

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08872

研究課題名(和文)D-ニューロンを用いた脳機能評価法の開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research to develop evaluation method for cerebral function by mean of D-neuron.

研究代表者

西村 明儒(NISHIMURA, Akiyoshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：60283561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：海馬歯状回分子層に球状沈着物を多く検出した法医剖検例で、ドパミン関連分子、レクチン、一本鎖DNAを組み合わせ蛍光二重染色で検討した。レクチンの染色性は、死後8日と7日で大きく変化した。レクチンを用いた診断法は、死後7日を目安に適用の可否を検討する必要があると考えられた。Braak Stageは、以上になると必ず何らかの臨床症状を示すが、stage IVの場合、無症状から重症までの可能性があり、しかも症例数も多く、別の指標が待たれていた。Stage IIIの中でもTAAR1染色性が低い例は、生前に認知症状を呈していた可能性が高く、TAAR1染色性は、死後の脳機能評価法として有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical examinations among dopamine related substances, lectins and single stranded DNA were performed by mean of double fluorescent immunohistochemical staining method on forensic autopsied brains detected not a few lectin positive spherical deposits in the dentate gyrus of hippocampus. As reactivity of lectin staining showed much difference between less 7days and over 8days after death, lectin histochemical evaluation is supposed to apply on cases with less 7days postmortem period. Though over Braak stage IV cases show some symptom, stage III cases show from no symptom to severe ones, moreover, any examination method was longed for not a few stage III cases. Stage III cases showing low reactivity of trace amine associated receptor 1(TAAR1) might have any symptom during alive, reactivity of TAAR1 might be suspected to be helpful postmortem evaluation method of cerebral function.

研究分野：法医学

キーワード：レクチン反応陽性球状沈着物 海馬 歯状回 アルツハイマー 認知症 脳損傷 PTSD 統合失調症

1. 研究開始当時の背景

我々は、これまでに統合失調症や認知症性脳変性疾患の剖検例の海馬歯状回分子層において数種類のレクチンに反応を示す直径 2~3 μ m の球状の構造物を検出し、これを spherical deposits (SPD) と名付け、その組織化学的特性や電子顕微鏡による超微細構造の特徴について報告している¹⁾⁻⁷⁾。SPD は、若年の非精神病者には、ほとんど認められず、高齢者であっても認知症や脳変性疾患でなければ出現していてもその頻度はきわめて低い。Alzheimer 型認知症、Tangles 型認知症、嗜銀性顆粒型認知症、あるいはレビー小体病の如き、変性疾患脳ではこの SPD が比較的高頻度に検出されるとともに Bodian 法、渡辺法、Gallias-Braak 法などの塗銀染色によって、老人斑、neurofibrillary tangles、嗜銀性顆粒、レビー小体などの各疾患における特徴的な変性所見もまた高頻度に認められる。一方、統合失調症脳では、SPD は高い頻度で検出されるが、変性所見はまったく検出されない。この特徴を利用して、従来の病理組織学的検査と併用することで、脳の変性所見がないにも拘わらず、SPD が高頻度に出現しているものを統合失調症と剖検診断することが可能ではないかと提唱している^{3),4)}。統合失調症での neuro-network 構築異常については、古くは鍍銀染色による光顕的観察によって、細胞体が本来存在する場所より白質寄りに分布していることから発育段階での migration の異常であるとの報告⁵⁾があり、これは、近年、modified Gimsa 染色⁶⁾や cresyl violet 染色の如き神経染色による全 neuron の大脳皮質内分布の調査⁷⁾や NADPH diaphorase formazan formation 法⁸⁾や抗 NOS 抗体を用いた免疫組織化学的手法⁹⁾によって cholinergic neuron で確認されている。また、統合失調症では対照例に比べて軸索が太く、葛籠折れ状態であることが migration 異常の結果と指摘されており¹⁰⁾、これに関して我々は、免疫組織化学的に D-neuron の軸索が同様の形態を示すことを報告している¹¹⁾。統合失調症の成因として提唱されているものに、この migration 異常が、発育段階の何らかのストレスによって引き起こされ、思春期に再びストレスに曝されることによって統合失調症を発症するという二段階ストレス仮説がある¹²⁾。我々は、この仮説に着目し、neuro-network の破壊と再構築が繰り返されている認知症脳変性疾患と統合失調症に共通にみられる所見を検索し、本研究の標的である SPD を見出した。統合失調症における形態的異常は、最近の報告¹³⁾⁻¹⁵⁾においても指摘されており、dopamine のみならず、cholinergic neuron¹⁶⁾や GABA neuron¹⁷⁾の組織学的異常も再指摘さ

