

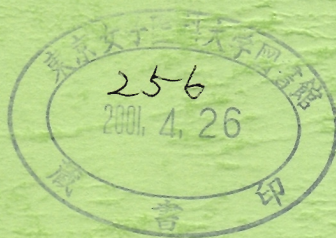
福山型先天性筋ジストロフィーにおける
アストロサイトの形態及び機能特性
に関する研究

課題番号 11670195

平成11年度～平成12年度

科学研究費補助金

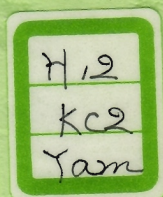
基盤研究 (C)(2) 研究成果報告書



平成 13 年 3 月

研究代表者 山本 智子

(東京女子医科大学医学部病理)



**福山型先天性筋ジストロフィーにおける
アストロサイトの形態及び機能特性
に関する研究**

(課題番号: 11670195)

平成 11 年度～平成 12 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者： 山本智子 (東京女子医科大学医学部病理)

1. 研究組織

研究代表者： 山本智子 （東京女子医科大学医学部病理学）

研究分担者： 小林槇雄 （東京女子医科大学医学部病理学）

2. 研究経費

平成 11 年度 1,200 千円

平成 12 年度 2,300 千円

計 3,500 千円

3. 研究発表

(1) 学会誌等

山本智子、柴田亮行、加藤陽一郎、金澤美穂、澤田達男、
小林槇雄. 脳発達過程における oxidative stress に関する
免疫組織科学的検討. 日本病理学会会誌 89: 338, 2000

Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Sawada T, Kobayashi
M. Oxidative stress in the brain of Fukuyama congenital
muscular dystrophy. Pathol Int 50 (suppl): A174, 2000

目次

1. 研究組織
2. 研究経費
3. 研究発表
4. 研究成果

(2) 口頭発表

山本智子、柴田亮行、加藤陽一郎、金澤美穂、澤田達男、
小林慎雄. 脳発達過程における oxidative stress に関する
免疫組織科学的検討. 第 89 回日本病理学会総会、平成 12
年 4 月 13 日

Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Sawada T, Kobayashi
M. Oxidative stress in the brain of Fukuyama congenital
muscular dystrophy. XXIII International Congress of The
International Academy of Pathology, October 16, 2000

4. 研究成果

はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は骨格筋及び中枢神経系に主病変を有する常染色体劣性の遺伝性疾患である [1, 2]。FCMD 症例の骨格筋や中枢神経系で、基底膜の形態的、免疫組織科学的な異常が観察されており、FCMD の病因として基底膜の脆弱性が考えられている[3-7]。中枢神経系においてはアストロサイトの足突起により *glia limitans* が形成され神経組織と髄膜を境界しているが、*glia limitans* 表面に基底膜が形成される。胎児 FCMD 症例の中枢神経系では *glia limitans* の部分的な欠損とその部からの神経組織の過剰遊走が認められることから、基底膜の異常に伴う *glia limitans* の欠損が小多脳回を主とする FCMD 中枢神経系病変の病因と考えられている[3-11]。中枢神経系における基底膜、*glia limitans* の形成にはアストロサイトが関与しているが、我々のこれまでの検討では、FCMD 症例のアストロサイトの未熟性を示唆する所見が得られており、FCMD 脳病変形成にアストロサイトが関与している可能性が高いと思われる [12]。

最近種々の病気の原因として酸化ストレスが話題となっているが、FCMD の未熟なアストロサイトは酸化ストレスを受けやすい可能性が考えられる。本研究においては、FCMD のアストロサイトの性

