

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06752

研究課題名(和文) 多系統萎縮症：乏突起膠細胞の鉄代謝異常と酸化ストレス亢進の病的意義の解明

研究課題名(英文) Multiple system atrophy: the pathogenic role of oligodendroglial iron overload and oxidative stress

研究代表者

清水 宏 (HIROSHI, SHIMIZU)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：40608767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：多系統萎縮症(MSA)において乏突起膠細胞における鉄過剰と酸化ストレス亢進の病的意義を明らかにすることを目的に、MSA剖検脳組織を用い、鉄代謝関連蛋白質、各種酸化的修飾産物の免疫組織化学を行った。MSA被殻では発症早期から鉄含有乏突起膠細胞が認められ、その増加とともに striatal-pallidal fiberの髄鞘染色性が低下した。また乏突起膠細胞はMalondialdehydeおよび4-hydroxy-2-nonenalに陽性を示した。以上よりMSAでは鉄過剰に由来する酸化ストレス亢進が乏突起膠細胞の髄鞘形成障害に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to assess whether oligodendroglial iron overload and augmentation of oxidative stress play a role in the pathogenesis of multiple system atrophy (MSA). We performed histological and immunohistological analysis using autopsied specimens obtained from 11 cases of MSA with varying disease severity and 4 control subjects. In the putamen of the patients with MSA, iron- and ferritin-positive oligodendroglia were observed. The number of these iron-positive oligodendroglia appeared to be inversely correlated with the intensity of myelin staining of the striatal-pallidal fibers. The affected oligodendroglia in the striatum were also positive for some of the oxidative stress markers, including the malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). These results suggest that in MSA, iron overload and resultant augmentation of oxidative stress in the oligodendroglia may be associated with the altered myelination of the striatal-pallidal fibers.

研究分野：神経病理学

キーワード：多系統萎縮症 鉄 酸化ストレス 乏突起膠細胞

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスとは、生体内に生じた活性酸素種・活性窒素種、およびそれらによって派生する酸化修飾産物が生命現象に与える影響のことであり、その異常な亢進により炎症反応や細胞死などが生じる。酸化ストレスの亢進は様々な神経変性疾患の病的機序として想定され、その制御は治療法として有望視されている。例えばパーキンソン病では、活性酸素の発生源である鉄とドパミンを多く含む黒質では酸化ストレスが亢進しやすく、リン酸化アルファシヌクレインの凝集が促進されると考えられている<sup>1)</sup>。実際、パーキンソン病患者の黒質では、酸化ストレスマーカーとされる過酸化脂質・蛋白質・核酸・アルデヒドが豊富に認められる。また、アルファシヌクレインを強制発現させたパーキンソン病の細胞モデルでは、培地への鉄の添加により酸化ストレス亢進とリン酸化アルファシヌクレインのオリゴマー化が観察されている<sup>2)</sup>。

多系統萎縮症 (Multiple system atrophy: MSA) は小脳失調、パーキンソニズム、自律神経障害を主症状とし、神経病理学的には乏突起膠細胞胞体内および神経細胞核内・胞体内におけるリン酸化アルファシヌクレインの蓄積を特徴とする。パーキンソン病同様、MSA においても酸化ストレスの病態への関与が指摘されている<sup>3)</sup>。実際、MSA 患者脳で蓄積するリン酸化アルファシヌクレインは、活性酸素種・活性窒素種により酸化・ニトロ化を受けている。また MSA 動物モデルでも、酸化ストレスによるリン酸化アルファシヌクレインの凝集促進が観察されている<sup>4)</sup>。

我々は MSA の酸化ストレス亢進の一因として、鉄に注目した。生体内では鉄は主として三価鉄および二価鉄として存在し、後者はフェントン反応によりヒドロキシラジカルを生じるため、強力な活性酸素の発生源となる。MSA には乏突起膠細胞へのリン酸化アルファシヌクレイン沈着、ミエリン形成不全や細胞死が密接に関わる。乏突起膠細胞においては、適切な鉄代謝がミエリン形成に不可欠とされ、またミクログリアと並び元来鉄含有量の多い細胞種であることから、酸化ストレスに晒されやすい環境下にある。さらに、MSA の早期診断マーカーとして、MRI T2 強調画像では被殻外側に低信号域が出現することが知られ、組織学的には被殻に鉄が沈着している<sup>5)</sup>。とくに偶発的 MSA 剖検例の観察によれば、被殻にリン酸化アルファシヌクレイン陽性の乏突起膠細胞胞体内封入体 (Glial cytoplasmic inclusions: GCIs) が少数出現している段階で、すでに鉄が沈着している<sup>6)</sup>。これらの知見は、MSA では発症早期より活性酸素源としての鉄の代謝に異常がある可能性を示唆している

