

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790348

研究課題名(和文)皮膚生検によるレヴィ小体病の新たな診断法の確立

研究課題名(英文)Development of the diagnostic method for Lewy body disease. Accumulation of protease-resistant alpha-synuclein in the skin.

研究代表者

池村 雅子(Ikemura, Masako)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80524553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：レヴィ小体病は中枢・末梢神経系を侵す全身病である。皮膚にもリン酸化 シヌクレイン(psyn)の沈着がみられレヴィ小体病の診断法になりえるが、診断法として実用化するにはより高感度に病変を可視化する必要がある。そこで抗非リン酸化 シヌクレイン抗体(LB509)を用いて、蛋白分解処理耐性の シヌクレインの皮膚への沈着を検索した。中枢神経系レヴィ小体病スコア 以上の症例多数例で検討した結果、いずれのステージにおいても、psynを用いた検討よりも高い陽性率を得られた。特に発症前レヴィ小体病における陽性率は2倍となり、抗 シヌクレイン抗体を用いた皮膚生検は、レヴィ小体病の診断法として実用可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：Lewy bodies (LBs) containing alpha-synuclein are the hallmark lesions of Lewy body disease, including Parkinson disease (PD), PD with dementia, dementia with LBs and pure autonomic failure. Since protease treatment is known to enhance the immunoreactivity of abnormal alpha-synuclein, we immunohistochemically examined the abdominal skin tissue in LBD using anti-alpha-synuclein antibody with protease treatment. Protease-resistant alpha-synuclein is deposited in nerve fascicles mainly around blood vessels in LBD, but not in control subjects. The sensitivity of the positive skin immunoreactivity was 57.7% in subclinical PD, 88.2% in PD and PD with dementia and 53.8% in dementia with LBs. The sensitivity is higher than that using anti-phosphorylated alpha-synuclein antibody. Skin biopsy with anti-alpha-synuclein antibody may have diagnostic application in cases of LBD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：パーキンソン病 レヴィ小体病 皮膚生検 -シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

病理学的にレビー小体の出現を認める疾患群はレビー小体病 (Lewy body disease; LBD) と総称され、パーキンソン病 (Parkinson disease; PD)、レビー小体型認知症 (dementia with LBs; DLB)、レビー小体を伴う純粋自律神経不全症が含まれる。レビー小体病は、中枢神経系のみならず、末梢神経をも侵す全身疾患であり、運動障害、認知機能障害に加え自律神経症状が主な臨床症状としてあげられる。この自律神経症状は直接生命予後にも影響するため、レビー小体病は神経変性疾患の中でも全身内科的管理が重要となる疾患の一つである。これまで、レビー小体病に関する神経病理学的興味は、脳に集中する傾向にあったが、最近本邦で心筋シンチグラフィがレビー小体病の診断に汎用されるようになった事、レビー小体の主成分がリン酸化シヌクレイン (psyn) である事が判明し免疫組織化学的手法により容易にレビー小体関連病変が検索可能になった事から、末梢神経系における病理にも注目が集まるようになった。これまで我々は、連続開頭剖検例を対象として中枢神経系及び副腎・皮膚などの末梢神経系を、抗 psyn 抗体を用いて検索し、末梢神経系におけるレビー小体病理の解析に取り組んできた。結果、レビー小体病では高頻度に末梢神経系にも病変が及んでいる事や、皮膚に分布する神経線維にも特異的に抗 psyn 抗体陽性像が出現する事を初めて明らかにした。これは、神経変性疾患であるレビー小体病を、皮膚生検を用いて生前に確定診断し得る事を示している。しかしながら、皮膚の抗 psyn 抗体陽性所見の出現率は、明らかなパーキンソン病でも 71.4% と、検査法として確立するには感度の点で課題が残った。また皮膚に出現する抗 psyn 抗体陽性像は、非常に小さく判定が困難である事も多かった。そこで、より高感度に psyn を検出可能な、レビー小体病の診断法の確立を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、神経変性疾患であるレビー小体病の新たな診断法として、皮膚生検を確立する事を目的とする。これまで、レビー小体の主成分である抗 psyn 抗体を用いた免疫組織化学的検索により、レビー小体病では皮膚にも病変が広がっている事を明らかにしてきたが、診断法として実用化するには、より高感度に病変を可視化する必要がある。本研究ではリン酸化蛋白検出法である in situ proximity ligation assay 法を皮膚検体に応用することや、抗非リン酸化シヌクレイン抗体を用いた検討により高感度・明瞭に皮膚のレビー小体病理を検出する方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) 高感度のレビー小体病を検出する染色法

