

19980040

パーキンソン病および多系統萎縮症の病態解明
に関する研究

(課題番号 H10-特別-008)

平成10年度厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)

平成11年 4月

主任研究者 若林孝一 (新潟大学脳研究所)

(別添2)

厚生科学研究費補助金 (厚生科学特別研究事業)
総括研究報告書

パーキンソン病および多系統萎縮症の病態解明に関する研究

主任研究者 若林 孝一 新潟大学脳研究所 脳疾患解析センター 助教授

研究要旨

原因不明の神経難病であるパーキンソン病 (PD) と多系統萎縮症 (MSA) における神経細胞変性機序を明らかにする目的から、 α -synuclein に対する特異抗体を用いこの二疾患を含む各種神経変性疾患剖検例について検討した。その結果、 α -synuclein の異常蓄積は PD を含めレビー小体の出現を伴う疾患と MSA に特異的であることが明らかとなった。つまり、この蛋白の異常蓄積は、レビー小体病では神経細胞内におけるレビー小体の形成により、一方、MSA では主にグリア細胞内の封入体として生じていることが明らかにされた。さらに、グリア細胞における α -synuclein の異常蓄積は、MSA ではオリゴデンドログリア内に生じ、中枢神経系に広範に分布しているのに対し、PD ではアストロサイト内に形成され、その出現には比較的長い経過を必要とし、中脳にはほぼ限局して出現することが示された。レビー小体病と MSA は神経細胞とグリア細胞における α -synuclein の異常を共有する conformational disorder である。

A. 研究目的

Parkinson 病 (PD) の大多数は孤発性であり、その原因は今なお不明であるが、1997年、常染色体優性遺伝形式を呈する PD において α -synuclein 遺伝子が原因遺伝子であることが判明した。その後 α -synuclein は PD に constant に出現する神経細胞内封入体である Lewy body (LB) の重要な構成成分のひとつであることが我々を含む国内外の研究者によって明らかにされた。 α -Synuclein は、Alzheimer 病脳において non-A β component として見出されたアミロイド蛋白の前駆体 (NACP) と同一であり、正常脳ではシナプス前終末に局在している。

本研究では、まず種々の神経変性疾患を含む多数の剖検例をもとに免疫組織化学的検索を行い、 α -synuclein の異常蓄積が PD に特異的であるか否かについて検討した。その結果、 α -synuclein の異常蓄積は代表的な脊髄小脳変性症である多系統萎縮症 (MSA) にも広範に生じていることを見出した。近年、複数の神経疾患において種々のグリア封入体の報告がなされているが、その先鞭をつけることになったのが MSA におけるグリア封入体の報告である。そこで本研究では神経細胞とグリア細胞の両面から PD と MSA という二疾患の病態メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 神経変性疾患剖検例における α -synuclein の局在に関する免疫組織化学的検討

LB の出現を伴う疾患として PD 10 例、dementia with

LBs (DLB) 9 例 (常染色体優性遺伝形式を呈する 2 例を含む)、incidental LB disease (ILBD) 8 例、Hallervorden-Spatz disease (HSD) 2 例を用いた。さらに、MSA、Alzheimer 病、Pick 病、進行性核上性麻痺、corticobasal degeneration、孤発性 ALS、家族性 ALS、常染色体優性ならびに常染色体劣性遺伝形式を呈する若年性パーキンソンニズム、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、Huntington 病、Joseph 病、myotonic dystrophy を含む 56 剖検例も対象とした。各例の病変部位から 4 μ m 厚のパラフィン切片を作製。ポリクローナルおよびモノクローナル抗 α -synuclein 抗体を用い ABC 法にて免疫染色を施し顕微鏡観察した。 α -Synuclein 免疫電顕にはホルマリン固定組織から 50 μ m 厚の切片を作製、浮遊法にて免疫染色を施し、エボン包埋後、超薄切片を作製し電顕観察した。

2. PD におけるグリア封入体の検討

孤発性 PD 30 例 (罹病期間 1-30 年)、ILBD 7 例、正常対照 30 例を対象とした。各例の中脳から 4 μ m 厚のパラフィン切片を作製。免疫染色には α -synuclein および β -synuclein、タウ、ユビキチン、チュブリンに対する抗体を用いた。また、アストロサイトのマーカーとして GFAP と vimentin を、オリゴデンドログリアのマーカーに transferrin を用い、 α -synuclein との二重免疫染色を施した。 α -Synuclein 陽性のグリア封入体はもどし電顕法にて観察した。各例におけるグリア封入体の数 (一側黒質あるいは半側中脳) を計測するとともに、黒質の神経細胞脱落の程度を 4 段階評価し、グリア封入体の数、黒質の神経細胞脱落、罹病期間の間の相関の有無について検討した。

