

## 論文の内容の要旨

論文題目 進行性核上性麻痺における臨床と分子病理の統合的研究

指導教員 辻 省次教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

崎山 快夫

### 【背景】

進行性核上性麻痺(Progressive supranuclear palsy, 以下 PSP)は、1964 年 Steele-Richardson-Olszewski が臨床病理学的連関を初めて報告した成人発症の神経変性疾患で、パーキンソン症状と認知機能障害を主徴とし、非典型的なパーキンソン症候群の最も主要な疾患の一つである。神経病理学的には、脳幹、基底核、海馬、新皮質に抗タウ免疫染色陽性の神経原線維変化(Neurofibrillary tangle, 以下 NFT)、グリア原線維変化(Glial fibrillary tangle, 以下 GFT)を認める。生化学的には Sarkosyl 不溶分画のウェスタンブロットで 4 リピート(R)タウを示すバンドが認められる。遺伝的には Microtubules Associated Protein Tau (以下 MAPT)遺伝子の H1 haplotype と相関を認める。疫学的には、近年の英国の調査では、6.4 人/10 万人と報告されている。既報告では日本人は全員が H1 haplotype であるが、特定疾患研究事業での登録数は欧米の有病率と比較して著しく少なく、十分な疫学調査が存在しないのが現状である。英国や米国では患者団体主導の PSP ブレインバンクが整備されているが、臨床的に PSP あるいはパーキンソン病と診断された症例の臨床病理一致率が示されている。しかし、反対に PSP の病理を持つ症例における臨床病理一致率を示すデータは存在せず、これを示すには連続剖検例における検討が必要と思われた。

本研究は、高齢者専門総合病院における多数連続剖検例を母集団とした高齢者ブレインバンク(Brain Bank for Aging Research, 以下 BBAR)から PSP 病理を持つ症例を抽出し、その臨床症状を後方視的に検討することで、PSP の臨床的広がりを見直しを再定義することを試みた。

## 【方法】

1. PSP ブレインバンクの構築：東京都老人医療センター開院 1972 年以後の連続開頭剖検例 6909 例に対し、1994 年以前の症例については、PSP の病理診断がついている症例について、1995 年例以降は凍結臓器から抽出された DNA が保存され、臨床・神経データベースが構築されており、それらの臨床・神経病理所見について再検討を行った。免疫組織化学を含む最新の分子病理学的手法で再評価を行い、臨床病理所見を統合し、研究資源として整備した。

## 2. 神経病理学的評価

全開頭剖検例に神経病理医が立会い、臨床医からの情報や神経放射線画像をもとに脳の凍結部位を決定した。左右差が疑われる症例は、病変のより軽度な半側を凍結側とし、それ以外では左右交互に凍結側とした。表面からの肉眼的観察・写真撮影後、凍結側の大脳は 7mm 厚冠状断、脳幹は約 5mm 厚水平断、小脳は 7mm 厚矢状断の断面を作成、肉眼的観察・写真撮影後、9 箇所ルーチン部位に加え、病変部位を適宜追加し 4%パラホルムアルデヒドに 24-48 時間固定、パラフィン包埋後 6 $\mu$ m 切片を作成した。非凍結側は 20%中性緩衝ホルマリンに 7-13 日間固定後、神経内科・神経病理合同ブレインカッティングカンファランスにて、固定側の半脳も原凍結側と同様に断面を作成した。肉眼的観察・写真撮影後、米国国立神経疾患・脳卒中研究所(以下 NINDS)-PSP 神経病理診断基準、レビー小体型認知症(以下 DLB)コンセンサスガイドラインの切り出し推奨部位、老人斑・NFT の Braak Staging、CERAD のアルツハイマー病(Alzheimer Disease, 以下 AD)診断基準を包括した 26 箇所の代表的部位を切り出し、パラフィン包埋後、6 $\mu$ m 切片を作成した。

染色は、通常染色として全切片に Hematoxylin & Eosin 染色と Klüver-Barrera 染色を施行した。代表的部位に、渡銀染色である Gallyas-Braak 染色、改良 Methenamine 銀染色、Bodian 染色、Bielschowsky 染色、アミロイド沈着評価目的に Congo-Red 染色、血管の評価目的に elastica-Masson 染色を行った。免疫染色は、Ventana 20NX autostainer を用いて施行。一次抗体には、抗タウ抗体として抗リン酸化タウ抗体(AT8, PHF-1, AP422)、抗 4R タウ抗体(RD4, ET3, 抗 4R タウ抗血清)、抗 3R タウ抗体(RD3)、抗コンホメーション特異抗体(MC1)を採用、その他の老年性変化の評価に、抗アミロイド  $\beta$  抗体(12B2)、抗リン酸化  $\alpha$  シヌクレイン抗体(Psyn64)、抗ユビキチン抗体、抗 glial fibrillary acidic protein 抗体、抗 CD68 抗体、抗リン酸化ニューロフィラメント抗体(SMI31)を用いた。

