

200936064A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

生体試料等の収集に関する研究

(難治性疾患克服のための組織バンクの研究)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 矢澤 生

平成22(2010)年 3月

# 目 次

I. 総括研究報告	
生体試料等の収集に関する研究（難治性疾患克服のための組織バンク の研究）	----- 1
矢澤生	
（資料）病理解剖組織の収集	
II. 分担研究報告	
1. 多系統萎縮症の病理組織収集（神経病理診断）	----- 9
橋詰良夫	
2. 多系統萎縮症の病理組織収集（組織バンクの活用研究）	----- 12
矢澤生	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 21

# I . 総括研究報告

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 総括研究報告書

### 生体試料等の収集に関する研究 (難治性疾患克服のための組織バンクの研究)

研究代表者 矢澤 生 国立長寿医療センター研究資源有効利用室長

#### 研究要旨

緩徐に進行する難治性の神経変性疾患は神経変性に対する根本的な治療法がなく、長期臥床状態（寝たきり）の最重要の原因である。増加する医療費を抑制するために難治性疾患の治療法を開発し、寝たきりの患者を減少させることは有効な手段である。本研究では国立長寿医療センターと愛知医科大学において、難治性疾患や高齢者の臨床研究基盤として病理組織等の組織バンクの収集に関する研究を行った。組織バンクは病理解剖から中枢神経の病理組織を研究目的に保存・管理し、病理組織の活用研究を行う方法である。難治性疾患である多系統萎縮症(MSA)と歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症(DRPLA)について組織バンクの資源を活用し、難治性疾患の神経変性に対する根本的な治療法開発の研究を行った。中枢神経を障害する難治性疾患において、病理組織の収集による解析と病理組織を活用する研究は有効であることを示した。疾患モデル動物に関する研究と病理組織研究を並行して実施することにより、難治性神経疾患の治療開発は新しい展開を迎える。

#### 研究分担者

橋詰良夫 愛知医科大学 神経病理学教授

#### 研究協力者

佐々木良元 三重大学 神経内科助教

開発するために、病理解剖によるヒト組織の解析は最初の手がかりとなると同時に、治療研究を臨床応用に向けて進めるための最終確認の方法となる。従来の病理解剖による研究は形態学的な病理診断が中心であったが、ゲノム研究やプロテオミクス研究が進歩し病理組織に関する研究においても新しい解析方法が取り入れられた。我が国では病理脳組織の研究は欧米に比べて遅れ、病理脳組織を研究資源として有効に活用しているとはいえない。本研究では保存方法や生命倫理等の観点から、厚生労働省高度専門医療センター（ナショナルセンター）である国立長寿医療センターと愛知医科大学脳リソースにおいて組織バンクの有効性を検討し、我が国の組織バンクのあり方を考察した。さらに、難治性神経疾患の一つである多系統萎縮症の治療法開発研究を具体的な例として、病理組織の活用研究について検討した。

#### A. 研究目的

増加する医療費を抑制するために、多額の医療費がかかる難治性疾患の治療法を開発し長期臥床状態（寝たきり）患者を減少させることは有効な手段である。緩徐に進行する難治性神経変性疾患は、神経変性に対する根本的な治療法がなくリハビリテーション等の保存的な治療効果も少ないために寝たきりの最重要の原因である。本研究は難治性疾患の治療研究基盤となる組織バンクの病理組織資源の活用研究により、神経変性に対する治療法を開発することを目的とする。組織バンクは病理解剖から脳等のヒト組織を研究目的に保存・管理し、ヒト病理組織の活用研究を行う方法である。有効な治療法がない難治性神経変性疾患の治療法を

#### B. 研究方法

本研究期間は平成21年度の1年間である。

難治性疾患として非遺伝性脊髄小脳変性症の多系統萎縮症(MSA)と遺伝性の歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)について研究を実施した。矢澤研究代表者は国立長寿医療センターにおいて、高齢者の医療研究基盤として病理解剖症例から収集する組織バンクの研究を行った。病理組織研究の推進のために具体的な活用指針を検討した。また、収集した病理組織の有効性を国民へ発信するために、分子生物学、細胞生物学、さらに病理形態学的方法により組織バンク資源の活用研究を行い、多系統萎縮症の治療法開発に関する研究を行った。橋詰分担研究者は愛知医科大学加齢医科学研究所脳リソースの蓄積のために、東海地域の神経病理診断に関するネットワーク形成を行った。

(倫理面への配慮) 組織バンクでは、病理解剖をうける患者又は患者家族から、研究目的及び方法・患者の不利益・撤回する権利などに関するインフォームドコンセントを受けた。組織バンク登録の際には試料の匿名化などにより、個人情報保護を徹底した。組織バンクを活用する研究に関して、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し国立長寿医療センター倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

### (1) 病理組織収集に関する研究

橋詰研究分担者は年間約 200 症例の病理解剖を行い、愛知医科大学加齢医科学研究所脳リソースは約 4000 例を蓄積する我が国有数の脳リソースである。一方、国立長寿医療センター組織バンクは新たな症例に対して研究目的のインフォームドコンセントを明確に策定し、高齢者の疾患研究のために平成 18 年度より資源の収集を開始した。

