

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591286

研究課題名(和文)免疫組織化学的研究からみた下オリーブ核仮性肥大の病態解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis of pseudohypertrophy of the inferior olivary nucleus based on the immunohistochemical study

研究代表者

小川 克彦 (Katsuhiko, Ogawa)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：9034994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：下オリーブ核仮性肥大の免疫組織化学的研究を行った。alphaB-crystallin (alphaBC) が陽性である神経細胞が仮性肥大側ではしばしばみられ、microtubule-associated protein 2 に陽性であった。alphaBC と SMI-31 の両者に陽性の細胞もみられた。alphaBC は仮性肥大における神経細胞の微小管やニューロフィラメントを保護する作用がある。KB 染色では辺縁が染色される細胞がみられ、これは粗面小胞体が辺縁に偏在していることを示していた。同様に辺縁が染色される KDEL 陽性の細胞もみられ、KDEL 受容体が粗面小胞体に移行していることを示していた。

研究成果の概要(英文)：Objective was to analyze the immunohistochemical changes of pseudohypertrophy of the inferior olivary nucleus (PH-10). alphaB-crystallin (alphaBC) was frequently expressed in the neurons and co-localized with microtubule-associated protein 2 (MAP2). alphaBC and SMI-31 were co-localized in some neurons. Periphery-stained KDEL-positive neurons were shown. Central chromatolytic neurons were found with KB staining, which indicated that the rough endoplasmic reticulum (ER) was distributed to the periphery of the cytoplasm. alphaBC prevents microtubule disassembly and phosphorylation of the neurofilaments under stressful conditions. Our results indicated that alphaBC protected microtubules and neurofilaments in PH-10. The retrograde transport of KDEL receptors from the Golgi complex to the ER is increased under stressful conditions. We considered that KDEL receptors were retro-transported to ER, and then the ER containing KDEL receptors was distributed to the periphery of the cytoplasm.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理

キーワード：仮性肥大 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

(1) 下オリブ核仮性肥大は、肉眼的にも容積の増大として認められ、病理組織学的には神経細胞の肥大と空泡形成・突起の肥大と発達・神経細胞核の duplication・著明なグリオーシスがみられる。突起の肥大は特徴的で、時に突起どうしが絡みあい「糸球体様構造」を呈することがある。

(2) 多くの経シナプスの神経変性 (transsynaptic neuronal degeneration) は、神経細胞への求心性入力神経線維の障害によって生じ、その結果、障害された神経細胞は萎縮し神経細胞周囲のグリオーシスを伴う。下オリブ核仮性肥大の機序として、下オリブ核への求心性神経線維の障害による経シナプスの変性機序が考えられている。しかし、下オリブ核仮性肥大を対象とした免疫組織化学的研究は少なく、その病態機序に関する報告は乏しい。

2. 研究の目的

(1) われわれは種々の神経疾患の下オリブ核を対象に熱ショックタンパク質 (heat shock protein : HSP) の 1 つである α B-crystallin (α BC) の発現に関する研究を以前に行い、下オリブ核仮性肥大の神経細胞において α BC が発現していることをはじめて報告した¹⁾。更に、仮性肥大側における「phosphorylated neurofilament-H (pNF-H) (SMI-31) 陽性神経細胞」、「microtubule-associated protein 2 (MAP2) 陽性の肥大した突起」、「大径 synaptophysin (SYP) 陽性顆粒」の存在を報告した²⁾。仮性肥大側では「辺縁が染色される Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) 受容体陽性神経細胞」と「KDEL 受容体陽性の肥大した突起」がみられるのに対し、非肥大側の神経細胞では細胞質が顆粒状に染色されていた²⁾。「大径 SYP 陽性顆粒」は「シナプス終末の分布変化」を示していた。以上の結果から、 α BC は神経細胞に対し保護的に作用していると推測し、下オリブ核仮性肥大の神経細胞における「異常なリン酸化ニューロフィラメント」の出現と「KDEL 受容体の分布変化」を確認した²⁾。また、突起の肥大を免疫組織化学的に示した。