状をさらに検討するため、酸化終末産物、非酸化的経路による終末産物、活性酸素修復酵素等の状態を検討した。

材料及び方法

2 例の胎児及び 6 例の小児、成人 FCMD 剖検例の脳（前頭葉ないし頭頂葉）及び延髄のホルマリン固定、パラフィン包埋材料を用いた。3 例の胎児例を含む 9 例の非 FCMD 症例をコントロールとして用いた（表 1）。6 μm の切片を作成し、avidin-biotin complex 法を用い酸化終末産物、非酸化経路による終末産物、活性酸素の修復酵素の免疫組織化学的染色を行った。一次抗体には advanced glycation endproducts、4-hydroxynonenal、8-hydroxy deoxyguanosine、Cu/Zn superoxide dismutase、Mn superoxide dismutase、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、 α B-crystallin を使用した（表 2）。切片は 3% H_2O_2 で 10 分、正常ヤギ血清で 30 分ブロッキングを行い、洗浄後一次抗体を加え 4°C で一晩インキュベートした。二次抗体で室温、30 分、AB complex で室温、30 分反応させた後、chromogen diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) を用いて発色した。核染には hematoxylin を用いた。

染色結果は陰性、弱陽性、陽性の 3 種類に分類し、陽性細胞に関しては、神経細胞は 500 個以上、グリア細胞は 1000 個以上の細胞を数え、その割合を算定した。脳においては皮質 2-6 層の神経

細胞及び皮質下白質のグリア細胞を、延髄においては神経細胞、グリア細胞ともに被蓋、オリブ核の平均を算定した。

結果

結果は図 1、表 3、4 に示すとおりである。

胎児例及び 6 才の症例では 大脳、延髄ともに FCMD 症例とコントロール症例の間に明らかな差異は認められなかった。14-27 才の小児、成人 FCMD 症例では、大脳のアストロサイトにおいて、酸化終末産物である advanced glycation endproducts が、コントロール症例ではほとんど染色されないのに対して、核、細胞質に弱陽性に染色される傾向が認められた。その他の酸化終末産物である 4-hydroxynonenal、8-hydroxy deoxyguanosine や非酸化経路による終末産物の pyrraline、methylglyoxal に関しては大きな差異は認められなかった。活性酸素の修復酵素に関しては、Mn superoxide dismutase 陽性細胞が FCMD 症例で大脳、延髄ともにより多く観察される傾向が認められた。

考察

Advanced glycation endproducts は蛋白の glycosylation のみでなく、炭水化物や脂質の酸化によっても形成され、細胞質や核、細胞外基

質に蓄積する [13-15]。 4-hydroxy-2-nonenal は脂質過酸化のよいマーカーであり、通常細胞質が染色される [16]。 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine は酸化ストレスによる核やミトコンドリアの DNA 損傷により形成され、免疫染色では核ないし細胞質が染色される [17]。これに対し pyrraline や methylglyoxal は非酸化的経路により形成される終末産物といわれている [13]。酸化ストレスにより形成され、酸化終末産物の形成にかかわる free radical 等は Cu/Zn superoxide dismutase、Mn superoxide dismutase 等の修復酵素で除去されることが知られている [13,18,19]。

今回の検討においては、非酸化経路による終末産物にはコントロール症例との差異がみられず、弱いながら酸化終末産物のひとつ advanced glycation endproducts に陽性所見が得られた。FCMD のアストロサイトが酸化ストレスに対して感受性が高まっていることによる可能性が考えられる。小児、成人例で advanced glycation endproducts の蓄積がみられたことは、おそらく加齢とともに酸化ストレスにさらされる期間が長くなることや、酸化終末産物の代謝が不十分になっているためと思われる。Mn superoxide dismutase 陽性細胞の増加はおそらく酸化ストレスに対する二次的なものと考えられる。小児、成人例の FCMD では修復酵素の増加にも関わらず、アストロサイトの advanced glycation endproducts の蓄積を完全には阻止できない状態であると思われる。

上記所見は FCMD におけるアストロサイトの未熟性を支持する

とともに、FCMD 脳病変の形成にアストロサイトが深く関わっている可能性を支持するものと考えられる。最近、今回検索した以外にも種々の酸化終末産物が報告されており、今後それらの検討を行うことも興味深い。また、Western blot hybridization 等の定量的解析には現在のところ十分量の凍結材料が得られておらず、今後の症例の蓄積をまって検討を進めていく予定である。

