

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (AR-JP)

5家系における *parkin* 遺伝子変異の検討

丸山 美枝子¹、斎藤 正明¹、中野亮一¹、池内 健¹、
石川 厚²、湯浅 龍彦³、辻 省次¹

目 的

常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (AR-JP) は、パーキンソニズムと軽度のジストニアを主徴とし、症状の日内変動や、睡眠による症状の改善を呈する L-DOPA 反応性の若年性のパーキンソニズムと定義される。AR-JP は連鎖解析により 6 番染色体長腕 6q25.2-q27 に位置することが明らかにされていたが、1998 年、Kitada¹⁾により、同領域内に位置する新規遺伝子 *parkin* が AR-JP の原因遺伝子として単離、同定された。そこで我々は AR-JP 家系において *parkin* 遺伝子の変異解析を行い、遺伝子変異と臨床像の相関を比較、検討した。

対 象

本邦 AR-JP 5 家系 (うち発症者 10 名; 男性 6 名, 女性 4 名。発症年齢 12 歳 ~ 38 歳。) (図 1)

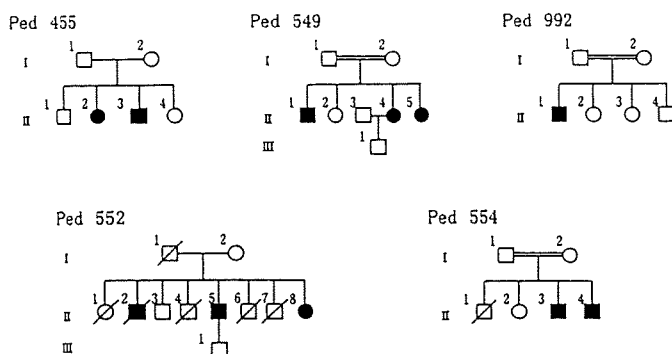


図 1 家系図

方 法

parkin 遺伝子の各々のエクソンの両側イントロンに設定した PCR primer を用いて、各家系の発症者において PCR を行い、欠失の有無を検索した。PCR の結果欠失が認められた症例については、*parkin* 遺伝子の cDNA をプローブに用いた Southern blot 解析にも欠失を確認した。また、血族婚を認めず、6q25.2-q27 上のマイクロサテライトマーカーを用いたハプロタイプ解析から AR-JP locus に heterogeneity を示す家系においては、複合ヘテロ接合の可能性を考慮して、各エクソンごとに欠失領域周辺を gene dosage 解析し確認した。

一方、明らかな欠失の認められない症例については、末梢血由来の total RNA を用いて RT-PCR を行った後翻訳領域の塩基配列解析を行うとともにゲノム DNA を用いた PCR-RFLP 解析を行い、患者特異的な変異を検出した。

結果および考察

AR-JP 5 家系の発症者を解析した結果、Ped 455 において del. exon 4 と del. exon 2-4 の複合ヘテロ接合型欠失、Ped 549 においてホモ接合体の del. exon 2-4、Ped 992 においてホモ接合体の del. exon 6-7 を検出した (図 2)。いずれの欠失も frameshift を生じ、del. exon 2-4 と del. exon 4 は exon 5 で、del. exon 6-7 は exon 8 で終止コドンを生じる。

Point mutation としては、Ped 522 において exon 2 の nonsense mutation (C97T, Arg33 → stop)、Ped 554 において exon 12 の missense mutation (G1292T, Cys431 → Phe) を検出した (図 2)。

3 家系で認めた欠失や、exon 2 の nonsense mutation はタンパク質の大部分を喪失させることから、Parkin タンパクの loss of function が予想される。特筆すべき変異として、Ped 554 で認めた exon 12 の missense mutation による 431 番のシステインからフェニルアラニンへのアミノ酸置換が挙げられる。この 431 番システイン残基は *parkin* タンパクの C 末端に位置し、2 個の亜鉛イオンへの結合部位を有する RING finger motif に必須のアミノ酸残基であり、これがフェニルアラニンへ置換することにより亜鉛イオンとの結合能の低下が生じ、RING finger 構造の変化や Parkin タンパクの機能不全もしくは機能喪失を引き起

1 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野
2 国立療養所西小千谷病院神経内科
3 国立精神・神経センター国府台病院神経内科

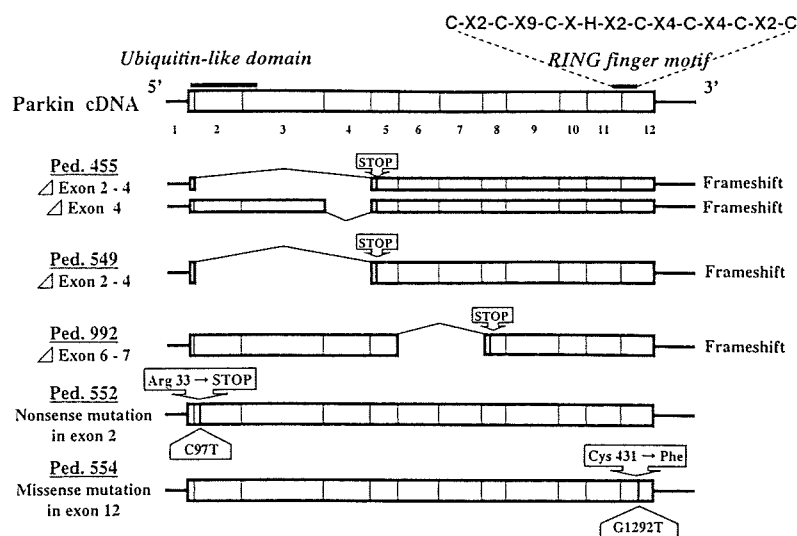


図2 変異 Parkin 遺伝子構造のまとめ

Pedigree	455		549			552		554		992
consanguinity	-		+			遠戚		+		+
ID	II-2	II-3	II-1	II-4	II-6	II-5	II-8	II-3	II-4	II-1
Mutation	△ exon 4 △ exon 2-4	△ exon 4 △ exon 2-4	N.E	△ exon 2-4	△ exon 2-4	exon 2 nonsense	exon 2 nonsense	exon 12 missense	exon 12 missense	△ exon 6-7
M/F	F	M	M	F	F	M	F	M	M	M
Age	15	13	68	60	54	64	57	45	42	35
Age at onset	12	12	38	33	23	35	38	26	24	30
Yahr stage	I	I	III	III	III	III	III	III	II	I
Symptom at onset	gait disturbance		akinesia	gait disturbance	gait disturbance	gait disturbance	gait disturbance	gait disturbance	tremor	gait disturbance
Sleep benefit	-	+	?	+	+	+	+	+	+	-
Foot dystonia	歩行時 上肢にあり	歩行時 上肢にあり	?	+	+	-	+	+	+	+
DTR	減弱	+	+	brisk	+	brisk	+	brisk	brisk	亢進
DID	-	-	?	+	+	+	+	+	+	+
WO	-	-	?	+	+	+	+	+	+	+

図3 遺伝子変異と臨床像の相関

こす可能性を考えた。

最近の Hattori ら²⁾の知見を含め、今回の解析結果から、AR-JP の疾患病態は Parkin タンパクの機能喪失が引き起こすものと示唆される。しかしながら、5 家系における遺伝子変異と臨床像の比較では、発症年齢や臨床症状等の臨床像と parkin 遺伝子変異との間には明らかな相関は認められなかった (図3)。

結 論

今回、我々は AR-JP 5 家系においてそれぞれ異なる parkin 遺伝子変異 (欠失変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異) を見いだしたが、各家系間における変異と臨床像には明らかな相関は認められなかった。1 家系で認めた

exon 12 の ミスセンス変異は、構造解析上 Parkin タンパクの機能に何らかの影響を及ぼすことが想定され、AR-JP をはじめとした機能喪失型疾患の発症メカニズムを考える上で重要と思われる。parkin 遺伝子変異が引き起こす分子病態メカニズムの解明に向け、今後さらに数多くの AR-JP 家系について genotype-phenotype correlation に関する詳細な検討が必要と考えた。

文 献

- 1) Kitada T et al. Nature 392:605-8, 1998
- 2) Hattori N et al. Biochem Biophys Res Commun 249:754-8, 1998

相模原地区のパーキンソニスムの遺伝子検索 (1)

長谷川一子 古澤英明 坂井文彦 楠淳一 横山照夫

小幡文弥* 船山 学*

はじめに

近年、家族性パーキンソニスムの遺伝子検索が行われてきている。ここで、家族性パーキンソニスムに含まれる疾患は臨床的にも神経病理学的にも、単一ではなく、遺伝様式も常染色体劣性遺伝様式をとる群、ジストニアが前景にたつ群、Lewy小体を欠く一群などが含まれる。家族性パーキンソニスムの原因遺伝子としては、 α -シヌクレインが世界で初めて報告されたが、この遺伝子異常が見いだされた家系はイタリア・ギリシア由来の家系で、臨床像、病理像ともに極めて孤発性パーキンソン病に類似している。また、Kitadaらの報告したParkinは我が国に多く症例が見いだされている若年型パーキンソニスムの原因遺伝子と考えられ、この群は若年発症でジストニアが顕著で、神経病理学的にはLewy小体が認められない。今回我々が検討を開始したパーキンソニスム家系は神奈川県相模原地区在住の優性遺伝様式をとるパーキンソニスムで、臨床像は薬物療法が有効で孤発性パーキンソン病と何等の差異を認めないが、神経病理学的には孤発性パーキンソン病の診断根拠ともなるLewy小体を認めない特殊な群である。このパーキンソニスム家系の原因遺伝子を明らかにすることは、臨床経過を追っている我々の責務と考え、分子遺伝学的アプローチを開始した。

目的

我々が約20年に亘り経過観察中である相模原地区の5世代に亘るパーキンソニスム家系の原因遺伝子が、既知の遺伝子とは異なることを証明することと、自験家系の原因遺伝子の解明と、その機能を明らかとすることを目的とした。