(2) しかし、下オリブ核仮性肥大での α BC の作用機序、「MAP2 陽性の肥大した突起」と「シナプス終末の分布変化」との関係、「異常なリン酸化ニューロフィラメント」と「KDEL 受容体の分布の変化」の意義については未だ解明されていない。本研究では、下オリブ核仮性肥大の病態機序を共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織化学的研究に基づいてこれらの問題を解明した。

3. 研究の方法

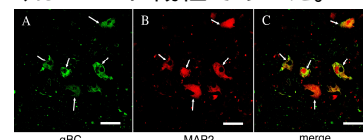
前回の研究では 8 例を対象としていたが

²⁾、更に両側肥大例が 1 例追加し、合計 9 例を対象とした。従って、仮性肥大は 9 例 12 側に観察された。この 9 例の延髄を対象に Klüver-Barrera (KB) 染色を行った。また、通常の ABC 染色により抗 caspase-3 抗体 (polyclonal antibody, GeneTex, CA, USA, 1 : 100) を用いて追加例の延髄を染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織化学的研究を行い、下オリブ核仮性肥大の病態機序について考察した。免疫染色を以下の組み合わせで行った。仮性肥大した延髄より厚さ 6 μ m の切片を作成して、その切片を (1) 抗 SYP 抗体 (polyclonal antibody, DAKO, Glostrup, Denmark, 1 : 10) / 抗 MAP2 抗体 (monoclonal antibody, Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA, 1 : 80)、(2) 抗 α BC 抗体 (polyclonal antibody, Stressgen, British Columbia, Canada, 1 : 100) / 抗 MAP2 抗体、(3) 抗 α BC 抗体 / SMI-31 (Sternberger-Meyer, Inc., Baltimore, MD, USA, 1 : 5000)、(4) 抗 SYP 抗体 / SMI-31、(5) DAPI (Merck Millipore, 1 : 1000) / 抗 Calbindin D28k 抗体 (polyclonal antibody, Thermo, Medria Rd Rockford, USA, 1 : 40) / 抗 MAP2 抗体、(6) 抗 KDEL 受容体抗体 (monoclonal antibody, Stressgen, British Columbia, Canada, 1 : 500) / 抗 SYP 抗体 (polyclonal antibody, AnaSpec, Tremont, CA, Canada, 1 : 30)、の組み合わせで二重染色を行い、蛍光色素 (alexa を使用) で発色して共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview Model confocal laser microscopy : Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。(1) から (5) の組み合わせの染色の発色では、SMI-31 と MAP2 は alexa 546、 α BC・SYP・Calbindin D28k は alexa 488 を用いた。(6) の染色では KDEL 受容体は alexa 488 を用い、SYP は alexa 546 を使用した。それぞれの染色の単染色画像、更に merge 画像を解析した。

4. 研究成果

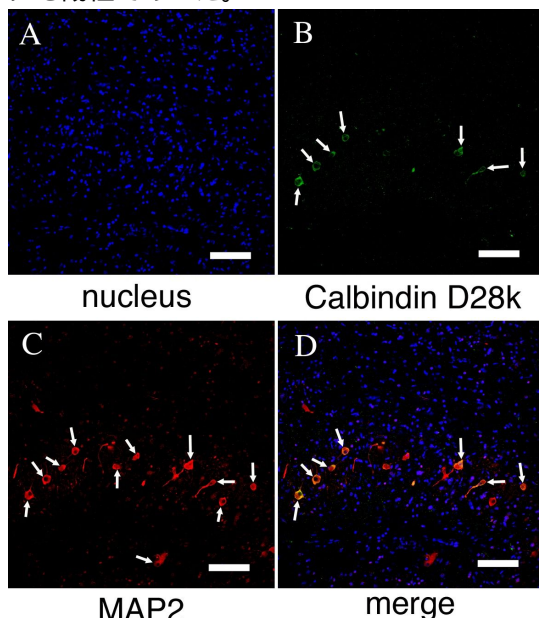
(1) KB 染色では、11 側の仮性肥大側で細胞の辺縁が染色されるが「中心部が染色されない神経細胞 (central achromatic neuron)」が観察された。新規例に対して施行した caspase-3 染色では caspase-3 陽性の神経細胞はみられなかった。