の選定

パーキンソン病の中脳及び皮膚標本を、抗シヌクレイン抗体 (LB509; Funakoshi, Tokyo, Japan)、抗リン酸化シヌクレイン抗体 (pSyn#64; Wako, Japan) を用いて検討した。抗シヌクレイン抗体に関しては、前処理としてプロテアーゼ処理を行った。免疫組織化学は Ventana 自動免疫染色装置を用いて行った。また抗シヌクレイン抗体あるいは抗リン酸化シヌクレイン抗体のどちらか 1 抗体を用いた in situ proximity ligation assay (PLA) single recognition 法を用いたレビー小体病検出の検討も行った。

2) 多数例のレビー小体病皮膚検体を用いた陽性率の検討 (抗非リン酸化シヌクレイン抗体を用いた免疫組織化学的検討)

方法 1) の結果、抗非リン酸化シヌクレイン抗体を用いる事により、従来の抗リン酸化シヌクレイン抗体による検索よりも、より高感度に皮膚レビー小体病理が検出できる可能性が示唆された。

対象症例

東京都健康長寿医療センターで 1995 年 1 月から 2006 年 3 月までに行われた連続開頭剖検例 1594 例中、高齢者ブレインバンクの中枢神経系レビー小体ステージが Ⅰ以上である症例 138 例及びステージ 0 の 10 例、ステージ Ⅰの 10 例を対象とした。これは、抗リン酸化シヌクレイン抗体を用いた皮膚レビー小体病を検討した症例群と同様であり、その結果は論文化されている (J Neuropathol Exp Neurol 2008; 67: 945-953)。4 例のみ標本の準備が困難であり、対象外としている。高齢者ブレインバンクの中枢神経系レビー小体病ステージは臨床症状、黒質の細胞脱落の有無、DLB 国際診断基準会議に基づくレビー小体スコアを組み合わせたものであり、ステージ 0: レビー小体関連病理なし、ステージ 0.5: 抗リン酸化シヌクレイン抗体陽性となる Lewy neurites や dots を認めるが、レビー小体なし。ステージ Ⅰ: レビー小体の出現をみるが、黒質の脱色素なし (偶発性 LBD)、ステージ Ⅱ: レヴィ小体の出現と黒質の脱色素を伴うが、たんどくで症状を発現するレベルに達していないか、達していても臨床の記載がない症例 (発症前 LBD)、ステージ Ⅲ: 認知症を伴わないパーキンソン病 (PD)、ステージ Ⅳ: 認知症を伴い、病理学的にレビー小体スコア移行型の基準を満たす症例 (PDDT, DLBT)、ステージ Ⅴ: 認知症を伴い、病理学的にレヴィ小体スコアで新皮質型の基準を満たす症例 (PDDN, DLBN) である。

皮膚の病理学的検索の方法

剖検時に採取した腹部皮膚を 10% 緩衝ホルマリン固定し、パラフィン包埋後 6 μm 切片を作成し、上記 1) と同様の方法で免疫組織化学

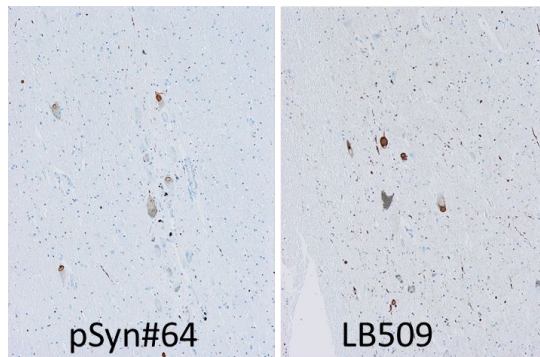
的に検索した。

3) 実際の皮膚生検材料を用いた検討
健康長寿医療センターにおいて、これまで従来の方法である抗リン酸化 シヌクレイン抗体を用いて、病理学的に検索された皮膚生検材料を対象とした。新たに抗 シヌクレイン抗体を施行し、生検当時の陽性率と比較した。検索方法は、2)と同様である。

4. 研究成果

1) 抗 シヌクレイン抗体を用いたパーキンソン病皮膚の免疫組織化学的検索
プロテアーゼ処理抗 シヌクレイン抗体を用いる事により、より頻度高く中枢神経系及び皮膚のレビー小体病理の検出が可能であった。中枢神経系では、Lewy neurites や dots が LB509 を用いた検討でより多く検出されるとともに、グリア細胞胞体内にも陽性例が多数認められた(図 1)。

