

学 位 論 文 題 名

伴性劣性球脊髄性筋萎縮症におけるアンドロゲン
受容体発現と神経病変選択性の研究

学位論文内容の要旨

伴性劣性球脊髄性筋萎縮症 (X-linked spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA) は伴性劣性遺伝形式を呈し、成人期に発症する運動ニューロン疾患である。臨床的には四肢の筋萎縮、筋力低下、球症状などで発症し緩徐進行性を示し、手指振戦、有痛性筋痙攣、感覚神経障害などの神経症状や性腺機能障害など多彩な随伴徴候を伴う。病的には脊髄・脳幹部の脊髄前角細胞や舌下神経核、疑核、顔面神経核などが選択的に障害される。

本症の遺伝形式と性腺機能障害や女性化乳房などを高率に合併すること、アンドロゲン受容体 (androgen receptor; AR) がX染色体にコードされていることから、その原因はARの異常ではないかと想定されていた。アンドロゲンは、運動ニューロンの生長、発達や再生に関与していると考えられており、AR異常が内分泌症状だけでなく、運動ニューロンの変性を生じる可能性がある。1991年、Fischbeckらは、AR遺伝子の第1エクソン内のCAGリピート数が本症で特異的に延長していることを明らかにした。この遺伝子異常がどのような機序で本症の病態を発現してくるのかは、現在のところ未だ明らかになっていない。本研究においてはSBMAの発症機構・病変選択性を考えるため、中枢神経組織における（特に病変の主座となる脊髄、脳幹）ARの存在・分布を明らかにし、SBMA患者のAR発現を観察検討した。

まず第1にAR異常と下位運動ニューロン変性の関連を明らかにするために、脊髄におけるARの局在を検討し、AR蛋白の同定を試みた。生後3ヵ月のラットを還流固定後、同脊髄の凍結切片を作成した。抗ARモノクローナル抗体を用いたABC法による免疫組織染色を行なった。また、ラット脊髄を細切懸濁後、超遠心分離し上清を得て、ウエスタンブロットを施行した。代表的なアンドロゲン依存組織である前立腺を比較対照とし、組織特異性を検討した。

脊髄神経細胞の多くはAR陽性を示し、特に大型の前角細胞で強いAR発現を認めた。ARの局在は核優位にARが発現される細胞、細胞質優位に発現される細胞、核・細胞質共に陽性の細胞が存在した。ウエスタンブロットでは対照とした前立腺組織が95kD、41kDの2本のバンドを示したのに対し、脊髄では41kDのみしか認めなかった。これらの所見に関して性差はみられなかった。つまり、脊髄神経細胞のARの存在が免疫組織学的に初めて同定され、特に運動神経細胞に豊富に発現すると考えられた。SBMAにおけるAR遺伝子異常と下位運動ニューロン変性の密接な関連が明かされ、神経組織のAR蛋

白は組織特異的に発現している可能性も示唆された。

次にラットの各組織（前立腺，脊髄，大脳，小脳）からmRNAを抽出し，AR cDNAのNru I-Hind III fragmentをプローブとしてノーザンブロット分析した．10kbのAR-mRNAが前立腺，脊髄のみでなくSBMAでは侵されない大脳，小脳にも存在することが明らかになった．

そこで中枢神経組織の各神経細胞のAR発現を詳細に検討するため，ヒト正常対照剖検4例のパラフィン標本を用い，脱パラ後，抗ARモノクローナル抗体を用いたABC法による免疫組織染色を施行した．また臨床病理学的にSBMAと診断された2例の剖検例を同様に比較解析し，SBMAのAR遺伝子変異がAR蛋白の発現に与える影響を検討した．

ARは正常中枢神経細胞に広く分布し，脊髄前角細胞に最も強い発現を認めた．脳幹の疑核，舌下神経核も含め，SBMAに強い病変が存在する部位はAR発現が強かった．外眼筋を支配するIII，IV，VI核，小脳歯状核，脊髄の後角，Clarke核，中間質外側核，仙髄のOnufrowicz核等のSBMAで侵されにくい細胞にも十分にARは存在した．一方SBMA例では，正常組織とAR発現分布は変わらず，変性が著しい萎縮性の残存運動神経細胞もAR陽性であり，むしろ正常より強く染色される傾向にあった．これらの事から1) SBMAにおける神経病変局在分布はAR発現パターンで説明できない，2) SBMA遺伝子変異であるARのCAG repeatの増大は神経組織におけるAR蛋白の発現に大きな影響を及ぼさないことが証明された．

AR遺伝子変異がSBMAに特異的であり，その原因である事は間違いない事実であるが，その発症機構，病変選択性は依然明確でない．今後は変異ARの標的遺伝子転写活性に及ぼす影響，並びに脊髄前角細胞を代表とする標的細胞のアンドロゲンを介した生物学的特異性を明らかにしていく事がSBMAの発症機構，病変選択性の理解に重要であると思われる．

