

運動失調症モデル動物の病態解析に基づく分子標的の探索と利用シーズの開発

業務担当責任者：祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科
研究協力者：蒋 月梅 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科
足立弘明 産業医科大学神経内科
勝野雅央 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨

多系統萎縮症 (MSA) 患者の小脳におけるインターニューロンの病理学的変化について解析した。MSA では小脳プルキンエ細胞層・顆粒細胞層における Hu 及び GAD 陽性の抑制性インターニューロンの数が減少しており、残存するインターニューロンに α -synuclein が沈着し、double stranded break DNA、cleaved caspase-3、topro3 が陽性であった。また、MSA 小脳のインターニューロンでは細胞周期のマーカである cyclin D1 が細胞質に蓄積しており、細胞周期制御機構に異常が生じてアポトーシス様の細胞障害・細胞死を生じていることが示唆された。

A. 研究目的

MSA ではオリゴデンドロサイトの細胞質内封入体 (glial cytoplasmic inclusion: GCI) が病理学的特徴とされ、その構成成分として α -synuclein が同定されている。近年、各種神経変性疾患におけるインターニューロンの障害が報告されているが、MSA におけるインターニューロンの障害については詳細な検討がなされていない。本研究では MSA における小脳インターニューロンの変化に着目し、病理学的に解析した。

B. 研究方法

MSA 剖検例の 8 例 (男性 4 例,女性 4 例) および非神経疾患コントロール 5 例、および脊髄小脳変性症 4 例 (SCA1 2 例、SCA3 2 例) から得られたパラフィン包埋組織を対象とした。抑制性インターニューロンのマーカーである抗 Hu 抗体、抗 GAD 抗体を用いた

免疫組織化学を行った。また、細胞障害の検出には TUNEL in situ Hybridization を用いた。定量的解析は Win Roof 5.6 および Stat View 5.0 を用いて実施した。

(倫理面への配慮)

患者検体 (病理組織) を用いた実験については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、名古屋大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を受けた上で実施した。

C. 研究結果

小脳プルキンエ細胞層および顆粒細胞層に存在する Hu 陽性および GAD 陽性の抑制性インターニューロンの数は MSA において減少していた (図 1)。こうした変化は SCA1 や SCA3 では認められず、MSA に特異的な変化であることが示唆された。

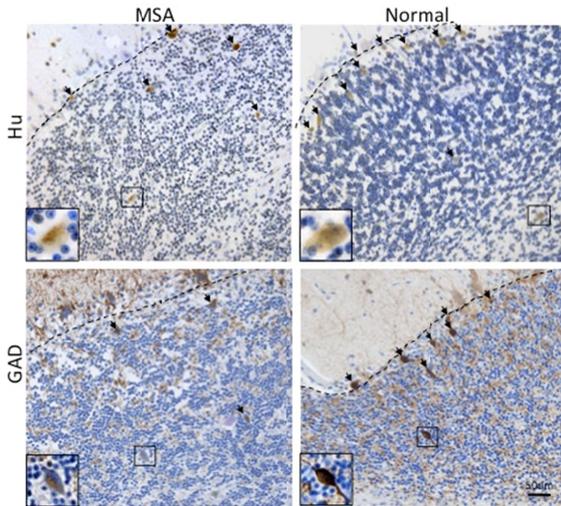


図 1. MSA およびコントロール小脳における Hu 陽性インターニューロンおよび GAD 陽性インターニューロン

MSA 小脳に残存する抑制性インターニューロンは、核染色である Topro3 で染色され、double stranded break DNA、cleaved caspase-3 も陽性であった（図 2）。Tunel を用いた解析でも MSA 小脳の抑制性インターニューロンは陽性を示し、これらの結果から MSA 小脳インターニューロンではアポトーシス経路が活性化していることが示唆された。