## 2. 研究の目的

MSA では病初期から鉄過剰に伴う酸化ス

レス亢進が生じ、特に被殻では乏突起膠細胞のミエリン形成が障害される可能性を想定し、これを MSA 剖検例で検証することを目的とする。MSA のほか、大脳基底核に鉄沈着を伴う疾患として無セルロプラスミン血症、static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood ( SENDA ) の各 1 例でも鉄沈着による酸化ストレス亢進有無を明らかにする。

## 3. 研究の方法

MSA はオリブ・小脳・橋が主体に障害される病型 ( OPC 萎縮型、MSA-OPCA ) と、被殻・黒質が主体に障害される病型 ( Striato-nigral 変性型、MSA-SND ) があり、本研究では、MSA-SND 5 名 ( 年齢 57-68 歳、罹病期間 1-7 年 ) および MSA-OPCA 4 名 ( 64-71 歳、罹病期間 2-7 年 )、MSA 長期例 2 例 ( Shy-Drager 型で経過 13 年の 84 歳例、SND と OPCA が同等に障害された経過 12 年の 68 歳例 )、正常対照 4 名 ( 51 -88 歳 ) を対象とした。

後方被殻を含むホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、Berlin blue 染色および以下の抗体を用いた免疫染色を行った： フェリチン、過酸化アルデヒド Malondialdehyde ( MDA )、過酸化脂質 4-hydroxy-2-nonenal ( 4-HNE )、過酸化核酸 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ( 8-OHdG )。さらに MSA および正常対照 2 例で、被殻の OCT 包埋急速凍結切片における上記抗体を用いた免疫染色を行った。

MSA に加えて、基底核に鉄沈着を伴う疾患として、無セルロプラスミン血症、SENDA の各 1 例について、MSA と同様の検討を行った。

## 4. 研究成果

### ・MSA

#### 鉄染色・フェリチン免疫染色

MSA 剖検例では、SND か OPCA かのサブタイプによらず、リン酸化アルファシヌクレイン陽性の GCI を含有すると考えられる腫大した乏突起膠細胞の胞体が Berlin blue で陽性に染色され、特に罹病期間の短い初期例では striatal-pallidal fiber に沿って認められた。罹病期間が長くなるにつれ被殻全体に鉄染色陽性の乏突起膠細胞が豊富に認められるようになり、同時に striatal-pallidal fiber のミエリン染色性が低下し、ミエリン合成障害が進行する様子が観察された。フェリチン免疫染色では、Berlin blue 染色とほぼ同等の結果を得た。

#### 酸化ストレスマーカー免疫染色

MDA 免疫染色では、MSA 群では乏突起膠細胞の胞体が陽性に染色され、その数はおおむね罹病期間とともに増加した。ただし染色性が不安定な点が問題であった。全体としてバックグラウンドが強く正常対照でも神経細胞やグリアの胞体が陽性になる例もあり、また

MSA でも死戦期の血圧低下などの影響で陽性像が得られないなどの問題点があった。4-NHE 免疫染色では、MDA 免疫染色同様に MSA 群では乏突起膠細胞の胞体が陽性に染色された。しかしながら 4-NHE 免疫染色では病気の進行とともに背景に出現するミクログリア・マクロファージも陽性となり、必ずしも乏突起膠細胞の染色動態のみを追跡できないことが問題であった。ホルマリン固定パラフィン包埋切片での検討に加え、被殻の OCT 包埋急速凍結切片でも染色を試みたが、MDA、4-NHE ともに、上記の染色強度の不安定性やバックグラウンドなどの問題を克服することが困難であった。8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 免疫染色では、核酸の過酸化を予想したが、ホルマリン固定パラフィン包埋切片、OCT 包埋急速凍結切片標本とも、MSA、正常対照の両群で陽性像は得られなかった。

#### ・ SENDA、無セルロプラスミン血症

SEDA では、淡蒼球において神経細胞やアストロサイトの胞体が鉄染色およびフェリチン免疫染色で陽性となった。また神経細胞の胞体が MDA で、奇怪な形態のアストロサイト胞体が 4-NHE でそれぞれ陽性となった。無セルロプラスミン血症でも、被殻に出現した奇怪な形態のアストロサイトの胞体が 4-NHE で陽性となり、これらの疾患でも鉄過剰に伴い酸化ストレスが亢進している可能性が示唆された。

酸化ストレスマーカーによる免疫染色、特に MDA と 4-NHE では MSA における乏突起膠細胞の胞体が陽性に染色され、同時に striatal-pallidal fiber の染色性が低下してゆくことから、酸化ストレス障害による髄鞘形成障害が MSA の一因である可能性が示唆された。無セルロプラスミン血症や SENDA においても鉄過剰により酸化ストレスが亢進し、組織の破壊が進むことが示唆された。しかしながら染色の安定性や特異度の面で問題があり、上記の可能性をさらに証明するためには、免疫染色のみならず生化学的な検討が不可欠である。

