

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	佐藤 朋江
学位	博士（医学）
学位記番号	新大院博（医）第780号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	成人発症神経核内封入体病の封入体形成における、TGF- $\beta$ シグナル関連タンパクの関与の検討
論文審査委員	主査 教授 五十嵐 博中 副査 教授 池内 健 副査 教授 小野寺 理

博士論文の要旨

【背景】神経核内封入体病 (Neuronal intranuclear inclusion disease; NIID) はエオジン好性、かつ、p62 陽性の核内封入体 (Nuclear inclusion; NI) が、中枢神経系の神経細胞やグリア細胞のみならず、末梢神経や一般臓器の細胞にも広く出現することを特徴とする神経変性疾患である。発症年齢や臨床症状が極めて多彩であることから、複数の異なる病態を有する疾患群である事が推測されている。その中で、成人発症 NIID の大多数は白質脳症 (Leukoencephalopathy; LE) を伴う認知症を呈する。近年、診断には、特徴的な MRI 所見に加えて、皮膚生検による NI の検索が有用であることが報告された。本疾患の病態機序は不明であるものの、組織学的に、NI の多くはアストロサイトに出現し、病巣においてアストロサイトの形態異常やグリオース不全が認められることから、アストロサイトの機能障害が疑われている。アストロサイトの活性化や増殖を促進する主要な増殖因子として TGF- $\beta$  が知られている。TGF- $\beta$  シグナル経路は、Smad2/3 のリン酸化と核内移行を介して伝達され、Smad ubiquitination regulatory factor-2 (Smurf2) により抑制的に調節されている。申請者はこの経路の障害がアストロサイトの機能異常を招き、本疾患の NI の形成および病態に関与していると推測した。

【方法】本研究では、LE を伴い中枢神経症候を呈した成人発症 NIID の剖検例 5 例と生検例 1 例 (With LE 群)、および、それらを有さず剖検にて偶発的に NI が認められた 3 例 (Without LE 群) の大脳組織と、LE を伴い中枢神経症候を呈し皮膚生検にて成人発症 NIID と診断された 7 例の皮膚組織を対象として、NI の形態学的特徴と TGF- $\beta$  シグナル関連蛋白の発現を検討した。これらの症例のホルマリン固定、パラフィン包埋ブロックから切片を作製し、免疫組織化学及び免疫蛍光二重染色を行った。NI は抗 p62 抗体による標識で同定し、NI の面積、NI を有する神経細胞及びグリア細胞の密度を計測した。さらに、With LE 群および Without LE 群より各 1 例の前頭葉組織を用いて、抗 p62 抗体を用いた包埋後免疫電子顕微鏡法による超微形態観察を行った。また、NI を有する細胞における核内のリン酸化 Smad2/3 (pSmad2/3) の消失率と、NI の Smurf2 陽性率の定量解析を行った。

【結果】NI は概ね 90% がグリア細胞に出現し、その出現頻度は LE の有無に関連しなかった。With LE 群の NI は  $17.0 \mu\text{m}^2$  を超える大きさのものまで幅広く出現していたが、Without LE 群ではそのような NI は認められなかった。超微形態的には、With LE 群の前頭葉皮質組織において、内

部にコア様の電子密度の高い均一な部分を有する NI を、Without LE 群のそれより高頻度に認めた。さらに、pSmad2/3 の正常な核内の発現は、LE の有無に関わらず、NI を有する細胞で低下や消失していた。両群において、一部の NI は Smurf2 陽性を示し、その陽性率は皮質細胞および脳室上衣細胞のいずれにおいても、With LE 群において有意に高く、皮膚生検例の脂肪細胞でも同様であった。

【考察】NI は神経細胞よりもグリア細胞、特にアストロサイトに圧倒的に多く出現していたことは、アストロサイトが本例の病態に関与していることを支持した。また、その出現頻度が LE の有無に関連していないことから、NI 形成は直接的には細胞障害には結びついていないと考えられた。LE の有無による NI の大きさや超微形態の相違からは、病態の進行に伴い NI の構造や組成が変化する可能性が示唆された。また、正常で見られる核内の pSmad2/3 の発現が、LE の有無にかかわらず、NI を有する細胞で減少もしくは消失していることから、NI を形成している細胞において TGF- $\beta$  シグナル経路の障害が組織障害を来すより以前の段階から生じていると考えられた。一方で、Without LE 群の脳組織に比して、With LE 群のそれや、NIID 発症例の皮膚組織において、NI の Smurf2 陽性率が有意に高かったことから、その過剰発現が TGF- $\beta$  シグナル経路を抑制してアストロサイトの機能障害を引き起こし、LE の発症に関与している可能性が示唆された。また With LE 群の皮質細胞と上衣細胞、および、NIID 発症例の皮膚組織の脂肪細胞の NI における smurf2 陽性率が近似して高値を示したことから、Smurf2 の過剰発現は、部位や細胞種にかかわらず進行すると考えられた。皮膚生検組織における p62 と Smurf2 に対する抗体を用いた蛍光免疫二重染色による NI の共陽性率の測定は本疾患の診断の参考となり得る。

#### 審査結果の要旨

神経核内封入体病 (Neuronal intranuclear inclusion disease; NIID) はエオジン好性、かつ、p62 陽性の核内封入体 (Nuclear inclusion; NI) が、中枢神経系の神経細胞やグリア細胞のみならず、末梢神経や一般臓器の細胞にも広く出現することを特徴とする神経変性疾患である。本疾患の病態機序は不明であるものの、組織学的に、NI の多くはアストロサイトに出現し、病巣においてアストロサイトの形態異常やグリオシス不全が認められることから、アストロサイトの機能障害が疑われている。アストロサイトの活性化や増殖を促進する主要な増殖因子として TGF- $\beta$  が知られている。TGF- $\beta$  シグナル経路は、Smad2/3 のリン酸化と核内移行を介して伝達され、Smad ubiquitination regulatory factor-2 (Smurf2) により抑制的に調節されている。申請者はこの経路の障害がアストロサイトの機能異常を招き、本疾患の NI の形成および病態に関与していると推測し病理および生科学的分析をおこなった。

その結果、NI は概ね 90% がグリア細胞に出現し、その出現頻度は LE の有無に関連しなかった。With LE 群の NI は  $17.0\mu\text{m}^2$  を超える大きさのものまで幅広く出現していたが、Without LE 群ではそのような NI は認められなかった。超微形態的には、With LE 群の前頭葉皮質組織において、内部にコア様の電子密度の高い均一な部分を有する NI を、Without LE 群のそれより高頻度に認めた。さらに、pSmad2/3 の正常な核内の発現は、LE の有無に関わらず、NI を有する細胞で低下や消失していた。両群において、一部の NI は Smurf2 陽性を示し、その陽性率は皮質細胞および脳室上衣細胞のいずれにおいても、With LE 群において有意に高く、皮膚生検例の脂肪細胞でも同

様であった。

これらの所見は申請者の  $\text{TGF-}\beta$  経路の障害がアストロサイトの病理変化のメカニズムの一つであるという仮説を支持するものであり、今後の病態メカニズム解明と疾患に対する治療戦略の方向決定に大きな貢献をもたらすものと考えられる。このことにより、博士課程論文として妥当であると判断した。