愛知医科大学脳リソースはこれまでに多系統萎縮症(MSA)と歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)について 146 例を蓄積した(添付資料参照)。孤発性脊髄小脳変性症のMSA症例は 129 例で、病理解剖時平均年齢 65.5 歳、罹患期間 6.9 年であった。遺伝性脊髄小脳変性症である DRPLA については 17 例で、死亡時平均年齢 42.0 歳であった。国立長寿医療センター組織バンクでは MSA 症例は 1 例(76 歳)、DRPLA 症例は 1 例(58 歳)であった(添付資料参照)。

次に、矢澤研究代表者は国立長寿医療センターにおいて組織バンクの資源の活用研究を推進するために、研究者に対して組織バンクの

研究資源の利用に関する意識調査を実施した。調査の結果、計画段階の研究を含めると組織バンクを活用する希望のある研究者は多いことが明らかになった(調査した研究者全員が組織バンク資源の活用を希望した)。一方、調査した研究者は組織バンクに関する法律や生命倫理の理解は充分ではなかった。特に、研究資源が死体組織であるという観点から社会的なコンセンサスや国民感情への配慮まで考慮する研究者は少なかった。組織バンクに関する研究は患者遺族や臨床医の貢献により成り立つ研究であり、研究者は組織提供に関与する人々への感謝の気持ちを忘れてはならない。問題の解決に向けて国立長寿医療センターでは活用研究に関する法律の知識や生命倫理を養うための研究者セミナーを実施した。さらに、組織バンクに関する国民に対する情報発信としてホームページを活用した。組織バンクのあり方、保存方法や研究資源の活用研究者の調査などについて 6 ヶ月ごとに改訂した。新しい情報を公開し、できる限り簡単に理解しやすい内容を心がけた。今後も社会的コンセンサスや国民感情に十分配慮して情報発信を行う。

### (2) 組織バンクの活用研究

矢澤研究代表者は組織バンクの資源を活用し高齢者の難治性神経疾患に関する治療法の開発研究を行った。橋詰研究分担者は神経変性の形態学的特徴に関する研究を重点的に行い、国立長寿医療センター組織バンクと活用研究を支援した。

矢澤研究代表者は多系統萎縮症(MSA)のモデル動物に関する研究とヒト病理組織の研究を並行して行い、治療法の開発の糸口をつかんだ。組織バンクにおけるMSA患者脳の病態を解析しモデルマウスを開発した(Yazawa et al, *Neuron*, 2005)。モデルマウスから作製した初代培養細胞を使って、発病の原因として蓄積する $\alpha$ -synuclein と相互作用する微小管蛋白の $\beta$ -チューブリンを見だし、微小管蛋白を抑制する薬剤により $\alpha$ -synuclein の蓄積を抑制する方法を発見した(Nakayama et al, *Am J Pathol*, 2009)。さらに最近、*in vitro* 治療研究から疾患モデルマウスの *in vivo* 治療研究まで発展させる成果を得た。

橋詰研究分担者は病理解剖症例を蓄積し、多系統萎縮症の組織分類や神経病理学的な特徴を明確にし、臨床的特徴と病理学的特徴の関連を検討した。MSA の病理学的特徴である中枢

神経に出現するグリア細胞質内封入体(GCIs)は神経細胞脱落の強い領域に局在し、 $\alpha$ -synucleinはGCIsだけでなく神経細胞にも蓄積することを示した。この神経病理所見は、矢澤研究代表者が行ったMSAモデル動物の研究結果と合致する。さらに、GCIsは神経細胞脱落が乏しい初期において認めるといふ神経病理所見は、GCIsに蓄積する $\alpha$ -synucleinが神経細胞内の蓄積に先立って起こるMSAモデル動物の発病メカニズムそのものを示している。以上のように、橋詰研究分担者の実施した病理学的研究は、矢澤研究代表者の実施するMSA治療研究と表裏一体の関係にあり、MSAの病態解明において両者の研究は相補的に推進する必要があることを明らかにした。

#### D. 考察

##### (1) 研究の達成度

本研究では到達目標として2つの課題を設定した。第1の課題は、組織バンクの研究資源として病理解剖組織の収集に関する課題である。収集した症例数だけでなく、病理組織収集の方法やルールに関する検討が充分に行われることが到達度では重要であると考えられる。インフォームドコンセント、収集にあたっての倫理性、病理診断の正確性等がこれにあたりと考える。第2の課題は、組織バンクの研究資源を有効に活用し、治療法開発などの具体的な成果を国民へ還元することである。この成果が無ければ病理解剖や病理組織収集は益々困難になるため、疾患治療研究などの国民に分かりやすい研究成果を情報発信することが重要である。本研究では第1の課題は、愛知医大脳リソースを主体として多くの研究資源が獲得された。一方、施設間で組織収集には大きな差があり問題点が明確になった。第2の課題では国立長寿医療センターにおいて多系統萎縮症の治療法開発に関する研究が積極的に行われ、研究資源の有効な活用が国民に還元できる準備が整えられた。

##### (2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

本研究における学術的・国際的意義は組織バンクの活用研究で実証された。矢澤研究代表者の実施した多系統萎縮症における病理組織活用とモデル動物による研究は、「臨床応用につながる治療法の研究」として欧米の研究者から強い関心と賛辞が寄せられた。本研究の社会的意義としては愛知医科大学脳リソー