対象

対象は相模原地区の家族性パーキンソニスム発症者および、発症者の未発症同胞とした。発症者および未発症同胞から採血する際には本研究の目的等についてインフォームド・コンセントを充分に行った。

方法

1) 既知遺伝子の検討:

(1) α -Synuclein; イタリア・ギリシア家系の原因遺伝子としてPolymeropoulosら¹⁾により α -Synucleinが報告されている。この家系は常染色体優性遺伝様式をとりLewy小体陽性である。最近、抗 α -Synuclein抗体でLewy小体が染色されることが明らかとなり、 α -Synucleinはパーキンソン病の発症との関連でも注目されている。 α -Synucleinの遺伝子変異部位としてはexon 3, 4が報告されているため、自験例についてもこの両者での変異の有無について検討した。exon 3についてはKrugerら²⁾に従い、exon 4はPolymeropoulosらのprimerを用いてPCR増幅した後、MaeIII siteの有無を検証した。なお、Krugerらの用いた制限酵素であるTsp 45 Iが入手できなかったため、Mva I が同様。

北里大学 東病院 神経内科

*北里大学 医療衛生学部

Analysis of α -Synuclein Gene in Kitasato Family

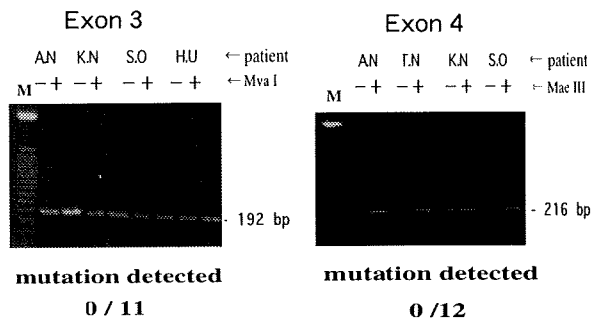


図 1 .

の作用を有することを確認後, Mva I を Tsp 45 I の代わりに使用した.

(2) Parkin; Parkinについては前述した様な特徴を示し, 常染色体劣性遺伝様式をとる群である. 遺伝形式, 臨床像は自験例とは異なるが, Lewy小体を欠く群であるため, 自験例についても遺伝子欠失の有無を検討した. 具体的にはKitadaら³⁾の報告に示されているPCR primerを用い, hot spotsと考えられるParkinのexon 3, 4, 5, 6, 7を増幅し, exon deletionの有無を検討した.

(3) Tau; Tau は神経原線維変化との関連が古くから注目されているが, 最近, FTD-P 17 (fronto-temporal dementia with Parkinsonism linked Chr.17) の原因遺伝子としても注目されてきている. FTD-P 17と自験例とは臨床像および病理像が異なるため, Tau 遺伝子の変異が自験家系の原因遺伝子である可能性は少ないと想定されるが, 否定するために検討を加えた. TauについてはSpillantiniら⁴⁾ Huttonら⁵⁾, Poorkajら⁶⁾の使用したprimerを用い, exon 10とその後ろのintronを増幅しdirect sequencingを行った.

exon 12についてはPoorkajらのprimerを用い, direct sequencingを行った.

(4) ubiquitin (UCH-L1遺伝子); Leroyら⁷⁾によりパーキンソン症家系の中にdeubiquitin enzymeであるUCH-L1のIle 93 → Met変異が報告されている. この変異に

Analysis of Parkin gene in Kitasato Family

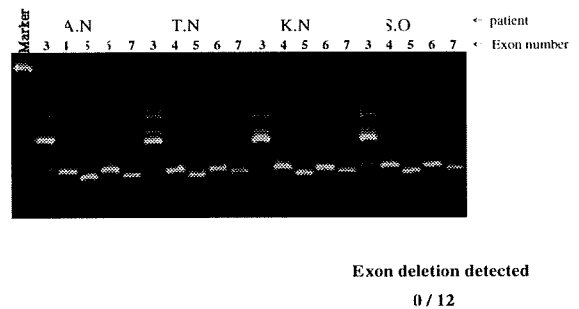


図 2 .

ついて, 彼らのPrimerを用いてPCR 増幅後, direct sequencingを行った.

(5) Dynactin; Dynactin遺伝子変異が家族性パーキンソン症の原因という報告はないが, 家族性パーキンソン症で2 p 13に原因遺伝子があるとの抄録をもとに検索したところDynactin遺伝子が同部位に存在することから検討を加えた. 合成プライマーは文献8, 9)によった.

2) microsatellite markerによる検討: 諸家の方法に従って, linkage mapping set (Applied Biosystems)および, autosequencer (ABI Prism 377)を使用してLinkage解析を行った.

結果

1) 既知遺伝子の検討:

(1) 図1に示すように α -Synuclein遺伝子での変異を示した患者は, exon3およびexon4をそれぞれ11および12人について調べたが, exon3およびexon4の双方ともなかった.

(2) Parkinでは調べた12人の患者では図2示すようにexon 3 ~ 7のうち, いずれかのexonについてdeletionが存在した症例はなかった.

(3) Tauについては, exon10に続くintron中に報告されている変異は検出されなかった. また, exon12の279Val → Metの変異もなかった.

(4) UCH-L1遺伝子ではLeroyらのprimerを用いてexon 4を増幅し, PCR産物の

direct sequencingを行った。その結果、調べた自家系患者9人の中で、彼らの報告した変異を示したものはなかった。しかし、検査した患者9人すべてにintron 4内にC362→Gの塩基置換を認めた。この為、この塩基置換が疾患と関連する可能性が考えられ、血縁者、健常者における塩基置換の有無を検討した。すると、3人の健常兄弟および2人の非血縁健常者にも検出され、この塩基置換はパーキンソニズム発症とは無関係なpolymorphismであると考えられた。

(5) Dynactin遺伝子ではintron 1内に点変異が認められたが、これも健常兄弟および非血縁健常者にも検出され、この塩基置換はパーキンソニズム発症とは無関係なpolymorphismであると考えられた。

2) microsatellite markerによる検討は現在数名の患者について施行中である。この結果についてはさらに症例を積み重ねた後、連鎖解析を行い、原因遺伝子の染色体座についての決定を行っていく予定としている。

考案

自験パーキンソニズム家系は臨床的および神経病理学的に極めて特異な常染色体優性家系である。今回の検討により自験家系が α -Synuclein遺伝子のpoint mutation, Parkin遺伝子の欠失, Tau遺伝子変異, UCH-L1遺伝子変異, Dynactin遺伝子と関連している可能性は否定的となった。現在, microsatellite markerによって連鎖解析を行っているが、病理学的にLewy小体を示さない点、および青斑核には異常を見いだしていない点に着目した、分子生物学的検討も加えていく必要がある。

結論

相模原地区のパーキンソニズム家系患者の原因遺伝子は α -Synuclein, Parkin, Tau, UCH-L1遺伝子変異のいずれとも異なる可能性が高い。

参考文献

- 1) Polymeropoulos MH et al Science 276:2045-2047. 1997
- 2) Kruger R et al Nature genetics 18:106-108. 1998
- 3) Kitada T et al Nature 392:605-608. 1998
- 4) Spillantini MG et al . Proc Natl Acad Sci USA 95:7737-7741. 1998
- 5) Hutton M et al Nature 393:702-705. 1998
- 6) Poorkaj P et al Ann Neurol 43:815-825,.1998
- 7) Leroy E et al Nature 395:451-452. 1998
- 8) Tokito MK et al Molec Biol Cell 7:1167-1180, 1996
- 9) Collin GB et al Genomics 53:359-364. 1998

核内レセプター-human Nurr1 の遺伝子構造とプロモーター領域の解析

中村重信 鳥居 剛 瓦井俊孝 川上秀史

はじめに

パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質のドパミン (DA) ニューロンが脱落することが特徴である。Nurr1 は、中脳黒質、腹側被蓋に豊富に発現するリガンド不明の核内レセプターであり、DA ニューロンの発生・分化に必須である。そのため、Nurr1 の構造やリガンド結合能の異常が PD 患者の神経細胞死に関係する可能性がある^{1,2)}。我々は、PD 治療の新しい方法を検索するため、ヒト Nurr1 を単離し、遺伝子構造を明らかにし、転写開始点を決定した。さらに、Nurr1 は種々の刺激により発現が誘導されるので、Nurr1 遺伝子のプロモーター領域に、刺激反応性の Nurr1 の発現誘導領域を決定した³⁾。

方 法

1) クローニングと塩基配列決定：ヒト黒質 cDNA ライブラリーを鋳型にして、ヒト Nurr1 cDNA の一部を PCR 法

にて増幅した。この PCR 産物を probe にしてヒト PAC ライブラリーを screening し、1 個の陽性クローンを得た。さらに pBluescript に subcloning し、塩基配列を決定した。2) ノザンプロットティング：HeLa 細胞を PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), A23187 (Ca^{2+} ionophore), CMX (cycloheximide) を加えた培地で 30 分, 1 時間, 3 時間, 6 時間および 12 時間培養後, total RNA を抽出した。RNA 5 μg を transfer し, PAC ライブラリーの screening に用いた probe を hybridization させた。3) 転写開始点の決定：HeLa 細胞を PMA, A23187, CMX を加えた培地で 3 時間培養後, mRNA を抽出した。RNA 5 μg と exon 1 に対応する 35bp の合成 primer を用いて, primer 伸長法により転写開始点を決定した。4) プロモーター領域の解析：5' 隣接領域の種々の長さの insert を PGV-B vector に組み込み, deletion mutant を作成した。pRL-TK を内部コントロールとして HeLa 細胞に cotransfection し, PMA および A23187 を含む培地で 6 時間培養後, 細胞を回収し, luciferase 活性を測定した。