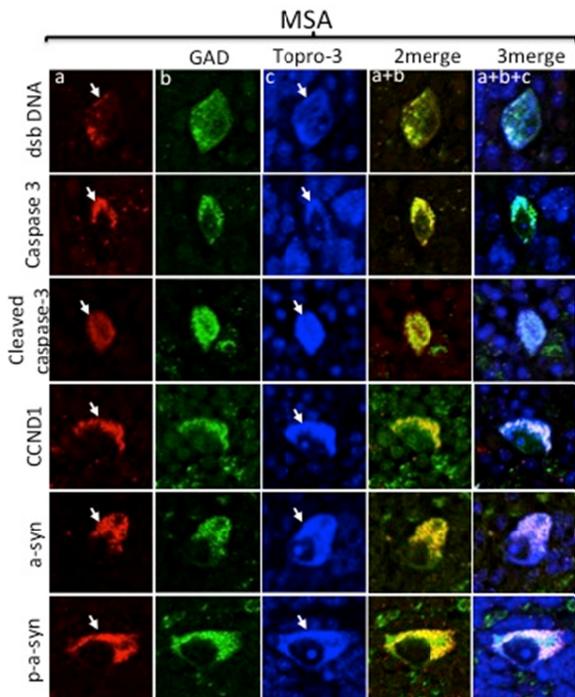


図 2. MSA 小脳インターニューロンにおける細胞障害

また、GCI に類似した細胞質内のリン酸化 α -synuclein がこれらの抑制性インターニューロン内にも認められ、両者に共通する病態の存在が示唆された。さらに、細胞周期マーカーを用いて染色を行ったところ、MSA 小脳に残存する抑制性インターニューロンの細胞質に cyclin D1 が蓄積していることが示され、少なくとも cyclin D1 陽性の一部は α -synuclein も陽性であった。

D. 考察

近年、神経変性疾患におけるインターニューロンの障害が報告されており、ハンチントン病や脊髄性筋萎縮症 (SMA) のモデルマウスではインターニューロン障害が表現型の発現に必須であることが示唆されており (Imlach et al., Cell 2012)、ALS のゼブラフィッシュモデルではインターニューロンの障害が運動ニューロン変性に先行することが知られている (McGown et al., Ann Neurol 2013)。MSA のモデルマウスにおいても抑制性インターニューロンの機能低下が示唆されており (Ito et al., BBRC 2012)、本研究結果を支持する所見であると考えられる。

E. 結論

MSA 患者の小脳では Hu 及び GAD 陽性の抑制性インターニューロンの数が減少しており、残存するインターニューロンに α -synuclein が沈着し、caspase-3 活性化などの分子変化が生じていることが示唆された。その機序の一つとして、細胞周期制御機構に異常が生じてアポトーシス様の細胞障害・細胞死を生じていることが示唆された。

[参考文献]

1. Imlach WL, Beck ES, Choi BJ, et al. SMN is required for sensory-motor circuit function in Drosophila. Cell.

2012;151(2):427-439.

2. McGown A, McDearmid JR, Panagiotaki N, et al. Early interneuron dysfunction in ALS: insights from a mutant sod1 zebrafish model. *Ann Neurol*. 2013;73(2):246-58.
3. Ito H, Nakayama K, Jin C, et al. α -Synuclein accumulation reduces GABAergic inhibitory transmission in a model of multiple system atrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 23;428(3):348-53.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 23(13) 3552-3565, 2014.
- 2) Renier KJ, Troxell-Smith SM, Johansen JA, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Chua JP, Sun Kim H, Lieberman AP, Breedlove SM, Jordan CL. Anti-androgen flutamide protects male mice from androgen-dependent toxicity in three models of spinal bulbar muscular atrophy.

Endocrinology. 155(7) 2624-2634, 2014.

- 3) Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. *Hum Mol Genet*. 24(2) 314-329 2015.

2. 学会発表

- 1) Halievski K, Xu Y, Henley CL, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Breedlove S, Jordan CL. Androgen-dependent deficits in muscle-derived BDNF correlate with motor dysfunction in two mouse models of spinal bulbar muscular atrophy. *Neuroscience 2014*, Washington DC, USA. 2014年11月.
- 2) Xu, Atchison W, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Breedlove S, Jordan CL. SBMA motor dysfunction may be due to failed neuromuscular transmission. *Neuroscience 2014*, Washington DC, USA. 2014年11月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし