



Wide distribution of alpha-synuclein oligomers in multiple system atrophy brain detected by proximity ligation

Sekiya, Hiroaki

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7463号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007463>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Wide distribution of alpha-synuclein oligomers in multiple system atrophy brain detected by proximity ligation

近接ライゲーションアッセイを用いた多系統萎縮症における α シヌクレインオリゴマーの分布に関する検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
神経内科学
指導教員：松本 理器 教授

関谷 博顕

多系統萎縮症 (multiple system atrophy, MSA) は成人発症の致死的な神經変性疾患であり、様々な程度の小脳失調や錐体外路症状、自律神經障害を呈する。病理学的にはリン酸化 α シヌクレイン (phosphorylated alpha synuclein, p-AS) の凝集体から成るグリア細胞質封入体 (glial cytoplasmic inclusions, GCIs) の出現が特徴的である。MSA 脳では神經細胞内封入体 (neuronal inclusions, NIs) もみられるが、GCIs に比べると稀である。従って、MSA の病理診断においては GCIs の存在が強調されており、MSA の神經細胞脱落はグリア細胞の障害の結果生じていると考えられてきた。しかし、高度の神經細胞脱落がみられる領域において GCIs が少数しかみられないとの報告もあり、AS の晚期凝集体が MSA 病理を完全に説明できているとは言えない。同じシヌクレインオーパチーであるパーキンソン病 (Parkinson's disease, PD) において AS の早期凝集体である AS オリゴマーが病因に深く関与するという説がある。しかし、既存の免疫染色では脳標本の AS オリゴマーを検出することが難しかった。近年、Roberts らは近接ライゲーション法 (proximity ligation assay, PLA) による PD 脳の AS オリゴマー検出を報告している。PLA では、オリゴスクレオチドをつけた 2 つの異なる蛋白質を標的とする抗体を組織や細胞に反応させる。それぞれの標的蛋白質が 40nm よりも近い距離に存在する場合には、それぞれのオリゴスクレオチドから環状 DNA が形成される。その環状 DNA を鋳型として増幅を行い、増幅された核酸に標識オリゴスクレオチドを反応させ、シグナルを可視化することができる。これを応用した AS-PLA により PD 患者の剖検脳で AS オリゴマー検出が報告されている。本研究では AS-PLA を用いて MSA 脳における AS オリゴマーの分布を検討した。

兵庫中央病院と神戸大学医学附属病院で神經病理学的に診断が確定した剖検脳と神戸大学大学院法医学分野で剖検となった神經疾患のない症例の剖検脳を用いた。MSA 群と PD 群、疾患コントロール群はそれぞれ 5 例で、疾患コントロール群の内訳は筋萎縮性側索硬化症が 3 例、肢帶型筋ジストロフィーが 1 例、筋強直性ジストロフィーが 1 例であった。また、正常コントロールの 4 例のうち、1 例がイレウス、1 例が腹膜炎、2 例が急性心筋梗塞による死亡例であった。パラフィン包埋した剖検脳から 6 μm 厚の連続切片を用い、被殻や黒質緻密部、橋核、下オリーブ核、小脳、海馬、大脳新皮質（前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、帯状回）について AS-PLA 染色と p-AS 免疫染色を実施した。AS-PLA 染色には PLA Duolink キット (Sigma-Aldrich 社) を用い、2 種類のオリゴスクレオチドを付加したマウスモノクローナル抗体 (syn211, Abcam 社) を使用し、プロトコールに従って染色を実施した。

まず始めに AS-PLA による神經細胞の染色型を検討し、びまん性染色、斑状染色、

点状染色、染色性なしの4型に分類した。MSA群では5例中4例で前頭葉皮質や側頭葉皮質、後頭葉皮質などの9領域にびまん性染色がみられたが、PD群の2領域を除き、PD群とコントロール群にはびまん性染色はみられなかった。小脳プルキンエ細胞ではMSA群の1例でびまん性染色がみられ、MSA群の2例で斑状染色がみられた。

次に神経網におけるASオリゴマーの蓄積についての検討を行った。2人の独立した評価者が、評価パネルを用いて部位ごとのASオリゴマーの程度を0（シグナルなし）から5（高度）の6段階評価を行った。皮質や白質については1つの部位ごとに最も染色性の高い3箇所ずつを評価し、スコアの平均値を採用した。コントロール群と比べMSA群では、黒質線条体や橋核、小脳歯状核、前頭葉や側頭葉、後頭葉の皮質と白質、帯状回皮質、海馬のCA1とCA2においてAS-PLAスコアが有意に高かった。また、黒質線条体や橋核、小脳歯状核、側頭葉と頭頂葉、後頭葉の皮質と白質においてはMSA群の方がPD群よりも有意にAS-PLAスコアが高かった。さらに、皮質と白質においてImageJを用いて染色面積を測定した。コントロール群と比べMSA群では、前頭葉と帯状回の皮質ならびに側頭葉と頭頂葉、後頭葉の皮質と白質においてAS-PLA染色面積が有意に広かった。さらに、側頭葉と頭頂葉の皮質と頭頂葉の後頭葉の白質では、MSA群の方がPD群より有意にAS-PLA染色面積が広かった。