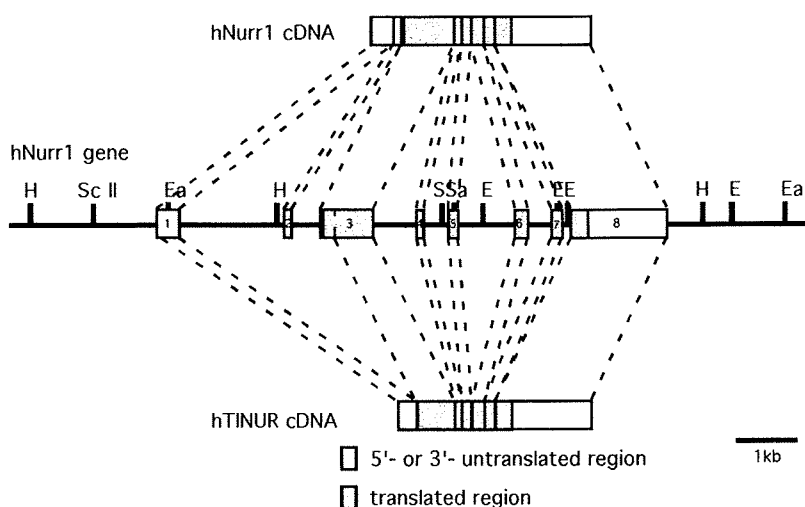


図1. ヒト Nurr1 の遺伝子構造. ヒト Nurr1 cDNA (上段) とヒト TINUR cDNA (下段) とを示す. H, ScII, Sa, E, Ea および S はそれぞれ制限酵素認識部位 HindIII, SacII, SalI, EcoRI, EagI および SmaI を表す.

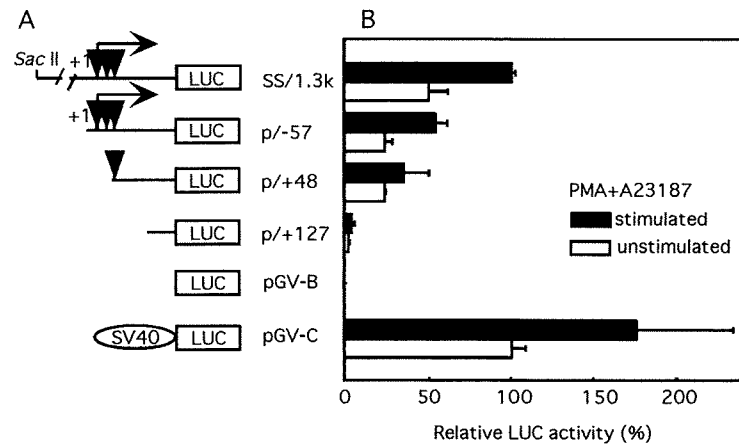


図4. 薬剤刺激に伴うヒト Nurr1 のプロモーター活性の解析. (A) 種々の長さのコンストラクト. 矢頭は転写因子結合配列 CRE, CArG-like, SP-1 site を示す. +1 は転写開始点. 陽性コントロールとして, SV40 のプロモーター/エンハンサーをもつ PGV-C を用い, 陰性コントロールには, プロモーター/エンハンサーをもたない PGV-B を用いた. 1 コンストラクトあたり luciferase 活性を 3 回測定し, 同じ実験を 2 回繰り返した. 標準偏差は error bar で示す.

結 果³⁾

1) ヒト Nurr1 は全長約 8.3kb の遺伝子で, 8 つの exon と 7 つの intron からなる (図 1). Intron は GT-AG rule に従っており, 翻訳領域は exon3 から 8 に渡っている (表 1). 5' 隣接領域には転写因子結合配列 CRE (cAMP responsive element), CArG-like box, Sp-1 site を各 1 ケ所認めた (図 3). 2) ヒト Nurr1 の RNA は, HeLa 細胞を薬剤刺激 30 分後から発現誘導を認め, 3 時間でピークに達し, 12 時間ではほぼ消失した. 未刺激 HeLa 細胞では Nurr1 の発現誘導は認められなかった. 3) 薬剤刺激にて誘導された Nurr1 の転写開始点は, CRE 内に 1 ケ所同定された (図 2). 未刺激 HeLa 細胞から抽出した mRNA では, バンドは認められなかった. 4) 転写因子結合配列 (CRE, CArG-like box, Sp-1 site) を含む 5' 隣接領域は, PMA, A23187 刺激により Nurr1 遺伝子の転写活性を促進することが示された (図 4).

考 察

Nurr1 の遺伝子構造は Nur77, NOR-1 の遺伝子構造と類似しており, これらは一つの subfamily を形成している⁴⁾. ヒト Nurr1 とマウス Nurr1 の遺伝子構造を比較すると, 5' 隣接領域の転写調節因子を含めて極めてよく保存されている^{5) 6)}. Nurr1 の発現は, 薬剤刺激のほか, 膜の脱分極, 痙攣, 脳虚血などの機械的刺激によっても誘導される^{4) 10)}. 本実験により, 薬剤刺激による Nurr1 の発現誘導には, 5' 隣接領域の転写因子結合配列が重要な役割をしていることを示した. マウス Nurr1 には 2 ケ所の転写開始点があるが^{3) 8) 9)}, 薬剤刺激で誘導されたヒ

ト Nurr1 の転写開始点は 1 ケ所であった. ヒト Nurr1 の cDNA には TINUR と呼ばれる isoform があることから, 転写調節因子や alternative splicing などが Nurr1 の機能発現に影響する可能性がある⁵⁾. また, Nurr1 は中脳の黒質や腹側被蓋に発現し, DA ニューロンの発現・最終分化に必須である. 今後は PD での Nurr1 遺伝子多型の検索が重要であろう. さらに, Nurr1 遺伝子の発現調節を行うことによって DA ニューロンへの分化を介する PD の根本的治療のきっかけをつかみたいと考えている.

結 語

ヒト Nurr1 遺伝子の遺伝子構造を明らかにし, プロモーター領域の解析を行った. 今後は PD の診断・治療への Nurr1 遺伝子の応用を考えたい.

文 献

- 1) Zetterstrom RH. et al: Science, 248-250, 1997.
- 2) Saucedo-Cardenas O. et al: Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 4013-4018, 1998.
- 3) Torii T. et al: Gene, in press.
- 4) Maruyama K. Int. J. Oncol., 1237-1243, 1998.
- 5) Mages HW. et al: Mol. Endocrinol., 1583-1591, 1994.
- 6) Law SW. et al: Mol. Endocrinol., 2129-2135, 1992.
- 7) Honkaniemi J. et al: J. Cereb. Blood Flow Metab., 557-565, 1996.
- 8) Saucedo-Cardenas O. et al: Gene, 135-139, 1997.
- 9) Castillo SO. et al: Genomics, 250-257, 1997.
- 10) Okabe T. et al: J. Immunol., 3841-3879, 1995

パーキンソン病患者におけるMTHFR遺伝子多型と ホモシステインの関与

中島健二 古和久典 安井建一 竹島多賀夫
 柏谷義宏 足立芳樹 浦上克哉

はじめに

われわれは、本学会議において次の点に関して検討してきた。まず、Takeshimaら¹⁾が作成したラット中脳ドパミン神経細胞初代培養系を用いて、神経栄養因子の有効性の確認および含硫アミノ酸であるホモシステイン(Hcy)の神経毒性について検討し報告した。さらにパーキンソン病患者を対象として、分子生物学的手法を用いた疫学的解析を行ってきた。メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)は、その遺伝子多型により酵素活性が変化し、多型ホモ(Val/Val)型では軽度の高Hcy血症を来すことが知られている²⁾。昨年我々は、パーキンソン病において、MTHFR遺伝子多型頻度の有意な変化を見だし、遺伝的危険因子のひとつであることを報告した。今回、さらに症例数を増やして遺伝子頻度の検討を行うとともに、一部の症例では、血漿Hcy濃度、MTHFR酵素活性、MTHFR関連ビタミン濃度等を測定し、パーキンソン病の臨床像との関連性を検討したので報告する。

方 法

(1)パーキンソン病患者(PD)群208例(平均年齢69.1歳)、健常対照(CTL)群201例(平均年齢68.6歳)を対象とし、白血球成分より分離精製したゲノムDNAを用いた。動脈硬化性パーキンソニズムの可能性が考えられる症例は除外した。MTHFR遺伝子のAla677Val変異についてFrosstら³⁾の方法にしたがってPCR-RFLPを行い、遺伝子頻度について χ^2 検定を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

(2)PD群86例(平均年齢67.7歳)、CTL群42例(平均年齢64.4歳)より採血したのち血漿分離し、測定まで凍結保存した。血漿システインおよびHcy濃度はhomocysteic acidをinternal standardとして高速液体クロマトグラフィ蛍光検出器法を用いて測定した⁴⁾。リンパ球MTHFR酵素活性はKangら⁵⁾の方法にしたがってMTHF酸化還元反応を用いて測定した。Mann-Whitney検定および一元配置分散分析を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

(3)PD群の臨床像に関して、年齢、性、発症年齢、罹病期間、重症度(Yahr分類)、服薬内容を調査し、各結果との関連性を検討した。

鳥取大学医学部脳神経内科

結 果

(1)PD群ではAla/Ala 36%, Val/Ala 47%, Val/Val 17%, CTL群ではAla/Ala 41%, Val/Ala 49%, Val/Val 10%であった(図1)。両群の遺伝子頻度の分布はHardy-Weinbergの法則に適合していた。CTL群に比して、PD群でVal/Val変異が有意に高頻度で認められた。