(2) 抗 α BC 抗体 / 抗 MAP2 抗体の二重染色では (図 1)、 α BC 陽性の神経細胞が高頻度に仮性肥大側で観察されていた。MAP2 染色では「MAP2 陽性の肥大した神経細胞」が仮性肥大側に多くみられ、「MAP2 陽性の肥大した突起」を伴っていた。MAP2 陽性神経細胞の多くは α BC に陽性であった。



(図 1)

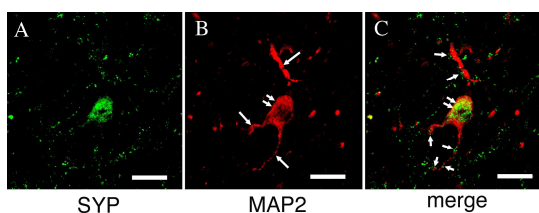
DAPI / 抗 Calbindin D28k 抗体 / 抗 MAP2 抗体の二重染色では (図 2)、Calbindin D28k 陰性の神経細胞がみられ、Calbindin D28k 陽性の神経細胞は MAP2 にも陽性であった。



(図 2)

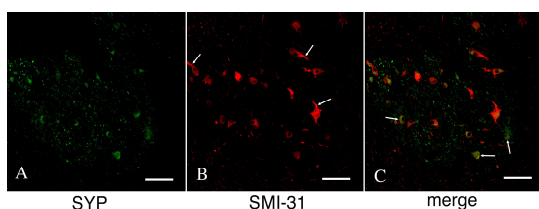
抗 α BC 抗体 / SMI-31 の二重染色では、仮性肥大側で α BC 陽性の神経細胞が多くみられ、SMI-31 陽性の神経細胞が散在していた。両者に陽性の神経細胞もしばしば観察された。

抗 SYP 抗体 / 抗 MAP2 抗体の二重染色では (図 3)、仮性肥大側で「MAP2 陽性の肥大した神経細胞」や「MAP2 陽性の肥大した突起」が観察され、「SYP 陽性の顆粒」が散在していた。この「SYP 陽性の顆粒」は「MAP2 陽性の肥大した突起」や「MAP2 陽性の肥大した神経細胞」の表面によく出現していた。



(図 3)

抗 SYP 抗体 / SMI-31 の二重染色では (図 4)、仮性肥大側で SMI-31 陽性の神経細胞が散在しており、「起始部が肥大した突起」も観察された。細胞体の一部が SYP 陽性であった神経細胞も観察された。



(図 4)

抗 KDEL 受容体抗体 / 抗 SYP 抗体の二重染色では、「KDEL 受容体陽性の辺縁が染色される神経細胞」と「KDEL 受容体陽性の肥大した突起」が観察され、この「KDEL 受容体陽性の辺縁が染色される神経細胞」と「KDEL 受容体陽性の肥大した突起」の表面に「SYP 陽性の顆粒」が散在して出現していた。正常側の神経細胞は KDEL 受容体染色では細胞体が顆粒状に染色されていた。

(3) KB 染色では「細胞の辺縁が染色される神経細胞」が仮性肥大側に多くみられた。正常側の神経細胞はその細胞体が顆粒状に染色されていた。KB 染色では粗面小胞体が染色されるので、この結果は仮性肥大側の神経細胞では粗面小胞体が細胞の辺縁に移行していることを示していた。