C. 研究結果

1. α -Synuclein陽性構造物について

PD、DLB、ILBD、HSDのいずれにおいてもLBは α -synuclein強陽性を呈し、LBの前段階の構造物と考えられているpale bodyも α -synuclein陽性であった。さらに、PDでは脳幹を主体に、DLBでは海馬および大脳新皮質にも α -synuclein陽性の神経突起が認められた。HSDの1例ではDLBと同様の、他の1例ではPDあるいはDLBよりもさらに広範な部位にLBおよび α -synuclein陽性構造物が認められた。また、LBを伴ういずれの症例群でも黒質や青斑核では神経細胞体のびまん性陽性像がしばしば認められた。免疫電顕ではLBならびにpale bodyを構成している異常なフィラメントに α -synucleinの反応性が認められたが、ニューロフィラメントには反応性は認められなかった。

MSAではすべてのglial cytoplasmic inclusion (GCI)が α -synuclein強陽性を呈した。さらに、 α -synuclein陽性の封入体は神経細胞の胞体内と核内にも認められた。これらは橋核、黒質、線条体、視床下核、下オリブ核、脳幹網様体、弓状核、歯状回顆粒細胞などに認められたが、プルキンエ細胞には全く認められなかった。グリア細胞の核内にはごく稀に封入体が認められた。免疫電顕ではGCIならびに神経細胞封入体を構成する異常フィラメントに α -synucleinの反応性が認められた。

Alzheimer病では老人斑を構成するdystrophic neuritesの一部が陽性を呈したが、その他の疾患では α -synuclein陽性の異常構造物は認められなかった。

2. PDにおけるグリア封入体

PDでは30例中24例に α -synuclein陽性のグリア封入体が認められた。それらはクロマチンが疎の卵円形核を取り巻き、コイル状の形態を呈しており、Gallyas-Braak (G-B) 法で認められるグリア封入体と同一であった。それらはしばしばユビキチン陽性であったが、タウならびにチュブリン陰性であった。二重免疫染色では α -synuclein陽性の封入体を有するグリア細胞の多くがアストロサイト由来であり、稀にオリゴデンドログリアに α -synuclein陽性封入体が認められた。電顕的には25-40nm径のfilamentous structureから成っていた。

グリア封入体は黒質の背内側部に好発する傾向があり、中脳被蓋部にも認められた。少数は青斑核を含む脳幹被蓋にも認められたが、他の部位には認められなかった。ILBDおよび対照例にはグリア封入体は認められなかった。

PDでは黒質における神経細胞脱落の程度とグリア封入体の数（一側黒質および半側中脳）の間に相関($P<0.03$ および $P<0.001$)が認められ、さらに罹病期間とグリア封入体の数（半側中脳）の間にも相関($P<0.001$)が認められた。

D. 考察

本研究結果は、 α -synucleinの異常蓄積がLB disordersとMSAに特異的であることを示すものである。特に、LB disordersにおいては α -synuclein免疫組織化学によって、この蛋白の蓄積、凝集、そしてLBへと発展してゆく様を早期段階から追うことが可能になった。さらに、MSAでは α -synucleinの異常蓄積はオリゴデンドログリアの胞体内と核内、そして神経細胞の胞体内、突起内、核内の計5つの部位に形成されることが明らかにされた。

PDをはじめとするLB disordersの黒質や青斑核ではLBの他に、メラニン含有神経細胞の胞体内に、境界の明瞭なメラニンを含まないpaleな領域がしばしば認められ、pale bodyと呼ばれている。この構造物は、電顕的にLBを構成しているフィラメントと区別できない異常フィラメントおよびニューロフィラメントから成っており、それに連続してLBの形成を認めることがある。さらに、免疫組織化学的にはLBよりも染色性は弱いながらもユビキチン陽性である。今回、pale bodyが α -synuclein陽性であったことを併せ考えるとpale bodyはLBの前段階に相当する構造物であると考えられる。なお、光顕的にpale bodyとよく似た構造物はAlzheimer病やPick病、進行性核上性麻痺、corticobasal degenerationにも認められたが、それらは α -synuclein陰性であった。つまり、LB disordersの黒質や青斑核に認められるpale bodyは真にLBのprecursorである。