(2)血漿システイン濃度は、PD群 287.6 ± 105.7 nmol/ml, CTL群 304.3 ± 109.4 nmol/mlで両群間に有意差は認められなかった。血漿Hcy濃度は、PD群 14.5 ± 12.1 nmol/mlで、CTL群 8.7 ± 3.5 nmol/mlに比して有意に高値であった($p=0.0027$)。血漿Hcy値をMTHFR遺伝子多型で分けると、PD Val/Val群で他群に比して有意に高値であった($p=0.0007$)(図2)。MTHFR酵素活性に関しては、PD群で従来の報告と同様に、遺伝子多型により有意にかわり、ホモ型で最も低下した(図3)。CTL群では同様の傾向が認められた。MTHFR酵素活性のthermolabilityに関しては、PD群、CTL群ともにホモ型で有意に酵素活性が低下した。PD群のみで検討した血中葉酸値は1例を除いて全員正常範囲であった。ホモ型でのみ血漿Hcy値と血中葉酸値との間に負の相関が認められた。血中ビタミンB₁₂値との間に関連性は認められなかった。

(3)血漿Hcy値と年齢、性、発症年齢、罹病期間、重症度(Yahr分類)、服薬内容(L-DOPAおよびその他の抗パーキンソン薬の有無)について検討したが、関連性は認められなかった。

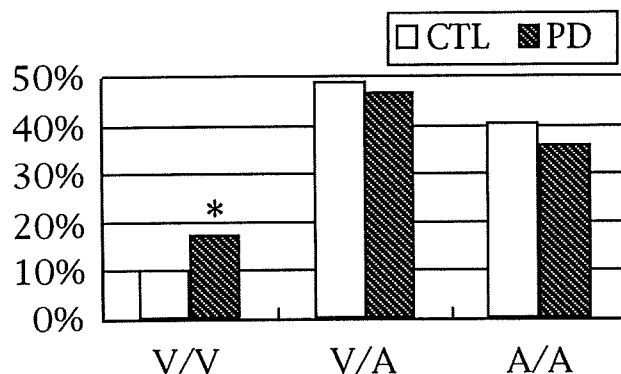


図1. MTHFR遺伝子多型の頻度

* $p<0.05$ vs CTL

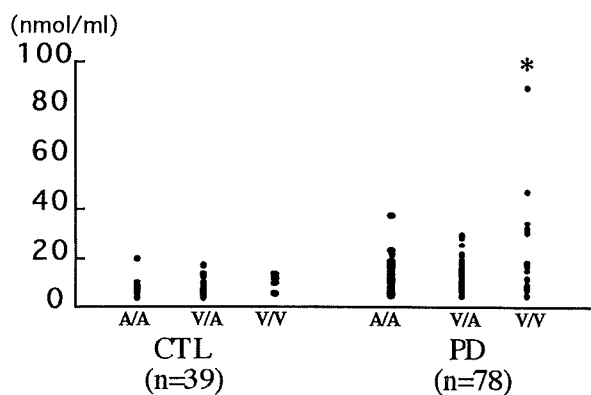


図2. MTHFR遺伝子多型と血漿Hcy濃度
血漿Hcy濃度は、PD Val/Val多型で他群に比して有意に高値を示した。*p=0.0007 (ANOVA, post hoc)

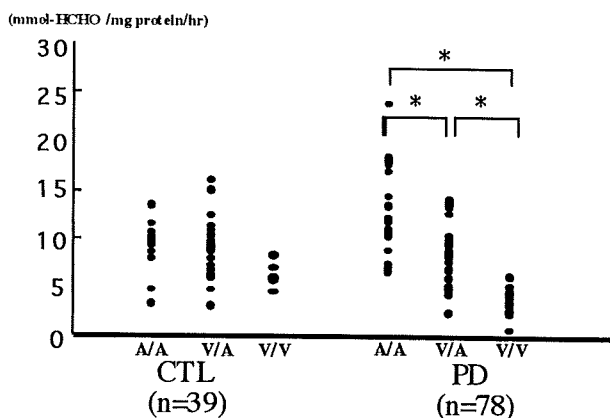


図3. MTHFR遺伝子多型とMTHFR酵素活性
MTHFR酵素活性は、PD群ではAla/Ala, Val/Ala, Val/Valの順で有意に低下した。CTL群においては同様の傾向が認められた。*p<0.0001 (ANOVA, post hoc)

考 察

MTHFRは、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸を5-メチルテトラヒドロ葉酸に還元する酵素で、生合成反応のメチル基供与に関わる重要な酵素である。血中Hcy濃度とMTHFR遺伝子多型の研究から、Ala677Val変異の多型ホモ型で軽度の高Hcy血症を来すことが明らかにされた³⁾。欧米⁶⁾や本邦^{7B)}の報告によると健常対象者の8~11%がホモ型と考えられている。昨年と同様に今回の検討においても健常対象者のホモ型は10.4%であり、パーキンソン病患者において多型ホモ型が17.3%と有意に高頻度であることがわかった。Harmonら⁹⁾は、同様の検討を行い有意差がなかったと報告しているが、パーキンソン病の発症年齢を限定している点や対照群でのホモ型の頻度も7.1%と少ない。さらに血漿Hcy値やMTHFR活性の検討はされておらず単純な比較は困難と思われる。

臨床的にパーキンソン病とHcyとの関連性をみた報告は少ない。Allainら¹⁰⁾はパーキンソン病患者で血漿システイン値には変化を認めず、血漿Hcy濃度のみが高い傾向であることを報告し、鉄イオンの過酸化との関連性を考察している。Kuhnら¹¹⁾は同様の結果を示し、動脈硬化との関連性を考察している。今回われわれは、動脈硬化との関連性が考えられる症例は除外し、臨床症状およびL-DOPA等の薬剤の反応性がよい典型的な症例のみを対象とした。本検討においても、血漿システイン値はCTL群と差がなく、血漿Hcy値のみが有意に高値であった。この病態をさらに明らかにするため、MTHFR酵素活性を検討したところ、Hcy値は、MTHFR遺伝子多型に基づく酵素活性の変化と強く関連することが明らかとなった。一方、HcyとMTHFRの代謝に関与する葉酸は、ホモ型患者においてのみ負の相関が示された。発症年齢や罹病期間、重症度、服薬内容との関連性は認められなかった。昨年の本会議で報告したように、Hcyは培養神経細胞に対し毒性を有し、その毒性は低濃度ではドパミン神経を選択的に傷害し、高濃度ではドパミン神経以外の神経細胞に対しても認められた。このことは、わずかな脳内Hcyの上昇がドパミン神経の変性を選択的に加速する可能性を示唆し、パーキンソン病の発症要因となっている可能性が考えられた。以上の点からパーキンソン病患者におけるMTHFR遺伝子多型(特にホモ型)が、病態を考える上で重要な役割を果たすものと考えられる。

今後、Hcyの神経細胞に対する毒性の機序を明らかにしていくことが必要である。また、食事療法などで臨床的に血漿Hcy値を改善することによって、パーキンソン病患者の臨床症状の改善が得られるのか否か、また人種差によるMTHFR遺伝子多型の頻度差やパーキンソン病との関連性の有無を明らかにしていく必要がある。

文 献

- 1) Takeshima T, et al: JNeurosci Meth 67: 27-41, 1996
- 2) Takeshima T, et al: JNeurosci 14: 4769-4779, 1994
- 3) Frosst P, et al: Nature Genetics 10: 111-113, 1995
- 4) Hyland K, et al: JChromatography 579: 55-62, 1992
- 5) Kang S-S, et al: Metabolism 37: 611-613, 1988
- 6) Nygard O, et al: N Eng JMed 337: 230-236, 1997
- 7) Morita H, et al: Circulation 95: 2032-2036, 1997
- 8) Nishio H, et al: Jpn J Human Genet 41: 247-251, 1996
- 9) Harmon DL, et al: JNeurol Neurosurg Psychiatry 62: 671-674, 1997
- 10) Allain P, et al: Neurotoxicology 16: 527-530, 1995
- 11) Kuhn W, et al: Eur Neurol 40: 225-227, 1998

Lewy body disorders と multiple system atrophy に共通する α -synuclein/NACP の異常蓄積

高橋 均¹⁾ 若林 孝一²⁾ 林 森太郎¹⁾
柿田 明美¹⁾ 山田 光則¹⁾ 豊島 靖子¹⁾ 吉本 真³⁾

はじめに

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(NAC)の前駆体(NACP)と同一であり、正常脳ではシナプス前終末に存在している¹⁻³⁾。1997年、常染色体優性遺伝形式を呈する Parkinson 病(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⁴⁾、その後 α -synuclein/NACP 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明らかとなった⁵⁻¹¹⁾。そこで今回、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討を行った。

方 法

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¹²⁾を含む)、incidental LB disease(ILBD)8 例、Hallervorden-Spatz disease(HSD)2 例を用いた。さらに、多系統萎縮症(MSA)、Alzheimer 病、Pick 病、進行性核上性麻痺、corticobasal degeneration、孤発性 ALS、家族性 ALS^{13, 14)}、常染色体優性¹⁵⁾ならびに常染色体劣性遺伝形式¹⁶⁾を呈する若年性パーキンソンニズム、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。ポリクローナル抗 α -synuclein/NACP 抗体⁹⁾を用い ABC 法にて免疫染色を施し光顕観察した。 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。

結 果

PD、DLB、ILBD、HSD のいずれにおいても LB は α -synuclein 強陽性を呈し(Fig. 1a)、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(Fig. 1b)。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(Fig. 1c)。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(Fig. 2a)。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(Fig. 2b, c)。これらは橋核、黒質、線条体、視床下核、下オリーブ核、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(Fig. 3)。

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。

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 免疫細胞化学によって、この蛋白の蓄積、凝集、そしてレビー小体へと発展してゆく様子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¹⁷⁾。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