α BC や heat shock protein-27 (HSP27) は低分子型の熱ショックタンパク質 (small heat shock protein : sHSP) に属する。sHSP はアクチンフィラメント・中間径フィラメント・微小管といった細胞骨格を安定化させる作用を有する。ストレス下では、 α BC はチューブリンに対して親和性を呈し、微小管の分解を抑制している。微小管は微小管関連蛋白質 (microtubule-associated proteins : MAPs) と種々の運動性蛋白質との間に作用する。MAP2 は MAPs の一つでチューブリンの合成や微小管の保護を行っている。電子顕微鏡を用いた研究により高濃度 Ca 下にあるストレス下の細胞で α BC が「微小管に接着した MAPs」の表面に付着していたことが報告されている。今回の結果でも α BC と MAP2 の両者に陽性の神経細胞が観察されたことから、仮性肥大した神経細胞においても α BC が MAP2 を介して微小管を保護している可能性が示唆された。

Calbindin D28k はカルシウム結合タンパクの一つで、MAP2 と並ぶ神経細胞のマーカーでもある。Calbindin D28k は細胞内のカルシウム濃度を調整して、細胞に対して保護的に作用する。細胞におけるカルシウム濃度の上昇は、caspase-3 などのアポトーシスに関連する酵素を活性化させて細胞死を惹起する。今回、仮性肥大側で Calbindin D28k 陰性の神経細胞が観察されたことから、仮性肥大側の神経細胞ではカルシウム濃度上昇により caspase-3 が活性化されていると推測した。caspase-3 は今回染色した 1 例では陰性であったが、今後は症例数を増やして染色する必要がある。

中間系フィラメントは細胞の骨格維持のために重要な作用を担う。ニューロフィラメントは中間系フィラメントの一つで神経細胞に存在し、その分子量により分類される。neurofilament-H は高分子量型のニューロフィラメントである。ニューロフィラメントのリン酸化は細胞骨格の再構築や軸索の成長に関わっている。「リン酸化した neurofilament-H (pNF-H)」は SMI-31 に反応

し、正常では軸索には出現するが細胞体には出現しない。神経細胞体における異常な「リン酸化したニューロフィラメント」の蓄積は、これまでにアルツハイマー型認知症の neurofibrillary tangle・筋萎縮性側索硬化症の脊髄前核細胞・クロイツフェルトヤコブ病や皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration) の神経細胞などにおいて報告されている。今回の結果から、異常な「リン酸化したニューロフィラメント」が仮性肥大側の神経細胞内で生じていることが示された。αBC はニューロフィラメントのリン酸化を抑制して細胞骨格を保護する作用も有している。これまでもアルツハイマー型老年認知症の神経細胞において αBC や HSP27 がニューロフィラメントのリン酸化を抑制しているという報告がなされている。今回の研究で αBC と SMI-31 の両者に陽性の神経細胞が観察されたことから、仮性肥大側の神経細胞で αBC がニューロフィラメントのリン酸化を抑制して細胞を保護している可能性が示唆された。

仮性肥大側では、「シナプス終末の分布変化」が生じていることが報告されている。SYP はシナプス終末のマーカーで、MAP2 は神経細胞体と樹状突起に存在するが、軸索には存在しない。以前、「MAP2 陽性の肥大した突起」の周辺に「SYP 陽性の顆粒」が出現していることを報告した²⁾。今回の結果から、「シナプス終末の分布変化」と「MAP2 陽性の肥大した神経細胞」や「MAP2 陽性の肥大した突起」との関連性について考察すると、「SYP 陽性の顆粒」が突起の表面だけでなく肥大した細胞体の表面にも出現していたことから、「シナプス終末の分布変化」は突起表面だけでなく、細胞体表面においても生じていることが示された。また、「MAP2 陽性の肥大した突起」は樹状突起である可能性が示唆された。