References

1. Fukuyama Y, Osawa M, Suzuki H: Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type. Clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev* 1981, 3:1-29
2. Kamoshita S, Konishi Y, Segawa M, Fukuyama Y: Congenital muscular dystrophy as a disease of the central nervous system. *Arch Neurol* 1976, 33:513-516
3. Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, Goto K, Koga R, Nonaka I, Sugita H, Arahata K: Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. *J Neurol Sci* 1993, 119:53-64
4. Matsumura K, Campbell KP: Dystrophin-glycoprotein complex: Its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 1994, 17:2-15
5. Ishii H, Hayashi YK, Nonaka I, Arahata K: Electron microscopic examination of basal lamina in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1997, 7:191-197
6. Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M, Komori T, Ikeya K, Kondo E, Saito K, Osawa M: Localization of laminin subunits in the central nervous system in Fukuyama congenital muscular dystrophy: an immunohistochemical investigation. *Acta Neuropathol* 1997, 94:173-179
7. Yamamoto T, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M, Komori T, Kondo E, Saito K, Osawa M: Early ultrastructural changes in the central nervous system

- in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Ultrastruct Pathol* 1997, 21:355-360
8. Takada K: Fukuyama congenital muscular dystrophy as a unique disorder of neuronal migration: A neuropathological review and hypothesis. *Yonago Acta Med* 1988, 31:1-16
 9. Nakano I, Funahashi M, Takada K, Toda T: Are breaches in the glia limitans the primary cause of the micropolygyria in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD)? -Pathological study of the cerebral cortex of an FCMD fetus. *Acta Neuropathol* 1996, 91:313-321
 10. Yamamoto T, Komori T, Shibata N, Kobayashi M, Kondo E, Saito K, Osawa M, Toda T: Fukuyama congenital muscular dystrophy: cortical dysplasia of the cerebrum in a 20 week fetus. *Neuropathology* 1996, 16:184-189
 11. Yamamoto T, Toyoda C, Kobayashi M, Kondo E, Saito K, Osawa M: Pial-glial barrier abnormalities in fetuses with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 1997, 19:35-42
 12. Yamamoto T, Armstrong D, Shibata N, Kanazawa M, Kobayashi M: Immature astrocytes in Fukuyama congenital muscular dystrophy: An immunohistochemical study. *Pediatr Neurol* 1999, 20:31-37
 13. Shibata N, Hirano A, Kobayashi M. Amyotrophic lateral sclerosis: Proein aggregation and posttranslational protein modification. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Diseases* 2000; 1:143-161.
 14. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathologic effects of advanced

- glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994; 70: 138-151.
15. Ling X, Sakashita N, Takeya M, Nagai R, Horiuchi S, Takahashi K. Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structures of advanced glycation end products in human tissues. *Lab Invest* 1998; 78: 1591-1606.
16. Ohhira M, Ohtake T, Matsumoto A, Saito H, Ikuta K, Fujimoto Y, Ono M, Toyokuni S, Kohgo Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal-modified-protein adducts in human alcoholic liver disease. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1998; 22: 145S-149S.
17. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol* 1999; 154: 1423-1429.
18. Liu X-H, Kato H, Nakata N, Kogure K, Kato K. An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in rat hippocampus after transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1993; 625: 29-37.
19. Zhang P, Anglade P, Hirsch EC, Javoy-Agid F, Agid Y. Distribution of manganese-dependent superoxide dismutase in the human brain. *Neurosci* 1994; 61: 317-330.