¹⁾新潟大学脳研究所病理学分野

²⁾同 脳疾患解析センター

³⁾大正製薬創薬研究所標的分子研究室

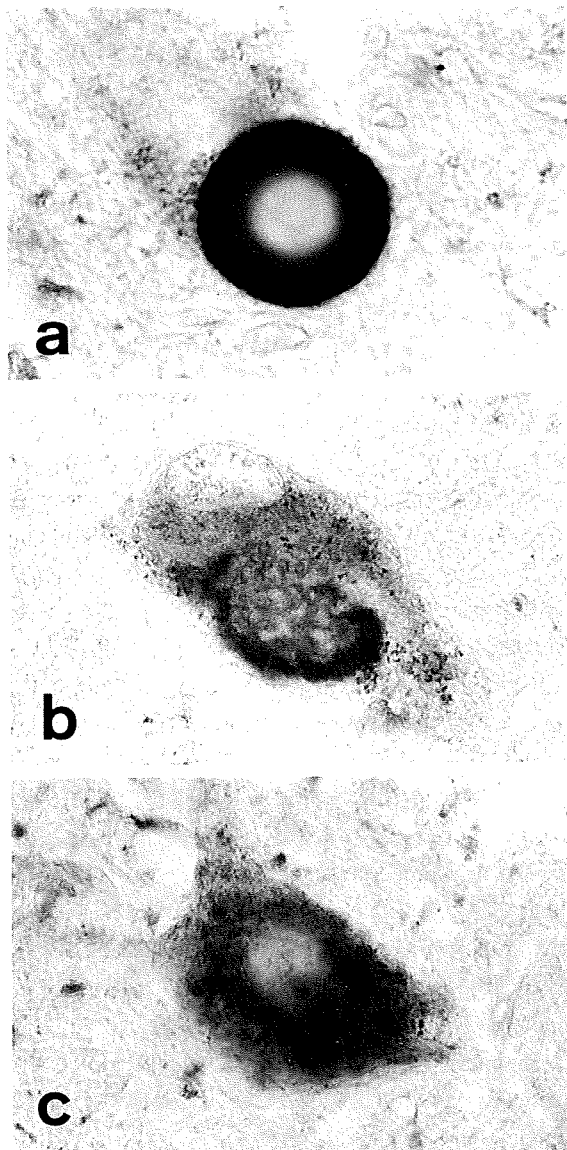


Fig. 1.
 α -Synuclein immunoreactivity of Lewy bodies (LBs) at different maturation stages. (a) Typical LB. $\times 1370$. (b) Irregularly shaped staining of a poorly pigmented neuron. $\times 850$. (c) Diffuse cytoplasmic staining of a morphologically normal-looking neuron. $\times 850$.

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¹⁸⁾。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¹⁷⁾。今回、pale bodyが α -synuclein陽性であったことを併せ考えるとpale bodyは真にLBの前段階に相当する構造物であると考えられる。

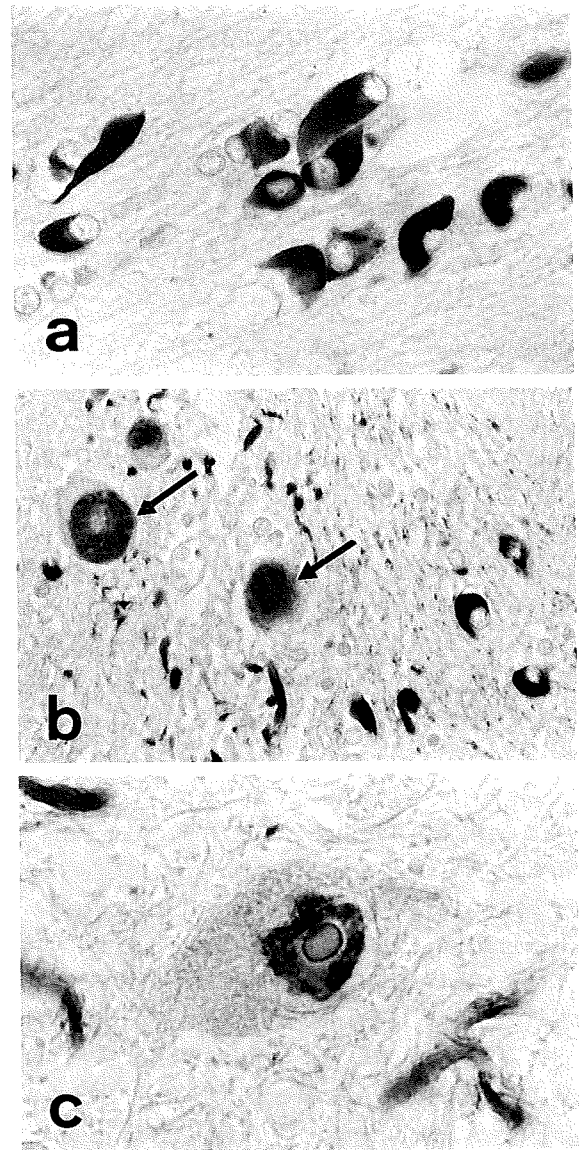


Fig. 2.
 α -Synuclein immunoreactivity in multiple system atrophy patients. (a) Glial cytoplasmic inclusions in the frontal white matter. $\times 540$. (b) Neuronal intracytoplasmic inclusions (arrows) in the pontine nucleus. $\times 450$. (c) Neuronal intranuclear inclusion in the pontine nucleus. $\times 1700$.

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²⁰⁻²⁶⁾。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

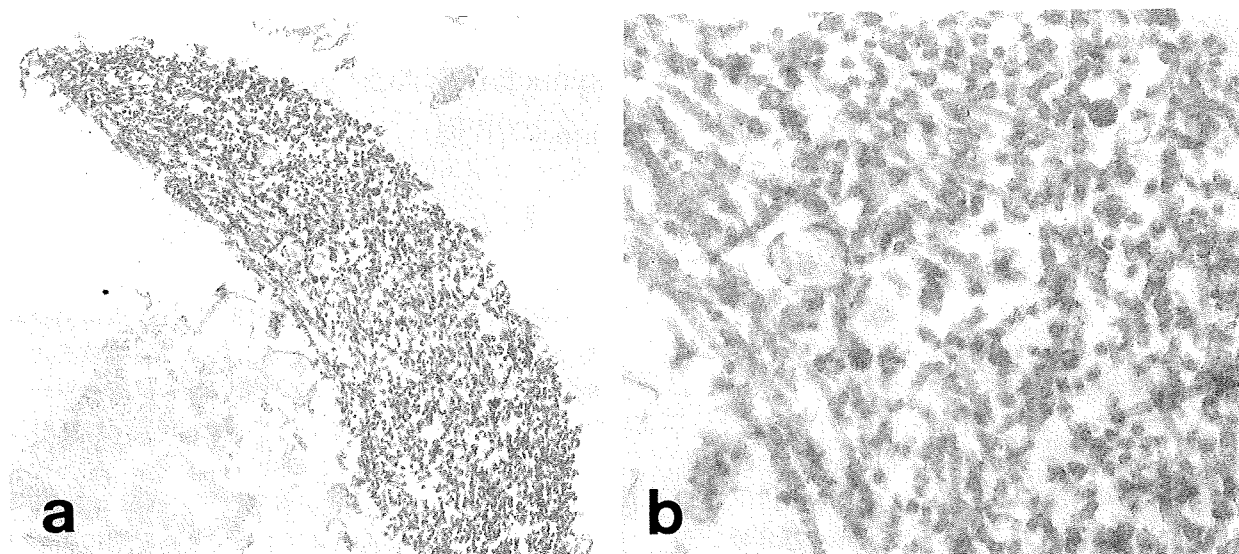


Fig. 3.

Immunoelectron microscopy of a glial cytoplasmic inclusion in the pontine nucleus labeled with anti- α -synuclein antibody. (a) Filamentous structures can be recognized by the antibody. x9300. (b) Higher magnification of the same inclusion. x32000.

末のみならず神経細胞の核内にも存在する¹⁹⁾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存在しているか否かについては今後の課題である。

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、今回検索した疾患群ではLB disordersとMSA以外には α -synuclein陽性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類似の構造物が認められ、LB-like hyaline inclusionと呼ばれている²⁷⁾が、それらも α -synuclein陰性であった。また、常染色体優性¹⁵⁾ならびに常染色体劣性遺伝形式¹⁶⁾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）では 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。

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/NACPはそれ自身が凝集しやすい性質を有している²⁸⁾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デ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。

文 献

- 1) Uéda K, et al.: Proc Natl Acad Sci 90: 11282-11286, 1993
- 2) Jakes R, et al.: FEBS Lett 345: 27-32, 1994
- 3) Iwai A, et al.: Neuron 14: 467-475, 1995
- 4) Polymeropoulos MH, et al.: Science 276: 2045-2047, 1997
- 5) Spillantini MG, et al.: Nature 388: 839-840, 1997
- 6) Wakabayashi K, et al.: Neurosci Lett 239: 45-48, 1997
- 7) Takeda A, et al.: Am J Pathol 152: 367-372, 1998
- 8) Baba M, et al.: Am J Pathol 152: 879-884, 1998
- 9) Irizarry MC, et al.: J Neuropathol Exp Neurol 57: 334-337, 1998
- 10) Arima K, et al.: Brain Res 808: 93-100, 1998
- 11) Spillantini MG, et al.: Proc Natl Acad Sci 95: 6469-6473, 1998
- 12) Wakabayashi K, et al.: Acta Neuropathol 96: 207-210, 1998
- 13) Takahashi H, et al.: J Neurol Sci 120: 15-21, 1993
- 14) Takahashi H, et al.: Acta Neuropathol 88: 185-188, 1994
- 15) Hayashi S, et al.: Brain Pathol 7: 1115, 1997
- 16) Takahashi H, et al.: Neurology 44: 437-441, 1994
- 17) Dale GE, et al.: Acta Neuropathol 83: 525-529, 1992
- 18) Takahashi H, et al.: Neuropathology 14: 73-80, 1994
- 19) Maroteaux L, et al.: J Neurosci 8: 2804-2815, 1988
- 20) Wakabayashi K, et al.: Neurosci Lett 249: 180-182, 1998
- 21) Mezey E, et al.: Nature Med 4: 755-757, 1998
- 22) Tu P-H, et al.: Ann Neurol 44: 415-422, 1998
- 23) Gai WP, et al.: Lancet 352: 547-548, 1998
- 24) Spillantini MG, et al.: Neurosci Lett 251: 205-208, 1998
- 25) Arima K, et al.: Acta Neuropathol 96: 439-444, 1998
- 26) Wakabayashi K, et al.: Acta Neuropathol 96: 445-452, 1998
- 27) Hirano A, et al.: Arch Neurol 16: 232-243, 1967
- 28) Yoshimoto M, et al.: Proc Natl Acad Sci 92: 9141-9145, 1995