KDEL 受容体は正常の状態ではゴルジ体に存在する。sHSP を含む分子シャペロンには KDEL というアミノ酸配列を有していて、分子シャペロンはこの KDEL 受容体によって認識される。sHSP を含む分子シャペロンは順輸送によって小胞体からゴルジ体に輸送されて KDEL 受容体によって認識され受容体共々ゴルジ体に再び輸送される。一方で、ストレス下では、KDEL 受容体の過剰産生が起き、KDEL 受容体がゴルジ体から小胞体に分布変化する。今回の結果では、KDEL 受容体は仮性肥大側の神経細胞では細胞の辺縁に分布していた。この結果は KB 染色にみられた小胞体の分布変化と同じであり、仮性肥大側の神経細胞では、KDEL 受容体がゴルジ体から小胞体に分布している可能性が考えられた。また、KDEL 受容体染色では、「KDEL 受容体陽性の肥大した突起」の周辺に「SYP 陽性の顆粒」が出現していた。この結果は MAP2 と SYP の二重染色の所見に酷似しており、「KDEL 受容体陽性の肥大

した突起」は樹状突起であると推測された。

(4) 今回の研究から、αBC が仮性肥大側の神経細胞において細胞骨格である微小管やニューロフィラメントに対して保護的に作用していることが考えられた。また、Calbindin D28k の染色性が仮性肥大側の神経細胞で低下していることが示された。このことから仮性肥大側の神経細胞においてカルシウム濃度の上昇による細胞毒性が生じていると推測され、細胞変性にアポトーシスが関連している可能性が示された。仮性肥大側の神経細胞では KDEL 受容体がゴルジ体から小胞体に分布変化して、KDEL 受容体を含んだ小胞体が細胞辺縁に移行していることが示された。しかし、KDEL 受容体分布変化を含め、下オリブ核仮性肥大の変性機序については未だ不明なところが多く、今後症例数を増やして研究していく必要がある。

文献

1) Ogawa K, Uehara K, Minami M, Suzuki Y, Mizutani T. Neuronal expression of αB crystallin (αBC) in the pseudohypertrophy of the inferior olives. Proceedings of the 81st Annual Meeting of the AANP, Inc. J Neuropathol Exp Neurol 2005; 64: 464 (abstract).

2) Ogawa K, Mizutani T, Uehara K, Minami M, Suzuki Y, Uchihara T. Pathological study of pseudohypertrophy of the inferior olivary nucleus. Neuropathology 2010; 30: 15-23.

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 1 件)

(1) Ogawa Katsuhiko, Kamei Satoshi, Ichihara Kazuaki, Uehara Kenji, Suzuki Yoshio, Uchihara Toshiki, Yoshihashi Hirokazu, Ja-Mun Chong : Immunohistochemical study of pseudohypertrophy of the inferior olivary nucleus. Clinical Neuropathology 33(1):68-75, 2014. (査読：有)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Ogawa Katsuhiko, Uehara Kenji, Minami Masayuki, Kamei Satoshi, Suzuki Yoshio, Uchihara Toshiki : Pathological study of pseudohypertrophy of the inferior olivary nucleus. 13th Asian Oceanian Congress of Neurology, Melbourne, 2012, 6. 5

(2) 小川克彦, 水谷智彦, 上原健司, 南正之, 亀井 聡, 内原俊記, 鈴木良夫, 鄭子文, 吉橋廣一: 下オリブ核仮性肥大における免疫組織化学的研究. 第 52 回日本神経病理学会学術研究会, 京都, 2011. 6. 3

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小川 克彦 (KATSUHIKO, Ogawa)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：90349994

(2)研究分担者

亀井 聡 (SATOSI, Kamei)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：40142509

市原 和明 (KAZUAKI, Ichihara)
日本大学・医学部・その他
研究者番号：50450581

(3)連携研究者

内原 俊記 (TOSHIKI, Uchihara)
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳病
理形態研究室・副参事研究員
研究者番号：10223570