れるとともに neurogenesis¹⁸⁾や neuron の細胞体の apoptosis¹⁹⁾や synapse の apoptosis²⁰⁾の存在を示唆する所見も報告されている。本研究の標的である SPD がこれら統合失調症脳において検出されている現象のいずれかと関連する可能性は高く、SPD が neurogenesis や apoptosis と関係していることが明らかとなり、二段階ストレス仮説の傍証となる可能性は高いと考える。また、認知症において大脳皮質軟膜下に生じるアミロイド小体と SPD の関係および脳損傷で生じる SPD とアミロイド小体の関係の相違についても検討を行う。現状では、認知症や脳損傷で生ずるアミロイド小体の病因論的役割が明確でないが、apoptosis との関連が示唆されている SPD との関係が明らかになれば、明確な陳旧性脳挫傷痕が見られない症例においてもアミロイド小体の出現頻度による評価が可能になることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、統合失調症や認知症性脳変性疾患の海馬歯状回分子層において検出され、健常者にはほとんど見られない、D-neuron の apoptosis との関連が示唆されるレクチン反応陽性球状沈着物と脳の変性所見との関係を明らかにし、各種塗銀染色など従来の病理組織検査によって検出される神経変性所見と本沈着物の出現頻度を組合せた統合失調症や認知症性脳変性疾患の剖検脳における脳機能評価法を開発する基礎とし、将来的には、感情障害や人格障害、心的外傷後ストレス障害 (PTSD)、脳損傷後遺症をも含めた死後の精神鑑定法を開発することを目的とする。特に、今回は、過去に検討した各種抗体の発現と Trace amine associated receptor type 1 (TAAR1) の発現態様を検討し、更に SPD とアミロイド小体 (CA) との関連を明確化し脳損傷評価に役立てたい。

3. 研究の方法

(1) 平成 27 年度

平成 23、24 年に徳島大学医学部で行われた法医剖検例のうち、臨床的に統合失調症と診断されていた症例、認知症性脳変性疾患の病理所見を示す症例、自殺症例、脳損傷の症例、65 歳以上の非認知症の症例、等の 63 例の法医剖検脳の海馬切片に対してレクチン染色を行い歯状回分子層に球状沈着物を多く検出した症例に対し、ドパ脱炭酸酵素 (dopa decarboxylase, DDC) とレクチン (DBA, GS-I-B4)、single-stranded DNA (ssDNA) を組み合わせる免疫蛍光二重染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS NT) で観察することで、その構成成分を検討した。

(2)平成 28 年度

平成 21 - 23 年に徳島大学医学部で行われた法医剖検例のうち、精神疾患と診断されていなかった 41 症例の脳（アルツハイマー型認知症を除く）を用いた。それらの年齢は、24 歳から 89 歳、性別は、男性 25 例、女性 16 例、死後経過時間は、5 時間から 72 時間、死因の内訳は、溺死 4 例、凍死 1 例、外傷死 11 例、窒息死 8 例、内因死 12 例、焼死 3 例である。Braak stage (BS)の分布は、0 26 例、1 4 例、2 2 例、3 6 例、4 3 例である。これらの法医剖検脳（海馬）切片に対し、ドパミンやアンフェタミンなどの広いアゴニストスペクトラムを持ち、ドパミン輸送体あるいはドパミンの有効な作用を制御する受容体である TAAR1 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、解析を行った。さらに、TAAR1 とドパミン、アポトーシスとの関連を検討するためにそれぞれ DDC、ssDNA を組み合わせ免疫蛍光二重染色を施した。

(3)平成 29 年度

平成23年から27年に行われた法医剖検例の脳を用いた。年齢は、0歳から94歳、性別では、男性76例、女性37例、死後経過時間では、8時間から20日、死因は、中毒死18例、凍死8例、失血死10例、窒息死51例、頭部外傷12例、内因死（出血性）2例、内因死（心臓性）7例、衰弱死1例、不詳4例である。BSの分布は、0 65例、1 4例、2 20例、3 8例、4 12例、5 2例、6 2例である。ホルマリン固定・パラフィン包埋後、厚さ5μmに薄切し、病理組織診断に用いた脳113例の海馬を用いて、レクチンおよび蛍光抗体二重染色を施行し、鑑定症例への応用を検討した。