パーキンソン病における α -synuclein/NACP-positive astrocytic inclusion の出現

高橋 均¹⁾ 若林 孝一²⁾ 林 森太郎¹⁾ 吉本 真³⁾

はじめに

近年、多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多系統萎縮症(MSA)におけるグリア封入体の報告である^{1,2)}。我々は Gallyas-Braak(G-B)染色を用いた検討からパーキンソン病(PD)の中脳に嗜銀性、タウ陰性のグリア封入体が出現することを既に報告した³⁾。今回、これらのグリア封入体が α -synuclein/NACP 陽性であることを見出したので報告する。

方 法

孤発性 PD30 例(罹病期間 1-30 年)、incidental Lewy body disease7 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/NACP^{4,6)} および β -synuclein、タウ、ユビキチン、チュプ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。

結 果

PD では 30 例中 24 例に α -synuclein 陽性のグリア封入体認められた。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、G-B 法で認められるグリア封入体と同一であった(Fig. 1)。それらはしばしばユビキチン陽性であったが、タウならびにチュプリン陰性であった。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 filamentous structure から成っていた(Fig. 2)。

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。Incidental Lewy body disease 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。

考 察

今回、PD に認められた嗜銀性のグリア封入体は α -synuclein/NACP 陽性であり、この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 progressive supranuclear palsy にほぼ特異的であり、前頭葉皮質や線条体に好発する^{7,8)}。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⁹⁾。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^{7,10)}。しかも、これらは免疫組織化学的にタウ陽性⁸⁾、 α -synuclein 陰性^{6,11)} 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とは異なっている。

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¹²⁾ に類似している。しかし、アストロサイトがレビー小体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。例えばアルツハイマー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が、PD においては事実上 ghost Lewy body 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

¹⁾新潟大学脳研究所病理学分野

²⁾同 脳疾患解析センター

³⁾大正製薬創薬研究所標的分子研究室

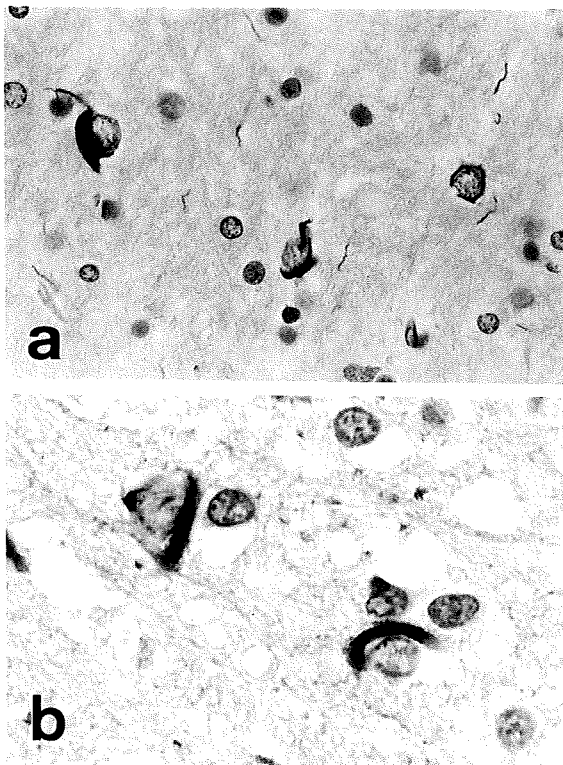


Fig. 1.
Glial inclusions in the midbrains of Parkinson's disease patients.
(a) Glial inclusions detected by the Gallyas-Braak methods. x550.
(b) α -Synuclein-positive glial inclusions in the substantia nigra. x850.

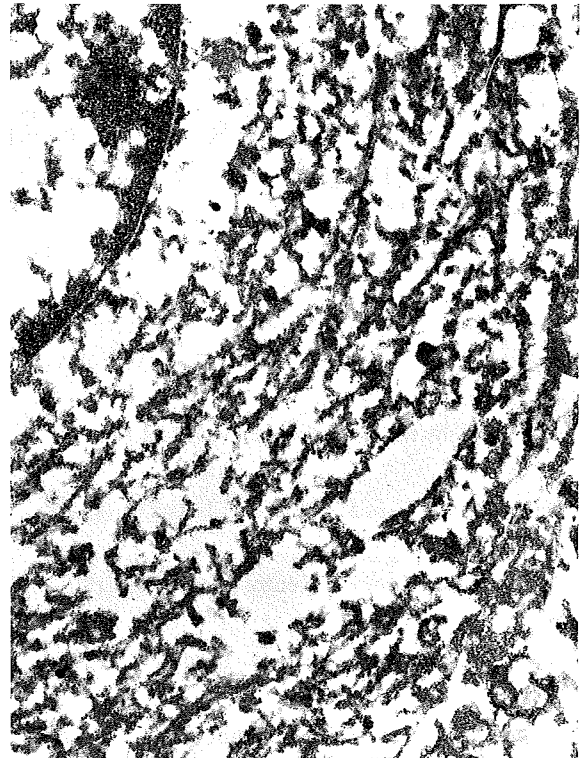


Fig. 2.
Electron micrograph of a glial inclusion, showing granule-coated filamentous structures. x21000.

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えるにも無理がある。最近、Mochizukiら¹³⁾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¹⁴⁾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incidental Lewy body disease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⁹⁾。一方、今回incidental Lewy body disease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。似たような事例はアルツハイマー病ならびに家族性ALSにおいても報告されている。Nakanoら¹⁵⁾は25年という長期経過のアルツハイマー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¹⁶⁾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Lewy body-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う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。

現在、 α -synuclein/NACPの異常蓄積はレビー小体の出現を伴う疾患^{4, 6, 11, 17-21)}とMSA^{5, 6, 22-26)}に特異的である。本研究から、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、中脳にほぼ限局して出現することが示された。

文 献

- 1) Papp MI, et al.: J Neurol Sci 94: 79-100, 1989
- 2) Nakazato Y, et al.: J Neuropathol Exp Neurol 49: 521-530, 1990
- 3) Wakabayashi K, Takahashi H: Neurosci Lett 217: 133-136, 1996
- 4) Wakabayashi K, et al.: Neurosci Lett 239: 45-48, 1997
- 5) Wakabayashi K, et al.: Neurosci Lett 249: 180-182, 1998
- 6) Wakabayashi K, et al.: Acta Neuropathol 96: 445-452, 1998
- 7) Bergeron C, et al.: J Neuropathol Exp Neurol 56: 726-734, 1997
- 8) Ikeda K, et al.: Neurobiol Aging 19 (1S): 85-91, 1998
- 9) Ikeda K, et al.: Acta Neuropathol 90: 620-625, 1995
- 10) Komori T, et al.: Acta Neuropathol 96: 401-408, 1998
- 11) Takeda A, et al.: Am J Pathol 152: 367-372, 1998
- 12) Pearson J, et al.: Neuroscience 8: 3-32, 1983
- 13) Mochizuki H, et al.: J Neurol Sci 137: 120-123, 1996
- 14) Kösel S, et al.: Acta Neuropathol 93: 105-108, 1997
- 15) Nakano I, et al.: Acta Neuropathol 83: 228-232, 1992
- 16) Kato S, et al.: Am J Pathol 151: 611-620, 1997
- 17) Spillantini MG, et al.: Nature 388: 839-840, 1997
- 18) Arima K, et al.: Brain Res 808: 93-100, 1998
- 19) Baba M, et al.: Am J Pathol 152: 879-884, 1998
- 20) Irizarry MC, et al.: J Neuropathol Exp Neurol 57: 334-337, 1998
- 21) Spillantini MG, et al.: Proc Natl Acad Sci USA 95: 6469-6473, 1998
- 22) Arima K, et al.: Acta Neuropathol 96: 439-444, 1998
- 23) Gai WP, et al.: Lancet 352: 547-548, 1998
- 24) Mezey E, et al.: Nature Med 4: 755-757, 1998
- 25) Spillantini MG, et al.: Neurosci Lett 251: 205-208, 1998
- 26) Tu P-H, et al.: Ann Neurol 44: 415-422, 1998

パーキンソン病における大脳皮質チロシン水酸化酵素の免疫組織化学的研究

田中順一 福田隆浩 高橋純子

目 的

ヒト大脳皮質深層に存在するチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性介在ニューロンが、パーキンソン病 (PD) において減少することを昨年我々は報告したり。今回、PD 以外の神経変性疾患、すなわち進行性核上性麻痺 (PSP)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、アルツハイマー病 (AD)、dementia with Lewy bodies (DLB) において、大脳皮質の TH 陽性細胞を検討した。

対 象 と 方 法

PA 18 例、PSP 6 例、ALS 13 例、AD 2 例、DLB 1 例および組織学的に異常を認めない正常対照 (Ctrl) 16 例の大脳を対象とした。上前頭回、上側頭回、島回、中心前回、中心後回、海馬傍回、楔状葉、扁桃核、尾状核、被殻、淡蒼球、視床、視床下核、中脳黒質や橋青斑核などの脳幹諸核をホルマリン固定パラフィン包埋し、6mm の切片を作成し、HE 染色、Klüver-Barrera (KB) 染色、Bodian 染色、Methenamine-Bodian 染色、Gallyas 染色、ubiquitin 免疫染色、tau 免疫染色、 α -synuclein 免疫染色および TH 免疫染色をおこない、各症例を病理組織学的に検討した。