図 1 中脳切片のレビー小体病理の比較 (左: pSyn#64, 右: LB509)。



また、皮膚においても、より明瞭に陽性像が認められるのみならず、同じ切片内により多くの陽性像が確認された(図 2)。免疫組織化学的に抗 シヌクレイン抗体で陽性となる像としては、血管周囲の神経束(図 3A)、神経束内に細い線状あるいは天状の陽性像(図 3B)、神経束内の太い線状(図 3C)の陽性像があげられた。

図 2 皮膚切片のレビー小体病理の比較 (左: pSyn#64, 右: LB509)

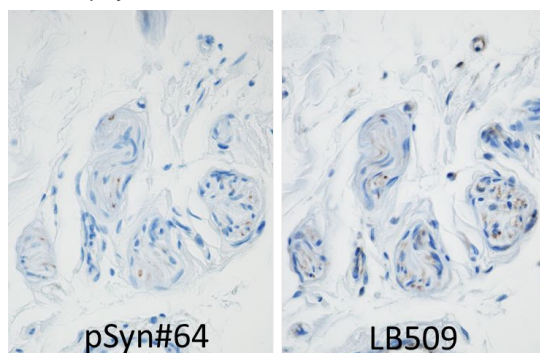
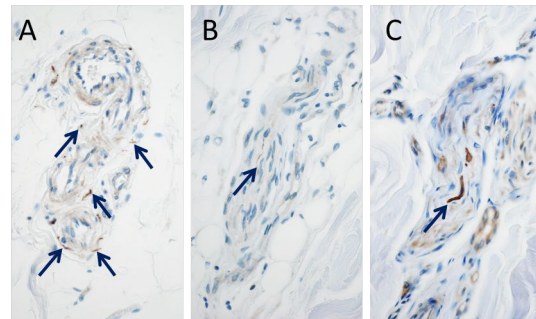


図 3 抗 シヌクレイン抗体 (LB509) によるレビー小体病理

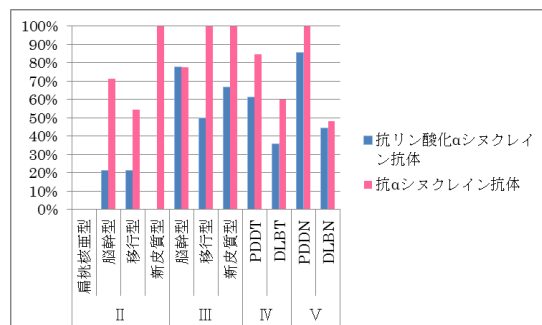


PLA 法では、中脳においてレビー小体病理を検出することは可能であったが、非常に陽性像は弱かった。

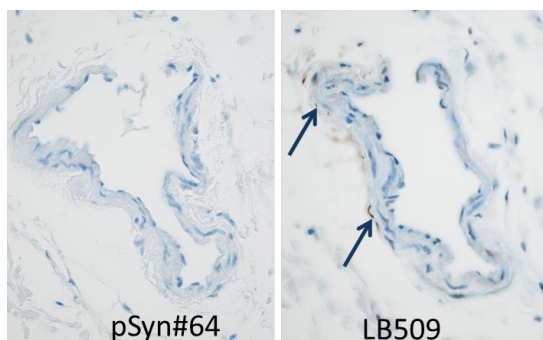
2) 抗 シヌクレイン抗体を用いた多数例の検討

抗 シヌクレイン抗体を用いた各レビー小体ステージの陽性率は、ステージ 0: 0% (0/10), ステージ 1: 20.0%(2/10), ステージ 2: 57.7%(30/52), ステージ 3: 85.7%(12/14), ステージ 4: 全体 68.4%(26/38), DLBT 60.0%(15/25), PDD 84.6%(11/13), ステージ 5: 全体 58.8%(20/34), DLBN 48.1%(13/27), PDDN 100%(7/7)となった ()内は陽性症例数/全体の症例数)。またさらに、レビー小体スコアの基準により、それぞれのステージを脳幹型(B)、移行型(T)、新皮質型(N)、扁桃核亜型(A)に分類すると、ステージ A: 0%(0/0), ステージ B: 71.4%(10/14), ステージ T: 54.5%(18/33), ステージ N: 77.8%(7/9), ステージ A: 100%(3/3), ステージ N: 100%(2/2)であった。抗リン酸化 シヌクレイン抗体を用いた検索におけるレビー小体病理の陽性率と比較すると表 1 のようになる。いずれのステージにおいても抗 シヌクレイン抗体を用いる事によって、皮膚レビー小体病理の検出率が上昇した。