被殻や黒質線条体、橋核、下オリーブ核といったMSAの古典的病巣では神経細胞や神経網のAS-PLA染色性は比較的弱く、残存している神経細胞に点状の染色性を認めたのみであり、神経細胞脱落とAS-PLA染色性との間に有意な負の相関がみられた。

MSA群では大脳皮質に多くのASオリゴマーがみられたが、連続切片のp-AS免疫染色では多くの神経細胞において封入体は検出できなかった。これらの皮質では神経細胞脱落は軽度であった。MSA群の1例では、帯状回皮質においてAS-PLAがよく染まったが、白質の染色性は弱かった。これらの領域では神経細胞やオリゴデンドロサイトの脱落は目立たなかった。

AS-PLAで検出されたASオリゴマーの特徴についてさらなる検討を行った。まず、MSA患者の上前頭回の連続切片を用いて、プロテイナーゼK処理を行ったうえでAS-PLA染色とp-AS免疫染色を実施した。プロテイナーゼK処理によってほぼ全てのAS-PLAのシグナルが消失したのに対し、p-AS免疫染色でのGCIsやNIsの染色性は変わらなかった。続いてASオリゴマーが神経細胞とオリゴデンドロサイトのいずれに局在するのかを調べるために、MSA脳の上前頭回の連続切片を用い、AS-

PLAとNeuNまたはOlig2の二重染色を実施した。皮質においては多くのAS-PLAシグナルが神経細胞に局在していた。さらに、生化学的にASオリゴマーの存在を検討するため、凍結脳サンプルを用いてwestern blotting(WB)を行った。MSA群とPD群ではサルコシル不溶画分に高分子量のASオリゴマーのバンドがみられたのに対し、コントロール群ではそのような高分子量のバンドは検出されなかった。

AS-PLAを用いてMSA脳におけるASオリゴマーの分布を検討した報告は本研究が初めてであり、MSA脳においてオリゴデンドロサイトのみならず皮質の神経細胞にも多数のASオリゴマーが分布していることを初めて明らかにした。

本研究のWBではMSA脳においてASオリゴマーと思われる多数の高分子量バンドがみられ、AS-PLA染色の結果と矛盾しないものであった。MSA脳において、従来の免疫染色ではほとんどGCIsがみられなかった領域にもWBで多数の高分子量のASがみられたとの報告がある。本研究で検出された多数のASオリゴマーの存在がWBと従来の免疫染色との乖離を埋めることが示された。

近年、ASオリゴマーの毒性についての報告が多数されており、本研究で示されたMSA脳における皮質神経細胞や小脳プルキンエ細胞へのASオリゴマー蓄積がMSAの病態において重要な役割を果たしている可能性がある。これまで神経機能障害はグリアの障害に伴う二次的なものと考えられてきたが、AS-PLAでみられたような広範なASオリゴマー蓄積を考慮すると、ASオリゴマーがより直接的に神経障害に関与していることが示唆される。

MSAの古典的病巣においては神経細胞脱落とAS-PLAの間に負の相関がみられた。AS-PLAで検出されたASオリゴマーはプロテイナーゼK処理で容易に溶ける早期凝集体であるのに対し、GCIsはプロテイナーゼK抵抗性であり、 β シート構造の豊富な線維化したASの晚期凝集体である。本研究で用いたMSAの剖検脳はすべて罹病期間の長い症例であり、病期初期から侵される古典的病巣では早期凝集体は残っておらず、AS-PLAシグナルが目立たなかったと考えられる。

MSA患者における遂行機能障害や記録力障害、視空間機能障害が報告されている。これらの障害の病因は明確ではないが、本研究でみられた大脳新皮質の神経細胞の多数のASオリゴマーが病因となっている可能性がある。

これまでNIIsやGCIsのようなAS晚期凝集体をみており、MSAの早期病変についての検討は困難だった。本研究では、ASオリゴマーに着目し、MSAの早期病変の特徴を検討した。MSAの帯状回で皮質にASオリゴマーが多数みられたのに対し、

白質では AS オリゴマーがほとんどみられなかった。また、二重染色でも AS-PLA シグナルの多くは神経細胞に局在しており、MSAにおいて AS オリゴマーの蓄積がまず神経細胞から始まると考えられる。