表 1 症例の概略

No	Age	Sex	PM time (hr:min)	Weight (g)	Diseases
1	18 gw	M	4:13	29.5	FCMD
2	20 gw	F	0:40	41.6	FCMD
3	6 yr	F	20:00	1396	FCMD
4	14 yr	M	3:30	1336	FCMD
5	14 yr	F	8:40	1260	FCMD
6	15 yr	F	1:33	1230	FCMD
7	17 yr	F	5:29	1340	FCMD
8	27 yr	M	1:32	1311	FCMD
9	22 gw	F	unknown	56.0	Cardiopulmonary hypoplasia
10	23 gw	F	1:40	79.0	Congenital pulmonary cyst
11	23 gw	M	37:02	77.0	CCAM of the lung
12	6 yr	M	1:46	1370	Ventricular septal defect
13	13 yr	F	9:02	1464	Ovarian tumor
14	17 yr	F	14:50	1420	Systemic lupus erythematosus
15	29 yr	M	1:37	1418	VAHS
16	31 yr	F	7:04	1415	Marfan syndrome
17	41 yr	M	1:30	1570	Abdominal aortic aneurysm

PM time=post-mortem time, gw=gestational week, yr=year-old

FCMD=Fukuyama congenital muscular dystrophy, CCAM=congenital cystic adenomatoid malformation, VAHS=virus-associated hemophagocytic syndrome

表 2 免疫染色に使用した一次抗体

Primary antibodies	Dilution	Source
glial fibrillary acidic protein	1:1000	DAKO
α B-crystallin	1:2000	Boehringer-Mannheim
advanced glycation end products (6D12)	1:1500	Panapharm Laboratories
4-hydroxynonenal	1:100	Nippon Oil Forces
8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	1:100	Panapharm Laboratories
pyrralin	1:1000	from Dr. Horiuchi*
methylglyoxal	1:200	Nippon Oil Forces
Cu/Zn superoxide dismutase	1:5000	from Dr. Asayama**
Mn superoxide dismutase	1:5000	from Dr. Asayama**

*Department of Biochemistry, Kumamoto University.

**Department of Pediatrics, Yamanashi Medical College

表3 大脳における免疫染色の結果

	AGE (%)	4-HNE (%)	8-OHdG (%)	PY (%)	MG (%)	Cu/Zn SOD (%)	Mn SOD (%)
Fetal cases	-	n	-	---+	-	+	---+
	FCMD						
	-	n	-	---+	-	+	---+
	Control						
Child and adult cases	+	-	5.9 (0-27.6)	---+	-	11.9 (0-56.6)*	36.4 (15.8-49.5)
(14-27 yr)	-	-	7.8 (0-33.1)	---+	-	1.6 (0-8.0)	17.3 (0-35.4)
	Control						

AGE=advanced glycation endproducts, 4-HNE= 4-hydroxynonenal, 8-OHdG= 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine,

PY=pyrralin, MG=methylglyoxal, SOD=superoxide dismutase

Glial cells in the white matter were counted.

yr=year-old, -=negative, +=weakly positive, n=predominant nuclear staining

*Only one case (case 4) showed 56.6% of positive cells and less than 3.1% of cells were positive in other cases.

表 4 延髄における免疫染色の結果

	AGE (%)	4-HNE (%)	8-OHdG (%)	PY (%)	MG (%)	Cu/Zn SOD (%)	Mn SOD (%)
Fetal cases	-	n	-	---+	-	+	+
	-	n	-	---+	-	+	+
Child and adult cases	-	-	0.4 (0-1.1)	---+	-	+	20.7 (1.7-37.5)
(14-27 yr)	-	-	1.6 (0-5.7)	---+	-	+	7.1 (2.5-14.0)