スの収集実績の成果は大きい。橋詰分担研究者は東海地域40病院のネットワークを形成し、臨床病理検討会(CPC)等を通じて神経疾患の医療と医師教育の向上に貢献した。

##### (3) 今後の展望

本研究により解決すべき課題が明らかになった。第1の課題は組織バンクの収集に関する課題である。今日の病理解剖症例の減少は深刻な問題であり、難治性神経変性疾患の克服研究のために病理解剖組織の収集を効率的かつ有効に行うための方策を検討する必要がある。既に、国立精神・神経センターでは特定の神経変性疾患に関して生前の病理解剖承諾による方法を難治性疾患克服研究事業において実施した。今こそ、難治性疾患克服のために貴重な研究資源を最大限に活用する方法を考える時期にさしかかっているといえる。本研究課題において研究を実施した2施設間で組織収集の実績は大きな差が存在することが示された。施設間の研究資源の蓄積状況により難治性疾患の治療研究の進展に影響を与える。病理組織は死体組織であり我が国の法律により病理解剖と保存に関して厳格な規制がある。今後、病理組織は益々貴重な研究資源となることが予想されるが、1日も早い治療法の開発を患者が望んでいる以上、治療研究を失速させるわけにはいかない。そこで、国立長寿医療センターではセンター病院の病理解剖症例の整備と並行して、病理組織活用を官学連携によるモデル事業として行うことを計画した。愛知医科大学と連携して組織バンク資源の収集と活用を効率的に行う新しい病理組織研究のあり方を検討した。

第2の課題は、難治性疾患である多系統萎縮症の治療法開発に関する研究を進展させ、臨床応用可能な治療法として成果を国民に届けることである。難治性疾患の研究は治療法開発がなければ成果があるとはいえない。多系統萎縮症の治療研究は*in vitro*の成果からモデルマウス脳における*in vivo*治療効果の検証を既に実施しており、臨床応用に向けて更に発展させる必要がある。

#### E. 結論

組織バンクの研究資源である脳等の病理組織の病態解析は、難治性神経疾患の神経変性のメカニズムを解明する上で重要である。本研究

では国立長寿医療センター組織バンクが愛知医科大学脳リソースと連携して新しい組織バンクのあり方を検討した。さらに、組織バンクを活用して多系統萎縮症の治療研究を行い、治療法開発に向けて第一歩を踏み出した。病理組織の収集と解析、多系統萎縮症の病態を反映する疾患モデルの作製、更に治療法開発のための病態解明、以上のプロセスを連続的に実施することが、難治性疾患の克服研究では重要であることを示した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Nakayama K, Suzuki Y, Yazawa I. Microtubule depolymerization suppresses alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. **Am J Pathol** 2009, 174, 1471-1480.

Sato T, Miura M, Yamada M, Yoshida T, Wood JD, Yazawa I, Masuda M, Suzuki T, Shin RM, Yau HJ, Liu FC, Shimohata T, Onodera O, Ross CA, Katsuki M, Takahashi H, Kano M, Aosaki T, Tsuji S. Severe neurological phenotypes of Q129 DRPLA transgenic mice serendipitously created by *en masse* expansion of CAG repeats in Q76 DRPLA mice. **Hum Mol Genet** 2009, 18, 723-736.

Kawada M, Tamada Y, Simizu H, Yanagishita T, Yamashita N, Ishida N, Watanabe D, Yoshida M, Ibi T, Sahashi K, Hashizume Y, Matsumoto Y. Reduction in QSART and vasoactive intestinal polypeptide expression in the skin of Parkinson's disease patients and its relation to dyshidrosis. **J Cutan Pathol** 2009, 36, 517-521.

Iwasaki Y, Ito M, Mori K, Deguchi A, Nagaoka M, Yoshida M, Hashizume Y. An autopsy case of diffuse neurofibrillary tangles with calcification: Early stage pathologic findings. **Neuropathology** 2009,

29, 697-703.

Yamamoto R, Iseki E, Higashi S, Murayama N, Minegishi M, Sato K, Hino H, Fujisawa K, Kosaka K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Yoshida M, Hashizume Y, and Arai H. Neuropathological investigation of regions responsible for semantic aphasia in frontotemporal lobar degeneration. **Dement Geriatr Cogn Disord** 2009, 27, 214-223.

Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Sobue G, and Hashizume Y. Clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: Accuracy based on analysis of autopsy-confirmed cases. **J Neurol Sci** 2009, 277, 119-123.

吉田眞理, 三室マヤ, 橋詰良夫, 早川恵理, 平山幹生. 脳肉芽腫性血管炎と $\beta$ アミロイド沈着. **神経内科** 2009, 70/2, 181-187.

橋詰良夫, 吉田眞理, 三室マヤ. 球脊髄性筋萎縮症における脊髄の病理 (脊髄の変性疾患 Atlas 6). **脊椎脊髄ジャーナル** 2009, 4, 22, 341-344.

加藤博子, 吉田眞理, 安藤哲朗, 杉浦真, 橋詰良夫. 急速に進行する片麻痺を呈した Lissauer 型進行麻痺の1剖検例. **臨床神経学** 2009, 6,49, 348-353.

岩崎靖, 三室マヤ, 吉田眞理, 祖父江元, 橋詰良夫. 剖検例からみた孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病の疫学的検討. **臨床神経学** 2009, 8,49, 463-467.

