALS5例の3ミクロン厚ミラー切片を用いて、BTBD10発現低下とGolgi装置の微細化およびpTDP-43の異常蓄積との関係を調べるため、一次抗体として抗BTBD10抗体に加え、human trans-Golgi network内側の蛋白質を認識する抗TGN46抗体、p-TDP43抗体を用いて検討を行った。

**C. 研究結果**

抗原の特異性に関して、ウエスタンブロッティングで抗BTBD10抗体は54kDa付近に特異的なバンドがみられた。また抗原ペプチドによる抗体吸収試験でも、抗BTBD10抗体の特異性が示された。非ALS例の脊髄前角細胞では、微細顆粒状に細胞質が抗BTBD10抗体によって染色された。一方、

ALS症例では、抗BTBD10抗体陽性となる神経細胞数が減少しており、特に大型の神経細胞において減少が明らかであった。ALS13例と非ALS10例で病理学的に脊髄前角細胞におけるBTBD10発現減少を検討した。結果は、非ALS例では平均5.0%（4.4～5.8%）のみでBTBD10発現減少がみられたのに対し、ALS例ではBTBD10発現減少が平均51.9%（42.1～59.5%）と優位に発現が減少していた（ $p < 0.001$ ）。ミラー切片を用いた検討では、BTBD10発現が正常である神経細胞の多くは、Golgi装置は正常でpTDP-43の異常凝集はみられなかった。一方、BTBD10発現が低下している神経細胞の多くは、Golgi装置の微細化やpTDP-43の異常凝集がみられた。

BTBD10発現が正常である神経細胞で、Golgi装置が正常であるものは平均89.6%（86.2～92.5%）、pTDP-43の異常凝集がみられないものは平均91.8%（89.7～93.1%）で、BTBD10発現が減少している神経細胞で、Golgi装置が正常であるものは平均10.5%（7.5～13.8%）、pTDP-43の異常凝集がみられないものは平均8.0%（6.9～10.3%）で、BTBD10が正常である神経細胞では、有意に正常なGolgi装置（ $p < 0.001$ ）またはpTDP-43凝集無し（ $p < 0.001$ ）が多くみられた。一方、BTBD10発現が減少している神経細胞では、Golgi装置の微細化がみられたものは平均93.5%（92.9～94.3%）、pTDP-43の異常凝集がみられたものは平均95.1%（93.8～96.5%）で、BTBD10発現が正常な神経細胞では、Golgi装置の微細化がみられたものは平均6.5%（平均5.7～7.1%）、pTDP-43の異常凝集がみられたものは平均4.8%（3.5～6.2%）で、BTBD10発現が減少している神経細胞では、有意にGolgi装置の微細化（ $p < 0.001$ ）またはpTDP-43異常凝集（ $p < 0.001$ ）が多くみられた。

#### D. 考察

大多数のALS症例で、TDP-43が異常凝集することが知られているが、今回、BTBD10蛋白発現減少とpTDP-43の異常凝集に強い関係が示されたことから、BTBD10発現減少はALSの病態に共通する機序である可能性が考えられた。

BTBD10蛋白発現が減少している神経細胞の大部分では、pTDP-43の異常凝集が起こっているのと同時に、Golgi装置の微細化がみられた。Golgi装置の微細化は、TDP-43が異常蓄積する神経細胞で高率にみられる（Fujita et al, 2008）。また、小胞体で合成された蛋白質は微小管上をGolgi装置へと輸送されるが、ALSではこの小胞輸送に障害があることが示唆されている（Sundaramoorthy et al, 2013）。微小管の安定化に関わる蛋白質であるstathminはAktにより活性化されることが知られているが（Karst et al, 2011）、BTBD10はAktを活性化させることから、ALSの運動ニューロンにおいては、BTBD10発現減少により微小管の不安定化が起こり、微小管を介した蛋白質輸送が障害されることで、Golgi装置の微細化が起こった可能性が推察される。

#### E. 結論

ALSの脊髄前角細胞では対照例と比較して、BTBD10蛋白発現の低下が有意にみられ、BTBD10蛋白の発現が低下している運動神経細胞では、Golgi装置の微細化や、pTDP-43の異常集積が高頻度でみられたことより、BTBD10の発現低下は、ALSにおける運動ニューロン変性過程に関与しているものと考えられた。