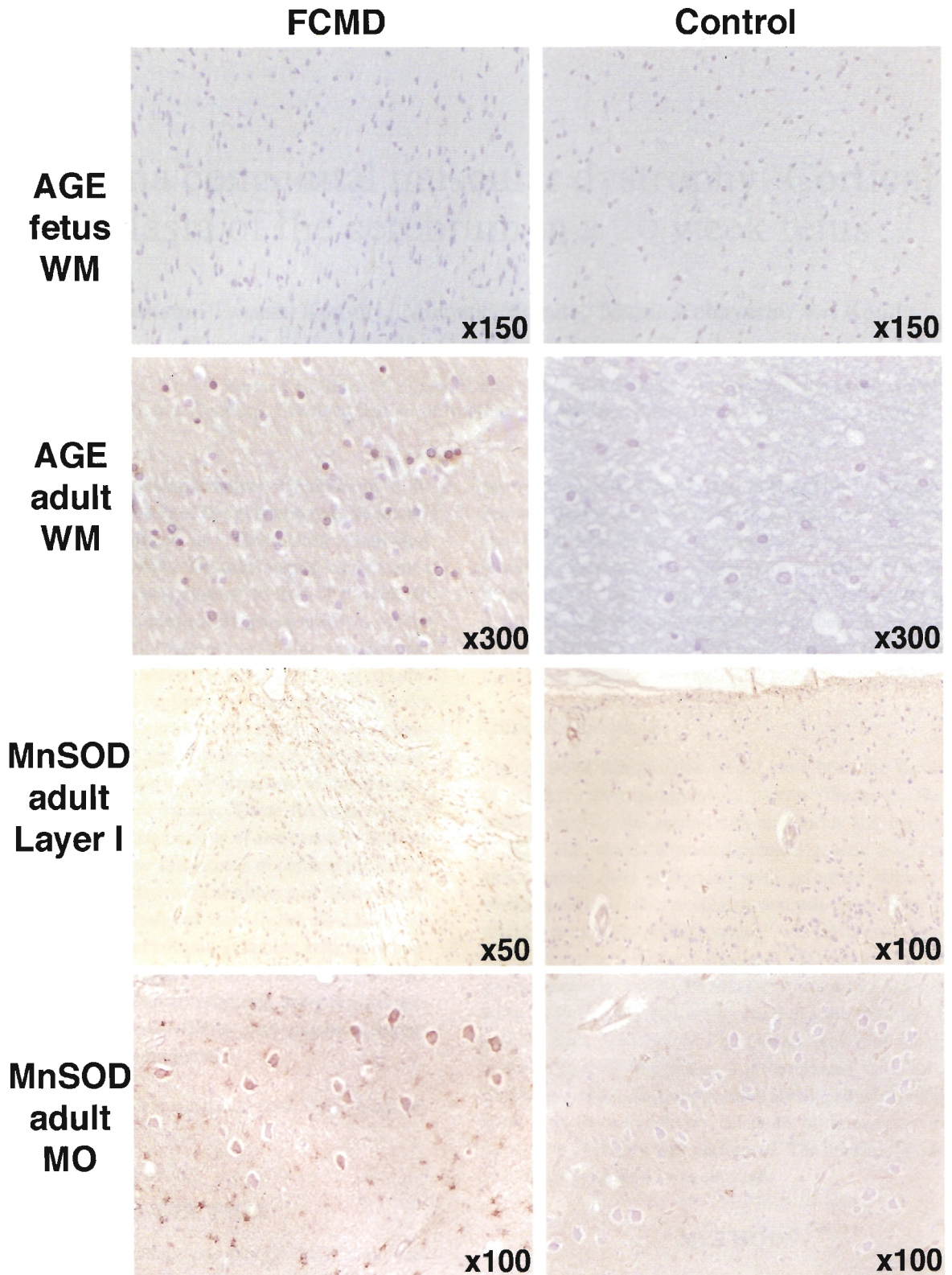
AGE=advanced glycation endproducts, 4-HNE= 4-hydroxynonenal, 8-OHdG= 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine,

PY=pyrralin, MG=methylglyoxal, SOD=superoxide dismutase

Average of positive cells in the tegmentum and oliary nuclei was calculated.

yr=year-old, -=negative, +=weakly positive, n=predominant nuclear staining

図1 免疫染色の結果



FCMD=Fukuyama congenital muscular dystrophy
AGE=advanced glycation endproducts
SOD=superoxide dismutase
WM=cerebral white matter, MO=medulla oblongata