### 2. 学会発表

中山貴美子, 鈴木康予, 矢澤生. Molecular mechanisms to form insoluble complex in a mouse model of multiple system atrophy (MSA). 多系統萎縮症の $\alpha$ -synuclein 蓄積の分子機構. 第32回日本神経科学大会, 2009年9月18日, 名古屋

鈴木康予, 中山貴美子, 橋本有弘, 矢澤生. Accumulation of C-terminal ATN1 fragment in DRPLA. 伸長ポリグルタミン鎖を含む DRPLA 蛋白のC末ペプチドの蓄積. 第32回日本神経科学大会, 2009年9月18日, 名古屋

長谷川康博、新美由紀、山名知子、吉田真理、橋詰良夫. Lewy 小体型認知症と多系統萎縮症の合併例 自律神経不全が軽度でパーキンソン症候を主徴とした 1 剖検例. 第 62 回日本自律神経学会総会、2009 年 11 月 5 日、和歌山

吉田真理、櫻井信夫、三室マヤ、橋詰良夫、新井哲明、長谷川成人、新井誠、糸川昌成、秋山治彦. TDP-43 G298S 変異示す認知症を伴う家族性 ALS. 第 28 回日本認知症学会学術集会、2009 年 11 月 20 日、仙台

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(資料)

### 病理解剖組織の収集

	MSA	DRPLA
愛知医科大学 脳リソース	129 (男 69、女 58*)	17 (男 11、女 6)
国立長寿医療センター 組織バンク	1 (女)	1 (女)

\*2名は男女不明

(2009年9月)

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

## 多系統萎縮症の病理組織収集

（神経病理診断）

研究分担者 橋詰良夫 愛知医科大学加齢医科学研究所神経病理学教授

### 研究要旨

多系統萎縮症は神経変性疾患の中でも頻度が高く、脊髄小脳変性症の代表的な疾患である。またその原因は不明であり、根本的な治療方法も開発されていない。私たちは永年にわたり多数例の多系統萎縮症の病理解剖を行い、生体試料や病理組織試料の収集を行ってきた。難治性疾患の克服のために、このような組織バンクは必須である。今回は収集された試料に基づき、本症の臨床と病理の特徴を分析し、その病態について考察を加えた。

### はじめに

多系統萎縮症(multiple system atrophy; MSA)はオリブ橋小脳萎縮(olivoponto-cerebellar atrophy; OPCA)、線条体黒質変性症(striatonigral degeneration; SND)、シャイ・ドレーガー症候群(Shy-Drager syndrome; SDS)を含む成人発症の孤発性神経変性疾患である。当初 OPCA, SND, SDS は独立した疾患として記載されたが、臨床像や病理学的な病変分布には共通点があることから、1969年に Graham と Oppenheimer らはこれらの病態を包括して MSA と総称すること提唱した。1989年から1990年に Pappe ら、Nakazato らは MSA のオリゴデンドログリアの胞体内に嗜銀性封入体を同定し、OPCA、SND、SDS のサブタイプすべてに共通して glial cytoplasmic inclusion (GCI) が出現することを記載した。さらにその後家族性パーキンソン病の遺伝子異常として  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ SN) が同定され、Lewy 小体が  $\alpha$ SN を構成蛋白とすることに加えて、MSA の GCI の主要な構成蛋白が  $\alpha$ SN であることが確認された。MSA は現在パーキンソン病

(Parkinson disease; PD)、レヴィー小体型認知症(Dementia with Lewy bodies; DLB)とともに synucleinopathy の代表的な疾患であり、 $\alpha$ SN 陽性の GCI は MSA の病理診断的指標となっている。本症は神経変性疾患の中でも頻度の高い疾患であり、代表的な脊髄小脳変性症で、そ

の病態のさらなる解明と治療方法の開発が求められている。

### A. 研究目的

原因不明の難治性疾患である多系統萎縮症の病態解明のために、病理解剖を通して本症の臨床情報の蓄積を行い、また病理試料の収集を行い、それらの試料を総合的に分析して検討を行なった。

### B. 研究方法

愛知医科大学加齢医科学研究所の剖検例 3163 例(1976 年～2006 年)の中で病理学的に確定診断された MSA102 例について臨床情報を分析し、剖検脳と脊髄について Gallyas 染色を含む各種神経系の特殊染色、 $\alpha$ -synuclein を含む免疫染色を行い、病理学的に解析した

### C. 研究結果

#### 臨床所見

Gilman らによる MSA の診断基準では、MSA は自律神経症状を伴うことを基盤とし、小脳症状が優位となるタイプを MSA-C (MSA with predominant cerebellar ataxia)、パーキンソニズムが主徴をなすタイプを MSA-P (MSA with predominant parkinsonian features) と亜型分類し、SDS という症候群名は誤用されているとのことで亜型分類から排除している。自律神経障害、小脳症状、パーキンソニズムに関して診断基準を定め、possible MSA, probable MSA

に分類し、definite MSA は線条体・黒質系 (SN 系)、オリブ・橋・小脳系 (OPC 系) に神経変性を伴う  $\alpha$  SN 陽性 GCI を認めるものと規定している。私たちの症例はすべて病理学的に GCI を確認しており、definite MSA である。死亡時平均年齢は  $65.5 \pm 7.4$  歳 (47~85 歳) であり、男女比 54:48 であった。平均罹病期間は  $6.9 \pm 4.0$  年 (1~25 年) であった。