#### 引用文献

- 1) Hauser DN et al. Neurobiol Dis 51:35-42, 2013
- 2) Ostrerova-Golts N et al. J Neurosci 20:6048-54, 2000
- 3) Jellinger KA. Mov Disord 29:1720-1741, 2014
- 4) Stefanova N et al. Am J Pathol 166:869-76, 2005
- 5) Matsusue E et al. Neuroradiology 50:559-567, 2008
- 6) Fujishiro H et al. Acta Neuropathol 116:269-275, 2008

#### 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 2 件)

(1) Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors associated with epileptogenesis of hypothalamic hamartoma.  
Kitaura H, Sonoda M, Teramoto S, Shirozu H, Shimizu H, Kimura T, Masuda H, Ito Y, Takahashi H, Kwak S, Kameyama S, Kakita A. Epilepsia. 査読あり 2017 Apr;58(4):e59-e63. doi: 10.1111/epi.13700.

(2) Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy.

Miyake N, Fukai R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Kramer U, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Mitsushashi S, Nishino I, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saito H, Matsumoto N. Am J Hum Genet. 査読あり 2016 Oct 6;99(4):950-961. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.08.005.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 中原亜紗、清水宏、山田光則、一萬田正二郎、米持洋介、中島孝、吉田敏一、矢澤正信、後藤敏、吉田邦弘、小野寺理、菅野祐幸、高橋均、柿田明美。  
Oculopharyngeal muscular dystrophy: 2 剖検例の臨床病理像。  
2017 年 6 月 3 日、東京都

(2) 伊藤絢子、清水宏、大田健太郎、中島孝、高橋均、柿田明美。  
淡蒼球・黒質・ルイ体変性を伴う ALS-TDP の臨床病理学的検討。  
第 58 回日本神経病理学会総合学術研究会、  
2017 年 6 月 2 日、東京都

(3) 清水宏、村松一洋、森下英晃、清家尚彦、田中英智、豊島靖子、清水信三、澤村守夫、岩科雅範、深浦法子、水島昇、高橋均、柿田明美。  
Static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood の一剖検例。  
第 57 回日本神経病理学会総合学術研究会、  
2016 年 6 月 2 日、弘前市

(4) 清家尚彦、清水宏、豊島靖子、田中弘、大竹弘哲、下畑享良、池内健、高橋均、柿田明美。  
EIF2B5 遺伝子変異を伴う

Leukoencephalopathy with vanishing white matter (VWM): 成人発症例におけるグリアの多彩な形態異常。  
第 57 回日本神経病理学会総合学術研究会、  
2016 年 6 月 2 日、弘前市

( 5 ) 伊藤絢子、清水宏、北浦弘樹、田中英智、若林孝一、高橋均、柿田明美。  
パーキンソン病におけるグリア細胞の関与：凝集 シヌクレイン抗体を用いた免疫組織化学的検討。  
第 57 回日本神経病理学会総合学術研究会、  
2016 年 6 月 2 日、弘前市

( 6 ) 竹内亮子、清水宏、他田真理、豊島靖子、小野寺理、西澤正豊、高橋均、柿田明美。  
Appearance of unique tau-positive astrocytes in the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis.  
第 57 回日本神経病理学会総合学術研究会、  
2016 年 6 月 2 日、弘前市

( 7 ) 清水宏、田中英智、松崎紗矢香、黒羽泰子、金澤雅人、小池亮子、堀川揚、小柳清光、小野寺理、西澤正豊、柿田明美、高橋均。  
TDP-43 陽性封入体の出現を認めた家族性 ALS の姉妹剖検例。  
第 56 回日本神経病理学会総合学術研究会  
2015 年 6 月 5 日、福岡市

( 8 ) 北浦弘樹、白水洋史、清水宏、増田浩、高橋均、亀山茂樹、柿田明美。  
Epileptogenesis in mesial temporal lobe epilepsy: physiological and histological features.  
第 56 回日本神経病理学会総合学術研究会  
2015 年 6 月 5 日、福岡市

〔図書〕(計 1 件)

清水 宏、柿田明美。

脊髄小脳変性症の神経病理。運動失調のみかた、考えかた -小脳と脊髄小脳変性症-。宇川義一(編集)。査読なし、中外医学社。p. 300-307。総 358 ページ。2017 年 9 月 25 日。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 宏 (SHIMIZU, Hiroshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：4 0 6 0 8 7 6 7

(2) 研究分担者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA, Yasuko)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：2 0 3 3 4 6 7 5

高橋 均 (TAKAHASHI, Hitoshi)  
新潟大学・脳研究所・非常勤講師  
研究者番号：9 0 2 0 6 8 3 9