結 果

組織学的に検索した正常対照群の大脳皮質および中脳黒質、被殻、尾状核において、神経細胞脱落・グリオース・ミクログリアの増生等の所見は認められず、老人斑や神経原線維性変化は年齢相応に存在し、皮質型 Lewy 小体は認められなかった。TH 免疫染色では中脳黒質 TH 陽性細胞 (図 1b) の脱落はなく、被殻の TH 陽性線維も密に存在した (図 1a)。大脳皮質深層には TH 陽性細

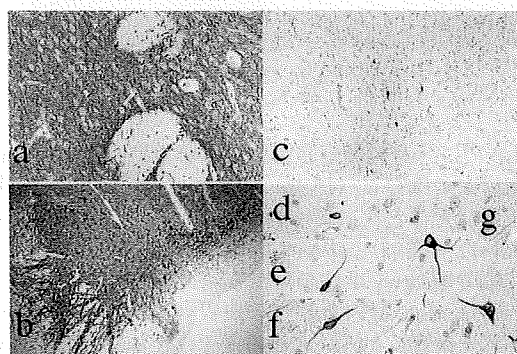


図 1 正常対照群 TH 免疫染色 a, 被殻 (X30); b, 黒質 (X30); c, 島回皮質深層 (X30); d-g, 海馬傍回皮質深層 (X120)

胞が存在し、TH 陽性線維も多数認められた (図 1c)。TH 陽性細胞は樹状突起のないものから単～多極の樹状突起を持つものが存在し、その突起は皮質表面に対し垂直或いは平行に走っていた (図 1d-g)。

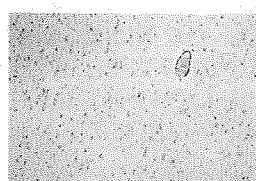


図 2 パーキンソン病 海馬傍回 (TH 免疫染色 X30)

PD では黒質神経細胞の著明な脱落を認め、被殻・尾状核の TH 陽性線維は減少していた。中脳や脳幹中心灰白質、マイネルト核には脳幹型 Lewy 小体が存在した。大脳皮質では TH 陽性細胞はほとんど脱落し、TH 陽性線維もごく少数存在するのみであった (図 2)。大脳皮質に皮質型 Lewy 小体が存在する症例は 10 例存在したが、いずれも検鏡にて弱拡大 1 視野に 5 個未満の頻度であった。

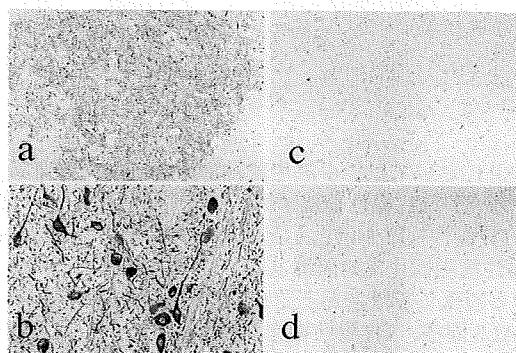


図 3 筋萎縮性側索硬化症 (TH 免疫染色) a, 被殻 (X30); b, 黒質 (X30); c-d, 海馬傍回皮質深層 (X30)

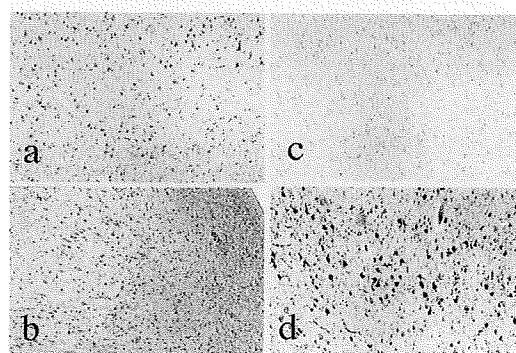


図 4 筋萎縮性側索硬化症 (X30) a, 上前頭回 (LFB-HE); b, 海馬 CA1 (LFB-HE); c, 海馬傍回皮質深層 (TH 免疫染色); d, 海馬傍回皮質 (Gallyas)

ALSのTH免疫染色では中脳黒質TH陽性細胞はよく保存され(図3b)、被殻のTH陽性線維も密に存在した(図3a)。大脳皮質にはTH陽性線維が多数認められた(図3c-d)。TH陽性細胞は正常対照群と同じ密度で存在するもの(図3c)から脱落してほとんど認められないもの(図3d)まで存在した。TH陽性細胞が脱落した症例には、全般的な脳虚血(図4b)により大脳皮質の神経細胞脱落(図4a)が認められる症例や、大脳皮質に老人斑や神経原線維性変化が認められ神経細胞脱落の強い症例(図4c-d)が存在した。

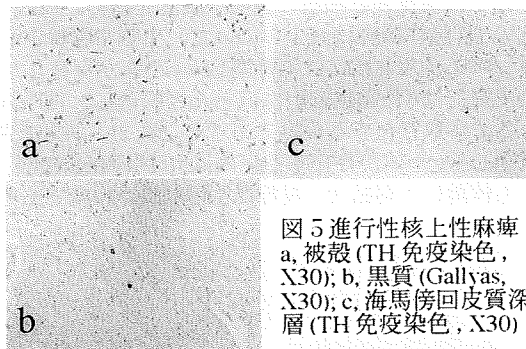


図5 進行性核上性麻痺
a, 被殻 (TH免疫染色, X30); b, 黒質 (Gallyas, X30); c, 海馬傍回皮質深層 (TH免疫染色, X30)

PSPにおいては、中脳黒質神経細胞はほぼ脱落し(図5b)、被殻のTH陽性線維は減少していた(図5a)。大脳皮質のTH陽性線維もほとんど認められなかったが(図5c)、TH陽性細胞は正常対照群と同じ密度で存在するもの(図5c)から脱落してほとんど認められないものまで存在した。ALS同様、TH陽性細胞が脱落した症例には全般的な脳虚血と大脳皮質神経細胞脱落が認められた。

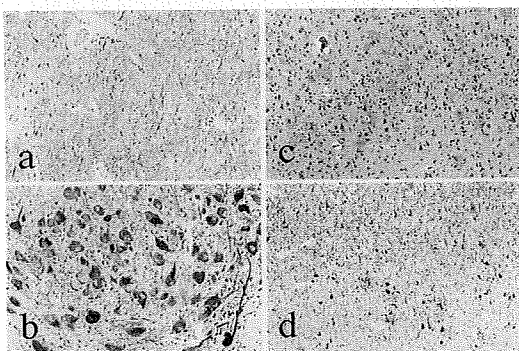


図6 アルツハイマー病 (X30)。a, 被殻 (TH免疫染色); b, 黒質 (TH免疫染色); c, 上側頭回皮質深層 (Methenamine bodian); d, 上側頭回皮質深層 (tau免疫染色)

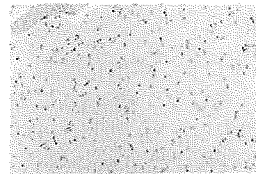


図7 アルツハイマー病
島回皮質深層 (TH免疫染色, X30)。

ADのTH免疫染色では中脳黒質TH陽性細胞はよく保存され(図6b)、被殻のTH陽性線維も密に存在した(図6a)。大脳皮質には老人斑や神経原線維性変化が多数認められ、神経細胞は強く脱落していた(図6c-d)。大脳皮質のTH陽性線維は少数認められたが、TH陽性細胞は脱落してほとんど認められなかった(図7)。

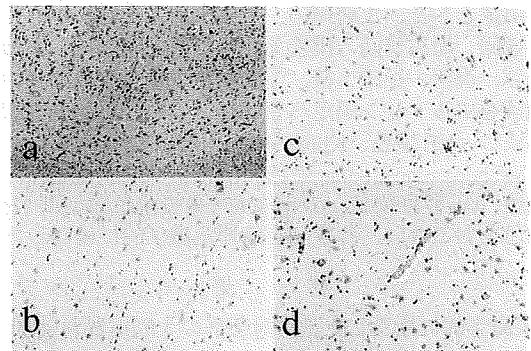


図8 Dementia with Lewy bodies 海馬傍回皮質深層 (X30)。a, Methenamine bodian; b, ubiquitin; c, tau; d, α -synuclein

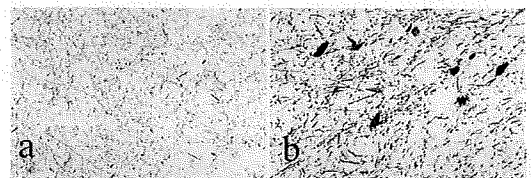


図9 Dementia with Lewy bodies (TH免疫染色, X30) a, 被殻; b, 黒質

DLBでは黒質神経細胞の脱落は非常に軽度で、TH陽性細胞はよく残存し(図9b)、被殻・尾状核のTH陽性線維も正常対照群と比べ軽度減少しているものよく保存されていた(図9a)。中脳や脳幹中心灰白質、マイネルト核に脳幹型Lewy小体が存在し、大脳皮質ではubiquitin陽性 α -synuclein陽性 tau陰性の皮質型Lewy小体(図8b-d)が弱拡大1視野に5個以上の頻度で存在した。大脳皮質では、老人斑が多数認められたが(図8a)、神経原線維性変化や神経細胞脱落はほとんど認められなかった。大脳皮質のTH陽性細胞はTH陽性線維同様比較的よく保存されていた(図10)。