### 病理所見

MSA の病理学的 staging は OPC 系、SN 系の各領域の萎縮、細胞脱落とグリオシス、GCI の出現量によって分類している Jellinger らの staging を用いた。102 例中 OPC 系病変の強い OPCA-type が 33%、SN 系病変の強い SND-type が 22%、OPC 系と SN 系に同等の変性がみられる OPCA=SND-type が 39% であり、OPC 系と SN 系両者の変化がきわめて軽度な msa-type が 6% 存在した。msa-type は臨床的には自律神経障害が前景で小脳失調やパーキンソンニズムが目立たず罹病期間も比較的短いいわゆる SDS に相当する例が含まれた。GCIs はオリゴデンドログリアの胞体内にみられる嗜銀性封入体で、免疫染色では  $\alpha$  SN、ユビキチン、トランスフェリン、リュウ 7 などに様々な程度に陽性を示した。超微形態的には径 15-30nm の granule-coated fibril から構成され、免疫電顕ではこのフィラメントに  $\alpha$  SN の免疫原性が認められた。GCIs は神経細胞脱落の強い領域に多数分布し、橋核、被殻背外側、被殻より程度は軽い尾状核背外側、淡蒼球、内包前脚・後脚、橋横走線維、中小脳脚、小脳白質、大脳では一次運動野、補足運動野の皮質深層から皮髄境界にかけて多数出現した。しかし脳内をくまなく観察すると GCIs は神経細胞脱落のみ見られない領域にも広い範囲に少数出現していた。つまり GCIs の形成自体は脳全体に及び脊髄にもみられる。逆に後索には GCIs の形成がきわめて少なかった。GCIs は神経細胞脱落のまだ乏しい初期から出現し、細胞脱落が高度となった状態でも多数残存して観察された。MSA では GCI に加えて、 $\alpha$  SN 陽性の神経細胞胞体内封入体 (Neuronal cytoplasmic inclusions; NCIs)、神経細胞の核内封入体 (neuronal nuclear inclusions; NNIs)、オリゴデンドログリアの核内封入体 (glial nuclear inclusions; GNIs)、さらに変性神経突起 (dystrophic neurites; DNS) がみられた。

### D. 考察

MSA では病理学的に OPC 系と SN 系、自律神経系に高度な変性がみられる。OPC 系ではオリブ核、橋核、小脳 Purkinje 細胞の脱落と横橋線維、中小脳脚、小脳白質の有髓線維の脱落、SN 系では被殻、尾状核、黒質の細胞脱落、基底核の有髓線維の脱落があり、被殻と尾状核では被殻の変性がより優位であり、被殻と尾状核の変性は背外側部位に優位で、黒質の細胞脱落とグリオシスも外側優位を示す。黒質の神経細胞脱落は OPC 系の変化、SN 系の変化のいずれにも出現する。自律神経系では脊髄中間質外側核、第 2 仙髄 Onuf、迷走神経背側核などの中枢自律神経系に強い変性を認める。最終的には 3 系統すべてに変性が及ぶが、3 系統の障害順序や程度には症例毎に差異がある。また MSA の病変は中心前回を含む運動野や脊髄前角にも広がり示し、錐体路や脊髄前根の有髓線維の計測では小径線維優位の脱落を示す特徴がある。これは小径有髓線維のオリゴデンドログリアの障害がより優位である結果なのか、あるいは小型神経細胞の軸索がより障害されやすい結果なのか、いずれにせよ MSA の病態を反映している可能性がある。

$\alpha$  SN 陽性オリゴデンドログリアの封入体 GCI は MSA の診断、病態解明の鍵となる構造物である。さらに私どもの教室の吉田らは初期例に確認される神経細胞の核内と胞体内の  $\alpha$  SN 陽性構造物は、MSA の病態に神経細胞自体にも一次的变化が出現していることを強調している。最近の培養細胞やトランスジェニックマウスの知見の蓄積からは様々なストレス下で神経細胞核内にも  $\alpha$  SN が誘導されることが示されており、グリア細胞と神経細胞の両者に同期して  $\alpha$  SN の出現を伴う変化が出現して、神経系の障害を相乗的に加速している可能性が示唆され興味深い。

### E. 結論

以上、永年の病理解剖を通じて集積された臨床と病理解剖の分析結果を報告した。正確に神経病理学的に診断された多数例の病理組織試料は難治性疾患の病態解明のために必須であり、多くの難病に苦しむ患者のための早期発見と治療方法の確立に役立つものと考えられるので、今後とも臨床医と病理医の共同作業によ

る地道な研究活動の推進が重要と考えられる。

病の疫学的検討. 臨床神経学 2009, 8,49, 463-467.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kawada M, Tamada Y, Simizu H, Yanagishita T, Yamashita N, Ishida N, Watanabe D, Yoshida M, Ibi T, Sahashi K, Hashizume Y, Matsumoto Y. Reduction in QSART and vasoactive intestinal polypeptide expression in the skin of Parkinson's disease patients and its relation to dyshidrosis. **J Cutan Pathol** 2009, 36, 517-21.