神経病理診断は、NINDS-PSP 神経病理診断基準を用いて、Typical PSP, Atypical PSP, Combined PSP に分類した。Combined PSP に合併する他疾患の病理の診断基準として、AD は BBAR 診断基準、パーキンソン病・DLB は BBAR 診断基準・DLB コンセンサスガイドラインの診断基準から総合的に判断、嗜銀顆粒性認知症については Jellinger の診断基準を用いた。ユビキチン陽性封入体を伴う前頭側頭葉型変性症については後方海馬の抗ユビキチン抗体免疫染色でスクリーニングしたが合併を認めなかった。また、全例について、老人斑・NFT の Braak staging、嗜銀顆粒・レビー小体の BBAR staging を行い、それらの広がり进行评估した。

3. 臨床病歴の評価：二人以上の神経内科専門医が病歴を評価し、手段的日常生活動作、Mini-Mental State Examination、長谷川式簡易知能スケールを参考に、Clinical Dementia Rating を決定した。生前におけるパーキンソン症状、眼球運動、精神症状を抽出した。
4. DNA microarray を用いた Microtubules Associated Protein Tau (以下 *MAPT*) 遺伝子の網羅的解析：DNA が保存された症例について、東京大学医学部神経内科で設計、Affimetrix 社で作成した DNA-microarray を用いて、*MAPT* 遺伝子の全塩基配列の解析を行った。
5. NINDS 病理診断基準における評価部位について抗リン酸化タウ抗体(AT8)免疫染色を施行し、半定量的 Grading を行い、認知症の有無、小脳症状の有無で比較した。
6. タウアイソフォーム特異抗体である抗 3R タウ抗体(RD3)、抗 4R タウ抗体(RD4)、AT8 の三つの抗体を用いて、PSP で必ず病変が出現する黒質と、3R タウの混入が指摘されている嗅内野の免疫染色を行い、その結果を、他の部位に適応した。
7. 認知症の有無と FDG-PET の連関、小脳症状を来たした症例の画像病理連関を検討した。

#### 【結果】

1. PSP の病理を持つ 71 例が抽出され、高齢者ブレインバンク全体の 1%、PD/DLB の約 1/3 と頻度の高い疾患であることが示された。典型的な Typical PSP は全体の 1/3 に過ぎず、動眼神経核の病変が軽く眼球運動障害が目立たない Atypical PSP や他疾患の合併を伴う Combined PSP が残りを占めており、臨床上診断困難例が高頻度に存在することを示した。*MAPT* 遺伝子の解析では、未報告の多型が二つ見つかったが、アミノ酸置換を伴う変異ではなく、病的でない多型と考えられ、FTDP17 の症例は認めなかった。
2. PSP における認知症の責任病巣は中心前回、小脳症状では小脳歯状核・小脳白質のタウ沈着にあることを示した。
3. PSP の固有病変は 3 つの抗タウ抗体のパネルで RD4 強陽性、AT8 陽性、RD3 陰性のパターンを示し、中心前回、小脳歯状核もこのパターンを示した。
4. FDG-PET で、認知症のある PSP とない PSP では前頭葉新皮質の糖代謝が前者では低下しており、中心前回で有意差を認めた。

5. 小脳症状での初発した症例では、PSP に合致する形態機能画像的特徴(形態：中脳被蓋萎縮。機能画像：前帯状回・前頭弁蓋・中脳の糖代謝低下)を認め、さらに左右差のある上小脳脚の萎縮と左右差のある歯状核を含んだ小脳半球の糖代謝低下を認め、対応する病理を認めた。

**【考察・結論】**

連続剖検例を母集団とした PSP の病理を持つ症例をブレインバンクとして整備し、臨床診断が困難と思われる Atypical PSP, Combined PSP が高頻度に存在することを示した。

タウアイソフォーム特異抗体を用いた分子病理学的手法を用いて、PSP 固有病変の染色パターンを示し、認知症・小脳症状が PSP の固有病変によって起こることを示した。