さらに今回、MSAではオリゴデンドログリアと神経細胞の胞体と核内に α -synucleinの異常蓄積が生じており、それらは異常なfilamentous structureから成っていることが示された。 α -Synucleinは正常脳ではシナプス前終末に存在する蛋白であるが、最近MSAにおいてGCIが α -synuclein陽性であるとの報告がなされている。Torpedo electroplaques (シビレエイ)の α -synucleinはhuman α -synucleinとhomologousであり、シナプス前終末のみならず神経細胞の核内にも存在することが知られているが、これまでヒト脳において α -synucleinが神経細胞の核内やグリア細胞内に存在するとの報告はなされていない。 α -Synucleinがシナプス前終末以外にも微量ながらも存在しているのか、さらにシナプス蛋白としての機能以外に果たしている役割など、今後の課題である。

これまで、多数の神経変性疾患において神経細胞およびグリア細胞に種々の封入体が出現することが知られている。しかしながら、今回検索した疾患群ではLB disordersとMSA以外には α -synuclein陽性となる封入体は認められなかった。特に、Cu/Zn SOD遺伝子変異を有する家族性ALSでは下位運動ニューロンにLBとよく似た構造物が認められ、LB-like hyaline inclusionと呼ばれているが、それらも α -synuclein陰性であった。また、常染色体優性ならびに常染色体劣性遺伝形式を呈する若年性パーキンソン

ニズム（いずれもLBの出現を欠く）において黒質および青斑核を染めてみたが α -synuclein陽性となる異常な神経細胞内構造物は全く認められなかった。すなわち、LBの出現しないPDは存在しないという立場からは、これら遺伝性のパーキンソニズムは明らかにPDとは異なる疾患であることが確認された。

LB disordersとMSAでは、ユビキチン・プロテアソーム系による蛋白分解機構に拮抗して α -synucleinの凝集、不溶化が生じていると推測される。 α -Synucleinはそれ自身が凝集しやすい性質を有しているが、この蛋白の異常蓄積は、前者では神経細胞内におけるLBの形成により、一方、後者では主にオリゴペンドログリア細胞内の封入体として生じている。つまり、このふたつの病態は α -synucleinの異常を共有するconformational disorderであると考えられる。

さらに今回、PDに認められる嗜銀性のグリア封入体は α -synuclein陽性であり、 α -synuclein陽性封入体を有するグリア細胞の大多数はアストロサイト由来であることが明らかになった。これまで、嗜銀性封入体を有するアストロサイトはその形態から、tufted astrocytes、thorn-shaped astrocytes、astrocytic plaquesの3種類が知られている。そのうちtufted astrocytesは進行性核上性麻痺にはほぼ特異的であり、前頭葉皮質や線条体に好発する。Thorn-shaped astrocytesは神経原線維変化を伴う例の脳室周囲や柔膜下に限局して認められる。一方、astrocytic plaquesは大脳皮質に認められ、現在corticobasal degenerationに特異的と考えられている構造物である。しかも、これらは免疫組織化学的にタウ陽性、 α -synuclein陰性である。したがって、今回PDに認められたastrocytic inclusionsはこれまで報告のあるアストロサイト封入体のいずれとも異なっている。

今回PDの中脳に認められたグリア封入体の分布はカテコラミンニューロンの分布に類似している。しかし、アストロサイトがLBあるいは神経細胞に由来する α -synuclein陽性構造物を貪食したという可能性は否定的である。例えばAlzheimer病では神経原線維変化を有する神経細胞が死滅した後、細胞外に遊離した神経原線維変化（ghost tangle）という状態が存在しうるが、PDにおいては事実上ghost LBという状態は観察されない。さらに、PDでは最も強い神経細胞脱落とグリオーシスは黒質の腹外側部に認められるが、今回グリア封入体は黒質の背内側部に好発していた。しかも、G-B染色や α -synuclein免疫組織化学では反応性アストロサイトは染まらないので、単に反応性アストロサイトの一部を認識していると考えられるにも無理がある。最近、MochizukiらはTUNEL法を用いた検索から、PDでは11例中8例の黒質においてグリア細胞にapoptotic-like changeが認められたと報告している。さらに、Köselらも22例中12例の黒質にTUNEL陽性のグリア細胞が認められ、うち11例ではTUNEL陽性グリアは中脳被蓋部にも認められたという。