Iwasaki Y, Ito M, Mori K, Deguchi A, Nagaoka M, Yoshida M, Hashizume Y. An autopsy case of diffuse neurofibrillary tangles with calcification: Early stage pathologic findings. **Neuropathology** 2009, 29, 697-703.

Yamamoto R, Iseki E, Higashi S, Murayama N, Minegishi M, Sato K, Hino H, Fujisawa K, Kosaka K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Yoshida M, Hashizume Y, Arai H. Neuropathological investigation of regions responsible for semantic aphasia in frontotemporal lobar degeneration. **Dement Geriatr Cogn Disord** 2009, 27, 214-23.

Iwasaki Y, Mimuro M, Yoshida M, Sobue G, Hashizume Y. Clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: accuracy based on analysis of autopsy-confirmed cases. **J Neurol Sci** 2009, 277, 119-23.

吉田眞理, 三室マヤ, 橋詰良夫, 早川恵理, 平山幹生. 脳肉芽腫性血管炎とβアミロイド沈着. 神経内科 2009, 70/2, 181-187.

橋詰良夫, 吉田眞理, 三室マヤ. 球脊髄性筋萎縮症における脊髄の病理 (脊髄の変性疾患 Atlas 6). 脊椎脊髄ジャーナル 2009, 4, 22, 341-344.

加藤博子, 吉田眞理, 安藤哲朗, 杉浦真, 橋詰良夫. 急速に進行する片麻痺を呈した Lissauer 型進行麻痺の 1 剖検例. 臨床神経学 2009, 6,49, 348-353.

岩崎靖, 三室マヤ, 吉田眞理, 祖父江元, 橋詰良夫. 剖検例からみた孤発性 Creutzfeldt-Jakob

### 2. 学会発表

長谷川康博、新美由紀、山名知子、吉田眞理、橋詰良夫. Lewy 小体型認知症と多系統萎縮症の合併例 自律神経不全が軽度でパーキンソン症候を主徴とした 1 剖検例. 第 62 回日本自律神経学会総会、2009 年 11 月 5 日、和歌山

吉田眞理、櫻井信夫、三室マヤ、橋詰良夫、新井哲明、長谷川成人、新井誠、糸川昌成、秋山治彦. TDP-43 G298S 変異示す認知症を伴う家族性 ALS. 第 28 回日本認知症学会学術集会 2009 年 11 月 20 日、仙台

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 多系統萎縮症の病理組織収集

### （組織バンクの活用研究）

研究分担者 矢澤 生 国立長寿医療センター研究資源有効利用室長

#### 研究要旨

組織バンクの研究資源を活用し多系統萎縮症(MSA)の発病機構を解明し、神経変性に対する根本的な治療法開発に関する研究を行った。組織バンクのMSA患者脳組織を解析した結果を基に疾患モデル動物を作製し、モデル動物脳から初代培養法による生細胞の解析研究からMSAの蓄積タンパク質である $\alpha$ -synucleinに結合するタンパク質を同定した。さらに、結合タンパク質の阻害物質を利用して治療することを検討した。初代培養細胞 *in vitro* からマウス個体 *in vivo* へと研究を進め、最終的に臨床応用可能な治療をMSA患者へ届けることを目的とする。

#### A. 研究目的

組織バンクは病理解剖から得られる脳脊髄組織について収集・保存管理・活用研究を行うための臨床研究基盤である。本研究では組織バンクの研究資源を活用して、多系統萎縮症(MSA)の発病機構を解明し、神経変性に対する根本的な治療法を開発することを目的とする。さらに、治療法開発に関する成果を国民へ届け、組織バンクや病理解剖の重要性を情報発信する。

#### B. 研究方法

国立長寿医療センターにおいて高齢者の医療研究基盤として病理解剖症例から組織バンクの収集、保存、活用に関する研究を実施した。病理組織を解析した結果からMSA患者脳に起こる病態を模倣する疾患モデルマウスを作製した。疾患モデルマウスの解析と並行して、分子生物学、細胞生物学、さらに組織形態学を合わせて組織バンク資源を活用し、MSAの治療法の開発研究を行った。得られた成果は論文発表及び国立長寿医療センター組織バンクのホームページから情報発信し、組織バンクの有用性を国民へ伝えた。

（倫理面への配慮）組織バンクでは病理解剖

をうける患者又は患者家族から、研究目的及び方法・患者の不利益・撤回する権利などに関するインフォームドコンセントを受けた。組織バンク登録の際には試料の匿名化などにより、個人情報保護を徹底した。組織バンクを利用する研究に関して、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し国立長寿医療センター倫理委員会の承認を得た。

#### C. 研究結果

##### (1) 多系統萎縮症の臨床的特徴

多系統萎縮症(MSA)は緩徐に進行する孤発性の神経変性疾患の一つである。MSAは異なる症状をもつ3つの神経変性疾患を統合した疾患である。運動失調症を主徴とするオリブ橋小脳萎縮症 olivopontocerebellar atrophy (OPCA)、パーキンソン症を主徴とする線条体黒質変性症 striatonigral degeneration (SND)、自律神経障害を主体とするシャイ・ドレーガー症候群 Shy-Drager Syndrome (SDS)の3疾患では、共通する神経病理学的特徴としてグリア細胞質封入体 glial cytoplasmic inclusions (GCIs)の出現を認めたために同じ疾患として考えられるようになった。MSAではグリア細胞の一種類であるオリゴデンドロサ