4 . 研究成果

(1)平成 27 年度

球状沈着物は、レクチンに反応し、統合失調症や認知症性脳変性疾患でよく検出されるが、今回の研究では、レクチンの染色性が高かった症例には生前に精神疾患を診断されていたものは1例しか含まれていなかった。症例の中にはBSの高いものもあったため、統合失調症や認知症性脳変性疾患の特徴は持っていたが診断はされていなかったケースが含まれていた可能性が考えられる。

ssDNA は、アポトーシスによる核の断片化により生じる。これまでの研究で、レクチンとssDNA は、ニューロンの部分的に崩壊した核の一部で共染されることが示されており、球状沈着物はニューロンのアポトーシスにより形成されることが明らかになっている。DDC とレクチンの共染性が認められたことから、球状沈着物は DDC を構成成分として含むことが示唆された。また、複数の症例で核周囲に DDC と ssDNA

の共染が見られた。以上のことから、球状沈着物は、ドパミン合成を行うニューロンの核の崩壊、つまりドパミン作動性ニューロン、セロトニン作動性ニューロン、D-ニューロンのアポトーシスの過程で生じ、さらにアポトーシスが進行し核が完全に崩壊した結果、球状に凝集するものと考えられた。

(2)平成 28 年度

BS 別の解析により、TAAR1 染色性は からにかけて急激な低下を示すことが分かった。BS の進行と共に TAAR1 が損なわれることで、正常の認知に必要な TAAR1 によるモノアミン作動性経路が抑制され記憶障害を生じ、認知症状が発現すると考えられた。また、一般的に BS が 以上になると臨床症状が見られるが、 の場合には無症状から重症まで多岐にわたり死後の脳機能評価に応用し難い指標である。しかし、 と の TAAR1 染色性の分散に有意差が見られなかったという結果は、 で既に TAAR1 が十分に損なわれている例があることを示唆している。以上のことから、 かつ TAAR1 染色性が低い例では生前に認知症状を呈していた可能性が高く、TAAR1 染色性は BS 分類と組み合わせることで死後の脳機能評価法として有用であると考えられた。

死因別の解析では、焼死の場合に TAAR1 染色性が有意に低下していた。この原因としては大きく 3 つ考えられる。まず焼死例に偶然 BS の高い症例が多かった可能性について考えられたが、死因別に BS の分散を解析したところ有意差は見られなかった。次に、焼死体では熱によるタンパク質変性が生じるために TAAR1 が変性してしまったため染色性が下がった可能性が考えられる。一方、焼死と BS には相関があるという可能性も挙げられる。すなわち、BS が高い症例は生前に認知症状を呈しており、それが火事の原因となり焼死に至った可能性が考えられる。Harvey らは、熱傷により入院した 65 歳以上の患者 1535 人で統計を取った結果、11.0%の患者が認知症歴を有していること、また認知症患者は非認知症患者と比較して重度の熱傷を負いやすい（総体表面積の 20%を超える熱傷を負う可能性が約 2 倍、30-day mortality が約 3 倍）と報告している²¹⁾。このように焼死症例で TAAR1 染色性が低くなった事は、焼死の原因と認知症に関連性があることを示唆している。

今回の結果では、TAAR1 減少と認知症状とに相関があると考えられた。特に認知症状の中でもせん妄に着目すると、認知症では記憶障害による二次的なせん妄が見られるのに対し、統合失調症の一次的なせん妄は、ドパミン輸送体によるドパミン放出増加・ドパミン availability 増加に起因するという報告がなされている²²⁾。

統合失調症では TAAR1 が増加していると仮定すると、認知症による TAAR1 減弱と対比付けることで、疾患の鑑別まで行うことができる可能性がある。今後、統合失調症についても TAAR1 染色性の評価・解析を行い、有用性を検討する必要がある。

また、TAAR1 と DDC の二重染色では両者ともに細胞内に見られ、一部共染性が認められた。このことから TAAR1 陽性 SPD は DDC を構成成分として含むことが示唆された。TAAR1 と ssDNA の二重染色では、核と考えられる場所の周辺に TAAR1 と ssDNA が存在していたことから、TAAR1 陽性の SPD はニューロンの核の崩壊、つまりアポトーシスの過程で生じるものだと考えられた。これまでの研究において、レクチンと ssDNA はニューロンの部分的に崩壊した核の一部で共染されることがわかっている²³⁾。したがって SPD に陽性反応を示す物質は種類を問わず、いずれもニューロンの核周囲のアポトーシスを起こしている部分に存在しているものだと考えられた。