表 1 抗リン酸化 シヌクレイン抗体を用いた皮膚レビー小体病理の検出率と、抗 シヌクレイン抗体を用いた皮膚レビー小体病理の検出率の比較。



抗リン酸化 シヌクレイン抗体ではレビー小体病理所見が検出されず、抗 シヌクレイン抗体において検出された一例を図 4 に示す。



3) 皮膚生検

2010 年以降、健康長寿医療センターにおいて、レビー小体病疑いで病理学的に検討された生検例 7 例を抗 シヌクレイン抗体で検索した結果、全ての症例で陽性例が確認された (表 2)。

表 2

症例	年齢・性	臨床診断	症状 (期間)	生検部位	pSyn#64	LB509
1	77M	REM 睡眠行動異常	REM 睡眠行動異常 (20 年)、起立性低血圧 (4 年)	左側腹部	陽性	陽性
2	67M	DLB	起立性低血圧	左側腹部	陽性	陽性
3	79M	PAF	起立性低血圧 (4 ヶ月)	左側腹部	陰性	陽性
4	73F	LBD	起立性低血圧 (1 年)	右上腹部	診断困難	陽性
5	71M	PAF	起立性低血圧 (2 ヶ月)	左下肢外側	陰性	陽性
6	61M	PAF	起立性低血圧 (30 年間)	両側上腕、心窩部	陽性	陽性
7	75M	PAF	起立性低血圧 (9 ヶ月)、発汗低下、便秘	左下腹部、左胸部、右鎖骨下	陽性	陽性

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 3 件)

Ikemura M, Maeda E, Hatao F, Aikou S, Seto Y, Fukayama M. Plexiform angiomyxoid myofibroblastic tumor (PAMT) of the stomach. A case report focusing on its characteristic growth pattern. *Int J Clin Exp Pathol* 7:685-689, 2014. 査読：有。

福井梨紗, 村川知弘, 此枝千尋, 井上雄太, 日野春秋, 一瀬淳二, 北野健太郎, 長山和弘, 安樂真樹, 池村雅子, 木村百合香, 中島淳. 中縦隔嚢胞を示した甲状腺乳頭癌右気管傍リンパ節転移の 1 例. *胸部外科* 66: 1109-1112, 2013. 査読：有。

Hirano K, Ikemura M, Mizuno S, Isayama H, Watanabe T, Saito T, Kawahata S, Ushino R, Hamada T, Miyabayashi K, Sasaki T, Kogure H, Yamamoto N, Sasahira N, Koike K, Fukayama M, Sugawara Y, Kokudo N. Two cases with hepatic amyloidosis suspected of having primary sclerosing cholangitis. *Hepatology Res* 43:911-916, 2013. doi: 10.1111/hepr.12034. 査読：有

Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ishikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Ikemura M, et al. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet* 91:320-329, 2012. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.07.014. 査読：有。

〔学会発表〕(計 5 件)

池村雅子, 木下修, 木村光利, 絹川弘一郎, 小野稔, 村山繁雄, 深山正久. 左室補助人工心臓 (LVAD) 装着剖検例における脳血管障害の病理学的検討. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌. 2013 年 6 月 6 日~8 日。

池村雅子, 田中麻理子, 松坂恵介, 山本和孝, 清水潤, 辻省次, 深山正久, 村山繁雄. 特徴的病理像を呈した髄膜炎の 1 剖検症例. 第 54 回日本神経病理学会総会, 東京. 2013 年 4 月 24 日~26 日。

池村雅子, 田中淳, 東浩太郎, 深山正久. 突然死の 1 剖検例. 日本病理学会秋期特別総会. 名古屋. 2012 年 11 月 22 日~23 日。

池村雅子, 篠崎綾, 今井英明, 石井一彦, 齋藤邦昭, 武笠晃丈, 齋藤延人, 柴原純二, 深山正久. 脊髄に発生した glioneuronal tumor with neuropil-like islands の一例. 日本脳腫瘍病理学会, 名古屋. 2012 年 5 月 24 日~26 日。

池村雅子, 高澤豊, 深山正久. 魅力ある CPC の工夫 院内 CPC スライド公開, CPCe ラーニングの試み. 日本病理学会総会, 東京. 2012 年 4 月 26 日~28 日。

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池村雅子 (IKEMURA, Masako)
東京大学医学部附属病院 助教
研究者番号：80524553

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：