イトに GCI 形成する。GCI 形成する主なタンパク質は  $\alpha$ -synuclein (Syn) であるが、Syn は GCI としてオリゴデンドロサイトだけに蓄積するのではなく、周辺の神経細胞にも蓄積することにより神経細胞の変性を来すことが本疾患の発病に重要である。

MSA の臨床症状は多彩であるが予後は不良なことが多い。特に、自律神経症状を伴う患者では突然死を発症することが知られている。また、従来は除外基準とされていた認知機能の低下が少なくないことが分かり、皮質下性の認知症の一つとして位置づけられている。

## (2) MSA の疫学的特徴

有病率は我が国では人口 10 万にあたり 4~7 人程度と報告されている。発病は 55~60 歳で、発症から死亡までの期間は 7~10 年である。

## (3) MSA の神経変性発症機構の解明

この 20 年間に遺伝性疾患の発症機構の解明は飛躍的に進んだ。患者遺伝子を分子生物学的手法、特に reverse genetics 等の方法により原因遺伝子を同定しそのタンパク質の解析へと展開する戦略により遺伝性疾患の治療法開発を具体化させた疾患もある。一方、遺伝性ではない難治性疾患では異なる研究アプローチが必要である。難治性の神経変性疾患の多系統萎縮症 (MSA) の発症機構を解明する手がかりは組織バンクに登録された MSA 患者脳解析である。神経病理学的な特徴である GCI と周辺の神経細胞の  $\alpha$ -synuclein (Syn) の蓄積は MSA の最大の特徴であり重要な発見である。Syn の蓄積が原因となる疾患群 synucleinopathy は他にも、黒質神経細胞に蓄積するパーキンソン病 (PD) や大脳皮質に蓄積するび慢性レビー小体病 (DLB) などがある。**では、何故同じタンパク質が蓄積するのにもかかわらず異なる神経変性を起こすのか？** これは単に Syn が蓄積する神経細胞の中樞神経系の局在が異なることではなく、神経細胞内の蓄積様式が異なると考えられる。つまり、PD や DLB では主として Syn は神経細胞の細胞体に蓄積するが、MSA では Syn は軸索やシナプスなどに蓄積する。細胞体蓄積型の神経変性とは別の神経変性様式により MSA の神経変性が起こることが予想される。この予想は、MSA の病変分布は Syn が蓄積するオリゴデンドロサイトが存在する白質とその周辺の神経細胞に存在する事実と合致す

る。白質に存在する神経細胞の構造は軸索が主であり、神経細胞変性は神経細胞体からではなく軸索等の白質内の構造から逆行性に神経細胞へ変性が及ぶと考えられる。

**次に、Syn が蓄積する GCI と神経細胞軸索との関係が問題となる。**そこで我々は神経病理学的観察から以下の仮説をたてた。「MSA の神経変性は、最初にオリゴデンドロサイトの Syn の蓄積により GCI が形成されて、次に GCI の形成の影響により神経細胞軸索内に Syn が蓄積し神経細胞が変性に至る。」そこで我々はこの仮説を実証するために MSA のモデル動物を作製した。オリゴデンドロサイトで特異的にヒト Syn を強制発現するトランスジェニック (TG) マウスを作製し、GCI などの MSA の病理組織学的特徴を有する疾患モデルとして報告した (Yazawa et al, *Neuron*, 2005)。TG マウスでは運動機能の低下や脳萎縮、神経細胞の脱落が観察され、変性したオリゴデンドロサイトが神経細胞の変性を誘導することを示した。したがって、オリゴデンドロサイトの Syn 蓄積は神経細胞の Syn 蓄積を誘導し、神経細胞の変性を引き起こすことが明らかになった。

**最後は、変性したオリゴデンドロサイトが誘導する神経細胞の変性機構を解明し抑制方法を考えることである。**MSA モデルマウスに起こる神経変性機構を脳初代培養細胞により調べると、変性オリゴデンドロサイトが神経細胞に影響を与えて神経細胞の Syn 蓄積を誘導することが分かった。TG マウス脳ではオリゴデンドロサイトに強制発現したヒト Syn により、神経細胞に内因性マウス Syn の蓄積が起こり神経細胞の変性を誘導することが明らかになった。つまり、オリゴデンドロサイトも神経細胞も同じ Syn タンパク質が原因となり神経変性を起こすが、ヒト、マウスの異なる Syn タンパク質を区別して観察することにより神経細胞の変性に直接関与するのは神経細胞内のマウス Syn 蓄積であることをつきとめた。

以上のように MSA に起こる神経変性は、①オリゴデンドロサイトの Syn 蓄積 (GCI 形成)、②変性オリゴデンドロサイトから神経細胞内の Syn 蓄積の誘導、③神経細胞の Syn 蓄積 (軸索型) の 3 過程により起こること分かった。この神経変性機構の解明により MSA の治療法開発に取り組んだ。