(3)平成 29 年度

死因別のレクチン染色では、DBAならびに GSI-B4を用いた。死因の違いによる染色性の有意差は、見られなかった。特定の死因によって SPDが発現した可能性は低く、レクチンを用いた診断法は、死因の種類を問わず、使用することが可能と考えられた。死後経過時間別のレクチン染色性では、8日以降のものが7日以内のものに比べて、レクチン染色性が高くなることが明らかになった。このことから、レクチンを用いた診断法は、死後7日を目安に適用の可否を検討する必要があると考えられた。

ssDNAとDDCの二重染色では、SPD部にssDNAのみの反応が認められ、DDCとの共存は見られなかった。一方、TAAR1とDDCの二重染色では、SPDにおいて、一部にTAAR1とDDCの共染が認められた。また、CAにもTAAR1単独での存在が認められ、全体が染まっているもの、辺縁が染まっているもの、まったく染まっていないものに分けられた。免疫電顕的に確認されているSPDとCAとの類似性やシグナルの分布パターンを支持する結果となった。この際、SPDで見られたDDCのシグナルが、CAでは見られなかったことから、SPDからCAへ変化する際にDDCが消失すると考えられた。さらに、アミロイド小体におけるTAAR1の染色態様の変化から、CAが形成されてから時間経過とともに中心部のシグナルが減少し、周辺のみに残存する状態を経て、消失していくと示唆された。さらに、CAにおけるTAAR1の染色性の特徴から、CAが形成されてから時間経過とともにTAAR1が中心から消失していくことも考えられた。今後は、さらに症例を増やして検討を重ねる必要があると考える。

引用文献

- 1) Nishimura A, et al: Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. *Forensic Sci Int* 113(1-3), 265-269, 2000.
- 2) Nishimura A, et al: Postmortem diagnosis of brain disorders -The histochemical detection of glycoconjugate deposition with lectins., *Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology* 2000 Vol.1, No.2 (July-Dec 2000): http://anil299.tripod.com/vol_001_no_002/paper003.html, 2000.
- 3) Nishimura A, et al: The aberrant glycogenesis in the hippocampus of schizophrenia. *Acta Crim Japon* 67, 49-55, 2001.
- 4) Nishimura A, et al: The carbohydrate deposits detected by histochemical methods in the molecular layer of the dentate gyrus in the hippocampal formation of patients with schizophrenia, Down's syndrome and dementia, and aged person. *Glycoconjugate J* Nov. 17(11), 815-822, 2001.
- 5) Falkai P, et al: Measurement of the alpha-cell-migraton in the entorhinal region: a marker for the developmental disturbances in schizophrenia? *Schizophr Research* 1, 157-158, 1988.
- 6) Selenon LD, et al: Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry* 52(10), 805-18, discussion 819-20, 1995.
- 7) Scheff SW, Baldwin SA: Preparation and Staining of Tissue for Counting Neurons. *Kopf Carrier* 45, 1-4, 1996.
- 8) Akbarian S, et al: Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch Gen Psychiatry* 50(3), 169-77, 1993.
- 9) Yanik M, et al: Is the arginine-nitric oxide pathway involved in the pathogenesis of schizophrenia? *Neuropsychobiology* 47(2), 61-5, 2003.
- 10) Benes FM, et al: Increased vertical axon numbers in cingulate cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 44, 1017-1021, 1987.
- 11) Ikeroto K: Significance of human striatal D-neurons: Implications in neuropsychiatric functions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28, 429-434, 2004.
- 12) Nuechterlein KH, et al: Developmental Processes in Schizophrenic Disorders: longitudinal studies

of vulnerability and stress. Schizophr Bull 18(3): 387-425, 1992.

13) Choi JS, et al: Decreased caudal anterior cingulate gyrus volume and positive symptoms in schizophrenia. Psychiatry Res 139(3), 239-47, 2005.

14) Nierenberg J, et al: Reduced left angular gyrus volume in first-episode schizophrenia. Am J Psychiatry 162(8), 1539-41, 2005.

15) Chance SA, et al: Ventricular enlargement in schizophrenia: a primary change in the temporal lobe? Schizophr Res 62(1-2), 123-31, 2003.

16) Lauer M, et al: Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. Neuropsychobiology 52(3), 111-7, 2005.

17) Pillai-Nair N, et al: Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. J Neurosci 25(18), 4659-71, 2005.

18) Murrell W, et al: Neurogenesis in adult human. Neuroreport 7(6), 1189-94, 1996.

19) Jarskog LF, et al: Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. Am J Psychiatry 161(1), 109-15, 2004.

20) Glanz LA, et al: Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. Schizophr Res 81, 47-63, 2006.

21) Lara Harvey, Burns. 2016 Mar; 42 (2): 282-90

22) Maldonado JR, Am J Geriatr Psychiatry 21 (12), 1190-222, 2013

23) Nishimura A, The Journal of Medical Investigation 57, 183-190

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：

番号：
 出願年月日：
 国内外の別：
 取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等 該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西村 明儒(NISHIMURA, Akiyoshi)
 徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
 研究者番号：60283561

(2)研究分担者

石上 安希子(ISHIGAMI, Akiko)
 徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
 研究者番号：60359916

(3)連携研究者

()

研究者番号：