今回、我々は PLA という手法を用いて AS オリゴマーの可視化を行い、MSA 脳の神経細胞における広範な AS オリゴマー蓄積が示された。AS 蓄積のプロセスやその毒性を考慮すると、神経細胞における AS オリゴマー蓄積が MSA における早期の病理変化であり、MSA の病態において重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2862 号	氏名	関谷 博顕
論文題目 Title of Dissertation	<p>Wide distribution of alpha-synuclein oligomers in multiple system atrophy brain detected by proximity ligation</p> <p>近接ライゲーションアッセイを用いた多系統萎縮症におけるα-シヌクレインオリゴマーの分布に関する検討</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 岩尾 一郎 Chief Examiner</p> <p>副査 甲村 美乙 Vice-examiner</p> <p>副査 横山 元 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

序論

多系統萎縮症 (MSA) は成人発症の致死的な神経変性疾患であり、様々な程度の小脳失调や錐体外路症状、自律神経障害を呈する。神経病理学的には α -シヌクレイン (AS) 陽性的グリア細胞質内封入体 (GCIs) の出現が特徴的とされる。MSA では神経細胞脱落がみられるにも関わらず、神経細胞内封入体 (NIs) の出現は GCIs と比べると稀であり、MSA における神経細胞脱落の機序はよくわかっていない。AS オリゴマーと比べると、GCIs や NIs は終末期の病理変化であり、MSA における早期病理変化を反映していない可能性がある。

今回、我々は MSA における早期病理変化を検討するため、AS の早期凝集体である AS オリゴマーに着目した。近接ライゲーション法 (PLA) を用いて MSA や他疾患の剖検脳における AS オリゴマーの分布を検討した。

結果

対象として、MSA 患者 5 例、パーキンソン病 (PD) 患者 5 例、シヌクレインノバチのないコントロール 9 例の剖検脳を用いた。MSA の剖検脳ではオリゴデンドロサイトに加えて大脳新皮質の神経細胞に広範かつ多量の AS オリゴマーがみられた。MSA 群では 5 例中 4 例で前頭葉皮質や側頭葉皮質、後頭葉皮質などの 9 領域に神経細胞に集簇する AS オリゴマーがみられたが、PD 群とコントロール群では PD の 2 例で 1 領域ずつに同様の染色型がみられるのみであった。

MSA の古典的病巣では AS-PLA の染色性は比較的弱く、残存している神経細胞に点状の染色性を認めたのみであった。さらに、神経網の染色性についてのスコアリングを行ったところ、コントロール群と比べ MSA 群では、黒質線条体や橋核、小脳歯状核、前頭葉や側頭葉、後頭葉の皮質と白質、帯状回皮質、海馬の CA1 と CA2 において AS-PLA スコアが有意に高かった。

黒質線条体や橋核、小脳歯状核、側頭葉と頭頂葉、後頭葉の皮質と白質においては MSA 群の方が PD 群よりも有意に AS-PLA スコアが高かった。MSA の帯状回皮質に AS オリゴマーが多数みられたのにに対し、帯状回白質では AS オリゴマーがほとんどみられなかった。過去の報告と違い、MSA 剖検脳において小脳プルキンエ細胞に AS オリゴマーがみられ、MSA 脳におけるプルキンエ細胞脱落の病因となっている可能性が示唆された。

考察

二重染色でも AS-PLA シグナルの多くは神経細胞に局在しており、MSAにおいて AS オリゴマーの蓄積がまず神経細胞から始まる可能性が示唆された。MSA の古典的病巣では神経細胞や神経網の AS-PLA 染色性は比較的弱く、神経細胞脱落と AS-PLA 染色性との間に有意な負の相関がみられた。ウェスタンプロットティングでは MSA 脳において AS オリゴマーに一致する多数の高分子量バンドがみられ、AS-PLA 染色の結果と矛盾しないものであった。

MSA の帯状回皮質に AS オリゴマーが多数みられたのに対し、帯状回白質では AS オリゴマーがほとんどみられなかった。また、二重染色でも AS-PLA シグナルの多くは神経細胞に局在しており、MSAにおいて AS オリゴマーの蓄積がまず神経細胞から始まる可能性が示唆された。

以上

これまで MSA 脳における AS オリゴマー分布についての報告はない。近年、AS オリゴマーの毒性についての報告が多数されており、本研究で示された MSA 脳における皮質神経細胞や小脳プルキンエ細胞への AS オリゴマー蓄積が MSA の病態において重要な役割を果たしている可能性があり、今後の研究発展が期待されることが示唆されたことから価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。