#### (4) 治療法の開発に向けて

TG マウス脳細胞からマウス初代培養系を用いた研究により、TG マウス脳神経細胞に蓄積するSynはMSA患者脳に起こるのと同様に病的な不溶化を示すことを示した。また、Synと同様に不溶化を起こす蛋白として微小管構成蛋白である $\beta$ -チューブリンを同定した。TG マウス脳神経細胞ではSynと $\beta$ -チューブリンは共存し、両者が結合する性質を見出した。さらに、微小管の重合阻害剤はSynの不溶化と蓄積を抑制することを明らかにし、Synと結合する $\beta$ -チューブリンの重合阻害がSyn蓄積を抑制することを報告した(Nakayama et al, *Am J Pathol*, 2009)。最近では*in vitro*治療研究から疾患モデルマウスの*in vivo*治療研究まで発展させる成果を得た。さらに、Synと $\beta$ -チューブリンの結合を選択的に阻害するSyn蓄積の抑制方法を検討することによりヒトへの臨床応用をめざすことを検討している。

#### D. 考察

組織バンクでは自らの存在意義を明確に示すために、難治性神経疾患の原因となる神経変性に対する治療法開発研究などにより国民の理解を得る必要がある。このため、組織バンクの研究資源が難治性神経疾患の研究に役立てられていることを積極的に情報公開することが求められる。従来の病理解剖における病理組織研究は専門的で国民には理解しにくかった。また、組織バンクを活用した研究が神経変性の治療研究に役立てられても組織バンクの重要性を示す視点を持たず、組織バンクの存在さえ国民には伝わりにくかった。組織バンクに関わる研究者が組織バンクの活用研究を通じて有用性を国民に示し、国民の理解を得た上で組織バンクの収集や活用研究の拡大をはかることが我が国では重要である。

#### E. 結論

組織バンクの研究資源である患者脳組織の病態解析は、難治性神経疾患の神経変性のメカニズムを解明する上で重要な研究方法である。国立長寿医療センター組織バンクを活用して多系統萎縮症の治療研究を行い、治療法の開発の糸口をつかんだ。組織バンクにおける患者脳の病態を解析しMSAモデルマウスを作製し、マウス脳からMSAの病態を有する初代培養細胞

を作製した。初代培養細胞を使って発病の原因として蓄積するSynと相互作用する微小管タンパク質を見だし、微小管タンパク質を抑制する薬剤によりSynの蓄積を阻止する方法を発見した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakayama K, Suzuki Y, Yazawa I. Microtubule depolymerization suppresses alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. *Am J Pathol* 2009, 174, 1471-1480.

Sato T, Miura M, Yamada M, Yoshida T, Wood JD, Yazawa I, Masuda M, Suzuki T, Shin RM, Yau HJ, Liu FC, Shimohata T, Onodera O, Ross CA, Katsuki M, Takahashi H, Kano M, Aosaki T, Tsuji S. Severe neurological phenotypes of Q129 DRPLA transgenic mice serendipitously created by *en masse* expansion of CAG repeats in Q76 DRPLA mice. *Hum Mol Genet* 2009, 18, 723-736.

##### 2. 学会発表

中山貴美子、鈴木康予、矢澤生. Molecular mechanisms to form insoluble complex in a mouse model of multiple system atrophy (MSA). 多系統萎縮症の $\alpha$ -synuclein蓄積の分子機構. 第32回日本神経科学大会、2009年9月18日、名古屋

鈴木康予、中山貴美子、橋本有弘、矢澤生. Accumulation of C-terminal ATN1 fragment in DRPLA. 伸長ポリグルタミン鎖を含むDRPLA蛋白のC末ペプチドの蓄積. 第32回日本神経科学大会、2009年9月18日、名古屋

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakayama K, Suzuki Y, Yazawa I	Microtubule depolymerization suppresses alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy.	American Journal of Pathology	174	1471-1480	2009
Sato T, Miura M, Yamada M, Yoshida T, Wood JD, Yazawa I, Masuda M, Suzuki T, Shin RM, Yau HJ, Liu FC, Shimohata T, Onodera O, Ross CA, Katsuki M, Takahashi H, Kano M, Aosaki T, Tsuji S	Severe neurological phenotypes of Q129 DRPLA transgenic mice serendipitously created by <i>en masse</i> expansion of CAG repeats in Q76 DRPLA mice.	Human Molecular Genetics	18	723-736	2009
Kawada M, Tamada Y, Simizu H, Yanagishita T, Yamashita N, Ishida N, Watanabe D, Yoshida M, Ibi T, Sahashi K, Hashizume Y, Matsumoto Y	Reduction in QSART and vasoactive intestinal polypeptide expression in the skin of Parkinson's disease patients and its relation to dyshidrosis.	Journal of Cutaneous Pathology	36	517-521	2009
Iwasaki Y, Ito M, Mori K, Deguchi A, Nagaoka M, Yoshida M, Hashizume Y	An autopsy case of diffuse neurofibrillary tangles with calcification: Early stage pathologic findings.	Neuropathology	29	697-703	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto R, Iseki E, Higashi S, Murayama N, Minegishi M, Sato K, Hino H, Fujisawa K, Kosaka K, Togo T, Katsuse O, Uchikado H, Furukawa Y, Yoshida M, Hashizume Y, Arai H	Neuropathological investigation of regions responsible for semantic aphasia in frontotemporal lobar degeneration	Dementia and Geriatric Cognitive Disorders	27	214-223	2009

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