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 代 邦 雄

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 小 柳 知 彦

学 位 論 文 題 名

伴性劣性球脊髄性筋萎縮症におけるアンドロゲン 受容体発現と神経病変選択性の研究

伴性劣性球脊髄性筋萎縮症 (X-linked spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA) は男性成人発症の運動ニューロン疾患である。臨床的に四肢の筋萎縮、筋力低下、球症状などで緩徐進行性に発症し、特徴的な性腺機能障害を伴う。病的には脊髄・脳幹の脊髄前角細胞や舌下神経核、疑核、顔面神経核などが選択的に障害される。本症のアンドロゲン受容体 (androgen receptor; AR) 遺伝子第1エクソン内のCAGリピート数が特異的に延長していることが明らかになったが、この遺伝子異常がどのような機序で本症の病態を発現してくるのか不明である。本研究はSBMAの発症機構・病変選択性を考えるため、中枢神経組織におけるARの存在・分布を明らかにし、SBMA患者のAR発現を観察検討した。なお、申請者は既に、SBMAの男性性腺機能障害に着目し、AR発現をその陰囊皮膚で検討し報告している。まず、ラット脊髄におけるARの局在を検討し、AR蛋白の同定を試みた。ラットを還流固定後、同脊髄の凍結切片を作成し、抗ARモノクローナル抗体を用いたABC法による免疫組織染色を行なった。脊髄を細切懸濁後、超遠心分離し上清を得て、ウエスタンブロットを施行した。代表的なアンドロゲン依存組織である前立腺を比較対照とした。脊髄神経細胞の多くはAR陽性を示し、特に大型の前角細胞で強いAR発現を認めた。ARの局在は核優位にARを発現する細胞、細胞質優位に発現する細胞、核・細胞質共に陽性の細胞が存在した。ウエスタン法では対照とした前立腺組織が95kD、41kDの2本のバンドを示したのに対し、脊髄では41kDのみしか認めなかった。これらの所見に性差はみられなかった。本研究により、脊髄神経細胞のARの存在が初めて同定され、特に運動神経細胞に豊富に発現すると考えられた。SBMAにおけるAR遺伝子異常と運動ニューロン変性の密接な関連が示され、神経組織がAR蛋白を組織特異的に発現している可能性も示唆された。次にラットの前立腺、脊髄、大脳、小脳からmRNAを抽出し、AR cDNAのNru I-Hind III fragmentをプローブとしてノーザンブロット分析した。10kbのAR-mRNAが前立腺、脊髄のみでなくSBMAでは侵されない大脳、小脳にも存在した。そこで、中枢神経組織の各神経細胞のAR発現を検討するため、ヒト正常対照剖検4例のバラフィン標本を脱バラ後、抗ARモノクローナル抗体を用いたABC法による免疫組織染色を施行した。また臨床病理学的にSBMAと診断された2例の剖検例を比較解析し、AR遺伝子変異がAR蛋白発現に与える影響を検討した。ARは正常中枢神経細胞に広く分布し、脊髄前角細胞に最も強い発現を認めた。脳幹の疑核、舌下神経核等のSBMAに強い病変が存在する部位はAR

発現が強かったが、外眼筋支配核、仙髄のOnuf核等のSBMAで侵されにくい細胞にも十分にARは存在した。一方SBMA例では、正常組織とAR発現分布は変わらず、萎縮性の残存運動神経細胞もAR陽性であった。これらの事から1) SBMAにおける神経病変局在分布はAR発現パターンで説明できない、2) SBMA遺伝子変異であるARのCAGリピートの増大は神経組織AR蛋白の発現に大きな影響を及ぼさないことが証明された。

口頭発表にあたり、リハビリテーション医学の眞野教授より、SBMAの治療として男性ホルモン投与の可能性、血清CK値上昇の機序、CAGリピートの増大の程度と神経徴候の関係、組織間のCAGリピートの差について、次に、泌尿器科の小柳教授よりは、本疾患での性腺機能障害に着目し、本研究の基礎となった陰嚢皮膚を用いたAR発現の検討は、初めての試みであると高い評価を受けると共に、神経系のARとアンドロゲン結合能、女性化徴候出現のメカニズムについての質問があった。最後に、第2病理の長嶋教授からは、ラットとヒトのARの相同性、抗ARモノクローナル抗体の特異性や認識部位について質問があった。また、AR発現量の検討における免疫組織染色法の限界についてのコメントと論文記載上の指示を頂いた。申請者は、これらの質疑に対して、自験データや過去の研究等を引用し、おおむね妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学における医学の研鑽や研究歴、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。