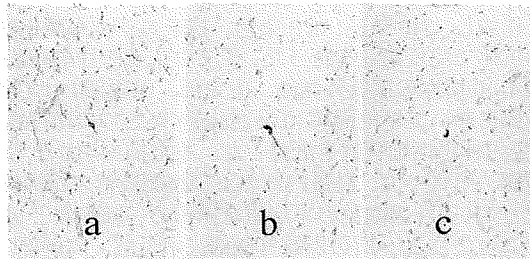


図 10 Dementia with Lewy bodies (TH 免疫染色, X60) a-c, 海馬傍回皮質深層

考 察

正常対照群大脳皮質深層に認められる TH 陽性介在ニューロン^{2,3)}はパーキンソン病では著明に減少する¹⁾。その機序は不明であるが、脳幹のドーパミン細胞と同様の機序で脱落すると考えられる。

ALS の基本病変は運動ニューロンの脱落、グリオーシスであり、中脳黒質病変は痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症など特殊な症例⁴⁾以外にはみられない。今回対象とした症例中には中脳黒質病変の存在する症例はなく、黒質 TH 陽性細胞および線条体と大脳皮質の TH 陽性線維は保たれていた。大脳皮質 TH 陽性細胞は著明に脱落している症例から正常対照群と変わらない症例まで、症例間に差がみられた。組織学的に虚血性変化を伴う症例や神経原線維性変化を伴い軽度の神経細胞脱落のある症例に TH 陽性細胞が脱落する傾向がみられることから、TH 陽性細胞が虚血に易感受性があり、老人性変化を伴う神経細胞脱落において初期の段階で脱落しやすいことが示唆された。

パーキンソニズムを呈する PSP の基本病変⁵⁾は大脳基底核や脳幹神経核の神経細胞や星膠細胞内に tau 蛋白の蓄積⁶⁾と神経細胞の脱落を引き起こす。中脳黒質の神経細胞も著明に脱落し、線条体および大脳皮質の TH 陽性線維の減少を認めるが、大脳皮質深層の TH 陽性細胞の減少は症例により異なる。全般的な脳虚血のある症例において TH 陽性細胞脱落は強かったことから、PSP では基本的には大脳皮質の TH 陽性細胞の脱落はなく、虚血などにより易感受性の TH 陽性細胞が障害を受け減少したと考えられた。

AD では検索したすべての大脳皮質に老人斑や神経原線維性変化が著明に出現し、高度の神経細胞脱落を認めた。黒質神経細胞および線条体 TH 陽性線維は比較的保持されたが大脳皮質 TH 陽性線維は認められるものの減少していた。TH 陽性細胞はほとんど認められず、その軸索あるいは樹状突起の減少により、大脳皮質 TH 陽性線維の減少をきたしたものと考えられた。

今回検索した DLB の病理所見は比較的典型例と考えら

れ^{7,8)}、黒質や脳幹中心灰白質に脳幹型 Lewy 小体を、そして大脳皮質に皮質型 Lewy 小体を多数認め、著明な老人斑が大脳皮質に存在した。神経原線維性変化はほとんど存在せず、神経細胞脱落も認められなかった。黒質神経細胞は軽度の脱落のみで、大脳皮質の TH 陽性細胞と TH 陽性線維は比較的残存しており、大脳皮質の TH 陽性細胞がほとんど脱落する PA との違いが目立った。生化学的に TH 活性が高度に低下する PA とは病態が異なる DLB の存在が示唆された。また、神経原線維性変化を伴い神経細胞脱落のある症例で容易に脱落する TH 陽性細胞は、大脳皮質において老人斑の存在だけでは障害されることは少ないことが示唆された。

結 論

パーキンソン病において著明に脱落する大脳皮質深層のチロシン水酸化酵素陽性介在ニューロンは虚血に弱い。また、神経原線維性変化を伴い神経細胞脱落がなければ、老人斑が存在しても大脳皮質 TH 陽性細胞は脱落しない。

文 献

- 1) Fukuda T, et al. Neuropathology in print, 1999
- 2) Gaspar P, et al. Neurosci Lett 80:257-262, 1987
- 3) Hornung JP, et al. Exp Brain Res 76:12-20, 1989
- 4) Mitsuyama Y. J Neurol Neurosurg Psychiatry 47:953-, 1984
- 5) Steele J, et al. Arch Neurol 2:473-86, 1964
- 6) Probst A, et al. Acta Neuropathol (Berl) 77:61-8, 1988
- 7) McKeith IG, et al. Neurology 47:1113-24, 1996
- 8) Ince PG, et al Brain Pathology 8:299-324, 1998

L-DOPA の MPTP マウスドパミン細胞に対する量的および経時的影響

田中順一 福田隆浩 高橋純子

目 的

約30年前、levodopaがパーキンソン病の治療に導入されて以来、抗パーキンソン病薬として amantadine, anticholinergics, dopamine agonists, monoamine oxidase-type B inhibitors, catechol-O-methyltransferase inhibitors や antioxidants が使用されているが、補充療法として使用する levodopa が現在でも最も有効な治療薬と考えられている。しかし、本来生体内で産生される endogenous levodopa と投与吸収された exogenous levodopa の分布や代謝は異なり、levodopa 長期投与による dyskinesias, complex motor fluctuations, psychosis など副作用の原因の1つと考えられている。パーキンソン病において levodopa 療法によりドパミン細胞および非ドパミン細胞やグリアが障害される可能性が指摘されており²⁾、それに関する報告が多数出されている。levodopa は自己酸化による酸化的ストレスを引き起こして、種々の培養細胞(神経細胞を含む)に対し非常に強い毒性を示すことが知られている^{3,4)}。正常のマウス⁵⁾やラット⁶⁾およびヒト⁷⁾においては、levodopa の黒質ドパミン細胞への障害はないとされている。また、6-hydroxydopamine (6OHDA) 処理ラットにおいて移植された胎仔ドパミン神経細胞に対する levodopa 毒性のある報告⁸⁾とない報告⁹⁾がある。6OHDA 処理後残存したマウス¹⁰⁾およびラット¹¹⁾腹側被蓋部ドパミン神経細胞に対して levodopa の毒性があるという報告の一方、ないとする研究¹²⁻¹⁴⁾が報告されている。現在実験的パーキンソニズムを用いた in vivo の実験において「exogenous levodopa がドパミン細胞を障害するか否か？」に関する結論は確定していない。今回我々は、MPTP 処理マウスを用い、黒質ドパミン神経細胞に対する levodopa の量的および経時的影響を観察し levodopa の毒性を検討した。

対 象 と 方 法

C57BL/6 マウスを対象に、MPTP30mg/kg/日を13日間腹腔内投与した群(67頭)と溶媒(生理的食塩水)のみの Ctr 群(10頭)に分けた。levodopa の量的検討のため、MPTP 処理2日後より、levodopa の投与量を0(5頭)、15(6頭)、30(7頭)、45(6頭)、60(13頭)mg/kg/日に分け50日間(週5回)腹腔内投与した。levodopa の経時的検討のため、MPTP 処理2日後より、levodopa 60mg/kg/日を0(6頭)、10(6頭)、20(6頭)、30(6頭)、40(6頭)、50(6頭)日間(週5回)に期間を分け投与した。Ctr 群は levodopa 投与期間中溶媒を投与した。薬剤投与終了2日後に、麻醉下で20%ホルマリン緩衝液にて経心臓的に灌流固定を行っ

た。黒質を通る中脳から30 μ m 間隔で3 μ m パラフィン切片を作成し、HE染色、KB染色、抗チロシン水酸化酵素(TH)抗体で免疫染色を行った。1マウス当たりTH免疫染色標本10切片の黒質外側部、中央部、内側部および腹側被蓋部において単位面積(0.0625mm²)当たりの総神経細胞数とTH陽性細胞数を計測した。また同一切片上の黒質外側、黒質中央、黒質内側および腹側被蓋の総神経細胞数とTH陽性細胞数の平均値を黒質の各細胞数とした。マウス当たり20ヶ所の黒質外側部、中央部、内側部、腹側被蓋部および黒質の総神経細胞数とTH陽性細胞数の平均値を求めて各群の有意差を検定した。

結 果

各群の脳には肉眼的に異常を認めなかった。Ctr 群と比べ、MPTP 処理群黒質の総神経細胞数とTH陽性細胞数は減少していた(図1)。

MPTP 処理後 levodopa を量的に変化させ50日間投与した群において、levodopa 45 mg/kg/日投与群で6頭中1頭、60 mg/kg/日投与群で13頭中3頭死亡した。MPTP 処理後 levodopa 投与量が多い群ほど、黒質各部位の総神経細胞数とTH陽性細胞数は減少する傾向がみられた。特に黒質外側・中央よりも黒質内側(図2)および腹側被蓋部にその傾向は強く認められた。黒質総神経細胞数(y/0.0625mm²)と levodopa 投与量(x mg/kg/day)との関連は、回帰直線 $y=30.34-0.16x$ ($R^2=0.393$, $n=33$, $p<0.0001$) によく相関した。黒質TH陽性細胞数(y)と levodopa 投与量(x)との関連は、回帰直線 $y=20.00-0.07x$ ($R^2=0.224$, $n=33$, $p=0.0055$) によく相関した(図3)。

MPTP 処理後 levodopa 60 mg/kg/日の投与期間を変化させた群において、40日投与群で6頭中1頭、50日投与群で13頭中3頭死亡した。MPTP 処理後 levodopa 60 mg/kg/

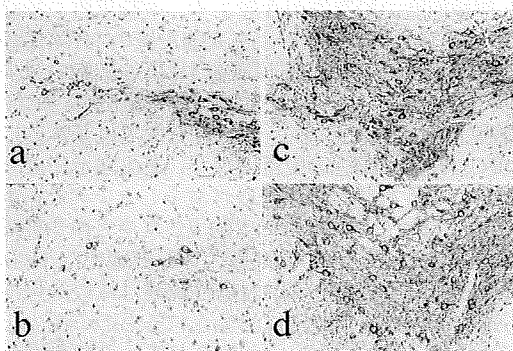


図1 Ctr 群黒質外側-中央(a)と黒質内側(b)、MPTP 処理後溶媒50日投与群黒質外側-中央(c)と黒質内側(d) (TH免疫染色)