神経細胞の胞体および軸索内における α -synucleinの異常蓄積はILBDでもconstantに認められることから、PDでは早期段階から生じている変化であると考えられる。一方、今回ILBDや軽度の黒質変性を呈するPDでは α -synuclein陽性のグリア封入体は全く認められないか、認められてもごくわずかであった。このことはグリア細胞における α -synuclein陽性封入体の形成には比較的長い期間を必要とすることを意味する。似たような事例はAlzheimer病ならびに家族性ALSにおいても報告されている。Nakanoらは25年という長期経過のAlzheimer病においてアストロサイト内にpaired helical filamentが存在することを電顕的に確認している。Katoらは、罹病期間が23年および11年という長期例の家族性ALSにおいてLB-like hyaline inclusionが神経細胞のみならずアストロサイト内にも形成されることを報告している。つまり、PDでは α -synucleinの異常蓄積はグリア細胞にも起こるが、その進行速度は神経細胞と比べ緩やかなものであると考えられる。

E. 結論

α -Synucleinの異常蓄積はLBの出現を伴う疾患とMSAに特異的である。本研究から、この蛋白の異常蓄積は、前者では神経細胞内におけるLBの形成により、一方、後者では主にグリア細胞内の封入体として生じていることが明らかにされた。さらに、グリア細胞における α -synucleinの異常蓄積は、MSAではオリゴペンドログリア内に生じ、中枢神経系に広範に分布しているのに対し、PDではアストロサイト内に形成され、その出現には比較的長い経過を必要とし、中脳にはほぼ限局して出現することが示された。レビー小体病とMSAは神経細胞とグリア細胞における α -synucleinの異常を共有するconformational disorderである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H: α -Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 249: 180-182, 1998
- 2) Wakabayashi K, Hayashi S, Kakita A, Yamada M, Toyoshima Y, Yoshimoto M, Takahashi H: Accumulation of α -synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 96: 445-452, 1998
- 3) Iwanaga K, Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tomita I, Satoh H, Takashima H, Satoh A, Seto M, Tsujihata M, Takahashi H: Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body

diseases. Neurology, in press

- 4) Wakabayashi K, Yoshimoto M, Fukushima T, Koide R, Horikawa Y, Morita T, Takahashi H: Widespread occurrence of α -synuclein/NACP-immunoreactive neuronal inclusions in juvenile- and adult-onset Hallervorden-Spatz disease with Lewy bodies. Neuropathol Appl Neurobiol, in press

2. 学会発表

- 1) 若林孝一、林森太郎、柿田明美、山田光則、豊島靖子、吉本真、高橋均：Lewy body disordersと multiple system atrophyに共通する α -synuclein/NACPの異常蓄積. 第40回日本神経病理学会
- 2) 若林孝一、林森太郎、吉本真、高橋均：パーキンソン病における α -synuclein/NACP-positive astrocytic inclusionの出現. 第40回日本神経病理学会
- 3) 若林孝一、福島隆男、小出玲爾、堀川楊、野田恒彦、渡部裕美子、森田俊、高橋均：Juvenile form of generalized neuroaxonal dystrophy with neurofibrillary and Lewy body pathologyの1剖検例. 第40回日本神経病理学会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

(別添3)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌名、巻号頁数、論文名	刊行年月	執筆者氏名
Neurosci Lett 249: 180-182 α -Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy	1998.6	Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H
Acta Neuropathol 96: 445-452 Accumulation of α -synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy	1998.11	Wakabayashi K, Hayashi S, Kakita A, Yamada M, Toyoshima Y, Yoshimoto M, Takahashi H
Neurology (in press) Lewy body-type degeneration in cardiac plexus in Parkinson's and incidental Lewy body diseases	1999	Iwanaga K, Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tomita I, Satoh H, Takashima H, Satoh A, Seto M, Tsujihata M, Takahashi H
Neuropathol Appl Neurobiol (in press) Widespread occurrence of α -synuclein/NACP-immunoreactive neuronal inclusions in juvenile- and adult-onset Hallervorden-Spatz disease with Lewy bodies	1999	Wakabayashi K, Yoshimoto M, Fukushima T, Koide R, Horikawa Y, Morita T, Takahashi H

19980040

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。